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 :

Azzouzi Asmaa

Rahmi Dilmi

Thème :

Application des méthodes : enzymatique et Fenton dans l'élimination d'un colorant

Soutenue publiquement le : 20/06 /2018, Devant le jury composé de :

Mme. Zouambie. Y	MCA	UYFM	Président
Mr. Kerchich.Y	MCA	UYFM	Examinateur
Mr. Bitam.S	MAA	UYFM	Examinateur
Mme. Boucherit .N	MCB	UYFM	Encadreur

Année universitaire 2017/2018

الملخص:

يشمل هذا العمل دراسة التخلص من أزرق الميثيلين بواسطة بروكسيداز اللفت وطريقة فنتون، باستخدام طريقة تاجوشي.
في الجزء الأول : فإن إزالة محلول أزرق المثيلين في وسط درجة حموضته 7 ، بواسطة إنزيم البروكسيداز إلى حد أقصى من تغيير اللون الناتج كان مردود إزالة اللون المتحصل عليه ٪ 86.92 تحت تأثير عوامل عدة للتراكيز 1.5 مغ/لتر من الركيزة ، 8ميلي مول من بيروكسيد الهيدروجين والنشاط الأنزيمي من 26.34 وحدة دولية/ مل.
في الجزء الثاني من هذا العمل أظهر العلاج بالفنتون أقصى تغير في اللون بنسبة ٪ 96.93 في وسط درجة حموضته 3 ، لتركيزات أزرق المثيلين ، بيرو كسيد الهيدروجين والأيونات الحديدية : 20 مغ/ لتر و 14 ميلي مول و 4 ميلي مول على التوالي .
أظهرت نتائج اللون المحسوبة مع النماذج المعدة لكلا العلاجين تفاوتا مع القيم المقاسة .
أظهرت المنتجات المختلفة التي تم الحصول عليها ، والتي تتميز بالأشعة فوق البنفسجية المرئية الطيفية و الأشعة تحت الحمراء ، تحويل جزيء أزرق المثيلين من خلال كلتا الطريقتين.

الكلمات المفتاحية : أزرق المثيلين ، إزالة اللون ، فنتون ، بيروكسيداز، تاجوشي.

Résumé

Ce travail consiste à étudier l'élimination du bleu de méthylène par la peroxydase de navet et la méthode Fenton, en utilisant la méthode TAGUCHI.

Dans la première partie, la décoloration des solutions du bleu de méthylène au milieu de son acidité 7, avec la peroxydase conduit à un rendement de décoloration de 86.92% pour les concentrations de 1.5 mg/l de substrat, 8mM de peroxyde d'hydrogène et d'activité enzymatique de 26.34 UI/ml.

Dans la deuxième partie de ce travail, le traitement Fenton a montré un maximum de décoloration de 96.63% au milieu de son acidité 3, pour les concentrations de bleu de méthylène, de peroxyde d'hydrogène et des ions ferriques: 20mg/l, 14mM et 4mM respectivement.

Les rendements de décoloration calculés avec les modèles établis pour les deux traitements, ont montré un faible écart avec les valeurs mesurées.

Les différents produits obtenus caractérisés par spectroscopie UV-Visible et IR, ont montré la transformation de la molécule du bleu de méthylène par les deux voies.

Mots clés: bleu de méthylène, décoloration, Fenton, peroxydase, TAGUCHI.

Abstract

This work consists of studying the elimination of methylene blue by peroxidase and the turnip Fenton method, using the TAGUCHI method.

In the first part, decolourisation of the methylene blue solutions is removed in the middle of its acidity 7, with peroxidase efficiency of decolourisation of 86.92 % for the concentration of 1.5 mg/l substrate, 8 mM of hydrogen peroxide and of enzymatic activity of 26.34IU/ml.

In the second part of this work, the Fenton treatment showed a maximum of decolourisation 96.93 % in the center of pH 3, for concentrations of methylene blue, hydrogen peroxide and ferric ions: 20mg/l, and 4 mM respectively.

The decolourisation yields calculated with the models established for the two treatments showed a small difference with the measured values.

The various products obtained, characterized by UV- Visible spectroscopy and IR, showed the transformation of the methylne blue molecule by both routes.

Key words: methylene blue, decolourisation, Fenton, peroxidase, TAGUCHI.

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout Puissant qui nous a donnée la force de mener à terme ce travail.

Merci à toute nos familles et surtout nos parents, merci à tous qui nous' aidons sans exception.

Nous tenons à remercier vivement notre encadreur Mme. Boucherit. N, pour avoir consacré une partie de son temps et pour accepté de nos encadrer et pour leur patience.

.

Nos profonds remerciements à tous les professeurs du Département de Science de la Matière de la Faculté des Sciences.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du Jury qui a accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements vont également à tous nos collègues de la promotion et nos amies pour leur sympathie et les bons moments qu'on a passés ensemble.

.

Sommaire

Liste des abréviations et nomenclatures
Liste des figures
Liste des tableaux
Introduction générale……..……..…….1
Chapitre I : Enzymes, peroxydases
I.1. Introduction……..…….…….……...3
I.2. Généralités sur les enzymes……..…….....3
I.3. Cinétique enzymatique……..……..…….....4
I.3.1. Modèle de Michaelis –Menten……..…….…….5
I.4. Facteurs influençant sur la cinétique enzymatique ……...…….....8
I.4.1. Influence du pH……..……8
I.4.2. Influence de la température.....9
I.4.3. Influence de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale…….…....9
I.4.4. Unités d'activité enzymatique.....9
I.5. Peroxydases..... 10
I.5.1. Définition..... 10
I.5.2. Structure.....10
I.5.3. Classe de peroxydase……..11
I.5.4. Fonction des peroxydases……..…….11
I.5.5. Cycle catalytique……....12
I.5.6. Applications industrielles des peroxydases……...….12
I.6. Conclusion……...……..14
Chapitre II : Pollution et Colorants
II.1. Pollution……..……15

Sommaire

II.1.1. Définition de pollution…… 15
II.1.2. Type de pollution…….....15
II.1.3. Paramètre de mesure de la pollution…….……..….17
II.2. Colorants…….....17
II.2.2. Définition et structure ……17
II.2.2. Classification……19
II.2.3. Utilisation des colorants……...23
II.3. Méthodes de traitement des colorants……...…….....23
II.3.1. Méthodes physique……...…….……...23
II.3.2. Méthodes chimique, Oxydation avancée……...……..…….……....24
II.3.3. Méthodes biologiques……...……...……...……..…..26
II.3.4. Méthodes enzymatiques.…….....26
II.4. Conclusion…….…..27
Chapitre III : Matériel et méthodes
III.1. Introduction…….. 29
III.2. Matériel utilisé ……...……..…..29
III.2.1. Equipements……...…….…….....29
III.2.2. Réactifs chimiques…….....29
III.3. Bleu de méthylène……..…...30
III.3.1. Définition……...……..……...30
III.3.2. Propriétés physiques et chimiques……..…….....31
III.3.3. Utilisations de bleu de méthylène……..…….....31
III.4. Méthodes…….……... 31
III.4.1. Préparation des solutions tampon de pH2 à pH 10……...…..31
III.4.2. Spectrophotométrie UV-Visible…….31
III.4.3. Spectrométrie Infra-rouge…….…….32
III.5. Extraction et purification de la peroxydase de navet…….…….....32

Sommaire

III.5.1. Préparation de l'extrait brut ……..... 32
III.5.2. Purification partielle de l'extrait enzymatique brut……..…....33
III.5.3. Dosage de l'activité enzymatique…….....33
III.6. Préparation et étalonnage de BM……...…….…….. 35
III.7. Etude de la décoloration de bleu de méthylène par la peroxydase de navet……..... 35
III.7.1. Effet de pH……...… 36
III.7.2. Effet du temps de contact……....…. 36
III.8. Modélisation du rendement de décoloration du BM par la peroxydas en utilisant la méthode de TAGUCHI…….……..... 37
III.8.1. Calcul des effets moyens……..…….……..... 37
III.8.3. Calcul de la réponse théorique……...38
III.8.4. Modèle matriciel selon la méthode TAGUCHI…….….... 38
III.8.5.Choix des niveaux……...…….... 38
III.8.6. Expression de modèle……..……..…..... 40
III.8.7. Modélisation entre les niveaux des paramètres par interpolation…….... 40
III.9. Etude de décoloration de Bleu de méthylène par la méthode de Fenton…….... 41
III.9.1. Effet de pH……..... 42
III.9.2. Effet du temps de contact……..…..… 42
III.10. Modélisation du rendement de décoloration du BM par la méthode de Fenton en utilisant méthode TAGUCHI…….……....… 42
III.11. Caractérisation des produits de transformation du BM issus des traitements enzymatique et Fenton……...….. 44
III.11.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis…….….. 44
III.11.2. Caractérisation par spectrométrie FTIR…….……..….. 44
III.12. Mesure de la demande chimique en oxygène……..…..... 44
III.13. Etude de la phytotoxicité…….…. 45

Sommaire

Chapitre IV. Résultats et discussion
IV.1. Détermination de l'activité enzymatique de l'EEPP de navet……..…..... 47
IV.2. Caractérisation spectrale du BM…….…… 47
IV.3. Etude de décoloration du Bleu de méthylène par la peroxydase de navet…….…..... 48
IV.3.1. Effet du pH…….... 48
IV.3.2. Effet du temps de contact……..... 49
IV.3.3. Résultats d'optimisation de décoloration du BM par la peroxydase de navet en utilisant la méthode de TAGUCHI…….. 50
IV.4. Etude de décoloration du Bleu de méthylène par la méthode de Fenton……..... 58
IV.4.1. Effet du pH…….…...….. 58
IV.4.2. Effet du temps de contact…….……..... 58
IV.4.3. Résultats d'optimisation de décoloration du BM par la méthode Fenton en utilisant la méthode de TAGUCHI……. 60
IV.5. Expression des modèles matriciels pour les traitements enzymatique et chimique du BM……... 68
IV.6.Validation du modèle établi…….. 68
IV.7. Caractérisation des produits de transformation du bleu de méthylène issus des traitements enzymatique et Fenton…….……..... 69
IV.7.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis……..….. 69
IV.7.2. Caractérisation par spectrométrie FTIR…….....…...72
IV.8. Résultats de la DCO ……...…75
IV.8. Résultats de la phytotoxicité ……....76
Conclusion générale……..... 79
Références bibliographiques
Annexes

Sommaire

Listes des abréviations et nomenclatures

	Significations	**Unités**
$[E]_0$	Concentration d'enzyme initial	mg/l
$[S]_O$	Concentration du substrat initial	mg/l
A	Absorbance	
AE	Activité Enzymatique	UI/ ml
BGP	Blomet Grands Pres	
BM	Bleu de Méthylène	
DBO_5	Demande Biochimique en Oxygène5	mg/l
DCO	Demande Chimique en Oxygène	mg/l
DO	Densité Optique	
E	Effet moyens des paramètres	
EC	European Community	
EEB	Extrait Enzymatique Brut	
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifier	
ES	Complexe Enzyme-Substrat	
HRP	Horse Radish Peroxidase	
I	Intensité de la lumière transmise	A
I_0	Intensité initiale de la lumière traversée	A
IN	Interactions entre des paramètres	
IRTF	Infra Rouge à Transformé de Fourrier	
IG	Indice de Germination	%
K_1,K_2,K-1	Constantes de vitesses	
K_m	Constante de mickaelis	
Kda	Kilo dalton	
L	Epaisseur de la cuve	cm
LRR	Longueur Relative des Racines	%
M	Masse molaire	mol/l
M	Moyens	%
P	Produit	
pH	potentiel d'hydrogène	
PG	Pourcentage de Germination	%
R	Rendements	%
T	Température	°C
t	temps	minutes
USA	United States of America	
U.I	Unité Internationale	
UV	Ultra -Violet	
v	Vitesse de réaction	mg/l.min
v_0	Vitesse initiale de la réaction	mg /l.(min)
v_{max}	Vitesse maximale de la réaction enzymatique	mg /l.(min)
WRF	White Rot Fungi	
λ	Longueur d'onde de la radiation	nm
λ_{max}	longueur d'onde de la radiation correspond à l'absorption maximale	nm
ε	Coefficient d'extinction molaire	l/(mol.cm)

Listes des abréviations et nomenclatures

ψ	Fenton	
δ	Sigma	l/mg

Listes des abréviations et nomenclatures

Listes des figures

Figure I.1. Modèle de clé –serrure proposée par Emil –FICHER ……..…….... 4

Figure I.2. Variation de la vitesse initiale V_0en fonction de la concentration en substrat [S] pour une cinétique de type Michaelis-Menten……..... 6

Figure I.3. Représentation graphique de la linéarisation de Michaelis –Menten :(a) : Eadie – Hosftee, (b) : lineweaver-Burk…….. 7

Figure I.4. Structure de la peroxydase de HRP……..…….....…. 10

Figure I.5. Structure de Ferriproto-porphyrine IX des peroxydases ……..…….....10

Figure I.6. Cycle catalytique de la peroxydase……...…….…...11

Figure II.1. Association des groupements chromophores aux systèmes conjugués……...…17

Figure II.2. Structure d'un colorant anthraquinonique, la purpurine ……..... 18

Figure II.3. Structure moléculaire de l'indigo……..……...…18

Figure II.4. Structure moléculaire d'un colorant xanthène……..…..... 19

Figure II.5. Structure moléculaire d'un noyau thiazine ……..…...19

Figure II.6. Structure moléculaire du bleu de méthylène……...……..…...19

Figure II.7. Structure moléculaire d'un colorant nitrosé……..……..……...….. 20

Figure II.8. Caractérisation du radical OH*……...……..... 24

Figure II.9. Procédés d'oxydation producteurs des radicaux hydroxyles OH*……...24

Figure III.1. Structure chimique du Bleu de méthylène….…….…...…. 28

Figure III.2. Spectrophotomètre UV-Vis…….……...…… 29

Figure III.3. Protocole expérimental d'extraction de la peroxydase de navet…… 31

Figure III.4. Protocole expérimental de purification de la peroxydase de navet…..…….…. 32

Figure III.5. Produits colorés de l'expérience N°02……33

Figure III.6. Mélange réactionnels utilisés dans le traitement enzymatique…….……..… 34

Figure III.7. photos de rotavapeur(1L)……..…. 43

Figure IV.1. Courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène, ε =4677.41 l/mol.cm…….. 45

Listes des figures

Figure IV.2. Courbe de balayage de BM (20mg/l)……..……....46

Figure IV.3. Courbe d'étalonnage de BM……..……..…46

Figure IV.4. Variation du rendement de décoloration du BM en fonction du pH(à T=20°C ; AE=8.78UI/ml ; C_{BM}=10mg/l ; C_{H2O2}=8 mM)……..…47

Figure IV.5. Effet de temps sur la transformation du BM (pH7, T=20°C, C_{H2O2}=8Mm, C_{BM}=10 mg/l)…….....…….……..... 48

Figure IV.6. Effet moyen de la concentration de BM sur le RDT par la peroxydase de navet……. 50

Figure IV.7. Effet moyen de la concentration de H_2O_2 sur le RDT par la peroxydase de navet……. 51

Figure IV.8. Effet moyen de l'AE sur le RDT par la peroxydase de navet…… 51

Figure IV.9. Interaction entre la concentration du BM et de H_2O_2 pour la décoloration enzymatique du BM……..… 53

Figure IV.10. Interaction entre la concentration du BM et l'activité enzymatique pour la décoloration enzymatique du BM…….53

Figure IV.11. Interaction entre la concentration de H_2O_2 et l'activité enzymatique pour la décoloration enzymatique du BM……..…54

Figure IV.12. Représentation graphique des rendements de décoloration enzymatique mesurés et théoriques……....56

Figure IV.13. Variation du rendement de décoloration du BM en fonction du pH (à T=20°C ; Fe^{2+}=2mM ; C_{BM}=10mg/l ; C_{H2O2}=8mM)…….... 57

Figure IV.14. Effet du temps de contact sur la transformation du BM (pH2, T=20°C ; Fe^{2+}=2mM ;C_{BM}=10mg/l ; C_{H2O2}=8 mM)…….……...…..….. 57

Figure IV.15. Effet moyen de la concentration de BM sur le RDT par la méthode Fenton……... 59

Figure IV.16. Effet moyen de la concentration de H_2O_2 sur le RDT par la méthode Fenton…….…. 60

Figure IV.17. Effet moyen de la concentration de Fe^{2+} sur le RDT par la méthode Fenton……... 60

Figure IV.18. Interaction entre la concentration du BM et de H_2O_2 pour la décoloration chimique du BM…….…….. 61

Figure IV.19. Interaction entre la concentration du BM et de Fe^{2+}pour la décoloration chimique du BM…….……..……..... 62

Listes des figures

Figure IV.20. Interaction entre la concentration du H_2O_2 et de Fe^{2+}pour la décoloration chimique du BM……..……..…..62

Figure IV.21. Représentation graphique des rendements de décoloration chimique mesurés et théoriques…….……65

Figure IV.22. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement par la peroxydase de navet (Essai N°4)…….….67

Figure IV.23. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement par la peroxydase de navet (Essai N°8)……...67

Figure IV.24. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement parla méthode Fenton (Essai N°13)…….……68

Figure IV.25. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement parla méthode Fenton (Essai N°17)……..……...68

Figure IV.26. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement Par la méthode Fenton (Essai N°18)……..……...……..69

Figure IV.27. Spectre FTIR du BM……..……...……..……71

Figure IV.28. Spectre FTIR du précipité du BM obtenu du traitement enzymatique…….72

Figure IV.29. Spectre FTIR du précipité du BM obtenu du traitement Fenton……..……73

FigureIV. 30. Photos de phytotoxicité de la solution du BM et ses produits de transformationissu du traitement enzymatique.....75

Figure IV.31. Photos de phytotoxicité de la solution du BM et ses produits de transformation issu du traitement Fenton……75

Liste des tableaux

Tableau I.1. Classification des enzymes selon la réaction……..…….……..4

Tableau II.1. Principaux groupements chromophores et auxochromes…..…….....17

Tableau II.2. Principales classes tinctoriales et leurs applications.……...…21

Tableau II.3. Principales peroxydases végétales impliquées dans le traitement des colorants effluents textile……..…..…26

Tableau III.1. Réactifs chimiques utilisés et leurs caractéristiques……..…….28

Tableau III.2. Niveau des trois facteurs choisis pour le traitement enzymatique du BM……...36

Tableau III.3. tableau des plans expériences pour le traitement du BM par la peroxydase de Navet……....37

Tableau III.4. Niveau des trois facteurs choisis pour le traitement chimique du BM……...…40

Tableau III.5. Tableau des plans d'expériences pour le traitement du BM par la méthode Fenten……..41

Tableau IV.1. Résultats des RDT de décoloration du BM par la peroxydase de navet…...49

Tableau IV.2. Effet moyens des paramètres de traitement par la peroxydase C_{BM}, C_{H2O2} et AE ; $M(RDT)_{BM}$=52.79%.....50

Tableau IV.3. Résultats d'interactions entre les paramètres influençant la décoloration enzymatique…… 52

Tableau IV.4. Rendements mesurés et rendements théoriques de décoloration enzymatique du BM …….……....55

Tableau IV.5. Résultats des RDT de décoloration du BM par la méthode Fenton…….....58

Tableau IV.6. Effet moyens des paramètres de traitement par la méthode Fenten : C_{BM} ,C_{H2O2} , $C_{Fe^{+2}}$;M(RDT)=67.12%.....58

Tableau IV.7. Résultats d'interactions entre les paramètres influençant la décoloration chimique ……..... 60

Tableau IV.8. Rendements mesurés et rendements théoriques de décoloration chimique du BM……..…..….. 64

Tableau IV.9. Validation du modèle ……..……..……..……..… 66

Tableau IV.10. Fréquences d'absorption d'IR du BM et de ses produits issus des deux traitements appliqués…….……..... 70

Tableau IV.11. Valeurs de DCO du BM et des surnageants des traitements : enzymatique et Fenten…….……..…..…… 74

Tabeau IV.12. Valeurs du test de phytotoxicité des produits issus de traitement enzymatique …….…….. 74

Liste des tableaux

Tableau IV.13. Valeurs du test de phytotoxicité des produits issus de traitement Fenton……..….74

Introduction générale

Introduction générale

Les colorants sont largement utilisés dans plusieurs secteurs tels que les imprimeries, les produits alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, textiles, etc.

Leur stabilité chimique, la facilité de leur synthèse et leur variété de couleurs leur permis cette large application. Cependant, ces colorants sont à l'origine de la pollution une fois évacués dans l'environnement. La production mondiale des colorants est estimée à plus de 800 000 t/an. Compte tenu de la composition très hétérogène de ces derniers, leur dégradation conduit souvent à la conception d'une chaîne de traitement physique-chimique et biologique assurant l'élimination des différents polluants par étapes successives [1].

Dès lors, le bleu de méthylène, malgré sa large application dans le domaine pharmaceutique, il a montré son effet nocif vis-à-vis peau, les yeux ou le système respiratoire [2].

Cependant sa présence dans les rejets liquides peut provoquer une vraie source de pollution, qui peut nuire le règne végétal, animale. A cet égard, plusieurs études ont été menés dont le but est de minimiser la concentration voire d'éliminer ce colorant des effluents [2].

Parmi ces études, nous citons : l'adsorption sur différents absorbants, les procédés d'oxydations avancées, et les méthodes biologiques. Tous ces traitements malgré leurs larges applications, ils présentent l'inconvénient suivant : soit de déplacer le colorant, soit d'atteindre un rendement de décoloration moyen ou le temps de la réaction sera trop lent

[3-5].

Face à ce problème, nous proposons d'appliquer deux procédés différents afin de monter les désavantagés que présentent les traitements antérieurs.

En premier temps, nous allons appliquer une enzyme extraite d'une source végétale, disponible en Algérie, c'est le navet blanc sur des solutions aqueuses de bleu de méthylène et cela après avoir optimiser le pH du milieu à traiter.

Dans cette étape, nous allons étudier les effets des concentrations du substrat, du Co-substrat et de l'activité enzymatique sur le procédé de décoloration.

En deuxième temps, l'oxydation en utilisant les réactifs Fenton sera appliquée, où nous allons étudier l'effet du pH, ensuite, nous allons étudier l'effet des concentrations de colorant.

Introduction générale

Au cours des traitements étudiés, nous allons appliquer la méthode de TAGUCHI, dont le but est de balayer l'intervalle des concentrations, d'atteindre un rendement de décoloration maximal et d'établir un modèle liant le rendement de décoloration et les paramètres dont il dépend.

Dans ce contexte, le manuscrit se devise en quatre chapitres :

- Le premier, sera consacré à présenter les différentes sources de pollution, leur cause et leurs paramètres. Ainsi, une étude bibliographique sur les colorants, leurs classifications ainsi, les principales méthodes de leurs traitements sera présentées.
- Le second, portera sur les notions de base des enzymes, en particulier sur les peroxydases et leurs applications technologiques.
- Le troisième, rapportera les différents réactifs et le matériel utilisés ainsi que les méthodes appliquées au cours de cette étude expérimentale ;
- Le dernier chapitre, englobe tous les résultats obtenus et les discussions correspondantes.

Enfin, le mémoire se termine par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I : Enzymes, peroxydases

I.1. Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Les réactions essentielles pour le fonctionnement d'un être vivant sont trop lentes et sans la présence de ces catalyseurs, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible.

En effet, les enzymes sont des catalyseurs particulièrement intéressants pour la conception des capteurs chimiques cependant, leurs structures tridimensionnelles complexes, les rendent plus sensibles à la dénaturation. Ainsi, la perte d'activité d'une enzyme dépend largement des conditions de son environnement (température, pH, etc.) [6].

I.2.Généralités sur les enzymes

Les réactions qui se déroulent dans une cellule sont toutes catalysées par des enzymes. Bien que soumises aux mêmes lois de la nature que les autres substances, les enzymes diffèrent des catalyseurs chimiques aux caractéristiques suivantes [7- 9] :

- ✓ Les enzymes augmentent la vitesse des réactions de 10^8 à 10^{12} fois par rapport aux Réaction non catalysée ;
- ✓ Les réactions catalysées par les enzymes ont lieu dans des conditions relativement douces : températures inférieures à 100°C, pression atmosphérique, et pH proche de la neutralité ;
- ✓ L'activité enzymatique se mesure en nombre de molécules de substrat transformées ou en nombre de molécules de produits formées par molécules d'enzyme et par unité de temps ;
- ✓ Notions : Coenzyme, cofacteur : Le cofacteur peut être un ion métallique (Ca^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}…), ou une molécule organique appelée aussi coenzymes**.** Ces coenzymes et ces cofacteurs jouent le rôle d'intermédiaires et d'agents liants (coordination) dans les réactions enzymatiques lors de la formation des composés complexes (enzyme-substrat) [10] ;
- ✓ Chaque enzyme dont la composition du site actif est définit est caractérisée par la double spécificité enzymatique [14] :
  - ***a. Spécificité réactionnelle*** : une enzyme ne peut catalyser qu'un type de réaction donné. Cette spécificité sert de base à la nomenclature et à la classification de ses catalyseurs biochimiques. On distingue six classes d'enzymes (Tableau. I-1) [10,8] ;
  - ***b. Spécificité de reconnaissances*** : il s'agit du contrôle la spécificité de substrat par l'enzyme car elle conditionne la formation du complexe (enzyme-substrat) par complémentarité entre la conformation de ce site et une partie de la molécule de substrat. La spécificité de substrat peut être absolue ou relative selon si l'enzyme agit

sur un seul substrat ou sur des composés possédant des formules chimiques proches [9]. Plusieurs enzymes ont un ajustement : la conformation du site actif est complémentaire de celle du substrat seulement après la liaison du substrat. Le modèle clé-serrure est la schématisation la plus adéquate de cette complémentarité (Figure. I.1).

Tableau I.1. Classification des enzymes selon la réaction [8].

