République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr YAHIA FARES de MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement



Mémoire De Fin D'étude

***En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Génie des* Procédés**

Option : Bioprocédés pharmaceutique

Thème :

Séparation, purification, et caractérisation de la peroxydase de navet blanc « Brassica rapa »

Proposer et dirégé par :

- Pr. ABOUSAOUD .M

Réaliser par :

- CHEKIRINE Hadjer
- ABADA Malika

Année universitaire : 2014/2015

REMERCIMENT

En premier lieu, nous exprimons nos profonds remerciements à " Allah Tout-Puissant" qui nous a soutenues le long de notre travail.

Ensuite nous tenons à remercier nos chers parents pour leur patience et encouragement à finir un chemin commencé il y'a si longtemps.

La préparation de ce mémoire a été rendue possible grâce au Pr. ABOUSEOUD Mahmoud, notre encadreur, qui nos beaucoup aidé par ses conseils et ses critique, merci Monsieur pour votre patience.

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous adressons nos chaleureux remerciements à tous les enseignants de Génie des procèdes et environnement de université de Médéa, et à tous les enseignants au long de nos vie scolaire.

Ce serait manquer à un devoir très important de ne pas remercier l'ensemble des membres du Hall Technologique.

Enfin, un grand merci pour mes collègues sans exception et à tous ceux qui ont participé au bon déroulement de ce travail.

Nous aimeront aussi adresser notre remerciement à laboratoire d'analyse de la polyclinique de Ouamri-Medea

Dédicace

Je dédie cette mémoire à . . .

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence,
La source de tendresse et l'exemple du dévouement
Qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.
Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.
Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.
Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma grand-mère

M'ont couvert avec la chaleur de leur amour et leur soutien.
Je leur dédie les premiers fruits de ma réussite et prie dieu le tout puissant de leur donner santé et longue vie.

A mes adorables neveux et nièces à qui j'ouvre grand mon cœur et mes bras, que Dieu les protège.(Khaola ,Lotfi ,Meriem,Marea Zaki Hossam,Rehabe,Yasser,Tifo ,Hamoudi,Bachoura ,Doaa,Sirine,Jilo, Dheaa,Malak)
A mes frères et mes sœurs
À mon biome Malika
A mes chères amis (e)…
À toute la promotion de Génie des Procédés Pharmaceutiques et environnement 2014 – 2015.
À tous ceux qui me sont chers.

Hadjer

DEDICACES

À l'Allah tout puissant qui m'a donnée la volonté et m'a mise Sur le chemin du savoir.

Je dédie ce travail de fin d'études :
À mes très chers parents qui ont consacré tout ce qu'ils Possèdent pour ma réussite.

Ames très chers frères et sœurs

A tous les membres de ma famille sans exception

À vous tous je vous dis merci d'être toujours là pour moi.

Et avec toute la joie je le dédie à tous mes collègues de géni Des procédés pharmaceutiques.

À ceux qui ne sont pas dans mon mémoire mais ils sont toujours dans ma mémoire.

Malika

الملخص :

الهدف من هذا العمل هو استخلاص و تنقية بيروكسيداز من مصدر نباتي(**الفجل** الأبيض) باستعمال طريقة الترسب بالاسيتون . تم الحصول على مردود يقدر ب 25.96% **مع الحصول على نشاط نوعي** UI/mg 63.83 .

دلت النتائج المطبقة على تأثير بعض الخصائص على حركية الأنزيم و التي تسمح لنا بمعرفة القيم القصوى لهذه **الخصائص** :درجة حرارة=C °40 **و** pH=7. **و** أيضا هناك بعض المعوقات على الأنزيم على سبيل المثال :

وبتأثير **بعض المنشطات مثل** ($FeSO_4$ (77%) ; SDS(6.23) ;urée(13.98%) EDTA (10.2%) Zn(15.64%) ; Mg(8.92) ;glucose(6.26%) ;Ca(16.27%) .كما سمحت الدراسة الحركية لتحويل الفينول بوجود الماء الاكسيجيني بتقويم الخصائص الحركية .زيادة **إلى** هذا يملك أنزيم البيروكسيداز طاقة الحركية تقدر ب 51.895 (KJ/mol) .

في الأخير قمنا بتطبيق إنزيم بيروكسيداز الفجل الأبيض **لإزالة ملون من محلول مائي ب مردود** يقدر ب: 96.02%

الكلمات المفتاحية: الأنزيم, بيروكدسداز, **الثبات الحراري** , الصبغ الازويكي.