Classification	**Type de réaction catalysée**
Oxydoréductases	Oxydo-Réduction
Transférases	Transfert de groupement fonctionnel
Hydrolases	Hydrolyse
Lyases	Elimination de groupement et formation de double liaison
Isomérases	Isomérisation
Ligases	Formation de liaison couplée à l'hydrolyse de l'ATP

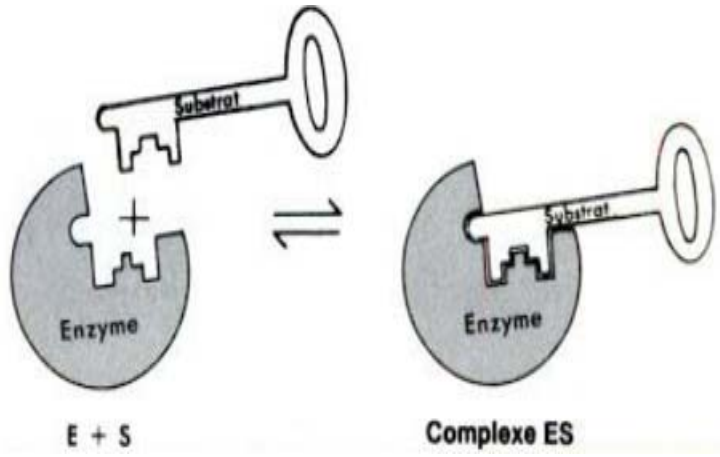


Figure I.1. Modèle de clé-serrure proposée par Emil-FISHER [11].

I.3. Cinétique enzymatique

Pour que l'enzyme fonctionne, elle doit se combiner spécifiquement avec son substrat au niveau du site actif, contenant les groupements catalytiques responsables de la transformation de ce substrat en produit.

Comme en catalyse chimique, l'enzyme, permet d'augmenter la vitesse d'une réaction sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci et d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction, en augmentant le nombre de molécules de substrat convertie sen produit par unité de temps [8].

Pour étudier la cinétique d'une enzyme, il est préférable de disposer de l'enzyme pure afin d'éviter toute interférence d'une réaction parasite dans le déroulement de la réaction. Il faut également s'assurer de la stabilité de l'enzyme dans les conditions d'étude : pH, température, composition du milieu d'incubation [7].

I.3.1. Modèle de Michaelis-Menten

Les modèles de cinétique enzymatique donnent des relations entre la vitesse de réaction (V) c'est-à-dire la quantité de substrat (S) disparu ou la quantité de produit (P) formé par unité de temps au cours d'une réaction (équation I.1) et les conditions expérimentales dans lesquelles se déroule cette réaction [7].

$$V = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \qquad \text{(I.1)}$$

Le modèle décrit un comportement cinétique classique, observé avec de nombreuses enzymes, en supposant l'existence d'un seul site actif par enzyme ou que ce dernier ne catalyse une réaction faisant intervenir un seul substrat.

Chaque fois que l'on parle de vitesse, il s'agit de vitesse initiale, Lorsqu'on met l'enzyme En présence du substrat, on observe la formation du produit. La courbe qui représente la variation de la concentration du produit en fonction du temps permet de mesurer la vitesse initiale [43]. On entend par vitesse initiale d'une réaction enzymatique la pente de la partie rectiligne de la courbe [P]=f(t), pratiquement, On mesure la tangente de la courbe

Expérimentale prés de l'origine du diagramme (fig.I.2).

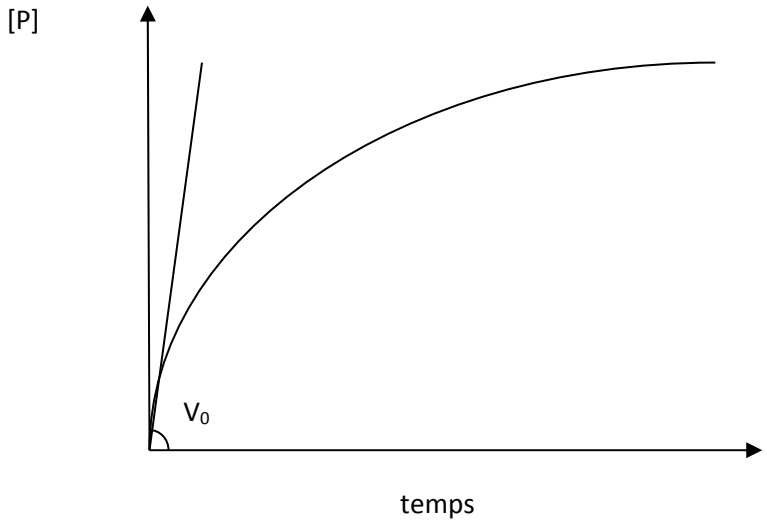


Fig.I.2. Evolution de concentration de produit en fonction du temps [43].

Le modèle de Michaelis-Menten, est basé sur le fait que la transformation enzymatique du substrat en produit nécessite la formation préalable du complexe (enzyme-substrat), ES, suivie de sa conversion en enzyme et produit, (réaction I.2) [7,8] :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \quad \text{(I.2)}$$

Avec:
E: Enzyme
S:Substrat
ES : Complexe enzyme-substrat
P: Produit
K_i: Constante de vitesse

Selon le modèle de Michaelis-Menten, la vitesse de réaction est donnée par l'équation I.3 :

Avec : $V_0 = \frac{V_{max}\,[S]}{[\delta]+Km}$ (I.3)

V_0 : Vitesse initiale de réactionnelle enzymatique (mg/l.min)

V_{max} : Vitesse de la réaction lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat (l'enzyme est à saturation) : $v_{max} = k_2\,[E]_0$, (mg/l.min)
[S] : Concentration de substrat (mg/L)

K_m : Constante de Mickaelis affinité (substrat-enzyme)

K_m exprime la concentration de substrat lorsque la moitié des molécules d'enzymes sont complexées au substrat (l'enzyme est à demi-saturation), (équation I.4) :

$$K_m = K = \frac{[E][S]_0}{[ES]} \qquad \text{(I.4)}$$

L'équation de Michaelis-Menten, est l'équation de base de la cinétique enzymatique. Elle décrit une hyperbole rectangulaire comme celle représentée sur la figure I.2.

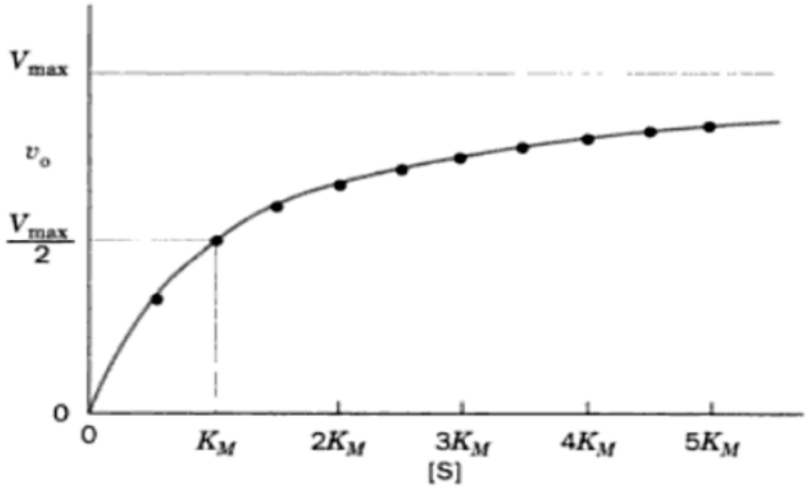


Figure I.3. Variation de la vitesse initiale V_0 en fonction de la concentration en substrat[S] pour une cinétique de type Michaelis-Menten [7]

La détermination graphique directe des constantes cinétiques (V_{max} et K_M) repose sur une linéarisation de Michaelis-Menten (équation I.3). En prenant l'inverse de la vitesse on obtient (équation I.5) :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{Km}{Vmax\,[S]_0} + \frac{1}{Vmax} \qquad \text{(I.5)}$$

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk. La représentation graphique $1/V_0 = f(1/[S])$ est une droite de pente K_m/V_{max}. Une autre représentation a été proposée par Eadie-Hosftee. En écrivant l'équation I.3 sous la forme suivante :

$$V_0 = Km\frac{V_0}{[S]} + V_{max} \qquad \text{(I.6)}$$

Les deux représentations sont données sur la figure I.3.

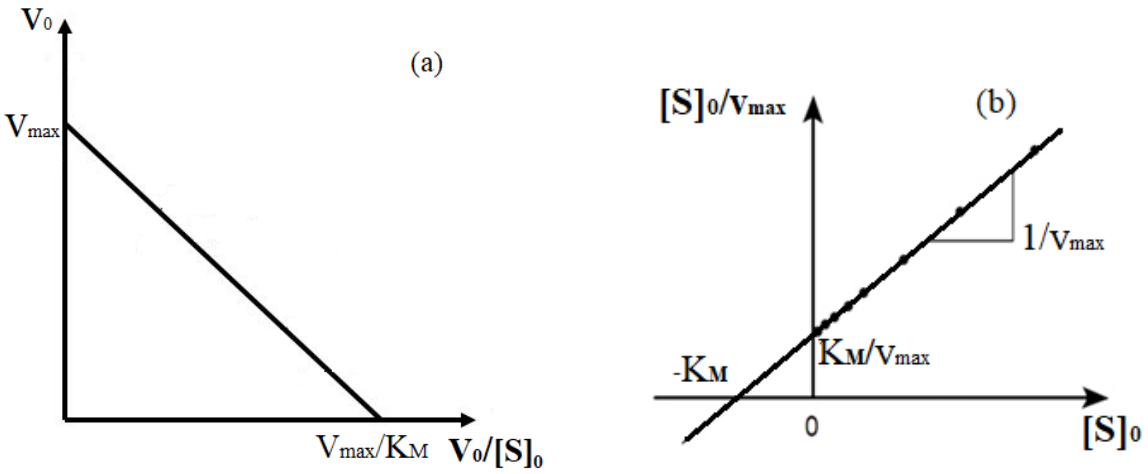


Figure I.4 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten : (a) : Eadie-Hosftee, (b) : Lineweaver-Burk[12].

I.4. Facteurs influençant sur la cinétique enzymatique

I.4.1. Influence du pH [13]

Pour chaque enzyme il existe un pH optimal c'est-à-dire un pH autour duquel l'enzyme fonctionnera mieux. Ce pH optimal situe généralement aux alentours de 7 (pH neutre). Cependant les enzymes agissants à tous les niveaux de l'organisme peuvent vivre à des pH très différents. Par exemple, le suc gastrique sécrété par l'estomac à un pH proche de 3.

Hors la valeur du pH optimal, l'enzyme est dénaturé. En effet, l'acidité du milieu peut déformer la structure tertiaire d'une enzyme de façon plus ou moins importante. Cette déformation de l'enzyme modifie son action. L'enzyme ne fonctionne plus normalement et sa vitesse de catalyse est réduite.

De plus, l'effet du pH est aussi lié à l'état d'ionisation des groupes d'acide aminé intervenants dans la formation ou l'activation du complexe (enzyme-substrat). En effet, il peut également modifier les charges électriques des radicaux des acides aminés (portions variables de l'acide aminé) du site actif. Cela conduit à la dénaturation du site actif où la reconnaissance (enzyme-substrat) ne peut plus être assurée.

I.4.2. Influence de la température [13]

Chaque enzyme possède une température optimale spécifique, comme pour le pH. Cette température est en moyenne comprise entre 37 et 40°C chez l'homme.

De même, au-delà de 40°C l'enzyme perd peu à peu ses fonctions catalytiques jusqu'à devenir totalement dénaturée de façon irréversible. En effet, la température modifie la structure tridimensionnelle du site actif en brisant les liaisons d'hydrogènes. On peut donc penser que les hautes températures cassent ces liaisons et même les liaisons covalentes (ou ponts de disulfure) provoquant ainsi la déformation du site actif.

Par ailleurs, il existe d'autres effecteurs qui agissent sur l'activité de l'enzyme tels que les inhibiteurs. Certaines de ces substances (les inhibiteurs compétitifs) se lient au site actif de l'enzyme ce qui empêche la formation du complexe (enzymes-substrats). D'autres inhibiteurs, appelés inhibiteurs allostériques ou non-compétitifs, se lient à un autre site de l'enzyme déformant ainsi l'enzyme qui devient alors inactive [13].

I.4.3.Influence de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale

La vitesse de réaction dépend de la concentration en enzyme et de la concentration en substrat. La concentration en enzyme est faible dans les milieux biologiques.

Quand concentration en substrat est faible dans le milieu, les complexes (enzyme-substrat) auront plus de mal à se former. La vitesse initiale de la catalyse est plus faible. Elle augmente avec la concentration en substrat jusqu'à ce que toutes les molécules d'enzymes soient liées à des molécules de substrat. L'enzyme est saturée : c'est le facteur limitant de la réaction [9].

I.4.4. Unités d'activité enzymatique

Il est difficile de mesurer la quantité d'enzyme en unités de masse ou de concentration molaire. L'activité enzymatique est définie en termes de vitesse de réaction. On distingue les unités suivantes :

- ***L'unité internationale(U.I)*** est la quantité d'enzyme requis pour convertir 1µmol de substrat en produit dans une minute à une température et pH spécifiés et sous des conditions de saturation du substrat.
- ***L'activité spécifique*** d'une enzyme est l'activité catalytique par unité de masse de protéine (I.U/mg d'enzyme solide)
- ***Le taux de roulement*** (« turnover number » en anglais) exprime l'activité catalytique en termes d'unité par mol d'enzyme pure (au lieu de mg de protéine) [14].

I.5. Peroxydases

Avant même que la notion d'enzyme été formulée, Louis-Antoine Planche constatait en 1810 que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc de recolorer la teinture de gaïac (incolore à l'état réduit) en présence de peroxyde d'hydrogène, ce qui valut le nom aux enzymes responsables, les peroxydases [15].

I.5.1. Définition

Les peroxydases (E.C.1.11.1.Z) 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. Leur présence était identifiée dans les plantes, les animaux et les microorganismes et leurs poids moléculaires varient de 30 à 150 kDa. Selon la nomenclature établie par la commission européenne des enzymes, les peroxydases se classent en 16 familles. Ainsi, leur nomenclature peut être selon la source : HRP : Horse Radish Peroxidase (peroxydase de raifort), ou selon le substrat : cytochrome c peroxydase, lignine peroxydase [18, 19].

I.5.2. Structure [15]

La plupart des peroxydases sont de nature hemoprotéique :

- *Partie héminique (coenzyme)* : c'est le site actif, il est caractérisée par la présence du Fe^{3+} comme ion central et 4 groupes pyrrole : Ferriprotoporphyrine IX (voir figure I.5) Au repos, cet atome possède quatre liaisons avec des atomes d'azote de la protoporphyrine et une liaison avec le groupement imidazole de l'histidine 170. Sur le côté distal de l'hème se trouvent trois acides aminés conservés : arginine 38, phénylalanine 41et histidine 42. Ces trois résidus servent de site de fixation de l'H_2O_2 interviennent dans la catalyse
- *Partie glycoprotéique* : elle est constituée de plusieurs chaines polypeptidiques où le nombre d'acides aminés varie de 153 à 753 acides aminés distribués en 10 à 13 hélices α et quelques chaines β.

La structure tridimensionnelle de la peroxydase d'HRP est décrite sur la figure I.4.

I.5.3. Classes des peroxydases

Les peroxydases se secrètent par les microorganismes, les animaux et les plantes. Selon leur structure et leurs propriétés catalytiques, elles sont classées en trois familles :

✓ **Peroxydases de classe I,** Se sont des peroxydases intracellulaires, on cite : cytochrome c peroxydase, ascorbate peroxydase, elles sont d'origine bactérienne [12].

✓ **Peroxydases fongiques extracellulaires (classe II),** ce type de peroxydase est isolé de différents mycètes, particulièrement (WRF) [19].

✓ **Peroxydases des plantes, (classe III),** Se sont distribuées dans le raifort (HRP), le navet, la courgette ou BGP, les grains de soja, la tomate, etc [19].

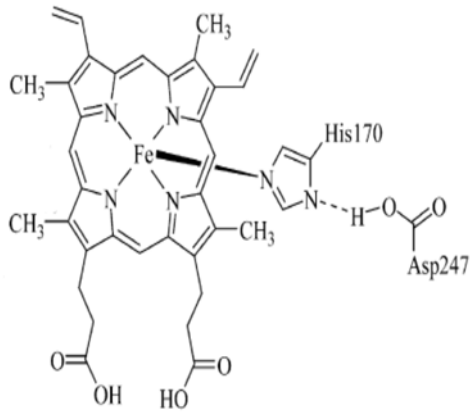


Figure I.5. Structure de la peroxydase de HRP [17].

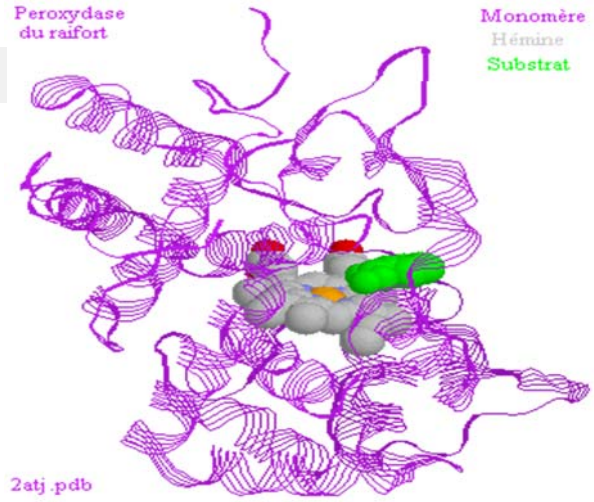


Figure I.6. Structure de Ferriproto-porphyrine IX des peroxydases [16].

I.5.4. Fonctions des peroxydases

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

1. Respiration et photosynthèse ;
2. Synthèse et dégradation des hormones ;
3. Décomposition de H_2O_2 du cytosol ;
4. Oxydation des composés toxiques ;
5. Biosynthèse de la paroi cellulaire et de l'éthylène;
6. Réponse de défense ; etc.

I.5.5. Cycle catalytique

En général, les réactions catalysées par les peroxydases est représentée comme suit, [20] :

$$\text{Peroxydase} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Composé I} + H_2O \quad \text{(I.7)}$$

$$\text{Composé I} + RH_2 \longrightarrow \text{Composé II} + RH \quad \text{(I.8)}$$

$$\text{Composé II} + RH_2 \longrightarrow \text{Peroxydase} + RH + H_2O \quad \text{(I.9)}$$

Le cycle catalytique des peroxydases commence par une oxydation de l'enzyme et une réduction et le peroxyde d'hydrogène pour produire le composé I, (le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferryl ($Fe^{IV} = O$). D'une part le composé I oxyde le substrat (RH) pour donner le radical correspondant ($R^{\bullet}$), et d'autre part, il se réduit pour produire le composé II. Les composés I et II réagissent simultanément avec une deuxième molécule (RH). Comme dernière étape le composé II est réduit de nouveau à l'état ferrique, correspondant à la forme native de l'enzyme, [20]. En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure I.6.

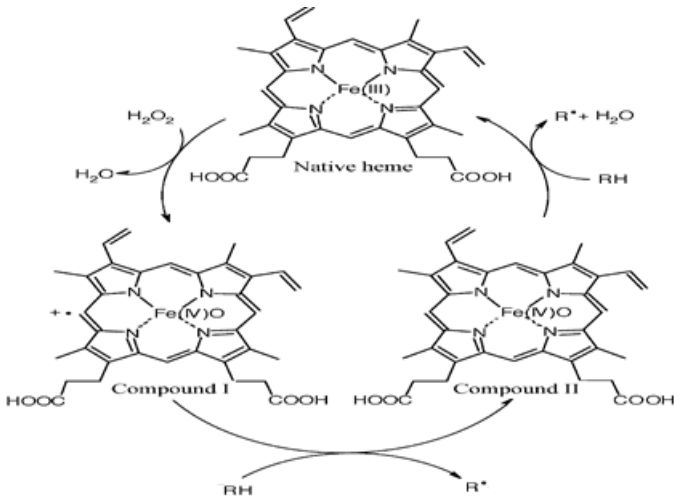


Figure. I.7. Cycle catalytique de la peroxydase, [20]

I.5.6. Applications industrielles des peroxydases [21]

Du fait de leur forte activité spécifique et de leur robustesse, les peroxydases ont trouvé de nombreuses applications industrielles et biotechnologiques. Les peroxydases végétales, et notamment la HRP, se retrouvent dans de très nombreux kits de diagnostic. Elles sont alors liées à un anticorps ou à autre molécule spécifique du test que l'on souhaite effectuer pour servir de marqueur par des réactions colorimétriques ou luminescentes.

- **Dégradation des colorants synthétiques :** Certains auteur sont montré que la destruction oxydative des composés colorés est considérablement stimulé par des enzymes oxydatives telle que la peroxydase, et peut-être d'un intérêt pratique pour la décoloration des colorants synthétiques.

Traitement des composés phénolique : Les peroxydases sont connues aussi pour polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que le phénol, les phénols substitués et les amines aromatiques présents dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres industries, y compris plastiques, textiles et les industries forestières.

- **Dégradation des pesticides :** Il a été estimé que certains affectent le système nerveux et d'autres sont considérés comme des poisons. Leur transformation voire leurs éliminations considère donc une importance des chercheurs. Cependant, des chercheurs ont rapporté la transformation de plusieurs pesticides organophosphorés par la Chloroperoxydase.

- **Synthèse des polymères :** Les radicaux libres produits par catalyse de la peroxydase peuvent participer à différentes réactions post-enzymatiques. La polymérisation par oxydation de composés aromatiques catalysés par les oxydoréductases permet la production de nouveaux polymères fonctionnels.

- **Utilisation de la peroxydase dans des produits cosmétiques protecteurs de la peau :** La peroxydase de l'extrait aqueux de fenouil (*Foeniculumvulgare*) a la capacité de réduire l'érythème provoqué par les UV. La capacité à réduire l'érythème est une mesure des capacités apaisantes, qui peuvent aussi être considérées comme une capacité à piéger les radicaux libres. Lorsque la peroxydase est présente, elle peut agir pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène, apportant ainsi un spectre total de protection contre les radicaux libres.

- **Mise en application de biosenseurs analytiques :** Les électrodes basées sur la peroxydase ont une utilisation répandue dans les systèmes analytiques pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques même la détermination des produits phénoliques et les amines aromatiques.

- **Dosage du cholestérol :** il consiste en la réalisation d'un capteur électrochimique enzymatique capable de détecter de façon sélective et rapide le cholestérol, substance importante en ce qui concerne la suivie de la santé humaine.

- **Application à l'analyse et les tests de diagnostic :** Le lactose contenu dans le lait et les produits laitiers est déterminé par la technique basée sur l'immobilisation de galactosidase et du HRP sur un support polymérique : étant la β- galactosidase l'enzyme clé pour détecter le

lactose, l'intervention de la peroxydase permet la formation des produits colorés, les couleurs développés sont utilisé pour estimer la concentration du lactose.

I.6. Conclusion

Une importance primordiale des enzymes particulièrement les peroxydases réside dans transformation des composés aromatiques tels que les phénols, les amines aromatiques et les colorants, qui constituent la majore classe des polluants dans les eaux usées dégagés à partir d'un certain nombre d'industries.

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

Chapitre II : Pollution et Colorants

II.1. Pollution

II.1.1. Définition [20]

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel qui apparait en totalité ou en partie come un sous-produit de l'action humaine. Cette pollution s'opère suite à une modification des flux d'énergie et de l'abondance des espèces vivantes.

La pollution modifie directement ou indirectement, à court ou long terme, l'utilisation qu'on peut faire d'une ressource (agricole, en eau, en produits biologiques ou encore au niveau de ses fonctions récréatives).

Globalement, trois principales causes de pollution peuvent être définies :

- ✓ Production d'énergie est la source de la pollution qui va de pair avec la civilisation industrielle moderne. En effet, que ce soit l'usage des combustibles fossiles, ou l'exploitation de l'énergie nucléaire, l'activité de production d'énergie est fatalement liée à la production d'agents polluants.
- ✓ Activités industrielles, en particulier métallurgiques et chimiques sont la deuxième cause de la pollution de l'eau et une fois encore tant au niveau de la production que de la consommation.
- ✓ Agriculture moderne est devenue une cause essentielle de la pollution des eaux et des sols. Il faut noter que cette dernière entraine la pollution des eaux par des phénomènes de ruissellement. En effet, l'usage d'engrais chimique et de pesticides à forte doses peut être constituent une source de pollution importante.

II.1.2. Types de pollution

a. Pollution physique

a.1. Pollution mécanique, elle résulte des décharges de déchets et de particules solides apportés par les eaux résiduaires industrielles, ainsi que les eaux de ruissellement. Ces polluants sont soit les éléments grossiers soit du sable ou bien les matières en suspension [22].

a.2. Pollution thermique, les eaux rejetées par les usines utilisant un circuit de refroidissement de certaines installations ont une température de l'ordre (70 à 80) °C. Elle diminue jusqu'à (40 - 50) °C lorsqu'elle contacte les eaux des milieux aquatiques ce qui entraine un réchauffement de l'eau, en influant ainsi sur la solubilité de l'oxygène [22].

a.3. Pollution radioactive, elle est occasionnée par la radioactivité artificielle des rejets qui trouvent leurs sources dans l'utilisation de l'énergie nucléaire sous toutes ces formes. Les éléments radioactifs s'incorporent dans les molécules des organismes vivants en provoquant une modification génétique [22].

b. Pollution chimique

b.1. Pollution organique**,** les effluents chargés de matières organiques biodégradables, issus des industries alimentaires et agroalimentaires, provoquent une consommation d'oxygène dissous de ces eaux, ce qui entrainement la mort des poissons par asphyxie et de développement (dépôts de matières organiques au fonds des rivières) de fermentation anaérobie (putréfaction) génératrices de nuisances olfactives [22].

La présence du phénol dans l'eau a pour origine les polluants industriels, ainsi que les revêtements bitumeux des canalisations et des réservoirs, la décomposition des produits végétaux et la dégradation des pesticides. Ces produits s'oxydent faiblement, se fixent peu, se filtrent facilement et ils sont souvent biodégradables [23, 22].

b.2. Pollution minérale, la présence des métaux lourds dans l'eau et l'atmosphère et par conséquent dans la chaine alimentaire est le cas le plus intéressant parmi les problèmes posés à la pollution. Les métaux sont classés comme suit par ordre décroissance de toxicité spécifique : Mercure, chrome, titane, cuivre, cobalt, nickel, plomb, zinc.

Les cyanures, constituent un poison à action rapide qui peut se rencontrer sous plusieurs formes y compris les formes gazeuses, liquides et solides. Autres éléments minéraux tels que : l'azote, le phosphore, les nitrates, les nitrites, les phosphates, l'ammoniac, et dioxyde de silicium constituent une source de pollution, si leurs teneurs dépassent les normes de la littérature [22].

c. Pollution microbiologique

L'eau peut contenir des microorganismes pathogènes (virus, bactéries et parasites), ils sont dangereux pour la santé humaine et limitant donc les usages que l'on peut faire de l'eau (industrie, utilisation domestique, etc.) [24, 22].

En Algérie, les statistiques du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, comptent 4 entreprises correspondant aux secteurs de la teinture et de finissage et 39 entreprises faisant partie de l'ensemble du secteur textile, avec une

consommation moyenne de 40,12 tons de pigments et de colorants par ans. Sur le plan aspect environnementaux, il existe 11 stations d'épuration des eaux résiduaires, 8 usines de traitement des huiles usées, 1 installation de recyclage des récipients, 10 vaporisateurs de déchets textiles, 5 installations de valorisation des récipients non-pollués et 2 usines de valorisation des plastiques [25].

D'après les données fournies par le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, 70% des industries correspondant aux sous-secteurs textiles de la teinture, du finissage et de l'impression réalisent le rejet sans épuration préalable [25].

II.1.3. Paramètres de mesure de la pollution

L'estimation de la pollution industrielle est un problème complexe et délicat qui fait appel à des dosages et des tests de plusieurs paramètres servant à caractériser de manière globale et pertinente le niveau de la pollution présente dans l'effluent [22, 26]. Parmi ces paramètres on cite :

a. Paramètres physico-chimiques [22, 26]

- ✓ Température
- ✓ Potentiel hydrogène
- ✓ Conductivité électrique
- ✓ Demande chimique en oxygène (DCO)
- ✓ Demande biochimique en oxygène (DBO_5)
- ✓ Matières en suspension.

II.2. Colorant

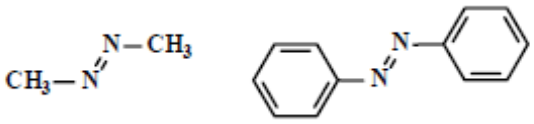
II.2.1. Définition et structure

Un colorant est une matière colorée par elle-même, capable de se fixer sur un support. La coloration plus ou moins intense des différentes substances est liée à leur constitution chimique. En effet, un colorant est un corps susceptible d'absorber certaines radiations lumineuses et de réfléchir alors les couleurs complémentaires [27].

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible. La molécule du colorant comporte un groupement chromophore : responsable de la transformation de la lumière blanche en lumière colorée par

réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie.

De manière générale, les colorants consistent en un assemblage de groupes chromophores, auxochromes et de structures aromatiques conjuguées, (figure II.1) (cycles benzéniques, anthracène, perylène, etc.). Le tableau II.1. Récapitule les principaux groupements chromophores et auxochromes.



Composé incolore Composé coloré

Figure II.1. Association des groupements chromophores aux systèmes conjugués [27]

Tableau II.1. Principaux groupements chromophores et auxochromes [27]

Groupements chromophores	Groupements auxochromes
Azo (-N=N-)	Amino ($-NH_2$)
Nitroso (-NO ou N-OH)	Methylamine ($-NHCH_3$)
Carbonyl (=C=O)	Diméthylamino ($N(CH_3)_2$)
Vinyl (-C=C-)	Hydroxyl (-OH)
Nitro ($-NO_2$ ou =NO-OH)	Alkoxyl (-OR)
Sulfure (>C=S)	Groups donneurs d'électrons

La dénomination des colorants comprend trois éléments [27] :

- Le nom générique de la classe d'application ;
- La couleur ;
- Le numéro d'ordre chronologique d'inscription au color index. (Par exemple : C.I. Bleu Basique 9).

II.2.2. Classifications

a. Classification chimique

Elle basée sur la nature du groupement chromophore et la structure chimique (tableau II.1).

a.1. Colorants azoïques [28]

Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence d'un groupement azoïque (Ar-**N**=**N**-Ar) reliant deux noyaux benzéniques. Suivant le nombre de chromophores azo rencontrés dans la molécule, on distingue les mono-azoïques, les diazoïques et les poly-azoïques.

a.2. Colorants anthraquinoniques [29]

Leur formule générale dérivée de l'anthracéne montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amino. Un exemple d'un colorant anthraquinonique est donné sur la figure II.2.

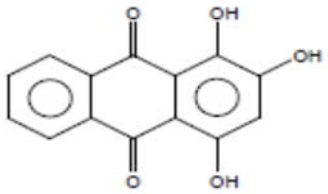


Figure II.2. Structure d'un colorant anthraquinonique, La purpurine

a.3. Colorants indigoïdes [27]

Les colorants indigoïdes tirent leur appellation de l'indigo (figure II.3). L'indigo est un des plus anciens colorants connus avec la pourpre, qui est un dérivé dibromo-6,6-indigo.

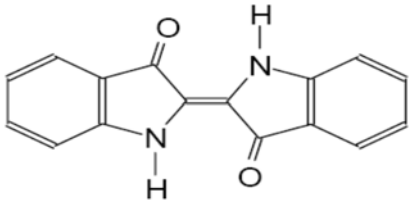


Figure. II.3. Structure moléculaire de l'indigo.

a.4. Les phtalocyanines [27]

Ont une structure complexe basée sur l'atome central d'un métal. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.).

a.5. Colorants triphénylméthanes [30]

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.

a.6. Colorants xanthène [27]

Ces colorants sont dotés d'une intense fluorescence. Le composé le plus connu est la fluorescéine, (figure II.4).

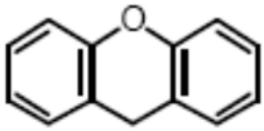


Figure. II.4. Structure moléculaire d'un colorant xanthène.

Avec ces colorants, les colorations obtenues ont une bonne résistance à la lumière ainsi qu'à l'eau ; par contre, ces colorants ne sont pas résistants au chlore.

a.7. Colorants thiazines [31]

Ils renferment un noyau thiazine (voir figure II.5). En pratique on a faire à la dibenzothiazine et le colorant le plus utilisé est la forme oxydée du bleu de méthylène comme l'indique (Figure II.6).

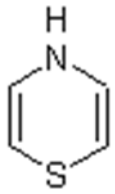


Figure II.5. Structure moléculaire d'un noyau thiazine



Forme bleue BM $^{+}$

Figure II.6. Structure moléculaire du bleu de méthylène.

a.8. Colorants nitrosés [32]

Forment une classe des colorants très limitée en nombre et relativement ancienne, (Figure II.7)**.**

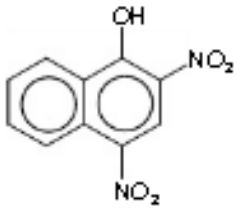


Figure. II.7. Structure moléculaire d'un colorant nitrosé.

b. Classification tinctoriale

Cette classification est basée sur la nature du groupement auxochrome présentant sur la molécule du colorant (Tableau. II.2), qu'il renseigne sur la 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 Vander Waals ou covalente [30].

Tableau II.2. Principales classes tinctoriales et leurs applications, [27]

Type	Caractéristiques
Colorants acides (anioniques)	Soluble dans l'eau grâce a leur groupes sulfonâtes ou carboxylates, ils sont ainsi dénommés parce qu'ils permettent de teindre les fibres animales (laine et soie) et le polyamide en bain légèrement acide. Ex : acide bleu 258.
Colorants basiques (cationiques)	Solubles dans l'eau. Les liaisons se font entre les sites cationiques des colorants (sels d'amines organiques) et les sites anioniques des fibres. Ex : bleu basique 9.
Colorants à mordant	Contiennent généralement un ligand fonctionnel capable de réagir fortement avec un sel aluminium, de chrome, de cobalt, de cuivre, de nickel ou de fer pour donner différent complexes colorés avec le textile. Ex : bleu mordant 9
Colorants réactifs	Leurs groupes chromophores sont issus essentiellement des familles : azoïque, anthraquinonique et phlalocyanine. L'appellation est liée à la présence d'une fonction chimique réactive, assurant la formation d'une liaison covalentes forte avec les fibres .Ex : noir réactif 5
Colorant de cuve	Insolubles, et doivent être transformés en leuco dérivés par réduction alcaline, la teinture se termine par la réoxydation in situ du colorant sous sa forme insoluble initiale. Réputés pour leur bonne résistance aux agents de dégradation. Ex : noire cuve 27
Colorants directs (substantifs)	Solubles dans l'eau, du fait de la présence de groupe sulfonâtes. Ils se distinguent par leur affinité pour les fibres cellulosique, Ex : rouge direct 23
Les pigments	Ne sont pas des colorants. Ils sont insolubles dans l'eau, ne présente aucune affinité pour les matières textiles et ne peuvent être appliqués à la surface des fibres qu'en les fixant à l'aide d'un liant.
Colorants dispersés	Faiblement solubles dans l'eau, des groupe hydrophyles (OH, NH_2, CH_2OH) ont été introduit dans la molécule pour permettre se former, en suspension dans l'eau, une fine dispersion, à l'origine de nom de colorant dispersés, Ex : bleu térasil BG.

II.2.3. Utilisations des colorants [18]

L'industrie des colorants constitue un marché économique considérable car de nombreux produits industriels peuvent être colorés, principalement :

- Pigments (industrie des matières plastiques) ;
- Encre, papier (imprimerie) ;
- Colorants alimentaires (industrie agro-alimentaire) ;
- Pigments des peintures, matériaux de construction, céramiques (industrie du bâtiment) ;
- Colorants capillaires (industrie des cosmétiques) ;
- Colorants et conservateurs (industrie pharmaceutique) ;
- Carburants et huiles (industrie automobile etc.) ;
- Colorants textiles à usage vestimentaire, de décoration, du bâtiment, du transport, colorants textiles à usage médical etc.

II.3. Méthodes de traitement des colorants

II.3.1.Méthodes physiques

a. Adsorption

L'adsorption est un procédé de transfert de matière entre une phase liquide (ou gazeuse) chargée en composés organiques ou inorganiques et une phase solide : l'adsorbant. Ce mode de traitement n'est pas applicable pour l'élimination de tous les colorants. Seuls les colorants cationiques, à mordant, de cuve et réactifs sont éliminés par cette technique [32].

b. Filtration sur membrane

La filtration sur membrane se décline en microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration et osmose inverse. Parmi les quatre types de procédés, la nanofiltration et l'osmose inverse sont les plus adaptés à la réduction partielle de la couleur et des petites molécules organiques [33]. Ces procédés restent très limités dans leurs applications car ils nécessitent des investissements importants à cause en grande partie du prix des matériaux utilisés [34].

C .Coagulation – floculation

Il s'agit des processus physico-chimiques par lesquels des particules colloïdales ou des solides en suspension fines sont transformés par des floculats chimiques en espèces plus visibles et séparables. Les flocs formés sont séparés par décantation et filtration puis évacués. [29]

II.3.2. Méthodes chimiques, Oxydation avancée

Les procédés d'oxydation avancées (POA) sont des techniques de traitement faisant appel à des intermédiaires radicalaires très réactifs, particulièrement les radicaux hydroxyles (OH·) [2].

a. Radicaux hydroxyles

En raison de son caractère oxydant fort (E° = 2.7 V/ESH), les radicaux $OH^{\bullet}$ sont responsables de l'oxydation de composés organiques principalement en générant par l'abstraction d'un hydrogène des radicaux libres organiques $R^{\bullet}$, (réactions II.1 et II.2)**.**Ces radicaux peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire formant ainsi des radicaux peroxydes, initialisant ainsi une série de réactions de dégradation oxydative qui peut conduire à la minéralisation complète des composés organiques [30].

$$OH^{\bullet}+RH \longrightarrow R^{\bullet}+H_2O \qquad (II.1)$$

$$R^{\bullet}+RH \longrightarrow 2R^{\bullet}+H_2O \qquad (II.2)$$

Le radical $OH^{\bullet}$ est l'oxydant le plus réactif après le fluor. sur la Figure II.8, les principales caractéristiques des radicaux hydroxyles libres $OH^{\bullet}$ sont illustrées.

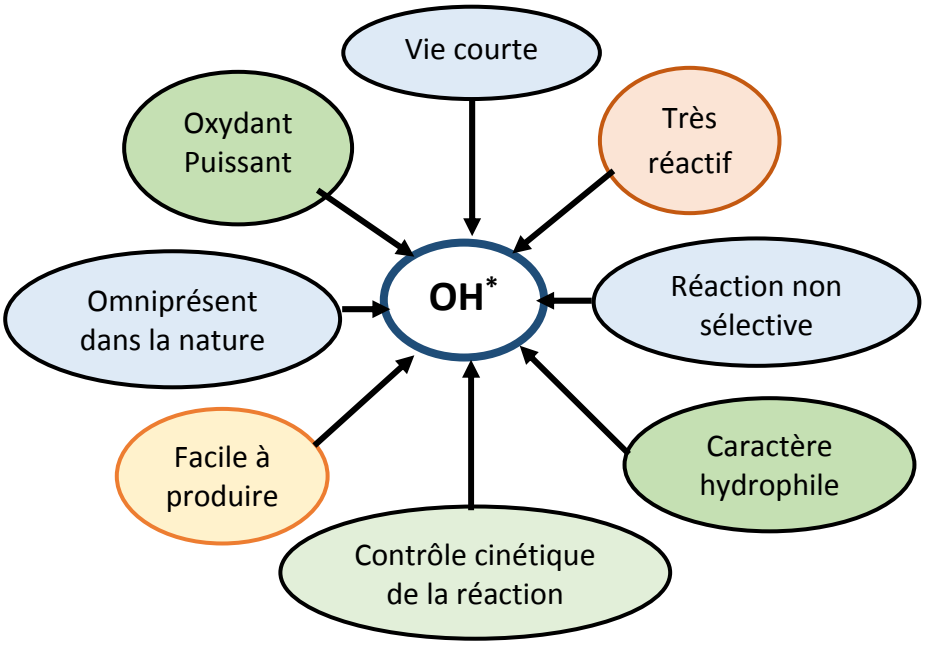


Figure II.8. Caractéristiques du radical $OH^{\bullet}$ [30].

Les radicaux $OH^{\bullet}$ peuvent être régénérés par de nombreuses technologies ou par plusieurs combinaisons (figure II.9).

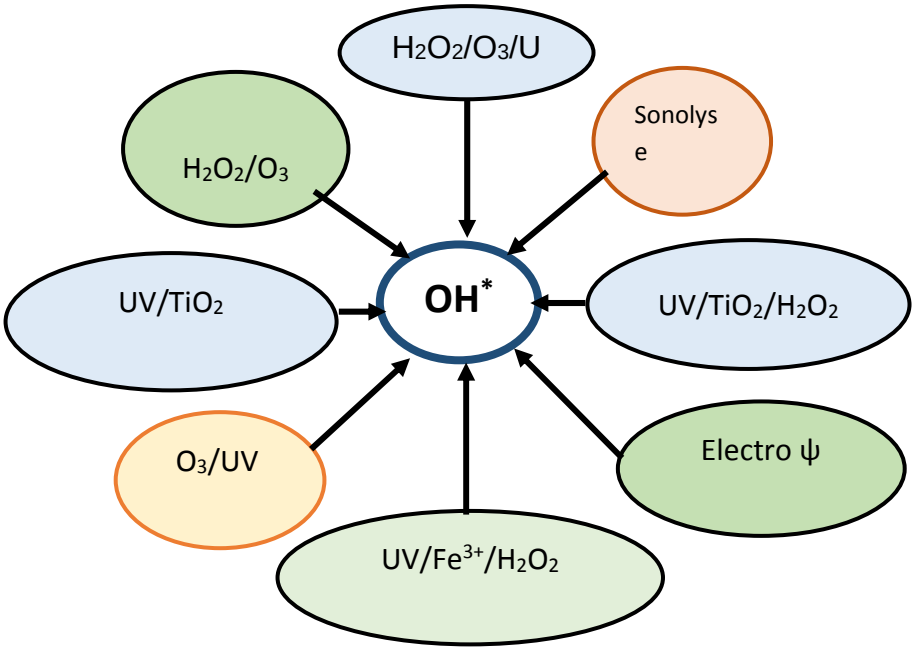


Figure II.9. Procédés d'oxydations producteurs des radicaux hydroxyles $OH^{\bullet}$ [30].

b. Procédé Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) [35]

Le réactif Fenton est un mélange constitué de H_2O_2 et les ions ferreux, qui génèrent les radicaux hydroxyles selon la réaction :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \quad \text{(II.3)}$$

Le procédé Fenton comprend une série de réactions en vue des réactions régénérées, le tableau A.1 de l'annexe 1, représentent les principales réactions d'initiations, de propagation et de terminaison pouvant intervenir dans ce procédé.

Des antérieures confirment que plusieurs paramètres gouvernant la cinétique de réaction de Fenton : le pH (il est compris entre 2.5 et 4), le rapport H_2O_2/Fe^{2+}, la température et la présence de consommateurs des radicaux hydroxyles (inhibiteur).

c. Méthode TAGUCHI [44]

La méthode TAGUCHI, inventée par GEN'ICHI TAGUCHI, est une méthode statistique pour réaliser des plans d'expériences. Appliquée dans l'industrie, cette méthode se concentre avant tout à minimiser les variations autour de la valeur de consigne. L'objectif est d'obtenir des produits, processus et systèmes aussi robustes et insensibles aux perturbations externes que possible.

La méthode TAGUCHI est appliquée dans le cadre de l'amélioration de la qualité et de la méthode Six Sigma. Cette méthode pragmatique a su rendre les plans d'expériences accessibles pour des techniciens.

II.3.3. Méthodes biologiques [23]

Basé sur les micros organismes en milieu aérobie (présence d'oxygène) ou anaérobie (absence d'oxygène), le traitement biologique est une méthode qui pourrait être nécessaire à la dégradation de composés organiques synthétiques tels que les colorants. Ce procédé peut conduire soit à une biodégradation totale avec formation de CO_2 et de H_2O_2, soit à une biodégradation incomplète, pouvant aboutir à un composé ayant une structure différente du parent produit.

II.3.4. Méthodes enzymatiques [35]

Les traitements enzymatiques des colorants impliquent des réactions chimiques extrêmement spécifiques et rapides, basées sur l'action des enzymes. Ces méthodes sont classées entre les procédés chimiques et biologiques. Ainsi, la variété de transformations catalysées par les enzymes a fait ces derniers une cible principale pour l'exploitation des industries biotechnologiques récentes. 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.

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

- 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 ;
- Transformation de divers composés aromatiques.

Les enzymes oxydoréductase, les peroxydases, les laccases et les oxydases de polyphénol 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, en composés insolubles moins toxiques, qui pourraient être facilement enlevé de la solution. Quelques applications de traitement des colorants textiles par les peroxydases sont résumées sur le tableau II.3.

Tableau II.3. Principales peroxydases végétales impliquées dans le traitement des colorants effluents textiles [35].

Source de peroxydase	Colorant /Effluent
Peroxydase de radis	Noir acide 10 BX Bleu Remazol, Rouge Cibacron Jaune directs 12
Peroxydase de navet	Effluent textiles Colorants directs
Peroxydase de courgette	21 colorants textiles et non textiles effluent textile Rouge dispersé 17 et Marron dispersé 1
Peroxydase de tomate Peroxydase de chou-fleur	Colorants directs Effluent textile

II.4. Conclusion

A l'issu de ce chapitre, nous avons essayé de présenter, quelques notions de bases sur la pollution : types et causes ainsi de donner un aperçu sur les molécules colorantes pouvant générés une éventuelle pollution.

Cependant, les colorants synthétiques organiques sont des polluants utilisés dans de nombreux secteurs industriels, ce qui génère des rejets chargés de colorant posant ainsi deux problèmes majeurs, l'un environnementale et l'autre lie à la santé publique. La mise en œuvre de procédés capables de traiter ces colorants s'avère nécessaire. Dans la suite de notre travail, nous allons appliquer deux méthodes de traitement des colorants à savoir : enzymatique et Fenton.

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1. Introduction

Une partie de notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de la faculté des sciences et le hall technologique de l'université de Médéa.

Une autre partie, a été effectuée au niveau du laboratoire de contrôle de qualité du complexe Antibiotical-SAIDAL- de Médéa.

Cependant, l'objectif de la présente étude s'oriente vers la réalisation des étapes suivantes :

1. Extraction et purification de la peroxydase de navet ;
2. Traitement d'un colorant acide utilisé en pharmaceutique « bleu de méthylène » par la peroxydase de navet ;
3. Traitement d'un colorant acide utilisé en pharmaceutique « bleu de méthylène » par la méthode Fenton ;
4. Caractérisation des produits de transformation.

Pour ce faire nous avons utilisé le matériel et nous avons appliqué les méthodes suivantes.

III.2. Matériel utilisé

III.2.1. Equipements

- Mixeur de type Moulinex ;
- Spectrophotomètre UV-visible, marque SHIMADZU ;
- FTIR, marque SHIMADZU ;
- Balance électronique de type SARTORUIS ;
- Centrifugeuse de type HETTICH (500-6000 tour/min) ;
- pH mètre OAKTON ;
- Agitateur magnétique de type Heidolph MR Hei-standard ;
- Rotavapeur : de capacite (1l) ;
- Bain marie AGIBAT(20-120°C).

III.2.2. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont listés dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Réactifs chimiques utilisés et leurs caractéristiques

Réactif chimique	***Formule brute***	***Masse molaire(g/mol)***	***Pureté/densité***	***Fournisseur***
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	34	30%	PROCHIMA SIGMA
Hydroxyde de sodium	NaOH	40.00	98.5%	SIGMA ALDRICH
Phosphate de potassium mono basique	KH_2PO_4	174.18	99%	SIGMA ALORICH
Acétone	C_3H_6O	58.07	99.5	USA GERMANY
Phénol	C_6H_6O	94.1	99.5%	RIEDEL-DE HAEN
4-amino-antypyrine	$C_{11}H_{13}N_3O$	203	99%	SIGMA ALDRICH
Sulfate de fer	$FeSO_4$	151.91	85%	RIEDEL-DE HAEN
Biphtalate de potassium	$C_8H_5KO_4$	204.22	99%	SIGMA ALDRICH
Acétate d'éthyle	$C_4H_8O_2$	88.11	99.9	EC
Acide chlorhydrique	HCL	36.46	38%	SIGMA ALDRICH
Chlorure de potassium	KCL	74.55	99.5%	RIEDEL-DE HAEN

III.3. Bleu de méthylène [2]

III.3.1. Définition: c'est un colorant dont le groupement chromophore est la phénothiazine (voir figure III.1). Il fait partie de la classe cationique de la classification tinctoriale.

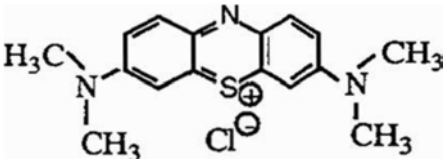


Figure III.1. Structure chimique du Bleu de méthylène

III.3.2. Propriétés

a) Propriétés Chimiques

- ✓ ***Nom chimique*** **:** Chlorure de 3,7-bis (diméthylamino) phénothiazin-5-ium
- ✓ ***Nom tinctorial*** **:** bleu basique 9
- ✓ ***Nom dans le Color Index*** **:** CI 52015
- ✓ ***Formule brute*** **:** $C_{16}H_{18}ClN_3$
- ✓ ***Masse molaire*** **:** 319.85 g/mol

b) Propriétés physiques

- ✓ ***Température de fusion*** : 180°C
- ✓ ***Solubilité*** : eau 40 g/l
- ✓ **pH** : 5.9

III.3.3. Utilisations du bleu de méthylène [35, 36]

Le BM est utilisé intensivement dans différents domaines tel que : la chimie, la médecine, L'art dentaire et l'industrie textile :

- ✓ *Biologie* : il colore certaines structures histologiques.
- ✓ *Pharmacie* : Antiseptique, antirhumatismal. Comme il est utilisé dans le traitement spécifique de méthémoglobinémie toxique.
- ✓ *Textile et imprimerie* : Teinture du coton, bois, soie et papier
- ✓ *Médecine :* c'est un limiteur optique combiné à un polymère, il est utilisé pour la protection des yeux contre les lasers intenses

III.4. Méthodes

III.4.1.Préparation des solutions tampon de pH2 à pH10

La préparation des solutions tampons de différents pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10) a été réalisée selon la pharmacopée Américaine [37].



Figure III.2. Spectrophotomètre UV-Vis.

III.5.1. Préparation de l'extrait brut

Une masse de 100g de navet (*brassicarapa*) rincée et coupée en petits morceaux a été homogénéisée avec 200 ml d'eau distille dans un mixeur. L'homogénéisât obtenu a été filtré sur multicouche de gaze, c'est l'extrait enzymatique brut, (Figure III.3).

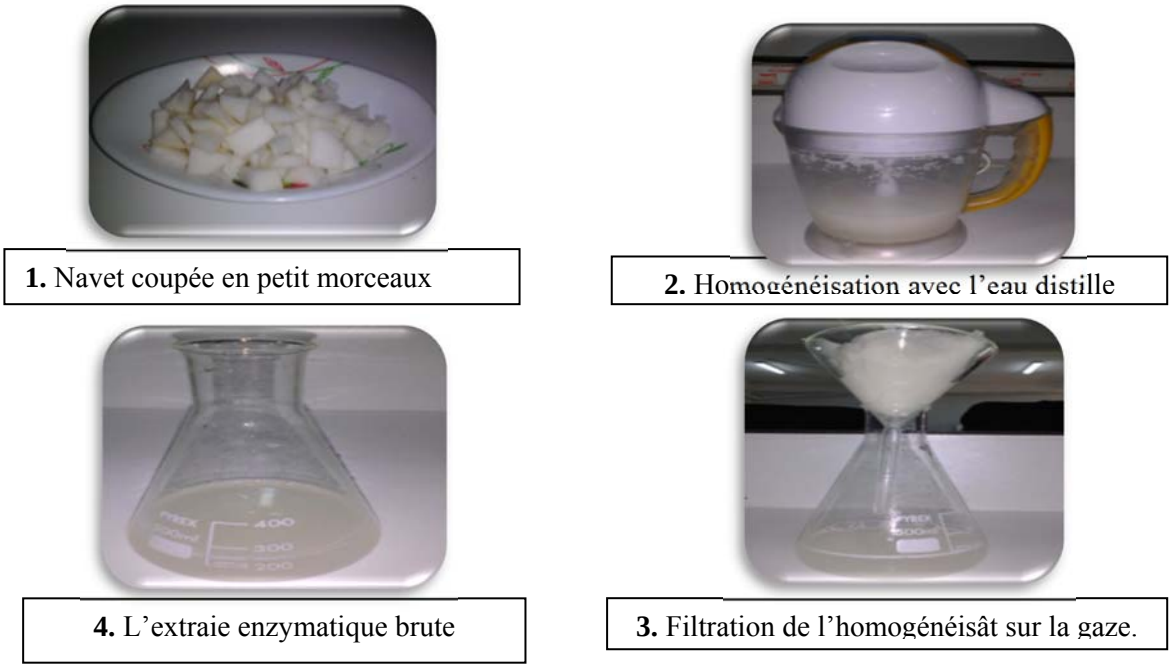


Figure III.3. Protocole expérimental d'extraction de la peroxydase de navet.