Résume

L'objectif de ce travail, est l'extraction et la purification de la peroxydase à partir d'une source végétale navet blanc '*Brassica rapa*' par la technique de précipitation à l'acétone. Le rendement de purification atteint est de 25.96%avec une activité spécifique 63.83UI/mg

Par la suite, les effets de certains paramètres sur l'activité de l'enzyme ont été étudiés. Les résultats ont permi de déterminer les valeurs optimales de ces paramètres donnant l'activité maximale : pH (7) ; Température (40°C). La présence de certaines substances peut inhiber la peroxydase ($FeSO_4$ (77%) ; SDS (6.23) ; urée (13.98%) EDTA (10.2%) alors que d'autres jouent le rôle d'activateurs Zn (15.64%) ; Mg(8.92) ;glucose(6.26%) ;Ca(16.27%). Une étude cinétique de transformation enzymatique du phénol en présence du peroxyde d'hydrogène a été réalisée et les paramètres cinétiques ont été déterminés. La peroxydase de navet s'est avéré une enzyme thermiquement assez stable. L'énergie de désactivation a été estimée à 51.895 (KJ/mol)

Enfin, une application environnementale qui consiste à éliminer un colorant d'une solution aqueuse en utilisant la peroxydase de navet a été positivement menée, avec un rendement96.02%.

Mots clé : peroxydase, enzyme, stabilité thermique, *brassica rapa* ,colorant azoïque

Abstract

The objective of this work is the extraction and purification of peroxidase from a plant source white turnip *Brassica rapa* by the acetone precipitation method. The purification yield obtained is 82% with a specific activity 63.83UI / mg subsequently; the effects of some parameters on the activity of the enzyme were studied. The results allows to determine the optimum values of these parameters giving the maximum activity pH (7); Temperature

(40°C). The presence of certain substances can inhibit peroxidase ase ($FeSO_4$ (77%); SDS (6.23); urea (13.98%) EDTA (10.2%), while others activators Zn (15.64%), Mg (8.92%), glucose (6.26%). Ca (16.27%). Enzymatic conversion study of the phenol in the presence of hydrogen peroxide was carried out and the kinetic parameters were determined .The turnip peroxidase proved a thermally relatively stable enzyme. The energy of deactivation was estimated 51.895 (KJ/mol)
Finally, an environmental application is to eliminate a dye from an aqueous solution using the turnip peroxidase has been positively carried out, with a rendement 25.96%.

Key word: enzyme peroxidase *Brassica rapa* thermostability, colorant azoique.

Liste des figures

CHAPITRE 1 :

Figure I.1 : Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine**.....**5

Figure I.2 : Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine**……...**5

Figure I.3: Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (glucose oxydase)**……..**6

Figure I.4 : structure quaternaire d'une protéine (glucose déshydrogénase) **…….....**6

Figure. I. 5 : forme clé-serrure**……...**7

Figure. I. 6 : forme induite**……**7

Figure.I.7 : Evolution de la concentration du substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E) en fonction du temps**…….....**11

Figure I.8 : Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne**…….**13

Figure I.9 : L'activité enzymatique en fonction de la température**……..**14

Figure I.10 : Différents mécanismes de réactions enzymatiques à deux substrats**……..**17

CHAPITRE 2 :

Figure. II.1 : Structure de l'hémine**……..**18

Figure. II .2. Structure de la peroxydase du radis**……**19

Figure. II. 3: Mécanisme réactionnel de la peroxydase**……...**20

Figure. II. 4 : Mécanisme d'oxydation des colorants azoïques par la peroxydase**……..**23

CHAPITRE 3 :

Figure. III. 1 : préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase de *Brassica* ***rapa*****.....***30*

Figure. III. 2 : Réaction entre le phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase**……**31

Figure. III. 3 : la courbe d'étalonnage de H_2O_2 (30%) (pH=7 et T ambiante)**……**32

Figure. III .4: courbe d'etalonnage de H_2O_2 (10%) (pH=7 et T ambiante)**.....**33

Figure. III. 5 : la courbe d'étalonnage de l'albumine λ=505nm. **……...**34

Figure. III. 6 : Effet de pH sur l'activité enzymatique de la peroxydase de «*Brassica rapa* » **…….**36

Figure. III. 7 : Effet de la température sur l'activité enzymatique de la peroxydase de *Brassica rapa* à pH=7. **…….**38