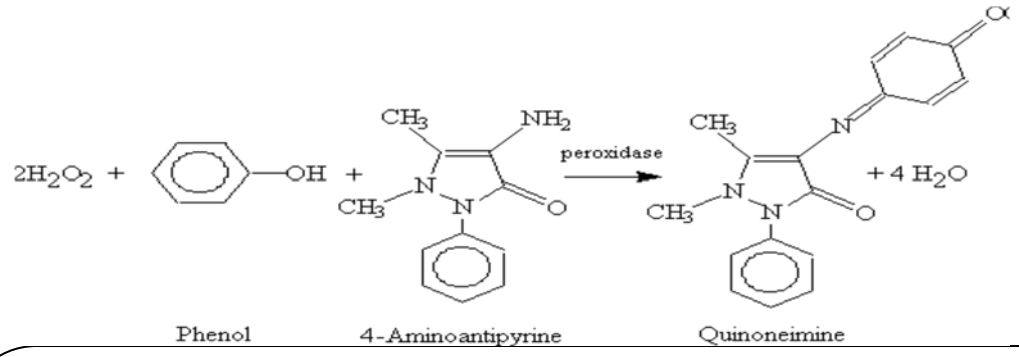
III.5.2. Purification partielle de l'extrait enzymatique brut

La méthode de précipitation à l'acétone, a été appliquée par addition graduelle de 200 ml d'acétone pré-refroidi à 200 ml à l'extrait brut de la peroxydase. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C. La solution est ensuite centrifugée à 3000 $tr.min^{-1}$ pendant 10 min. Ensuite, le

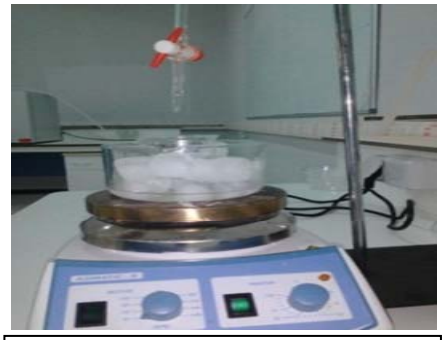
précipité est dissout dans 50 ml de solution tampon phosphate (50 mM) à pH 7, c'est l'extrait partiellement purifiée (EEPP). Le protocole expérimental est illustré sur la figure III.4).

III.5.3. Dosage de l'activité enzymatique [40]

La mesure d'activité enzymatique de la peroxydase est basée sur utilisation du 4-amino-antipyrine. Le principe de dosage est basé sur la réaction entre le phénol, le peroxyde d'hydrogène en présence de 4-Amino-antipyrine et la peroxydase (réaction III.2). Le produit formé au cours de cette réaction est un chromogène de Quinoneimine.



(III.2)



1-Purification d'EEB par acétone



2-Centrifugation des mélanges à 3000 tr/min



3- Obtention de l'EEP par dissolution du culot dans la solution tampon pH7

Figure III.4. Protocol expérimental de purification de la peroxydase de navet.

Le Quinoneimine est un produit coloré en rose présente des caractéristiques d'absorption particulières dans la gamme visible à une langueur d'onde maximale de l'intervalle de 500 à 520 nm ce qui permet de maitre en œuvre une technique de mesure d'activité enzymatique en continu. La vitesse initiale est alors déterminée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe obtenue. Nous avons basé sur ce dernier principe de mesure de l'AE, pour évaluer l'activité peroxydasique des solutions enzymatiques.

Par conséquent, nous faisons appel à deux expériences :

Expérience N°01 : elle sert à déterminer la longueur d'onde maximale ainsi qu'à étudier la cinétique de la réaction III.2. La vitesse initiale est alors déterminée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe cinétique de transformation de H_2O_2 obtenue par mesure de la DO après un temps t à 20 s d'intervalle

Expérience N°02 : sert à déterminer le coefficient d'extinction molaire de peroxyde d'hydrogène, obtenu de la courbe d'étalonnage : la densité optique en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène.

Les produits colorés de la réaction de dosage de l'activité peroxydasique pour les différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène sont donnés sur la figure III.5.



Figure III.5. Produits colorés de l'expérience N°02.

Donc l'activité enzymatique d'EEPP est calculée selon l'expression suivante :

$$AE = \frac{A}{\varepsilon}.1000.\frac{V(ech)}{V(EEPP)}$$

Avec :

A: la pente de la courbe cinétique (DO=f(t))

ε: le coefficient d'extinction molaire du H_2O_2(l/mol.cm)

V(èch) : Volume de mélange réactionnel (ml)

V(EEPP): Volume de mélange réactionnel purifier (ml)

III.5.4. Spectrophotométrie UV-Visible [38]

La spectrophotométrie ultra-violet-visible est une technique d'analyse quantitative, qui consiste à mesurer l'abondance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. La méthode a pour objectifs l'analyse qualitative par la détermination de la longueur d'onde maximale et quantitative par application de la loi de Beer-Lambert qui énonce :

$$A = \varepsilon . L . C \left(log \frac{I_0}{I} \right) \qquad \text{(III.1)}$$

Avec:

A : Absorbance ;
Ɛ : Coefficient d'extinction molaire (l/mol.cm) ;
L : Epaisseur de la cuve (cm) ;
C: Concentration molaire du composé dosé (mol/l) ;
I_0 : Intensité initiale de la lumière traversée ;
I : Intensité de la lumière transmise ;
Le spectromètre utilisé dans notre étude est représenté sur la figure III.2.

III.6. Préparation et étalonnage de BM

Les solutions aqueuses des colorants de BM étudiée, sont préparées par dissolution respective de leur poudre dans de l'eau distillée. Une étude de son spectre UV-visible à des longueurs d'ondes comprise entre 200 et 800nm, permet de déterminer la longueur d'onde maximale. La droite d'étalonnage, représentant la densité optique (ou absorbance) relative au maximum d'absorption, en fonction de la concentration, obéissant ainsi à la loi de Beer-Lambert sera établie.

III.7. Etude de la décoloration de Bleu de méthylène par la peroxydase de navet

Dans cette partie, nous allons appliquer le traitement enzymatique qui met en jeu la peroxydase extraite du navet.

Toutes les expériences réalisées au cours de cette partie ont été effectuées, en appliquant le même protocole. Les mélanges réactionnels sont préparés dans des tubes à essais, bien nettoyés, ils contiennent :

- 3ml de solution tampon d'un pH donné
- 1ml de BM
- 1ml d'H_2O_2

La réaction est initiée par l'ajout de 0.2 ml d'extrait enzymatique partiellement purifié, on laisse la réaction pour se dérouler pendant un temps déterminé ensuite les mélanges sont centrifugés pendant 15 minutes avec une vitesse de 3000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après la centrifugation est effectuée par un spectrophotomètre UV-visible (à λ_{max} du BM) afin de déterminer la concentration résiduelle du colorant, au cours de son élimination par la peroxydase. Les mélanges réactionnels sont illustrés sur la figure III.6



Figure III.6. Mélanges réactionnels utilisés dans le traitement enzymatique

III.7.1. Effet de pH

Cette expérience consiste à mettre en évidence le pH optimal de la dégradation de notre colorant par la peroxydase. Le pH optimal correspond au maximum de décoloration. L'intervalle du pH étudié s'étends de 2 à 10.

La décoloration est évaluée par le calcul du rendement en utilisant la formule (III.3) :

$$\text{RDT de décoloration (\%)} = \left[\frac{DO_{initiale} - DO_{finale}}{DO_{initiale}}\right] \times 100 \qquad \text{(III.3)}$$

III.7.2. Effet du temps de contact

La cinétique de la décoloration du BM a été réalisée à pH $_{optimal}$ et pour une concentration initiale de 10 mg/l en colorant, 8mM en H_2O_2 et une AE de 8.78 UI/ml

III.8. Modélisation du rendement de décoloration du BM par la peroxydase en utilisant méthode TAGUCHI [41]

L'objectif par la méthode TAGUCHI est de trouver les niveaux optimaux des paramètres (C_{BM}, C_{H2O2}et AE) qui maximisent le rendement de décoloration.

III.8.1. Calcul des effets moyens

Si on considère le paramètre A de niveaux i, la formule générale de calcul l'effet moyen est donné par l'expression III.4:

Effet de A au niveau i:

EAi = Moyenne des réponses lorsque A est au niveau i – Moyenne générale (III.4)

III.8.2. Calcul des interactions:

Les interactions, lorsqu'elles sont présentes dans un système, elles sont les phénomènes les plus difficiles à interpréter en l'absence de méthode. Le calcul de l'interaction entre deux facteurs A et B consiste à calculer la modification apportée à la réponse du système du fait de la configuration particulière des deux facteurs A et B. L'interaction INAiBj est l'interaction qui existe lorsque A est au niveau i et B est au niveau j. Cette interaction est l'une des interactions possibles résultant des configurations AiBj.

Interaction entre le paramètre A au niveau i et le paramètre B au niveau j est donné par l'expression (III.5).

INAiBj=moyenne des réponses lorsque (A=i, B=j)-M-EAi-ABj

Pour notre système de mesure nous avons 27 interactions à calculer (III.5)

$INC_{BM}iC_{H2O2}j$=Moyenne des rendements lorsque (C_{BM}=i, C_{H2O2}=j)-M-EC_{BM}i-EC_{H2O2}j

$INC_{BM}iAEk$= Moyenne des rendements lorsque (C_{BM}=i, AE=j)-M-EC_{BM}i-EAE_k

$INC_{H2O2}iAEk$ = Moyenne des rendements lorsque (C_{H2O2}=i, AE=j)-M-EC_{H2O2}i-EAE_k

III.8.3. Calcul de la réponse théorique

Les résultats de calcul des effets moyens et des interactions entres les paramètres permet de calculer la réponse théorique du système, il suffit d'ajouter à la moyenne générale des réponses : les effets moyens et les interactions correspondants au système. On peut donc écrire :

$$Rdt\ (i, j, k)=M+ EC_{H2O2}j+ EAE_k + EC_{BM}i +INC_{BM}iC_{H2O2}j+ INC_{BM}iAE_k+ INC_{H2O2}iAE_k \quad (III.6)$$

III.8.4. Modèle matriciel selon la méthode TAGUCHI

Pour faciliter le calcul de la réponse théorique du système étudié, il est préférable d'écrire un modèle sous forme matricielle.

III.8.5.Choix des niveaux

En appliquant de la méthode des plans d'expérience, à partir de 3 paramètres (facteurs : C_{BM}, C_{H2O2} et AE) pour déterminer leurs influences sur le rendement de décoloration. Les niveaux choisis sont résumés sur le tableau III.2. Le nombre d'essais est donc calculé et est égale à : 3^3 = 27 essais 'expériences'.

Tableau III.2. Niveaux des trois facteurs choisis pour le traitement enzymatique du BM.

Essais	***Colorant C_{BM} (mg/l)***	***Peroxyde d'hydrogène C_{H2O2} (mM)***	***AE (UI/ml)***
1	1.5	4	8.78
2	7.5	8	26.34
3	13.5	12	43.9

Les différentes combinaisons des essais réalisés, sont données sur le tableau III.3.

Tableau III.3. Tableau des plans d'expériences pour le traitement du BM par la peroxydase de navet.

Essais N ° :	***C_{BM} (mg/l)***	***C_{H2O2} (mM)***	***AE (UI/ml)***
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	2	1
5	1	2	2
6	1	2	3
7	1	3	1
8	1	3	2
9	1	3	3
10	2	1	1
11	2	1	2
12	2	1	3
13	2	2	1
14	2	2	2
15	2	2	3
16	2	3	1
17	2	3	2
18	2	3	3
19	3	1	1
20	3	1	2
21	3	1	3
22	3	2	1
23	3	2	2
24	3	2	3
25	3	3	1

26	3	3	2
27	3	3	3

III.8.6. Expression de modèle

Le modèle recherché sera exprimé selon la formule III.7. Nous cherchons donc à modéliser les effets des paramètres ainsi que les interactions, la modélisation s'écrira :

$$
\begin{aligned}
&RDT_{th}(i, j, k) = \\
&M + (EC_{BM}1 \;\; EC_{BM}2 \;\; EC_{BM})(C_{BM}) \\
&+ (E\, C_{H2O2}1 \;\; EC_{H2O2}2 \;\; EC_{H2O2}3)(C_{H2O2}) \\
&+ (E\, AE1 \;\; E\, AE2 \;\; E\, AE3)(AE) \\
&+ (C_{BM})^t \begin{bmatrix} INC_{BM}\,1\,C_{H2O2}1 & INC_{BM}\,1\,C_{H2O2}2 & INC_{BM}\,1\,C_{H2O2}3 \\ INC_{BM}\,2\,C_{H2O2}1 & INC_{BM}\,2\,C_{H2O2}2 & INC_{BM}\,2\,C_{H2O2}3 \\ INC_{BM}\,3\,C_{H2O2}1 & INC_{BM}\,3\,C_{H2O2}2 & INC_{BM}\,3\,C_{H2O2}3 \end{bmatrix} (C_{H2O2}) \\
&+ (C_{BM})^t \begin{bmatrix} INC_{BM}\,1\,AE1 & INC_{BM}\,1\,AE1 & INC_{BM}\,1AE\,3 \\ INC_{BM}\,2\,AE1 & INC_{BM}\,2\,AE2 & INC_{BM}\,2\,AE\,3 \\ INC_{BM}\,3\,AE1 & INC_{BM}\,3\,AE2 & INC_{BM}\,3\,AE\,3 \end{bmatrix} (AE) \\
&+ (C_{H2O2})^t \begin{bmatrix} INC_{H2O2}1\,AE1 & INC_{H2O2}1\,AE2 & INC_{H2O2}1AE\,3 \\ INC_{H2O2}2\,AE1 & INC_{H2O2}2\,AE2 & INC_{H2O2}2\,AE\,3 \\ INC_{H2O2}3\,AE1 & INC_{H2O2}3\,AE2 & INC_{H2O2}3\,AE\,3 \end{bmatrix} (AE)
\end{aligned}
\qquad \text{(III.7)}
$$

III.8.7. Modélisation entre les niveaux des paramètres par interpolation :

Il arrive parfois que lors de l'interprétation du modèle, on s'amène à choisir un niveau intermédiaire par rapport aux niveaux choisis pour les essais. Dans ce cas le calcul de la réponse théorique n'est pas possible directement à partir du modèle. Il faut faire une interpolation. Dans ce cas, il suffit de transformer les indicateurs de niveau : C_{BM} par INC_{BM}, C_{H2O2} par INC_{H2O2} et AE par INAE, tels que :

Si C_{BM} sera égale à $\begin{bmatrix}1\\0\\0\end{bmatrix} = \begin{bmatrix}IN\,C_{BM}\,1\\IN\,C_{BM}\,2\\IN\,C_{BM}\,3\end{bmatrix}$ et :

$$
\begin{aligned}
IN\,C_{BM}\,1 &= \frac{(C_{BM} - C_{BM}1).(C_{BM} - C_{BM}3)}{(C_{BM}1 - C_{BM}2).(C_{BM}1 - C_{BM}3)} \\
IN\,C_{BM}\,2 &= \frac{(C_{BM} - C_{BM}1).(C_{BM} - C_{BM}3)}{(C_{BM}2 - C_{BM}1).(C_{BM}2 - C_{BM}3)} \\
IN\,C_{BM}\,3 &= \frac{(C_{BM} - C_{BM}1).(C_{BM} - C_{BM}2)}{(C_{BM}3 - C_{BM}1).(C_{BM}3 - C_{BM}2)}
\end{aligned}
\qquad \text{(III.8)}
$$

Finalement, pour une telle valeur de paramètre C_{BM} inclus dans l'intervalle de 1.5 à 13.5mg/l, une valeur de paramètre C_{H2O2} inclus dans l'intervalle de 4 à 12mM et pour une valeur de paramètre AE inclus dans l'intervalle de 31 à 155 UI/ml, le rendement de décoloration théorique est donné par :

$$
\begin{aligned}
RDT_{th}(i,j,k) = {} & \\
& M + (EC_{BM}1 \;\; EC_{BM}2 \;\; EC_{BM}3)(INC_{BM}) \\
& + (E\,C_{H2O2}1 \;\; EC_{H2O2}2 \;\; EC_{H2O2}3)(INC_{H2O2}) \\
& + (E\,AE1 \;\; E\,AE2 \;\; E\,AE3)(AE) \\
& + (INC_{BM})^t \begin{bmatrix} INC_{BM}1\,C_{H2O2}1 & INC_{BM}1\,C_{H2O2}2 & INC_{BM}1\,C_{H2O2}3 \\ INC_{BM}2\,C_{H2O2}1 & INC_{BM}2\,C_{H2O2}2 & INC_{BM}2\,C_{H2O2}3 \\ INC_{BM}3\,C_{H2O2}1 & INC_{BM}3\,C_{H2O2}2 & INC_{BM}3\,C_{H2O2}3 \end{bmatrix} (INC_{H2O2}) \\
& + (INC_{BM})^t \begin{bmatrix} INC_{BM}1\,AE1 & INC_{BM}1\,AE1 & INC_{BM}1AE\,3 \\ INC_{BM}2\,AE1 & INC_{BM}2\,AE2 & INC_{BM}2\,AE\,3 \\ INC_{BM}3\,AE1 & INC_{BM}3\,AE2 & INC_{BM}3\,AE\,3 \end{bmatrix} (INAE) \\
& + (INC_{H2O2})^t \begin{bmatrix} INC_{H2O2}1\,AE1 & INC_{H2O2}1\,AE2 & INC_{H2O2}1AE\,3 \\ INC_{H2O2}2\,AE1 & INC_{H2O2}2\,AE2 & INC_{H2O2}2\,AE\,3 \\ INC_{H2O2}3\,AE1 & INC_{H2O2}3\,AE2 & INC_{H2O2}3\,AE\,3 \end{bmatrix} (INAE)
\end{aligned}
\qquad \text{(III.9)}
$$

III.9. Etude de décoloration de Bleu de Méthylène par la méthode Fenton

Toutes les expériences réalisées au cours de cette partie ont été effectuées, en appliquant le même protocole. Tout d'abord, on prépare des solutions du colorant et d'un H_2O_2 de concentrations données, les mélanges réactionnels sont préparés dans des tubes à essais, bien nettoyés, ils contiennent :

- 3ml de solution tampon d'un pH donné
- 1ml de BM
- 1ml d'H_2O_2

La réaction est initiée par l'ajout de 1 ml de sulfate ferrique, on laisse la réaction pour se dérouler pendant un temps déterminé ensuite la réaction est arrêtée par neutralisation à l'aide

d'une solution de NaOH (0.5M), puis les mélanges sont centrifugés à 3000tr/min pendant 15 minutes. L'analyse des mélanges avant et après la centrifugation est effectuée par un spectrophotomètre UV-visible (à λ_{max}du BM) afin de déterminer la concentration résiduelle du colorant, au cours de son élimination par les réactifs Fenton.

III.9.1. Effet de pH

Cette expérience consiste à mettre en évidence le pH optimal de la dégradation de notre colorant par les réactifs Fenton. Le pH optimal correspond au maximum de décoloration. L'intervalle du pH étudié s'étends de 2 à 10.

La décoloration est évaluée par le calcul du rendement en utilisant la formule (III.3).

III.9.2. Effet du temps de contact

La cinétique de la décoloration du BM a été réalisée à pH $_{optimal}$ et pour une concentration initiale de 10 mg/l en colorant, 8 mM de H_2O_2 et une concentration de 2 mM de Fe^{2+}.

III.10. Modélisation du rendement de décoloration du BM par la méthode Fenton en utilisant méthode TAGUCHI [41]

L'objectif par la méthode TAGUCHI est de trouver les niveaux optimaux des paramètres (C_{BM}, C_{H2O2} et C_{Fe2+}) qui maximisent le rendement de décoloration par les réactifs Fenton.

Dans la suite de l'étude, nous allons suivre les mêmes étapes que celles appliquées pour le traitement enzymatique, (i.e) : choix des niveaux, calcul des effets moyens, calcul des interactions et élaboration du modèle matriciel.

Les tableaux III.4 et III.5, récapitulent les niveaux choisis pour les trois paramètres influençant le traitement chimique et les combinaisons des 27 essais correspondant respectivement.

Tableau III.4. Niveaux des trois facteurs choisis pour le traitement chimique du BM

Essais N°	***Colorant C_{BM} (mg/l)***	***Peroxyde d'hydrogène C_{H2O2} (mM)***	***Ions ferrique C_{Fe}^{2+}(mM)***
1	10	2	2
2	20	8	4
3	30	14	6

Les différentes combinaisons des essais réalisés, sont données sur le tableau III.5.

Tableau III.5. Tableau des plans d'expériences pour le traitement du BM par la méthode de Fenton.

Essais N ° :	C_{BM} ***(mg/l)***	C_{H2O2} ***(mM)***	$C_{Fe^{2+}}$ ***(mM)***
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	2	1
5	1	2	2
6	1	2	3
7	1	3	1
8	1	3	2
9	1	3	3
10	2	1	1
11	2	1	2
12	2	1	3
13	2	2	1
14	2	2	2
15	2	2	3
16	2	3	1
17	2	3	2
18	2	3	3
19	3	1	1
20	3	1	2
21	3	1	3
22	3	2	1
23	3	2	2
24	3	2	3
25	3	3	1

26	3	3	2
27	3	3	3

III.11. Caractérisation des produits de transformation du bleu de méthylène issus des traitements enzymatique et Fenton

III.11.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis

Les surnageants récupérés des deux traitements appliqués aux conditions optimales, sont analysés par spectrophotométrie UV-Vis.

III.11.2. Caractérisation par spectrométrie FTIR

Les précipités récupérés des traitements enzymatique et Fenton aux conditions optimales ainsi que le BM, sont séchés à l'étuve à 60°C pendant 24h. ensuite, ils sont analysés par FTIR.

III.12. Mesure de demande chimique en oxygène (DCO) [37] :

-Introduire 50 ml de l'échantillon dans un erlenmeyer de capacité 500 ml ajouter 1g de sulfate de mercure puis ajouter 75 ml mélange d'acide sulfurique contenant du sulfate d'argent à 6.6 g/l et assurer qui'il ne subite aucun précipité de chlorure d'argent, dans le cas contraire chauffer légèrement jusqu'à dissolution .

-Ajouter 25 ml de solution de dichromate de potassium à 0.25N.

-Placer les erlenmeyer dans les postes de DCO-mètre.

-Ouvrir le robinet de l'eau pour la circulation et refroidissement des réfrigérants.

-Déclencher le DCO-mètre et mesurer le temps de 2 heures après la première bulle d'ébullition

-Après les 2 heures ajouter 400ml eau distillée pour chaque erlenmeyer à analyser.

-Laisser refroidir a une température ambiante.

-Titrer l'excès de dichromate de la solution avec de la solution mohr à 0.25N en utilisant un indicateur colorée de férione, jusqu'à la couleur rougeâtre on passant d'un virage de vert au bleu.

-En parallèle il est nécessaire d'effectuer un essai blanc de 50 ml de l'eau distillé en employant le même procéder de l'échantillon à analyser.

-appliquer la formule suivante :

$$\mathrm{DCO}(mg/l) = \frac{\mathrm{V(blanc)} - \mathrm{v(ech)} \times 8000 \times 0.25 \times \mathrm{F}}{50} \qquad \text{(III.10)}$$

V (blanc) : volume de $Fe(NH_4)_2(SO_2)_2$employé pour le blanc l'eau distillée en ml.

V (ech) : volume de $Fe(NH_4)_2(SO_2)_2$employé pour en ml.

0.25 : Normalité de fer (II) ammonium sulfate.

50 : prise d'essai de l'échantillon en ml.

F : facteur de correction de $Fe(NH_4)_2(SO_2)_2 = \frac{25}{\mathrm{v(blanc)}}$ (III.11)

III.13. Etude de la phytotoxicité [42]

Ce test permet d'aborder le risque d'impact de la mise en contact des solutions de colorant non traités et leurs produits de transformation issus des traitements enzymatique et Fenton sur la germination des grains de petit pois *(Pisumsativum L.)*



Figure III.7. photos de Rotavapeur (1L)

Les surnageants ont subi une extraction liquide à l'acétate d'éthyle, puis évaporés à l'aide du rotavapeur. Les précipités récupérés sont mis en solution dans l'eau distillée.

L'ensemble du système expérimental est placé dans un endroit de température (25°C) et d'humidité. Le test est déclenché par arrosage de 10 ml de chaque solution dans le pot et le contrôle se fait chaque 24h pendant 8 jours. Le pourcentage de germination, la longueur relative des racines et l'indice de germination sont calculés selon les expressions suivantes :

$$PG\ (\%) = \frac{\text{Nombre de grains germés dans l'essais}}{\text{nombre de grains germés dans le témoin}} .100 \qquad \text{(III.12)}$$

$$LRR\ (\%) = \frac{\text{longueur moyenne de racine de l'essais}}{\text{longueur moyenne de racine du témoin}} .100 \qquad \text{(III.13)}$$

$$IG = PG\,.\,LRR/100 \qquad \text{(III.14)}$$

Chapitre IV: Résultats et discussion

IV.1. Détermination de l'activité enzymatique de l'EEPP de navet

L'expérience réalisée nous a permis de déterminer la cinétique de réaction de transformation du phénol en produit coloré (réaction III.2) assurée par la peroxydase. L'allure est représentée par la figure A.3 de l'annexe A3

Ainsi, l'objectif de la deuxième expérience est d'établir la courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène : co-substrat de la peroxydase. Cette courbe est illustrée sur la figure IV.1

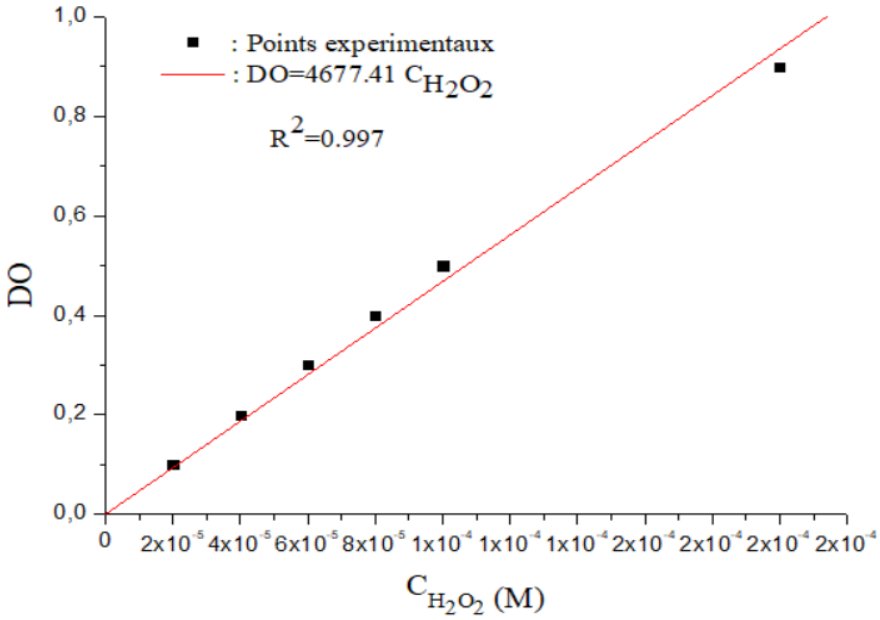


Figure IV.1. Courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène, ε =4677.41 l/mol.cm

Des résultats des figures A.3 et IV.1, la valeur de l'activité enzymatique de l'EEPP du navet est égale à 8.78 UI/ml.

IV.2. Caractérisation spectrale du BM

La courbe de balayage de la solution aqueuse de BM à 20mg/l (figure IV.2), nous a permis de déterminer la longueur d'onde maximale d'absorption : 664nm.

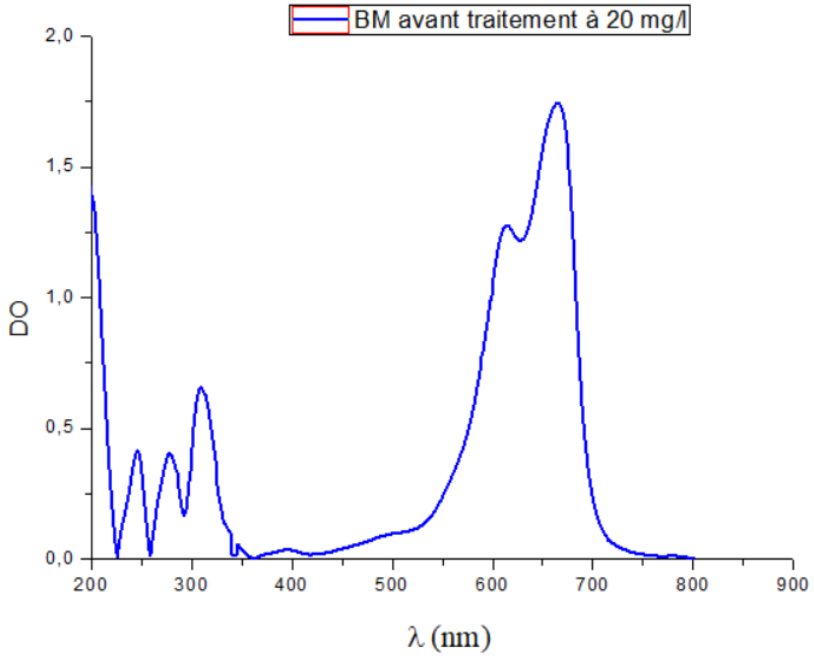


Figure IV.2. Courbe de balayage de BM (20mg/l)

Ainsi, la courbe d'étalonnage du BM est illustrée sur la figure IV.3.

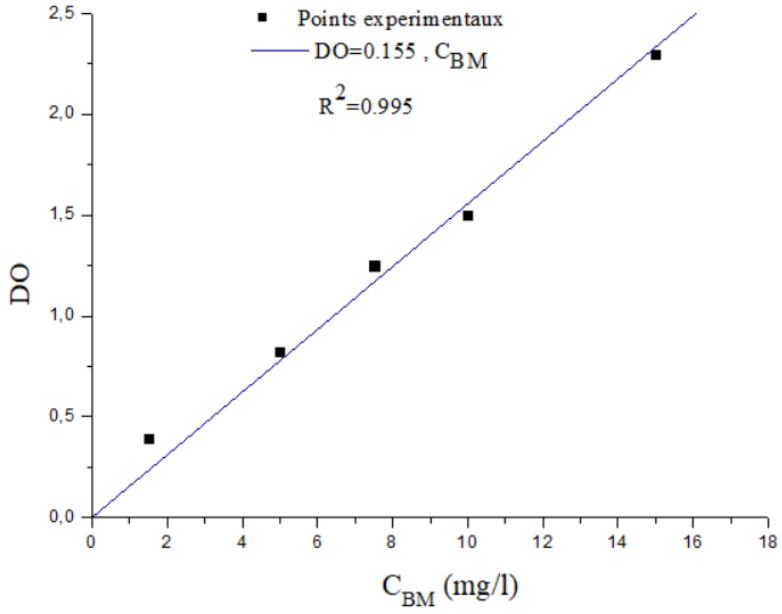


Figure IV.3. Courbe d'étalonnage de BM

IV.3. Etude de décoloration du Bleu de méthylène par la peroxydase de navet

IV.3.1. Effet du pH

Les résultats de l'effet de pH sur le rendement de décoloration des deux colorants par la peroxydase de courgette sont traduits sur la figure IV.4.

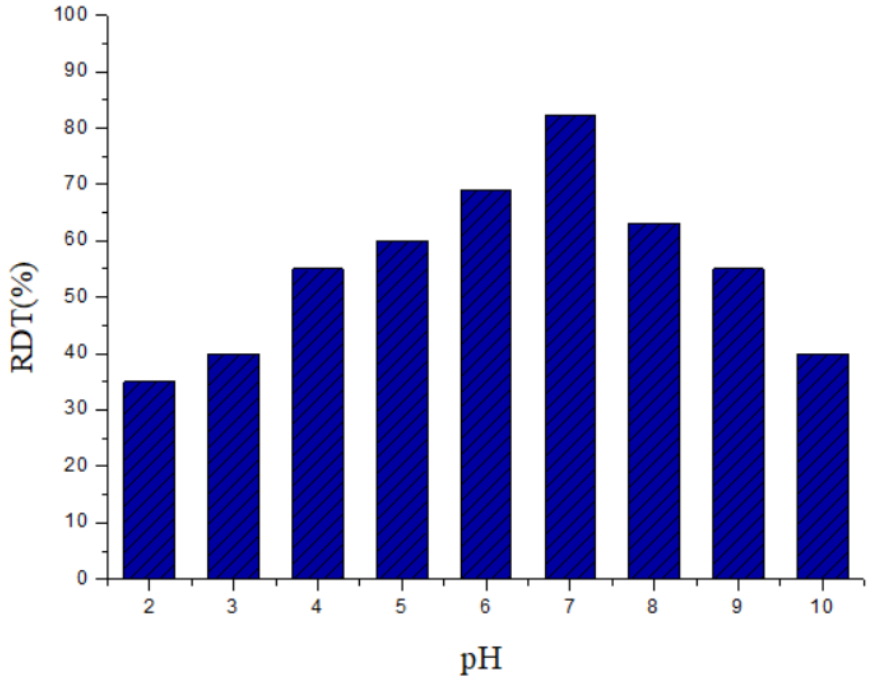


Figure IV.4. Variation du rendement de décoloration du BM en fonction du pH (à T=20°C ; AE=8.78UI/ml ; C_{BM}=10mg/l ; C_{H2O2}=8 mM)

D'après la figure IV.4 , il est clair que le pH correspondant à une décoloration maximale (RDT% =82.26%) est 7.

On observe que la décoloration de BM diminue aux faibles valeurs de pH acide (35% à pH 2) et augmente avec la basicité du milieu jusqu'à la neutralité (activité enzymatique maximale). Au de la de pH 7, l'enzyme commence à se désactiver.

IV.3.2. Effet du temps de contact

Selon les expériences réalisées sur l'estimation du contact optimal de la réaction considérée, nous avons obtenus les résultats représentés sur la figure IV.5.

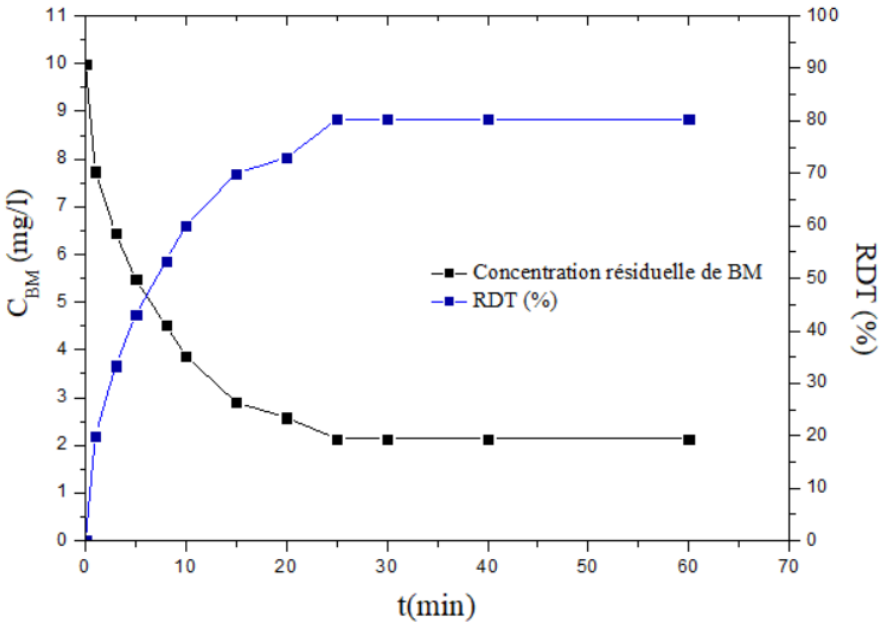


Figure IV.5. Effet de temps sur la transformation du BM (pH7, T=20°C, C_{H2O2}=8Mm, C_{BM}=10 mg/l)

D'après la figure IV.5, on constate que les concentrations du BM diminue jusqu'à ce qu'elle atteind une valeur de 2.14 mg/l (RDT(%)=80.26%) pendant 25 min. Au dela de cette valeur, la concentration reste constante. On exprime alors le temps necessaire qui correspond à la transformation du BM par la peroxydase de navet est 25min.

IV.3.3. Résultats d'optimisation de décoloration du BM par la peroxydase de navet en utilisant la méthode de TAGUCHI

La quantification de décoloration a été réalisée par la détermination des RDT de décoloration. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau IV.1.

Du tableau IV.1, on remarque qu'une décoloration maximale (RDT = 86.92%) est atteinte pour les concentrations de BM de 1.5 mg/l, peroxyde d'hydrogène de 8mM et d'activité enzymatique de 26.34 UI/ml. Les faibles décolorations sont obtenues pour les faibles doses de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène.

a. Résultats des effets moyens

Le tableau IV.2, récapitule les résultats des effets moyens des paramètres ciblés.

Tableau IV.1. Résultats des RDT de décoloration du BM par la peroxydase de navet

Essais	C_{BM}	C_{H2O2}	***AE***	***RDT%***
1	1	1	1	15.2
2	1	1	2	27.17
3	1	1	3	33.07
4	1	2	1	**86.41**
5	1	2	2	43.07
6	1	2	3	75.83
7	1	3	1	53.58
8	1	3	2	**86.92**
9	1	3	3	81.79
10	2	1	1	60
11	2	1	2	49.04
12	2	1	3	50.16
13	2	2	1	55.28
14	2	2	2	56.16
15	2	2	3	51.53
16	2	3	1	48.8
17	2	3	2	48.8
18	2	3	3	48.08
19	3	1	1	47.47
20	3	1	2	52
21	3	1	3	52.1
22	3	2	1	53.04
23	3	2	2	49
24	3	2	3	56.1
25	3	3	1	45.52
26	3	3	2	47.47
27	3	3	3	51.66
RDT_{moy}				52.79

Tableau IV.2. Effets moyens des paramètres de traitement par la peroxydase C_{BM}, C_{H2O2} et AE ; M(RDT) $_{BM}$=52.79%

Effet de C_{BM}			Effet de C_{H2O2}			Effet de AE		
E $C_{BM}1$	E C_{BM} 2	E $C_{BM}3$	E $C_{H2O2}1$	E $C_{H2O2}2$	E $C_{H2O2}3$	EAE1	EAE2	EAE3
3.1063	-0.8037	-2.3026	-9.8748	5.7041	4.1707	-1.0870	-1.7170	2.8041

Les résultats du tableau IV.2 sont exploités sous forme de graphes afin de montrer le paramètre qui possède l'impact le plus important dans le traitement enzymatique, comme l'indique les figures IV.6 à IV.8.

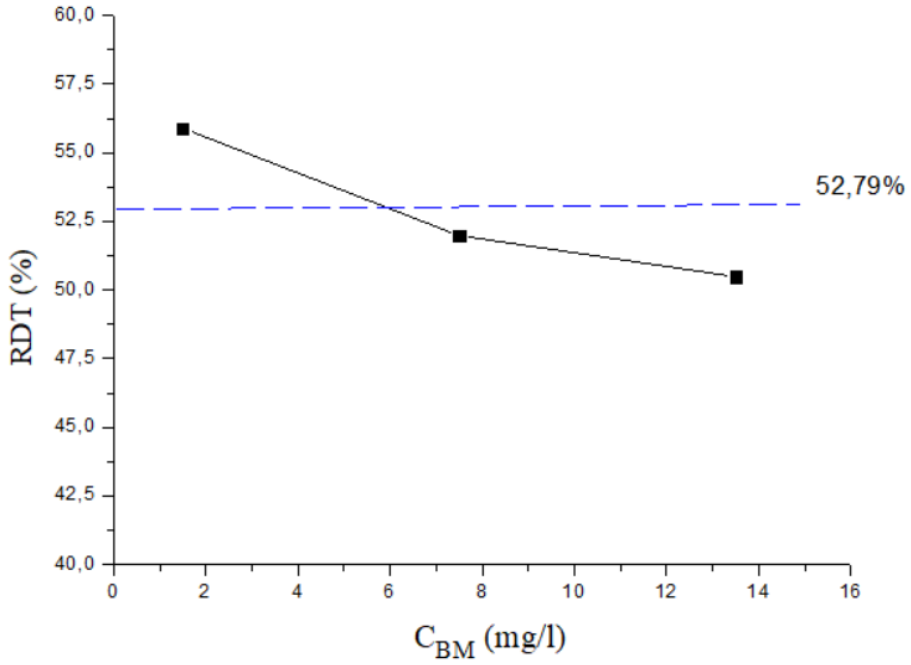


Figure IV.6. Effet moyen de la concentration de BM sur le RDT par la peroxydase de navet.

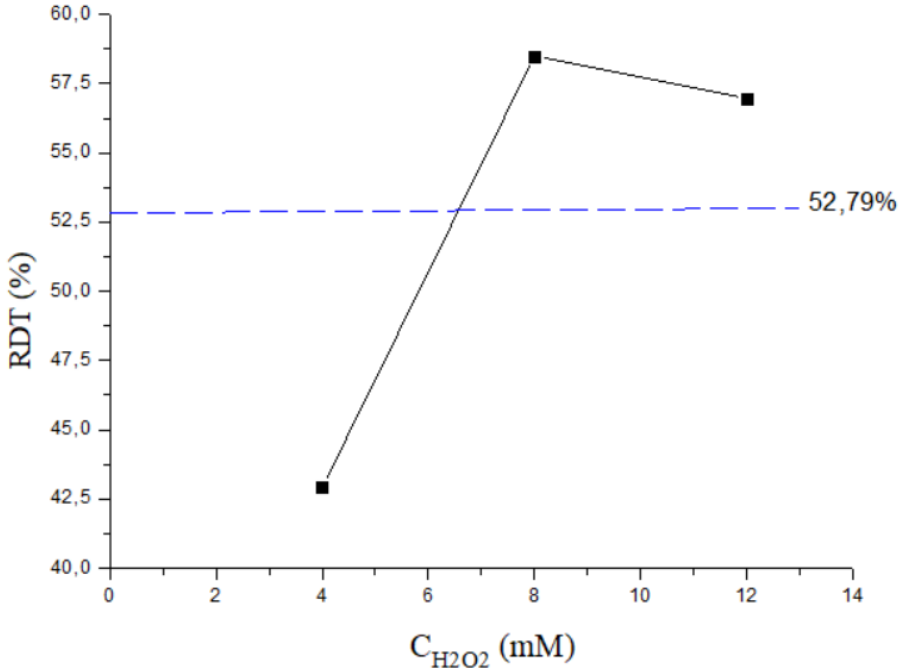


Figure IV.7. Effet moyen de la concentration de H_2O_2 sur le RDT par la peroxydase de navet.

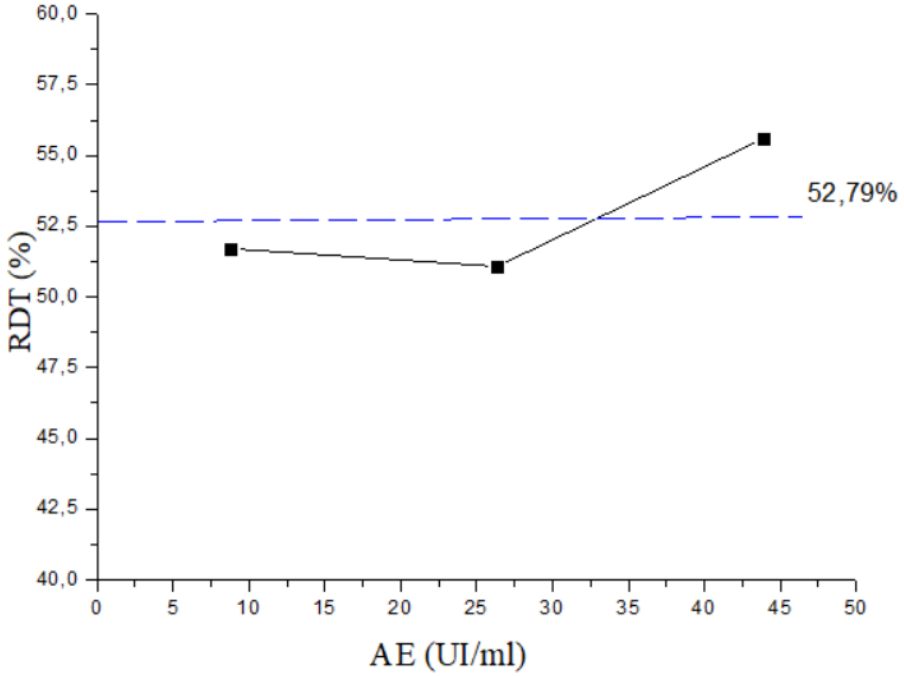


Figure IV.8. Effet moyen de l'AE sur le RDT par la peroxydase de navet.

De ces figures, nous constatons que la concentration de peroxyde d'hydrogène a l'impact le plus important sur la transformation enzymatique du BM. Cependant, l'activité enzymatique a un effet peu important par rapport au peroxyde d'hydrogène.

En ce qui concerne la concentration du BM, nous remarquons que son effet n'est pas négligeable aux niveaux 1 et 3.

b. Résultats des interactions entre les paramètres

Les valeurs des interactions entre les paramètres étudiés sont calculées et les résultats sont illustrés sur le tableau IV.3.

Tableau IV.3. Résultats d'interactions entre les paramètres influençant la décoloration enzymatique.

Interactions entre les paramètres de traitement enzymatique : C_{BM} et C_{H2O2} $M(RDT)_{BM}$= 52.79%			
C_{BM} / C_{H2O2} :	Niveau1	Niveau 2	Niveau 3
Niveau1	$INC_{BM}1C_{H2O2}1$= -20.8719	$INC_{BM}2C_{H2O2}1$= 6.839	$INC_{BM}3C_{H2O2}1$=14.032
Niveau 2	$INC_{BM}1C_{H2O2}2$=10.9581	$INC_{BM}2C_{H2O2}2$=-3.3641	$INC_{BM}3C_{H2O2}2$=-7.594
Niveau 3	$INC_{BM}1C_{H2O2}3$= 9.9137	$INC_{BM}2C_{H2O2}3$=-3.475	$INC_{BM}3C_{H2O2}3$=-6.438
Interactions entre les paramètres de traitement enzymatique : C_{BM} et AE $M(RDT)_{BM}$= 52.79%			
C_{BM} : / AE :	Niveau1	Niveau 2	Niveau 3
Niveau1	INC_{BM}1AE1=-3.076	INC_{BM}2AE1= -1.7896	INC_{BM}3AE1=4.8659
Niveau 2	INC_{BM}1AE2=3.797	INC_{BM}2AE2=1.0670	INC_{BM}3AE2=-4.8641
Niveau 3	INC_{BM}1AE3=-0.720	INC_{BM}2AE3= 0.7226	INC_{BM}3AE3= -0.0019
Interactions entre les paramètres de traitement enzymatique : C_{H2O2} et AE $M(RDT)_{BM}$= 52.79%			
C_{H2O2} : / AE :	Niveau1	Niveau 2	Niveau 3
Niveau1	INC_{H2O2}1AE1=-0.935	INC_{H2O2}2AE1= 1.541	INC_{H2O2}3AE1=-0.606
Niveau 2	INC_{H2O2}1AE2=7.505	INC_{H2O2}2AE2=-7.364	INC_{H2O2}3AE2=-0.142
Niveau 3	INC_{H2O2}1AE3= -6.570	INC_{H2O2}2AE3=5.822	INC_{H2O2}3AE3=0.748

Afin de montrer l'interaction entre les trois paramètres dont dépend la décoloration, nous avons exploité ces résultats sous forme de figures : IV.9 à IV.11.

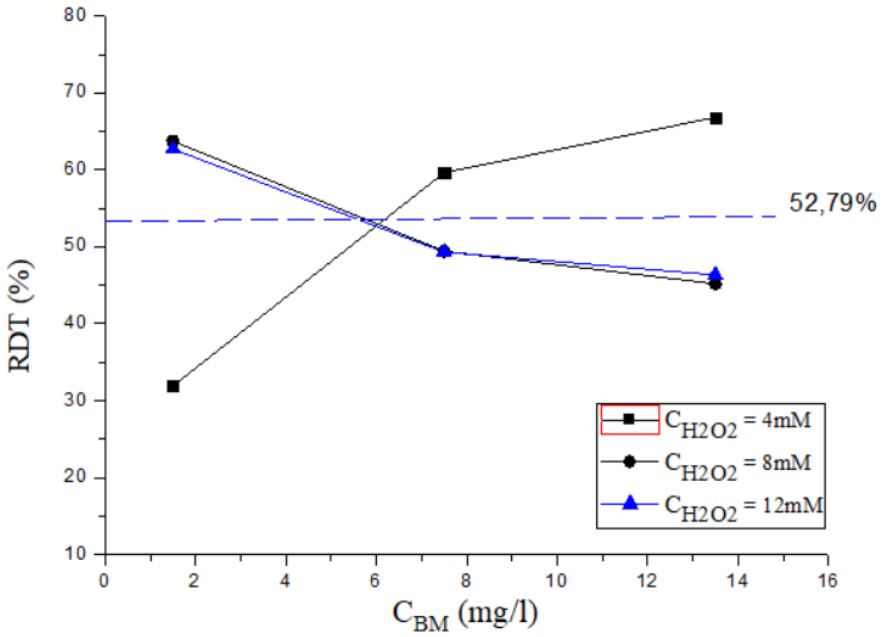


Figure IV.9. Interaction entre la concentration du BM et de H_2O_2pour la décoloration enzymatique du BM.

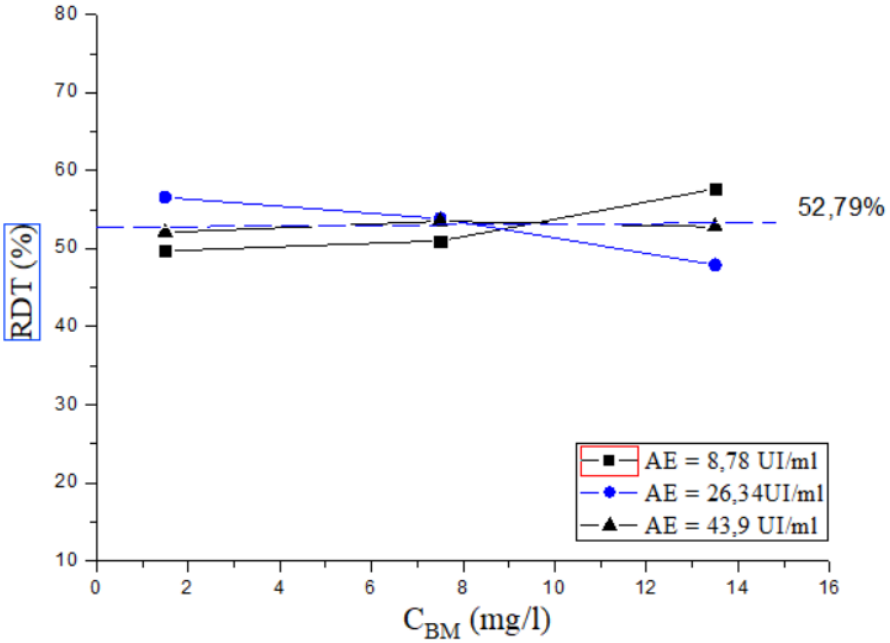


Figure IV.10. Interaction entre la concentration du BM et l'activité enzymatique pour la décoloration enzymatique du BM.