Figure. III. 8 : Variation de l'activité enzymatique de la peroxydase de navet blanc en fonction de temps à différent température (50 °C, 60 °C et 70 °C) pH=7, [phénol]=0.17M [4AAP]=0.0025 M [H_2O_2]=0.**0017M……...**43

Figure. III. 9 : ln (AE/AE0) relative on fonction de temps a différent Température et pH=7, [phénol]=0.17M [4AAP]=0.0025 M [H_2O_2]=0.0017M.…**……**44

Figure. III. 10 : ln(k) on fonction de (1/T) à pH =7, [phénol]=0.17M [4AAp]=0.0025 [H_2O_2]=0.**0017M……...**44

Figure. III. 11 : Cinétique de transformation de H_2O_2 on fonction de temps a différent concentration de H_2O_2. [Phénol]=0.17M ;[4AAP]=0.025M ;[AE]=0.76UI/ml……46

Figure. III. 11 : représentation de Michaelis-Menten V0=f ([H_2O_2] pour la peroxydase. [AE]=0.76UI/**ml……**47

Figure. III. 12 : représentation de Lineaweaver-Burk 1/V0=f (1/ [H_2O_2]) pour la peroxydase de *Brassica rapa* [AE]=0.76UI/**ml……...**47

Figure. III. 13 : représentation de Lineaweaver-Burk 1/V0=f (1/[H_2O_2]) pour la peroxydase de *Brassica rapa* [AE]=0.76UI/ml**……**48

Figure. III. 14 : L'évolution de dégradation de colorant noire d'eriochrome**…….**49

*Liste des tableau*x

CHAPITRE 1 : BIOPROCEDES ENZYMATIQUE

Tableau I.1 : Classification des enzymes**…….....**8

Tableau I. 2 : exemples d'enzymes employé dans différent secteur industrielle**……** 9

CHAPITR 3 : PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau. III. 1: Activité enzymatique des extraits brut et purifié de la peroxydase de navet blanc « *Brassica rapa »***……**33

Tableau. III. 2 : Concentration des protéines dans les extraits EEB et EEPP**…….**34

Tableau. III. 3 : Tableau de purification des extraits EEB et EEPP**……...**34

Tableau. III.4 : effet des effecteurs organiques sur l'activité de la peroxydase**…….**40

Tableau. III. 5 : effet des effecteurs inorganiques sur l'activité de la peroxydase**……..**40

Tableau. III. 6: les activités enzymatiques pour chaque concentration de H_2O_2**……**46

.

Tableau de matière

	Page
TABLE DES MATIÈRES	
ABRÉVIATIONS	
NOMENCLAUTRES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
Introduction générale	1
CHAPITRE I : BIOPROCEDES ENZYMATIQUE	
1) Introduction	3
2) Histoire de l'enzymologie	3
3) Définition	4
4) Propriétés des enzymes	4
5) Structure des enzymes	4
5.1. **Structure générale**	4
5.2. **Les sites actifs**	6
5.2.1. **Nature de site actif**	7
a) Le site de reconnaissance	7
b) Le site cataytique	7
6) Classification des enzymes	7
7) Dénaturation des enzymes	8
8) Diverses causes de dénaturation des enzymes	8
9) Application des enzymes dans l'indusutrie	9
10) Cinétique enzymatique	11
10.1. L'activité enzymatique	11
10.2. Equation de Michaelis- Menten	12
10.3. Expression algébrique da la vitesse	12
10.4. Signification des constantes cinétiques	14
10.5. Facteurs influençant la vitesse des réactions enzymatique	14
1) Influence de la Température	14

2) Influence du pH sur la vitesse de réaction	14
3) Effecteurs de la réaction enzymatique	15
a) Les activateurs	15
b) Les inhibiteurs	16
11) Système a deux substrats et deux produits	17
a. **Réactions séquentielles**	17
b. **Mécanisme séquentiel 1u hasard**	17
c. **Réactions ping-pong**	17
CHAPITRE II : PEROXYDASE	
1) Introduction	18
2) Définition	18
3) La spécificité de substrat	19
4) Structure du site actif	19
5) Le mécanisme réactionnel de la peroxydaseClassification	20
1. Peroxydases animales (classe I)	21
2. Peroxydases fongiques extracellulaires (classe II)	21
3. **Peroxydases des plantes (classe III)**	21
6) **Les applications de la peroxydase**	21
5.1. L'élimination des contaminants phénoliques et des composés aromatique	22
5.2. Dégradation des colorants	23
5.3. La production des colorants alimentaires	23
5.4. Dans l'industrie laitière	23
5.5. Des produits cosmétiques protecteurs de la peau	24
5.6. Biocapteurs à base du Peroxydase	24
5.7. Application de la peroxydase dans le domaine médicale	24
a) Dosage du glucose	25
c) Dosages des triglycérides	25

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE	
Introduction	26
MATERIEL ET REACTIFS	27
I. Procédure de Préparation de la peroxydase	29
a) extraction de peroxydase	29
b) Séparation de la peroxydase	29
c) Purification	29
II. Teste d'activité enzymatique	31
a) **Procédure**	31
III. La courbe d'étalonnage de l'eau oxygénée	32
a) **Procédure**	32
IV. Dosage des protéines	33
a) **Procédure**	33
b) **Résultat**	33
c) **Discussions**	35
V. Effet des conditions physico-chimiques sur l'activité enzymatique de la peroxydase	35
1) Effet de pH	35
a) **Procédure**	36
b) **Résultat**	36
c) **Interprétation**	37
2) Effet de la température	37
d) **Procédure**	37
e) **Résultat**	37
f) **Interprétation**	38
VI.* Effet des agents chimique sur l'activité de la peroxydase de *Brassica rapa	39
a) **Procédure**	39
b) **Résultat**	40
c) **Interprétation**	40
VII. Stabilité thermique	41
a) **Procédure**	42

b) **Résultat**	42
❖ Discussion	43
c) **Interprétation**	45
VIII. L'effet de concentration de peroxyde d'hydrogène	46
a) **Procédure**	46
b) **Résultat**	46
c) **Interprétation**	47
IX. Application de la peroxydase d'extrait de *Brassica rapa*	48
1) Application dans le domaine d'environnement	48
a) **Procédure**	48
b) **Résultat**	49
c) **Interprétation**	49
2) Application dans le domaine analytique.	50
a) Procédure	50
b) Résultat	51
❖ **Discussion**	51

Introduction générale

Au cours de ces dernières années, le nombre d'enzymes connues a considérablement augmenté et les applications sont multiples dans différents domaines : l'industrie agro-alimentaire, le secteur biomédical, chimie analytique, en pharmacologie, environnement… .
La peroxydase est l'une de ces enzymes appartenant à la famille des oxydoréductases, qui est largement distribuée dans la nature, avec des classifications différentes selon l'origine (animale, végétale ou bactérienne). La peroxydase contenue dans les cellules de certaines plantes (radis, navet, dattes, soja) a été largement étudiée. Il a été démontré que ce genre de peroxydases possède des propriétés particulières quant à leur pouvoir catalytique. Par ailleurs, la séparation et la purification sont faciles à mettre en œuvre en comparaison avec les sources bactériennes. Le navet blanc l'une de ces sources abondantes dans notre région.

La peroxydase agit sur un substrat donneur d'hydrogène en présence de peroxyde d'hydrogène. Grâce à son pouvoir catalytique non sélectif vis-à-vis d'une large gamme de substrats, la peroxydase trouve plusieurs applications dans différents domaines, notamment le domaine environnemental pour la dégradation des composés phénoliques et les colorants ainsi que d'autres applications dans l'industrie papetière, détergents, analytiques…..

Ce travail se propose donc de séparer et de caractériser la peroxydase de navet blanc *Brassica rapa* commerciale.

Le manuscrit sera donc articulé sur deux parties principales :

- Une partie bibliographique qui traite des notions générales sur l'enzymologie, dans ses aspects mécanistiques et cinétiques ainsi qu'une partie sur les applications des enzymes dans différents domaines. Suivie d'un traitement approfondi de la peroxydase (généralité, source, classification et leur application)
- Une partie expérimentale qui comprend premièrement la séparation et la purification partielle de la peroxydase de navet. Par la suite, on passe à la caractérisation de cette enzyme en étudiant les effets de différents paramètres physico-chimiques sur l'activité peroxydasique: pH, température, concentration initiale de substrat, en mettent aussi en évidence l'influence de quelques agents chimiques (organique et inorganique) sur l'activité enzymatique.

La détermination de la stabilité thermique a été aussi un point important dans la caractérisation, en vue de certaines applications nécessitant une température plus élevée que la température optimale.

Une application de la peroxydase a été incluse dans la partie expérimentale relevant du domaine environnemental ayant pour objet la décoloration enzymatique d'une solution aqueuse en présence de peroxyde d'hydrogène.

Une autre application a été réaliser dans le domaine analytique qui consiste a appliqué la peroxydase de navet blanc on association avec le glucose oxydase pour le teste de glycémie.