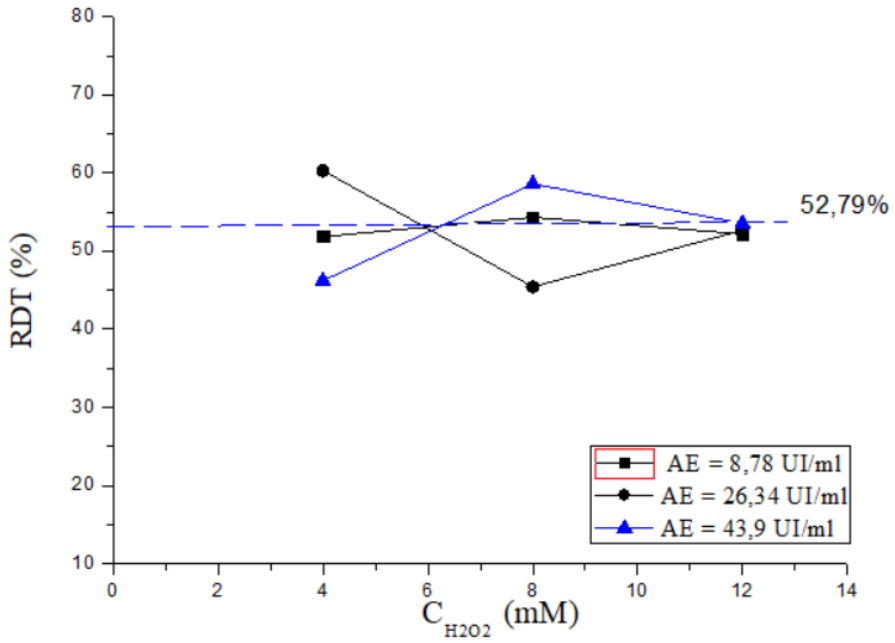


Figure IV.11. Interaction entre la concentration de H_2O_2et l'activité enzymatique pour la décoloration enzymatique du BM.

De ces figures nous pouvons tirer les constatations suivantes :

- La concentration du BM et celle du H_2O_2 interagissent fortement pour une dose de ce dernier de 4 mM. Au-delà de cette valeur, le substrat et le co-substrat n'interagissent pas ;
- Les variations de la concentration du substrat et de l'activité enzymatique n'ont qu'un léger effet sur la décoloration enzymatique du BM.
- L'interaction entre la concentration de H_2O_2 et l'AE est faible pour une valeur de cette dernière de 8.78UI/ml et même pour tout l'intervalle étudié de l'activité à la concentration de 12 mM de peroxyde d'hydrogène.

c. Résultats des rendements de décoloration théoriques par la peroxydase de navet

Le tableau IV.4, récapitule les valeurs des rendements mesurés et les rendements théoriques pour le BM. Ces valeurs sont exploitées graphiquement sur la figure IV.12.

D'après le tableau IV.4 et la figure IV.12, nous constatons qu'il existe quelques écarts (un maximum de 14.63 % au niveau 4) entre les RDT mesurés et calculés aux niveaux considérés pour les trois paramètres étudiés. Cependant, cette différence peut être due à l'existence d'autres paramètres non contrôlés dont dépend le procédé de traitement par la peroxydase.

Tableau IV.4. Rendements mesurés et rendements théoriques de décoloration enzymatique du BM

Essais	***RDT mesuré $_{BM}$(%)***	***RDT théorique $_{BM}$ (%)***	***Ecart (RDT mesuré $_{BM}$- RDT théorique $_{BM}$)***
1	15.2	20.0481	-4,8481
2	27.17	23.1815	3,9885
3	33.07	32.210	0,86
4	86.41	71.78	14,63
5	43.07	57.566	-14,496
6	75.83	75.96	-0,13
7	53.58	63.362	-9,782
8	**86.92**	76.412	10,508
9	81.79	82.514	-0,724
10	60	54.841	5,159
11	49.04	53.958	-4,918
12	50.16	50.400	-0,24
13	55.28	64.539	-9,259
14	56.16	46.309	9,851
15	51.53	52.121	-0,591
16	48.8	44.699	4,101
17	48.8	53.732	-4,932
18	48.08	47.248	0,832
19	47.47	47.780	-0,31
20	52	51.070	0,93
21	52.1	52.719	-0,619
22	53.04	58.411	-5,371
23	49	44.354	4,646
24	56.1	55.373	0,727
25	45.52	39.838	5,682
26	47.47	53.044	-5,574
27	51.66	51.767	-0,107

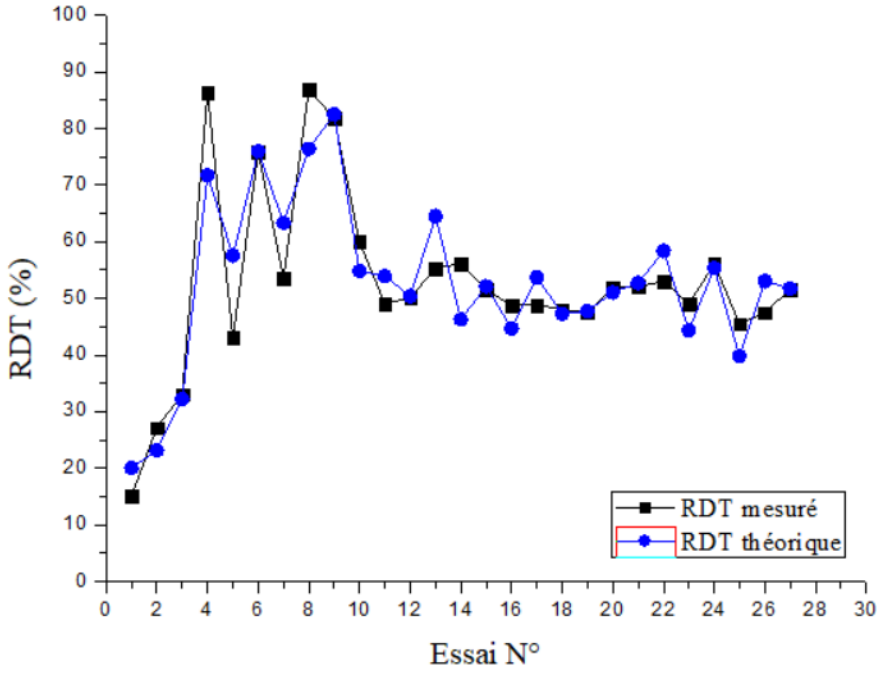


Figure IV.12. Représentation graphique des rendements de décoloration enzymatique mesurés et théoriques

IV.4. Etude de décoloration du Bleu de méthylène par la méthode de Fenton

IV.4.1. Effet du pH

Après le traitement du BM par le procédé Fenton, on obtient les résultats représentés sur la figure IV.13. Les résultats obtenus montrent qu'une décoloration maximale correspond à un pH3

Selon cette figure, lorsque la valeur du pH est supérieure à 3, la capacité d'oxydation Fenton est diminuée en raison de la décomposition du peroxyde d'hydrogène et la désactivation de catalyseur ferreux avec la formation de complexe hydroxyle de fer. Par conséquent, le processus Fenton est sensible aux valeurs du pH.

IV.4.2. Effet du temps de contact

Après le traitement du BM par procédé de fenton on obtient les résultats indiqués sur la figure IV.14.

On constate que, la concentration du BM a diminué au cours du temps, la décoloration maximale est atteinte après une durée est de 5 min sous les conditions de l'expérience, qui correspondent à un rendement de : 87%.

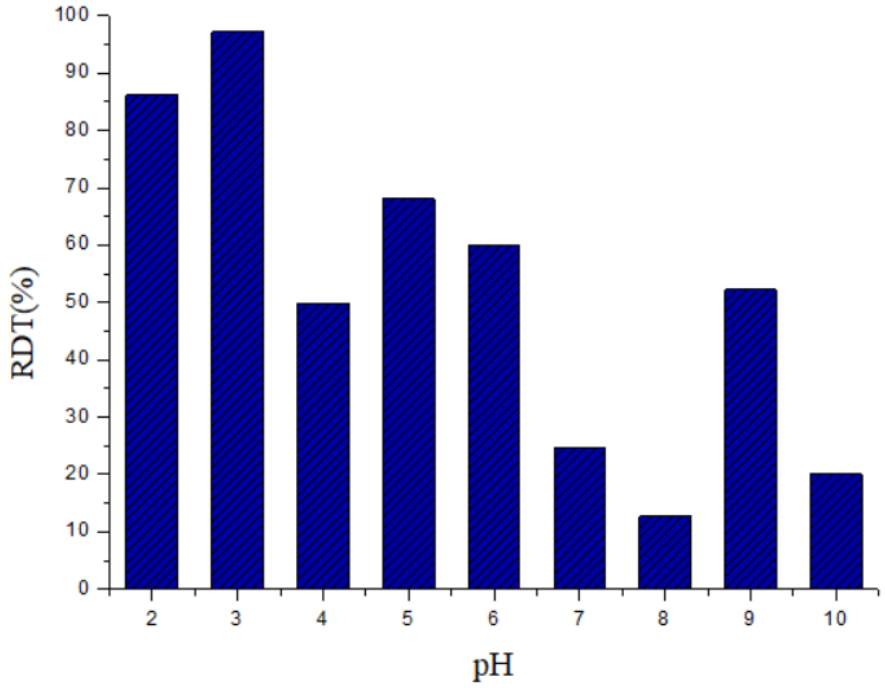


Figure IV.13. Variation du rendement de décoloration du BM en fonction du pH (à T=20°C ; Fe^{2+}=2mM ; C_{BM}=10mg/l ; C_{H2O2}=8 mM).

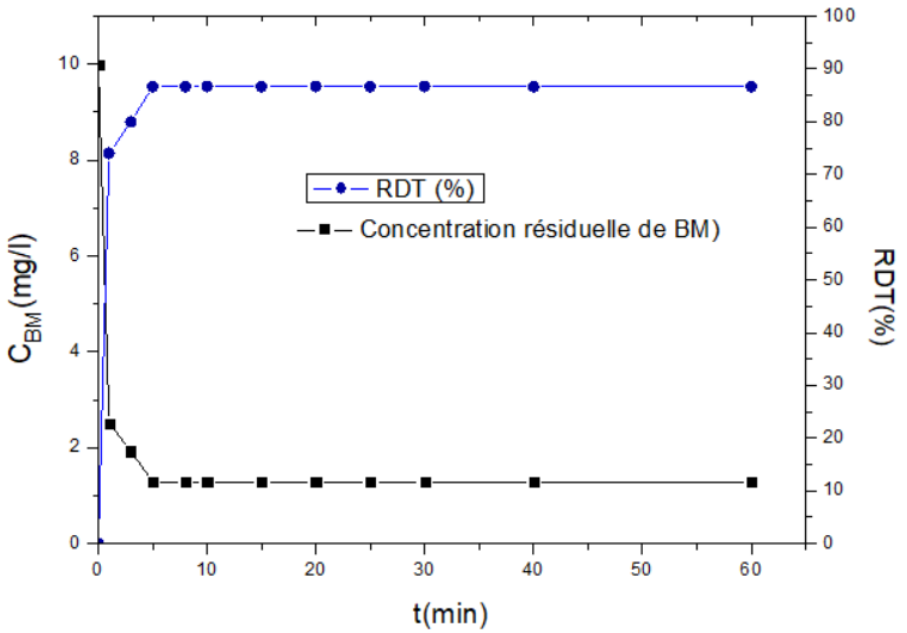


Figure IV.14. Effet du temps de contact sur la transformation du BM (pH2, T=20°C ; $C_{Fe^{2+}}$=2 mM ;C_{BM}=10 mg/l ; C_{H2O2}=8 mM).

IV.4.3. Résultats d'optimisation de décoloration du BM par la méthode Fenton en utilisant la méthode de TAGUCHI

La quantification de décoloration a été réalisée par la détermination des RDT de décoloration. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5. Résultats des RDT de décoloration du BM par la méthode Fenton

Essais N^0	***C_{BM}***	***C_{H2O2}***	***C_{Fe2+}***	***RDT(%)***
1	1	1	1	71.62
2	1	1	2	57.37
3	1	1	3	66.03
4	1	2	1	54.89
5	1	2	2	59.00
6	1	2	3	71.74
7	1	3	1	44.62
8	1	3	2	52.86
9	1	3	3	81.68
10	2	1	1	75.32
11	2	1	2	61.94
12	2	1	3	52.76
13	2	2	1	**95.03**
14	2	2	2	44.22
15	2	2	3	53.33
16	2	3	1	52.48
17	2	3	2	**96.63**
18	2	3	3	**94.29**
19	3	1	1	90.17
20	3	1	2	80.66
21	3	1	3	62.66
22	3	2	1	55.25
23	3	2	2	62.13
24	3	2	3	74.70
25	3	3	1	58.25
26	3	3	2	67.83
27	3	3	3	74.83
M (*Rdt) (%)*				**67.12**

De ce tableau, on constate qu'une décoloration maximale correspond aux trois valeurs (RDT = 96.63%, 95.03% et 94.29%) est atteinte pour les concentrations de BM de 20 mg/l, peroxyde d'hydrogène de : 8mM et 14 mM et de teneur des ions ferriques de 2 Mm et 4mM . Les faibles décolorations sont obtenues pour les faible doses des réactifs Fenton.

a. Résultats des effets moyens

Le tableau IV.6, récapitule les résultats des effets moyens des paramètres ciblés.

Tableau IV.6. Effets moyens des paramètres de traitement par la méthode Fenton : C_{BM}, C_{H2O2}, C_{Fe2+} ; M(RDT) $_{BM}$=67.12%

Effet de C_{BM}			Effet de C_{H2O2}			Effet de C_{Fe2+}		
E $C_{BM}1$	E $C_{BM}2$	E $C_{BM}3$	E $C_{H2O2}1$	E $C_{H2O2}2$	E $C_{H2O2}3$	E $C_{Fe2+}1$	E $C_{Fe2+}2$	E $C_{Fe2+}3$
-4.92	2.43	2.49	1.61	-3.76	2.15	-0.72	-2.38	3.1

Les résultats de tableau IV.6 sont représentés sous forme d'allures configurées sur les figures IV.15 à IV.16.

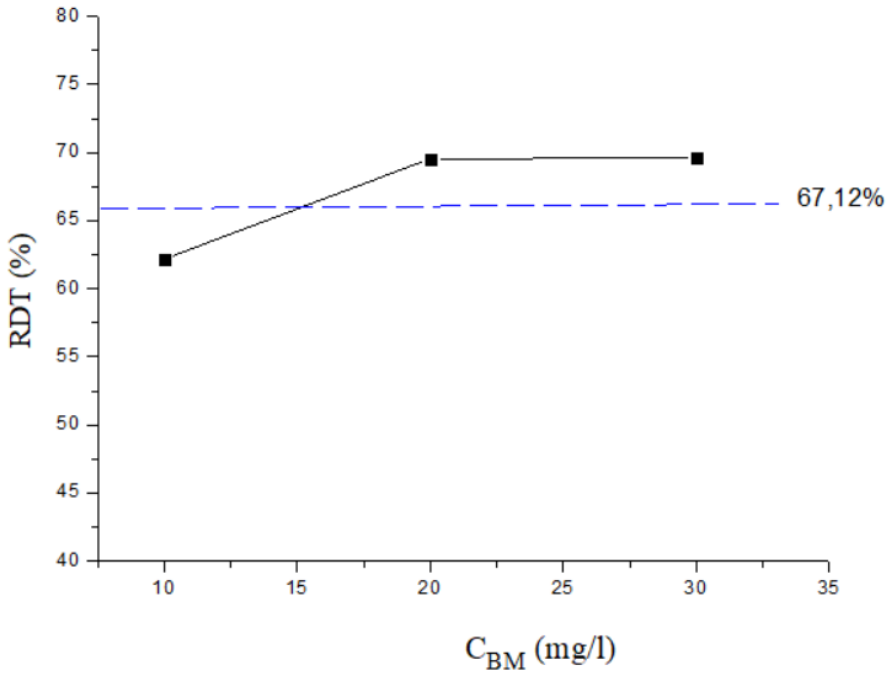


Figure IV.15. Effet moyen de la concentration de BM sur le RDT par la méthode Fenton.

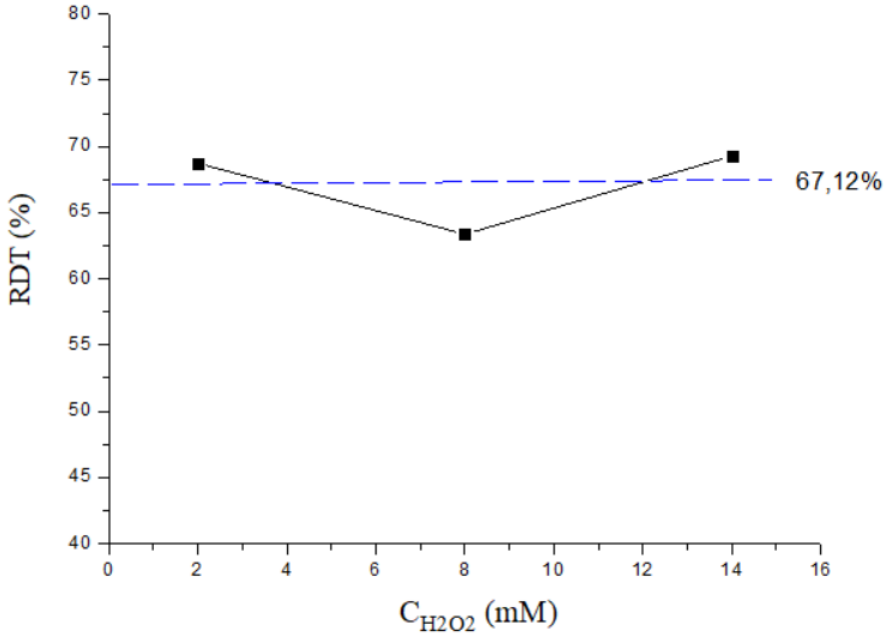


Figure IV.16. Effet moyen de la concentration de H_2O_2 sur le RDT par la méthode Fenton.

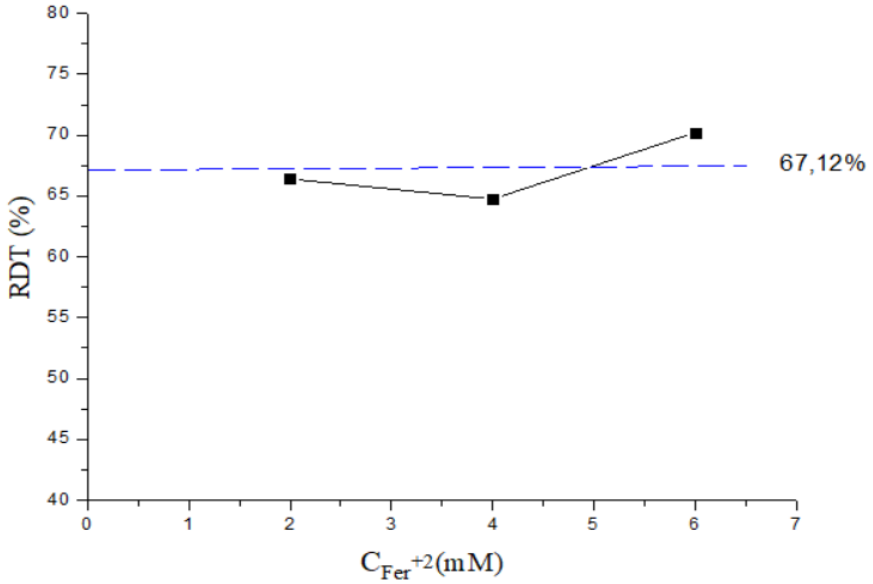


Figure IV.17. Effet moyen de la concentration de Fe^{2+} sur le RDT par la méthode Fenton.

A partir des figures illustrées, nous constatons que les trois paramètres étudiés ont des impacts comparables vis-à-vis la décoloration du bleu de méthylène par la méthode Fenton.

b. Résultats des interactions entre les paramètres

Les valeurs des interactions entre les paramètres étudiés sont calculées et les résultats sont illustrés sur le tableau IV.7.

Tableau IV.7. Résultats d'interactions entre les paramètres influençant la décoloration chimique.

Interaction entre les paramètres de Fenton C_{BM} et C_{H2O2};M(RDT)$_{BM}$=67.12(%)			
C_{BM} / C_{H2O2}	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Niveau 1	INC$_{BM}$ 1C$_{H2O2}$ 1=1.202	INC$_{BM}$ 2C $_{H2O2}$ 1=3.432	INC$_{BM}$ 3C $_{H2O2}$ 1=-4.633
Niveau 2	INC$_{BM}$ 1C $_{H2O2}$2=-7.819	INC$_{BM}$ 2C $_{H2O2}$2=-1.606	INC$_{BM}$ 3C $_{H2O2}$2=9.425
Niveau 3	INC$_{BM}$ 1C $_{H2O2}$3=6.617	INC$_{BM}$ 2C $_{H2O2}$3=-1.826	INC$_{BM}$ 3C $_{H2O2}$3=-4.791
Interaction entre les paramètres de Fenton : C_{BM} et C_{Fer}^{+2};M(RDT)$_{BM}$=67.12(%)			
C_{BM} / C_{Fer}^{+2}	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Niveau 1	INC$_{BM}$1C C_{Fer}^{+2} 1=-4.439	INC$_{BM}$2 C_{Fer}^{+2} 1=-3.407	INC$_{BM}$3 C_{Fer}^{+2}1=7.846
Niveau 2	INC$_{BM}$1C C_{Fer}^{+2}2= 5.439	INC$_{BM}$2 C_{Fer}^{+2}2=0.425	INC$_{BM}$3 C_{Fer}^{+2} 2=-5.865
Niveau 3	INC$_{BM}$1C C_{Fer}^{+2}3=-1.000	INC$_{BM}$2 C_{Fer}^{+2} 3=2.982	INC$_{BM}$3 C_{Fer}^{+2}3=-1.981
Interaction entre les paramètres de Fenton : C_{H2O2} et C_{Fe}^{2+};M(RDT)$_{BM}$=67.12*(%)*			
C_{H2O2} / C_{Fe}^{2+}	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Niveau 1	IN C_{H2O2}1 C_{Fe}^{2+}1 =11.029	IN C_{H2O2}2 C_{Fe}^{2+}1=0.315	IN C_{H2O2}3 C_{Fe}^{2+} 1=-11.345
Niveau 2	IN C_{H2O2}1 C_{Fe}^{2+} 2=5.743	IN C_{H2O2}2 C_{Fe}^{2+} 2=-5.865	IN C_{H2O2}3 C_{Fe}^{2+}2=0.122
Niveau 3	IN C_{H2O2} 1 C_{Fe}^{2+}3=-16.772	IN C_{H2O2}2 C_{Fe}^{2+} 3=5.549	IN C_{H2O2}3 C_{Fe}^{2+}3=11.223

Afin de montrer l'interaction entre les trois paramètres dont dépend la décoloration chimique, nous avons exploité traduit ces résultats sous forme de figures : IV.18 à IV.20.

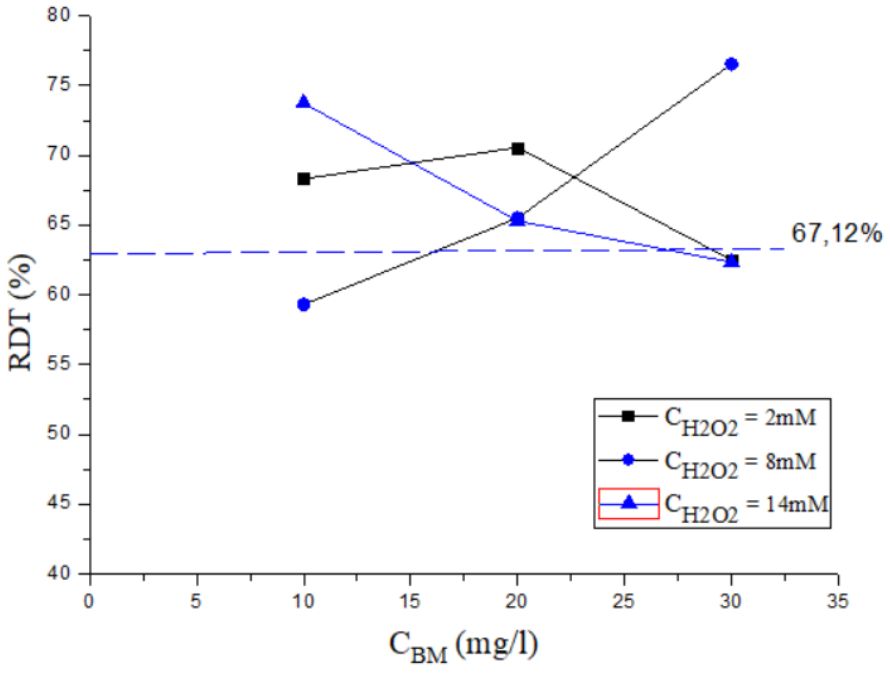


Figure IV.18. Interaction entre la concentration du BM et de H_2O_2pour la décoloration chimique du BM.

.

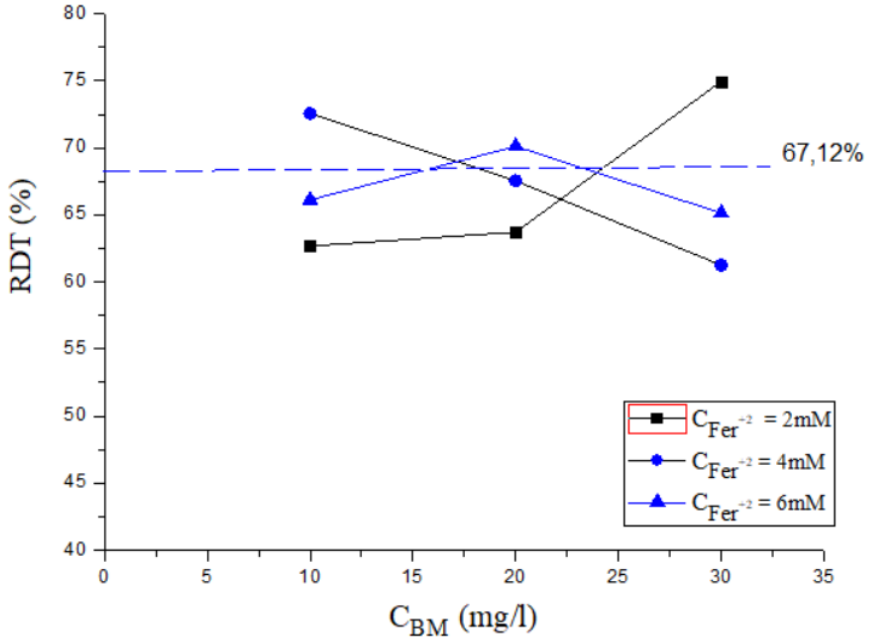


Figure IV.19. Interaction entre la concentration du BM et de Fe^{2+}pour la décoloration chimique du BM.

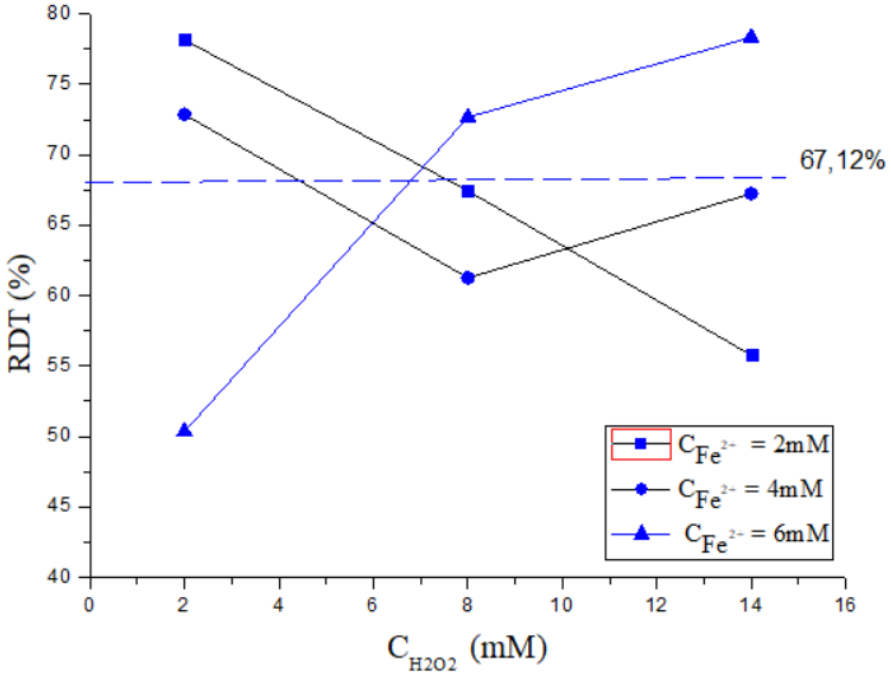


Figure IV.20. Interaction entre la concentration du H_2O_2 et de Fe^{2+}pour la décoloration chimique du BM.

L'analyse de ces figures, nous constatons que :

- Entre le BM et le H_2O_2, la variation des concentrations, influe la décoloration chimique (interaction maximale de 9.425%). Cependant aux concentrations de H_2O_2 de 14mM, et pour les teneurs de BM maximales, cet effet devient négligeable.
- Entre le BM et le Fe^{2+}, la variation des concentrations a peu d'effet par rapport a celui entre le colorant et le peroxyde d'hydrogène.
- Entre le H_2O_2et le Fe^{2+}, l'effet généré par la variation des teneurs de ces réactifs, est plus important, dont l'interaction a atteint -6.772%.

c. Résultats des rendements de décoloration théoriques par la méthode Fenton

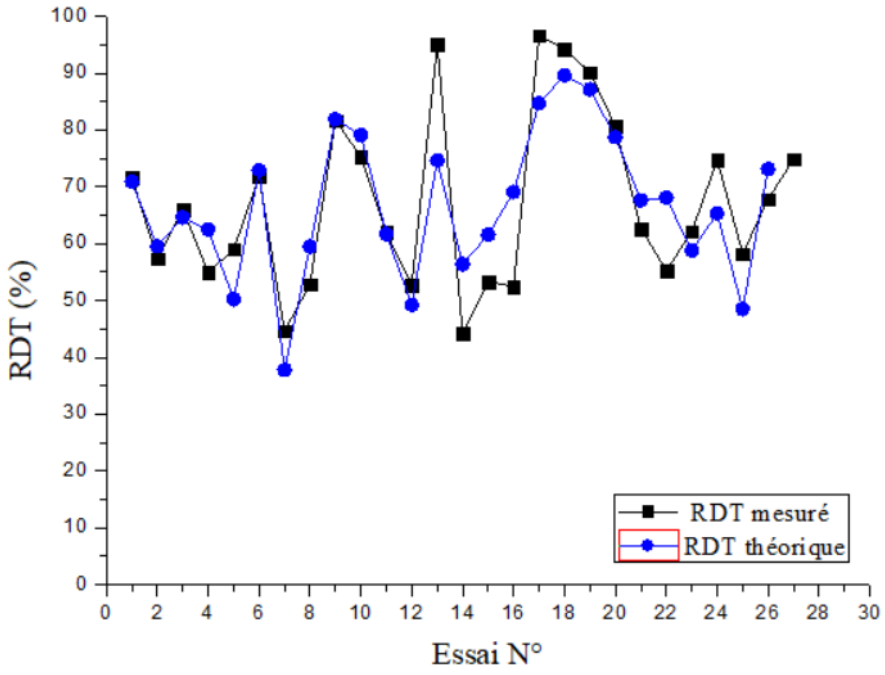
Le tableau IV.8, récapitule les valeurs des rendements mesurés et les rendements théoriques pour le BM. Ces valeurs sont exploitées graphiquement sur la figure IV.21.

D'après le tableau IV.8 et la figure IV.21, nous constatons qu'il existe quelques écarts (un maximum de -16.61 % au niveau 16) entre les RDT mesurés et calculés aux niveaux considérés pour les trois paramètres étudiés. Ces différences entre les résultats mesurés et les résultats théoriques, peut être expliquée par le fait que l'oxydation par les réactifs Fenton dépend aux d'autres paramètres que les concentrations du colorant, du peroxyde d'hydrogène et des ions ferriques.

Tableau IV.8. Rendements de décoloration chimique mesurés et rendements théoriques du BM

Essais N^{O}	*RDT mesuré $_{BM}$*	*RDT théorique(%)*	*Ecart (RDT mesuré $_{BM}$- RDT théorique) (%)*
1	71.62	70.878	0,742
2	57.37	59.531	-2,161
3	66.03	64.612	1,419
4	54.89	62.462	7,57-
5	59.00	50.221	8,779
6	71.74	72.94	-1,2
7	44.62	37.79	6,83
8	52.86	59.48	-6,62
9	81.68	81.9	-0,22
10	75.32	79.1	-3,78
11	61.94	61.69	0,25
12	52.76	49.23	3,53
13	95.03	74.65	20,38
14	44.22	56.38	-12,16
15	53.33	61.56	-8,23
16	52.48	69.09	-16,61
17	96.63	84.73	11,9
18	94.29	89.6	4,69
19	90.17	87.14	3,03
20	80.66	78.74	1,92
21	62.66	67.6	-4,94
22	55.25	68.06	-12,81
23	62.13	58.77	3,36
24	74.70	65.28	9,42
25	58.25	48.48	9,77
26	67.83	73.12	-5,29
27	74.83	79.32	-4,49

Figure IV.21. Représentation graphique des rendements de décoloration chimique mesurés et théoriques



IV.5. Expression des modèles matriciels pour les traitements enzymatique et chimique du BM

Afin d'évaluer les rendements de décoloration aux niveaux étudiés et aux autres niveaux, une exécution du logiciel MATLAB 7 après l'élaboration d'un programme a été réalisée. Le modèle matriciel de TAGUCHI est donné par les expressions IV.1 et IV.2 pour les applications par la peroxydase et Fenton respectivement.

$$
\begin{aligned}
RDT_{th}(i,j,k) &= 52.79 + (3.106 - 0.803 - 2.30)(C_{BM}) \\
&+ (9.8748 - 9.875\ 5.704\text{à}(C_{H2O2}) + (-1.087 \quad -1.717 \quad 2.804)(AE) \\
&+ (INC_{BM})^t \begin{bmatrix} -20.872 & 10.958 & 9.914 \\ 6.839 & -3.364 & -3.475 \\ 14.032 & -7.594 & -6.438 \end{bmatrix} \cdot (INC_{H2O2}) \\
&+ (INC_{BM})^t \begin{bmatrix} -3.076 & 3.797 & -0.720 \\ -1.789 & 1.067 & 0.723 \\ 4.866 & -4.864 & -0.002 \end{bmatrix} (INAE) \\
&+ (INC_{H2O2})^t \begin{bmatrix} -0.935 & 7.505 & -6.570 \\ 1.541 & -7.364 & 5.822 \\ -0.606 & -0.142 & 11.223 \end{bmatrix} (INAE)
\end{aligned}
\qquad \text{(IV.1)}
$$

$$RDT_{th}(i, j, k) = 67.12 + (-4.92 \quad 2.43 \quad 2.49)(C_{BM}) + (1.61 \quad -3.76 \quad 2.15)(C_{H2O2})$$
$$+ (-0.72 - 2.383.1)(Fe^{2+})$$
$$+ (INC_{BM})^t \begin{bmatrix} 1.202 & -7.819 & 6.617 \\ 3.432 & -1.606 & -1.826 \\ -4.633 & 9.425 & -4.791 \end{bmatrix} \cdot (INC_{H2O2})$$
$$+ (INC_{BM})^t \begin{bmatrix} -4.439 & 5.439 & -1.000 \\ -3.407 & 0.425 & 2.982 \\ 7.846 & -5.865 & -1.981 \end{bmatrix} \cdot (INFe^{2+})$$
$$+ (INC_{BM})^t \begin{bmatrix} 11.029 & 5.743 & -16.772 \\ 0.315 & -5.865 & 5.549 \\ -11.345 & 0.122 & 11.223 \end{bmatrix} \cdot (INFe^{2+}) \quad \text{(IV.2)}$$

IV.6. Validation du modèle établi

Le modèle exprimé par l'expression IV.2, a été validé aux niveaux donnés sur le tableau IV.9.

Ainsi, les valeurs de RDT mesurés et calculés sont données sur ce tableau.

Tableau IV.9. Validation du modèle IV.2.

Essais N°	***C_{BM} (mg/l)***	***C_{H2O2} (mM)***	***C_{Fe}^{2+} (mM)***	***RDT $_{mesuré}$ (%)***	***RDT $_{calculé}$ (%)***	***Ecart (RDT $_{mesuré}$- RDT $_{calculé}$) (%)***
1	20	14	5	94.46	88.51	5,95
2	30	10	4	58.00	59.73	-1,73
3	15	8	4	69.15	69.23	-0,08
4	25	12	3	51.30	53.76	-2,46

Nous constatons de cette opération, que le modèle établi ne présente pas un écart important avec les valeurs obtenues expérimentalement, d'où nous pouvons appliquer ce modèle sur la décoloration Fenton pour toutes les valeurs de l'intervalle pris pour la concentration du BM, de peroxyde d'hydrogène et des ions ferrique.

IV.7. Caractérisation des produits de transformation du bleu de méthylène issus des traitements enzymatique et Fenton

IV.7.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis

Les surnageant récupérés des essais N°4 et 8 du traitement enzymatique, correspondants aux maximum de décoloration (86.41% et 86.92%) ont été analysés par spectrophotomètre UV-Vis entre 200 et 800nm. Les figures IV.21 et IV.22 illustrent ces résultats.

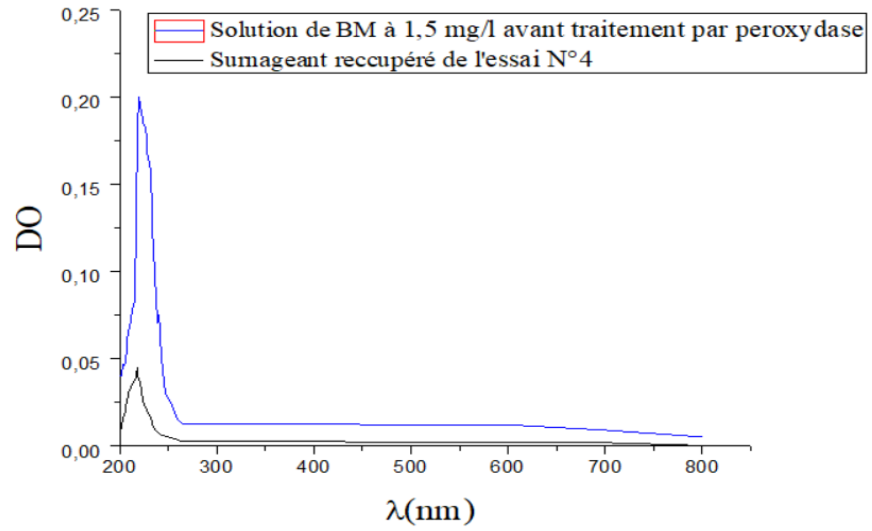


Figure IV.22. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement par la peroxydase de navet (Essai N°4)

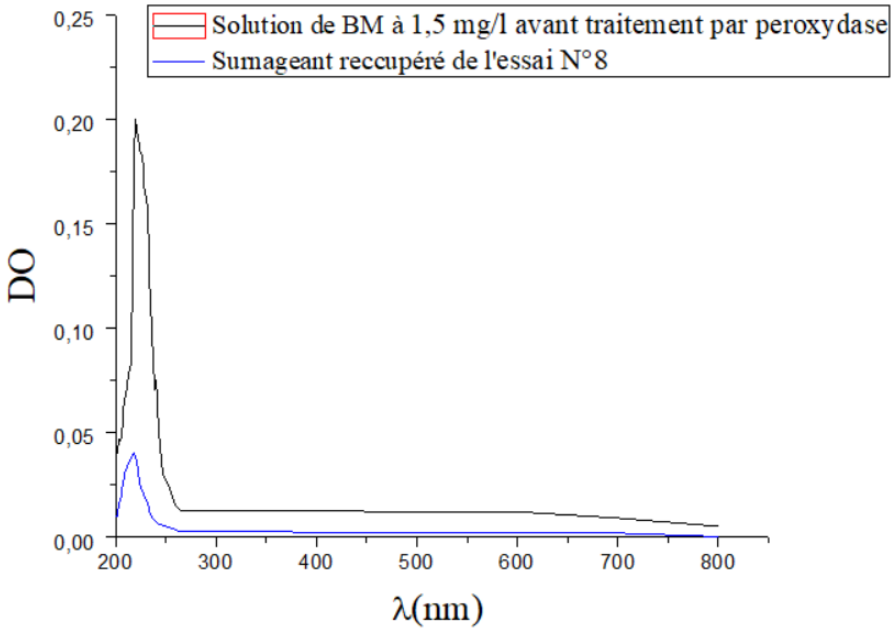


Figure IV.23. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement par la peroxydase de navet (Essai N°8)

De même, pour le traitement par la méthode Fenton, les surnageant récupérés des essais : 13, 17 et 18 sont analysés par UV-Vis et les résultats sont illustrés sur les figures IV.23 à IV.25.

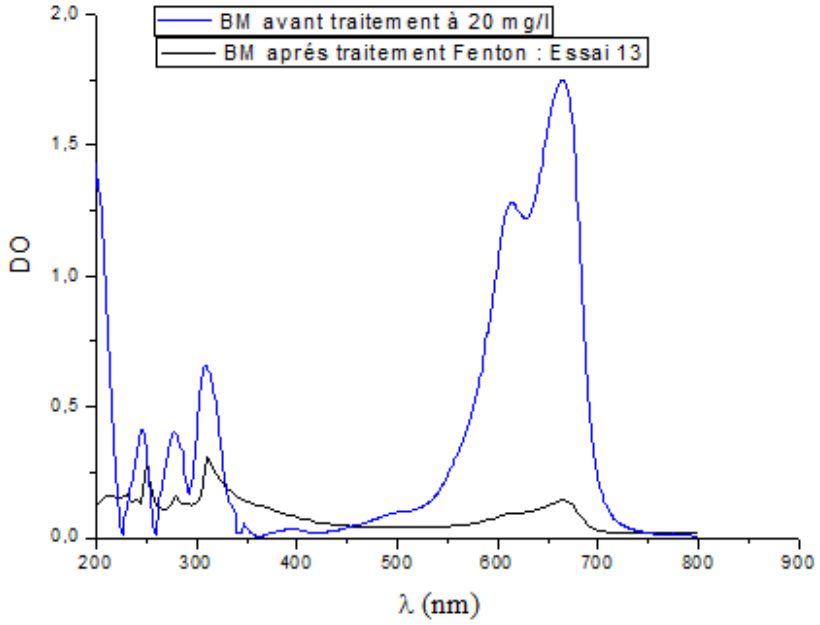


Figure IV.24. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement par la méthode Fenton (Essai N°13)

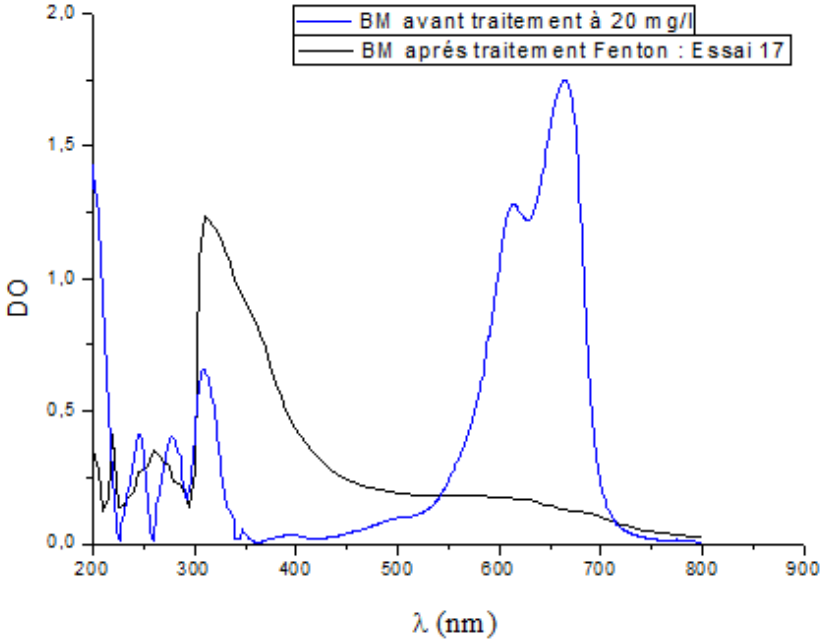


Figure IV.25. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement par la méthode Fenton (Essai N°17)

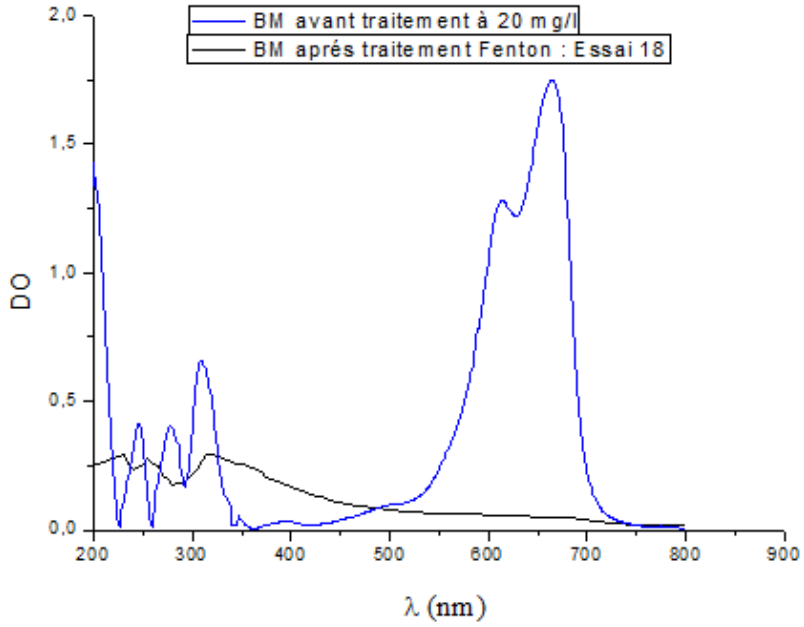


Figure IV.26. Résultats d'analyse UV-Vis de la solution du BM avant et après traitement par la méthode Fenton (Essai N°18)

De ces figures, nous constatons que la peroxydase de navet a réagi sur le groupement chromophore de la molécule du BM : absence d'un pic dans la région du visible (664nm). Ainsi, les radicaux hydroxyles ont réagi avec la molécule du BM, et cela a été traduit par une diminution importante de l'absorbance dans la région du visible.

IV.7.2. Caractérisation par spectrométrie FTIR

Les spectres FTIR des précipités du BM, du traitement enzymatique et du traitement Fenton, sont représentés sur les figures IV.26, IV.27 et IV.28 respectivement.

Les fréquences d'absorption des différents échantillons, sont résumées sur le tableau IV.10.
Il est évident de ces résultats, la disparition de certaines fréquences d'absorptions : transformation des liaisons. Donc, les produits contenus dans les précipités ont été obtenu après la transformation de la molécule du BM que ce soit par voie enzymatique ou chimique.

Tableau IV.10. Fréquences d'absorption d'IR du BM et de ses produits issus des deux traitements appliqués.

Fréquence mesurée du BM (cm^{-1})	***Fréquence mesurée du précipité enzymatique (cm^{-1})***	***Fréquence mesurée du précipité Fenton (cm^{-1})***	***Fréquence théorique (cm^{-1})***	***Vibration de liaison***	***Groupement chimique***
617.24	Absence	617.24	700-600	C-S	
663.53	700	Absence	730-665	C=C	Aromatique
1481.38	Absence	Absence	1470-1490	C=N	Imine
1400-1600	1543.1	1550.82	1600-1450	C=C	Aromatique
1000-1200	1000-1200	Absence	1220-1020	C-N	Amine 3ème
825.36 et 871.58 : fortes	859.71: faible	871.58 : faible	900-800	C-H déformation	Aromatique
1134.18 : forte	1103.32 : forte	1111.03 : moyenne	1225–950	C-H	Aromatique
1394 : forte	1396.51 : faible	1396 : moyenne	1398-1385	C-H	CH_3 aliphatique
2924.28	2924.24	2931.9	2975-2950	C-H	CH_2 aliphatique
3441.12	3302.24	3441.12	3500-3100	N-H	Amine 3ème

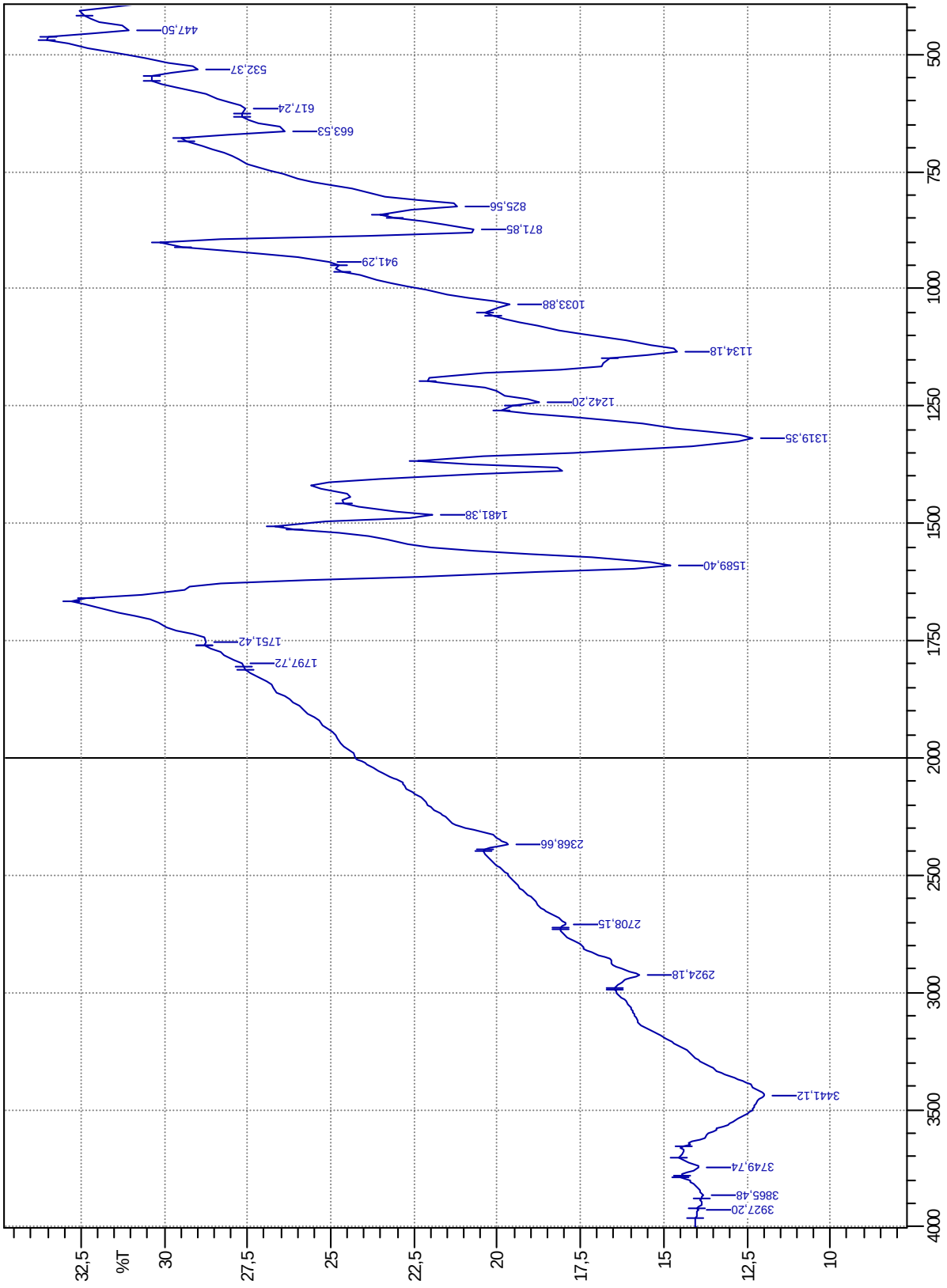


Figure IV.27. Spectre FTIR du BM

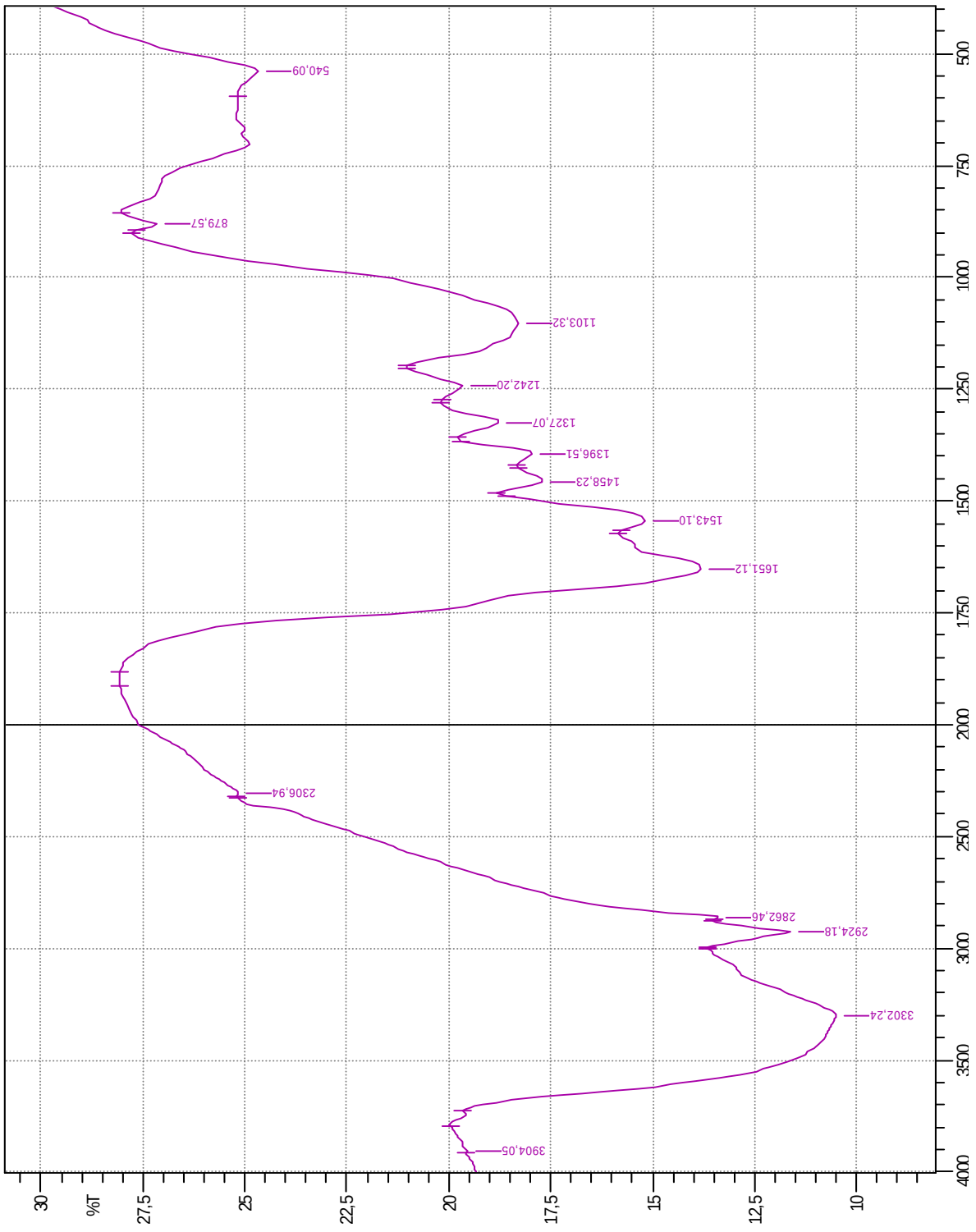


Figure IV.28. Spectre FTIR du précipité du BM obtenu du traitement enzymatique

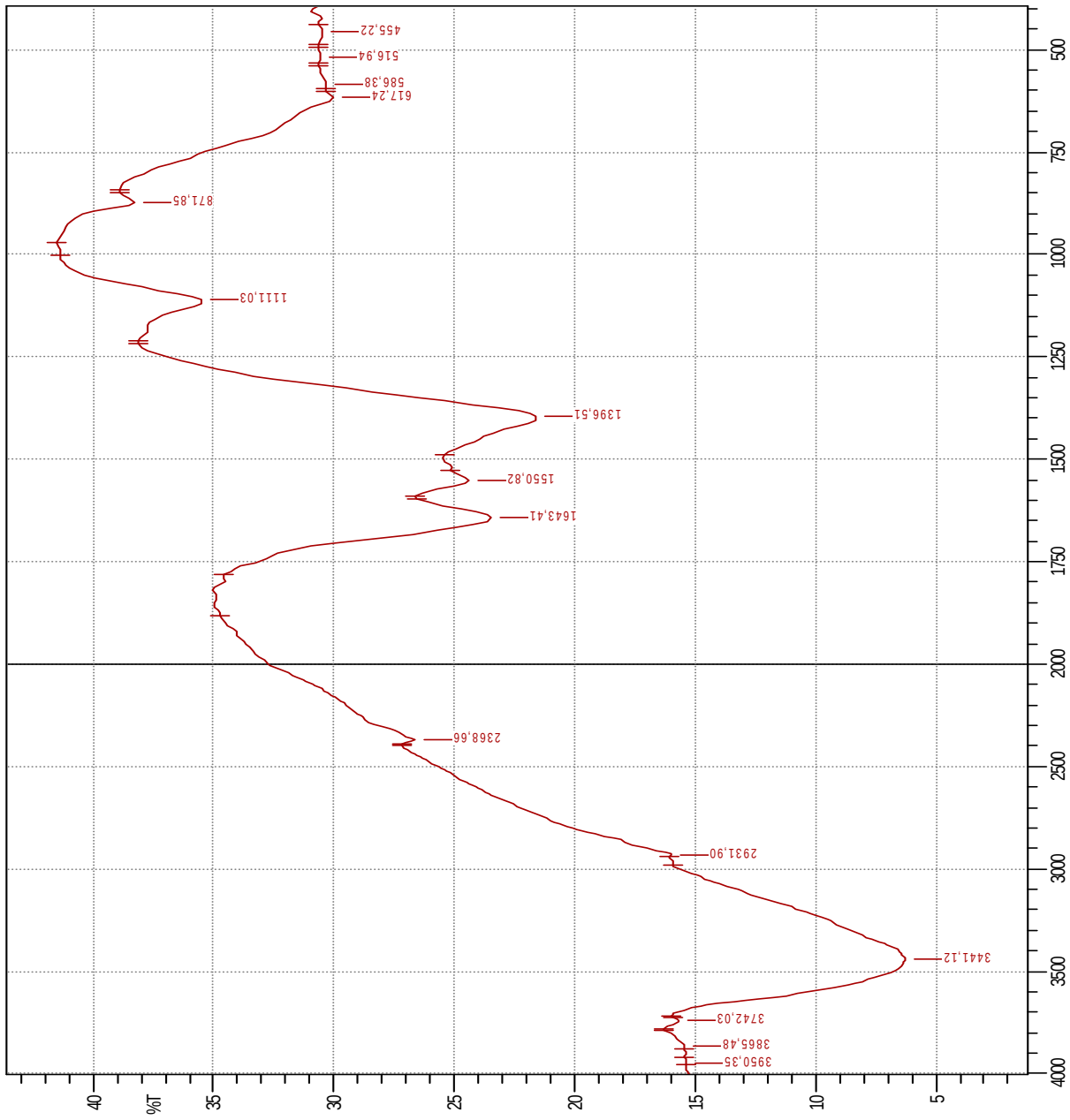


Figure IV.29. Spectre FTIR du précipité du BM obtenu du traitement Fenton

IV.8. Résultats de la DCO

La mesure de la DCO des solutions du BM avant traitement et des surnageant issus des traitements appliqués a donné les résultats du tableau IV.11.

Tableau IV.11. Valeurs de DCO du BM et des surnageant des traitements : enzymatique et Fenton

	Solution du BM à 1.5mg/l	***Surnageant après traitement enzymatique***	***Solution de BM à 20 mg/l***	***Surnageant après traitement par Fenton***
DCO (mg/l)	38.88	22.22	83.33	55.55

A partir de ces résultats, une diminution de la DCO est constatée. Donc les traitements appliqués conduisent à une diminution de la charge polluante présentée par les solutions du BM.

IV.9. Résultats de la phytotoxicité

Les résultats des tests de phytotoxicité sont résumés sur les tableaux IV.12 et IV.13.

Tableau IV.12. Valeurs du test de phytotoxicité des produits issus de traitement enzymatique

	Témoin	***Après l'essai N°4***	***Après l'essai N°8***	***Après l'essai N°9***
PG(%)	80	100	100	100
LRR(%)	58.55	76.57	81.08	72.07
IG	46.84	76.57	81.08	72.07

Tableau IV.13. Valeurs du test de phytotoxicité des produits issus de traitement Fenton

	Témoin	***Après l'essai N°13***	***Après l'essai N°17***	***Après l'essai N°18***
PG(%)	25	50	50	50
LRR(%)	90.16	98.36	92.90	43.72
IG	22.45	49.18	46.45	21.86

Pour le traitement enzymatique, nous constatons une amélioration des propriétés de phytotoxicité entre la solution du BM à 1.5 mg/l et ses trois surnageant. Par conséquent, la composition de ces derniers elle n'est pas chargée en sous-produits présentant un effet toxique vis-à-vis le petit pois.

Les photos correspondants aux différent test de phytotoxicité sont d'écrit aux ces figures

			
T é m o i n BM à 1.5mg/ l	*Après l'essai N°4*	*Après l'essai N°8*	*Après l'essai N°9*

FigureIV. 30. Photos de phytotoxicité de la solution du BM et ses produits de transformation issu du traitement enzymatique

			
T é m o i n BM à 20 mg/ l	*Après l'essai N°13*	*Après l'essai N°17*	*Après l'essai N°18*

Figure IV.31. Photos de phytotoxicité de la solution du BM et ses produits de transformation issu du traitement Fenton

Cependant, pour la solution du BM à 20mg/l, il est clair que les propriétés de phytotoxicité ont diminuées par rapport à celle à une concentration de 20 mg/l (de 80 à 25%). De plus, la longueur des racines n'est pas trop influencée par la composition des surnageant, dans ce cas la toxicité de ces derniers est pratiquement absente.

Figure A6.2. Photos de phytotoxicité de la solution du BM et ses produits de transformation issu du traitement Fenton

			
Témoin BM à 1.5mg/ l	*Après l'essai N°4*	*Après l'essai N°8*	*Après l'essai N°9*

Cependant, pour la solution du BM à 20mg/l, il est clair que les propriétés de phytotoxicité ont diminuées par rapport à celle à une concentration de 20 mg/l (de 80 à 25%). De plus, la longueur des racines n'est pas trop influencée par la composition des surnageant, dans ce cas la toxicité de ces

Figure A6.1. Photos de phytotoxicité de la solution du BM et ses produits de transformation issu du traitement enzymatique

			
T é m o i n BM à 20 mg/ l	*Après l'essai N°13*	*Après l'essai N°17*	*Après l'essai N°18*

Figure A6.2. Photos de phytotoxicité de la solution du BM et ses produits de transformation issu du traitement Fenton

Conclusion générale

Conclusion générale

Les expériences réalisées au cours de ce travail montrent que les procédés utilisant la peroxydase extraite de navet et l'oxydation mettant en jeu les réactifs Fenton étaient efficaces pour le traitement des eaux contenant un colorant très utilisé en industries pharmaceutique et textile à savoir le bleu de méthylène.

D'une part, cette transformation de colorant a été effectuée par une succession de réactions d'oxydo-réduction faisant appel à la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène comme co-substrat. Et d'autre part, l'action oxydante des radicaux hydroxyles produits dans le milieu à traiter a été appliquée.

Au cours de la présente étude nous avons arrivé aux conclusions suivantes :

- La peroxydase extraite de navet était capable de décolorer la solution aqueuse portée à pH7 de bleu de méthylène à une concentration de1.5mg/l et de 8mM de peroxyde d'hydrogène avec un rendement maximal de décoloration de 86.92%.
- L'étude de l'effet du pH sur la réaction Fenton vis-à-vis la solution aqueuse du bleu de méthylène a montré qu'un pH2 était le pH optimal pour cette oxydation.
- Les radicaux hydroxyles étaient capables de dégrader la quasi-totalité du bleu de méthylène à une concentration de 20mg/l et aux concentrations de 14mM et 4mM de peroxyde d'hydrogène et des ions ferriques, à cause deleur pouvoir oxydant très élevé, de leur réactivité et de leur non sélectivité vis-à-vis dessubstances organiques.

L'application de la méthode TAGUCHI, a montré son efficacité d'optimisation que ce soit pour le procédé enzymatique ou pour le procédé chimique. Cette méthode a mis évidence l'influence des concentrations des réactifs et catalyseurs et leurs interactions sur le rendement de décoloration du bleu de méthylène.

Un modèle matriciel a été élaboré pour les deux voies de traitements, dont sa validation sur le traitement chimique a confirmé son efficacité pour les valeurs des paramètres étudiés incluant dans l'intervalle des niveaux étudiés.

L'analyse spectrale des différents surnageant récupérés à l'issus d'une décoloration maximale, par UV-Visible, a montré la transformation du groupement chromophore du bleu de méthylène ;

Conclusion générale

L’analyse des précipités obtenus par FTIR, a montré aussi la transformation de la molécule du colorant.

Les résultats de l’étude de phytotoxicité, montrent que la solution du bleu de méthylène présente une toxicité vis-à-vis le petit pois, tandis que ses produits de transformation présentent une faible toxicité vers cette plante.

En perspective, il sera intéressant de compléter l’étude par une validation du modèle établi sur la décoloration par la peroxydase de navet, et de caractériser les produits de transformation par spectrométrie de masse.

Références bibliographiques

Références bibliographique

[1] Z. Carmen, S. Daniela, " Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents-A Critical Overview ", Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention-Environmental and Analytical Update, Edition Dr. Tomasz Puzyn, 55-87, (2012).

[2] R. Djerlfia, A. Fakir, " Elemination du bleu de méthylène par la procèdè d'oxydation avancée (fenton) ", Universitè Akli Mohamed, Oulhadj. Bouira, (2015).

[3] K. A. Bennani, M. Badia, H. Mohsine, B.Mina, A. Yaacoubi, " Élimination du colorant basique « Bleu de Méthylène » en solution aqueuse par l'argile de Safi ", Revue des sciences de l'eau, Université du Québec, (2018).

[4] A. Houas, I. Bakir, M. Ksibi and E. Elaloui, « Etude de l'Elimination de Bleu de Méthylène dans l'Eau par le Charbon Actif Commercial CECA40 ", Journal of Physics, 96, N°3, p. 479-486, (1999).

[5] F. Z. Saidi, " Elimination du bleu de méthylène par des procédés d'oxydation avancée", Mémoire De Magister, Université de Tlemcen, (2013).

[6] A. Jamis, M. Saks, " Cinetique Enzymatique, Cornich – Bowden ", EDP Science, 2005

[7] Q. Françoise, G. Paul François, G. Michel, G. Michel, " Bernadette Q-Maxi Fiches-Biochimie" , 2éd, dunod , (2015).

[8] D. Voet , J.G. Voet , Biochimie, 2e éditionn édition américaine, De Boeck,(1998)

[9] Muriel Vargel, Mémo-Fiches Concours Kiné Biologie, Grenoble, (2010)

[10] S. Farida, " Etude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée ", mémoire de fin d'étude, C.U.Médéa, (2010).

[11] L. André, D. Clément, " Biologie cellulaire et moléculaire ", Université Laval, (1983).

[12] S. Fabiano, « Immobilisation d'enzyme dans des films de polymère conducteur » , mémoire de fin d'étude, Université Claude Bernard-Lyon I , (2002).

[13] http:// www.cdc.qc.ca/ actes _ arc /2000 / bernard _ rafei _ actes _ ARC.

[14] http:// www.esi. Umontreal. ca / ~ badiaa / cinétique- enzyme

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

[16] N.C. Veitich, "Molécules of Interest : Horseradish Peroxidase ", a Moderm View of a Classic enzyme, Phytochemistry, 249-256, (2004).

[17]: www.perso.orange.fr/jean-jacques.auculaire/exoesite/peroxydase.htm.

Références bibliographique

[18] H. Qayum, “Peroxydase Mediated Decolorization and Remediation of Waste Water Containing Industrial dyes”, a review. Environ Science Biotechnologie 9:117–140, (2010).

[19] E. Torres, I. Bustos-Jaimes, S. Le Borgne. “Potential use of Oxidative Enzymes for the Detoxification of Organic Polluants”, Applied Catalysis B: Environmental 46, 1–15 (2003).

[20] B. Trifi, “Traitement des pollutants organique persistants par dècharge à barrier diélectrique (BDBD) et par décharge glissante (Glidarc) ”, These Doctorat , Facultè des Sciences, Tunisia, (2012).

[21] C. Regalado, B. E. Garcıa-Almend´arez, M. A. Duarte-V´azquez, « Biotechnological Applications of Peroxidases », Phytochemistry Reviews 3 **,**243–256, (2004).

[22] F. Mekhalif, “ Réutilisation des eaux résiduaires industrielles épurées comme eau d’appoint dans un circuit de refroidissement ”, Mémoire de Magister en Chimie Option : Pollution Chimique et Environnement ; Université du 20 Août 1955, Skikda, (2009).

[23] J. Rodier et all, “L analyse de l’eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer”, 8ème édition, DUNOD. PARIS, (1996).

[24] A. Botta, L. Bellon, “Pollution de l'Eau et Santé Humaine”, Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale, Université Euro-Méditérranée TEHYS. Avril (2001).

[25] L’industrie textile : Prévention de la pollution dans la région méditerranéenne, Centre d’Activités Régionales pour la Production Propre (CAR/PP), septembre (2002).

[26] C. T. Tandia « Protocole de Détermination des Paramètres Physico-Chimiques et Bacteriologiques », Centre Régional pour l’eau potable et l’assainissement a faible coût,Centre Collaborant De l’OMS *:* Contrôle et suivi de la qualité des eaux usées, Janvier (2007).

[27] H.S. Freeman and G.N. Mock, “Dye Application, Manufacture of Dye Intermediates and Dyes”, Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, Springer Science Business Media New York, 475-548, (2012).

[28] S. Patai, “The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Groups”, Edition John Wiley and sons, Chichester, 2 (1997).

[29] H. Zollinger, “Color chemistry syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments”, 3ème edition, Verlag Helvetica Chimical acta, Zürich, (2003).

Références bibliographique

[30] F. Harrlekas « Couplage des procédés membranaires aux techniques chimiques ou biologiques pour le traitement des rejets liquides de l'industrie textile », thèse de doctorat, université KADI Ayyad , Maroc(2008).

[31] http://sciences-physiques.acmontpellier.fr/ABCDORGA/Famille/COLORANTS.htm

[32] T.A. Kurniawant, G.Y.S. Chan, W.-H. LO, S. Babel. « Comparisons of low-cost adsorbents for treating waste watersladen with heavy metals », Science of the Total Environment, 366, 409-426 (2006) .

[33] Servan, D.J. Ballard, 1990/Risk/Beneflit and regulation, In pesticid. in the soil.sci. soc. Am Book series, n°2, Madiston, WI.USA ,(1990).

[34] N. Barka, « Elemination des colorant de synthese par adsorption UR un phosphate naturel et par dégradation photocatalyque sur TiO_2 suport2 », Thèse de Doctorat , University Ibn Zohr, Maroc (2008).

[35] Mohd. Rafatullaha, O.Sulaimana, R. Hashima, A.Ahmad , «Adsorption of Methylene Blue on Low-Cost Adsorbents», A review, Journal of Hazardous Materials 177, 70–80, (2010).

[36] F. Huang, L. Chen, H. Wang, Z. Yan, «Analysis of the Degradation Mechanism of Methylene Blue by Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma. Chemical Engineering Journal» 162 , 250–256.(2010).

[37] The United States Pharmacopeia: USP 24 : The National Formulary : NF 19, Edition : United States Pharmacopeial Convention, 1999.

[38] M. Hamon, F. Pellerin, M. Guernet, G. Mahuzeir, « Chimie analytique, méthodes spectrales et analyse organique », Edition Masson, 1990.

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

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

[41] M. Pillet, "Introduction aux plans d'expériences par la méthode deTaguchi", les editions d'organisation universitaires, 1992.

[42] D. Parin, Shah, S. R. Dave, M.S. Rao, « Enzymatic degradation of textile dye Reactive Orange 13 by newly isolated bacterial strain Alcaligenes faecalis PMS-1 », International Biodeterioration & Biodegradation 69 (2012) 41e50

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

Références bibliographique

Annexes

Annexes

Annexe A1

Tableau A.1 : Principales réactions intervenant dans le système de Fenton et les constantes cinétiques correspondantes, [41].

Réaction	***Constante de vitesse ($M^{-1}.l.s^{-1}$)***	***Equation N°***
Initiation : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$	5 5	A.I
Catalyse: Régénération du Fe^{2+}:		A.II
$H_2O^\bullet + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + HO_2^\bullet + H^+$	3,1.10^{-3}	A.III
$Fe^{3+} + HO_2^\bullet \rightarrow Fe^{2+} + O_2 + H^+$	2.10^{4}	A.IV
$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$	5.10^{7}	
Propagation :		A.V
$OH^\bullet + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2^\bullet$	3,3.10^{7}	A.VI
$HO_2^\bullet \rightarrow H^+ + O_2^{\bullet -}$	1,6.10^{5}	A.VII
$Fe^{2+} + HO_2^\bullet \rightarrow Fe^{3+} + HO_2^-$	< 2 x 10^{3}	A.VIII
$HO^\bullet + H_2O_2 \rightarrow HO_2^\bullet + H_2O$	3.0 x 10^{7}	
Terminaison		A.IX
$HO_2^\bullet + HO_2^\bullet \rightarrow H_2O_2 + O_2$	1.8 x 10^{6}	A.X
$HO_2^\bullet + HO^\bullet \rightarrow H_2O + O_2$	0.71 x 10^{10}	A.XI
$HO^\bullet + HO^\bullet \rightarrow H_2O_2$	5.2 x 10^{9}	

Annexes

Annexe A2

Verrerie

- Tubes à essai, fiole jaugées de : 5ml, 25ml, 50ml, 100ml et 1000 ml. Pipettes graduées et jaugées de : 0.1 ml, 0.2ml, 1ml et 10ml. Erlenmeyer de : 50ml, 100ml et 250ml. Eprouvettes de : 10ml, 50ml et 100ml. Cristallisoirs. Béchers de :50ml, 100ml et 250ml.
- Burette de : 100ml.
- Ampoule a décanter : 250 ml

Autres accessoires

- Cuve.
- Poires.
- Thermomètre.
- Barreaux magnétiques.
- Pissette.
- Spatule.
- Chronomètre.
- Thermomètre.

Annexes

Annexe A3

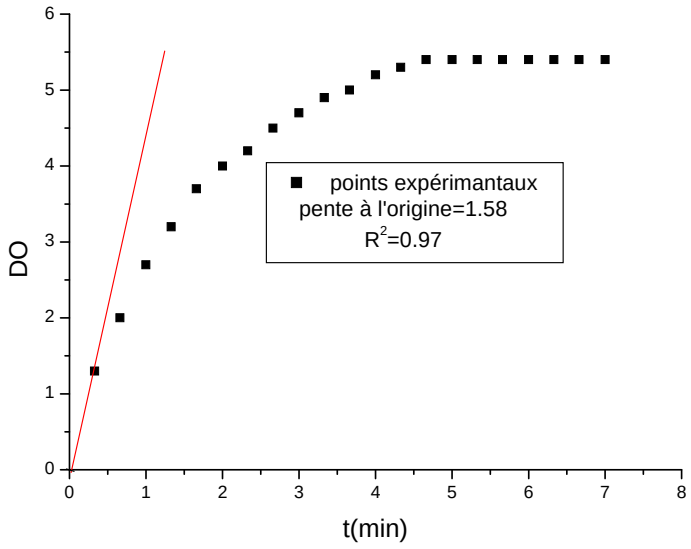


Figure A3. Cinétique enzymatique de réaction de transformation de phénol par la peroxydase de navet

Annexes

Annexe A4 : Photos du traitement enzymatique

Avant



Après



Avant



Après



Figure A4.1. Photos des solutions de BM avant et après traitement enzymatique

Annexes

Annexe A4 : Photos du traitement enzymatique

Avant



Après



Avant



Après



Figure A4.1. Photos des solutions de BM avant et après traitement enzymatique

Annexes

Annexe A4 : Photos du traitement enzymatique

Avant



Après

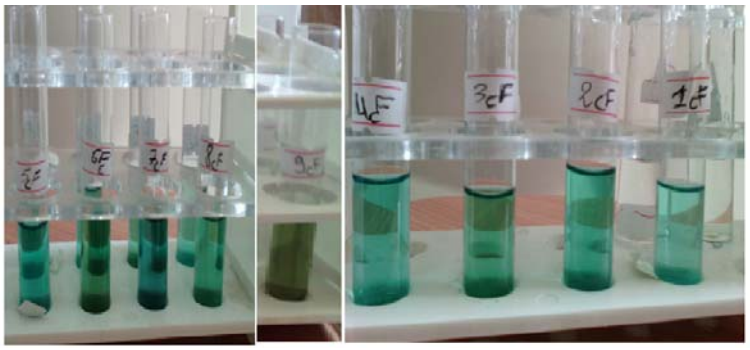


Figure A4.1. Photos des solutions de BM avant et après traitement enzymatique

Annexes

Annexe A5: Photos des traitements Fenton





Tube d'essai avant

Le traitement [BM]= 10mg/l

solutions après traitement pour les essais:

1 à 9.





Tube d'essai avant

Le traitement [BM]= 20mg/l

solutions après traitement pour les essais:

10 à 18.

Figure A5.1. Photos des solutions de BM avant et après traitement Fenton

Annexes

Annexe A5: Photos des traitements Fenton



Tube d' essai avant solutions après traitement pour les solutions:

Le traitement [BM]= 30mg/l 19 à 27

Figure A5.1. Photos des solutions de BM avant et après traitement Fenton

Annexes

Annexes