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

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 tell que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible [1].En leur absence ,les réactions chimique qui se produisent au sein des cellules organique serait trop lentes pour être exploitable .Un catalyseur est une substance qui permet à une réaction chimique de se dérouler plus vite [2].

2) Histoire de l'enzymologie

Il est très difficile de donner une date exacte de la découverte des enzymes. Une activité hors d'une cellule vivante a été observée en 1783 lorsque Spallanzani nota que la viande était « liquéfiée » par le suc gastrique des faucons. D'autres observations similaires ont été faites par la suite, mais la première découverte d'une enzyme est en général créditée à Payen et Persoz qui, en 1833 a traité un extrait aqueux de malt avec de l'éthanol et ainsi précipité une substance labile à la chaleur, qui initie l'hydrolyse de l'amidon. Ils ont appelé cette fraction « diastase ». Aujourd'hui, on sait que la diastase était une préparation impure d'amylase.

Le mot enzyme, « dans la levure » en grec, apparaît en 1878 : Kühne le propose pour faire la distinction entre les « ferments organisés » (le micro-organisme entier) ou « inorganisés » (excrétés par les micro-organismes) [3].

C'est en 1897 que Bertrand observa que quelques enzymes nécessitaient des facteurs dialysables pour avoir de l'activité catalytique : ces substances ont été appelées coenzymes.

À partir du début du 20^{e} siècle, de nombreux essais sont faits pour purifier les enzymes et décrire leur activité catalytique en termes mathématiques précis.

En 1902, Henri a suggéré qu'un complexe enzyme-substrat était un intermédiaire obligatoire dans la réaction catalytique. Il donne également une équation mathématique qui prend en compte l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse de réaction.

Le fait que les enzymes sont des protéines n'a été accepté que vers la fin des années 1920.

Enfin, c'est en 1965 que Monod, Wyman et Changeux présentent un modèle cinétique pour les enzymes allostériques (enzymes de régulation qui donnent des courbes de vitesses sigmoïdes et non hyperboliques) [3].

3) Définition

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseur en ce sens qu'elles font évoluer plus rapidement la réaction vers son point d'équilibre sont toutefois modifier la position de ce dernier. Ce sont des catalyseurs sélectifs et donc spécifiques, qui n'exercent leur activité qu'en un seul point de métabolisme. Une enzyme ne catalyse qu'un seul type de réactions [4].

4) Propriétés des enzymes

✓ Les enzymes présente en petites quantité, retrouvé intact à la fin de réaction, les enzymes sont douées d'une forte activité : une seule molécule peut transformer jusqu'à plusieurs millions de molécules de substrat par minute, la décomposition de l'eau oxygénée par exemple est cent million de fois plus rapide en présence de catalase que spontanément [5].

✓ Un catalyseur est spécifique d'une réaction donnée : c'est –à-dire qu'il n'active qu'un type de réaction [6].

✓ Abaissement de l'énergie d'activation : La présence des enzymes diminue l'énergie d'activation, sans modifier ni l'état initial ni l'état final, Cette énergie d'activation est généralement fournie par agitation ou par élévation de la température. Elle active les molécules et favorise leur contact pour activer la réaction. Cette énergie nécessaire est abaissée par la présence de l'enzyme : l'énergie d'activation pour l'hydrolyse des protéines est de 20Kcal en présence d'acide chlorhydrique, mais de 12 Kcal seulement en présence de trypsine [5].

✓ Les enzymes ne modifient pas l'équilibre de la réaction : La plupart des réactions biologiques donnent un équilibre A, B, C, D. Les enzymes ne modifient en rien cet équilibre.

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

✓ Les enzymes augmentent considérablement la vitesse de la réaction : L'enzyme attire les substrats sur son site d'action, le mettant en valeur pour faciliter la réaction. Sans enzymes, les molécules se rencontreraient au hasard, donc moins rapidement [5].

5) Structure des enzymes

5.1. **Structure générale**

Un enzyme est beaucoup plus volumineux que son substrat. ils constituées de plusieurs acides α-aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide

aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa [7].

On peut distinguer, comme pour toutes les protéines, quatre niveaux d'organisation dans la structure des enzymes:

- L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des enzymes. (Figure .I.1) [7].

Cette structure permet de connaître la composition chimique de l'enzyme (nature et pourcentages des différents acides aminés) ainsi que l'ordre d'enchaînement de ces unités. Elle ne donne aucune information sur l'organisation spatiale de la biomolécule, [8].

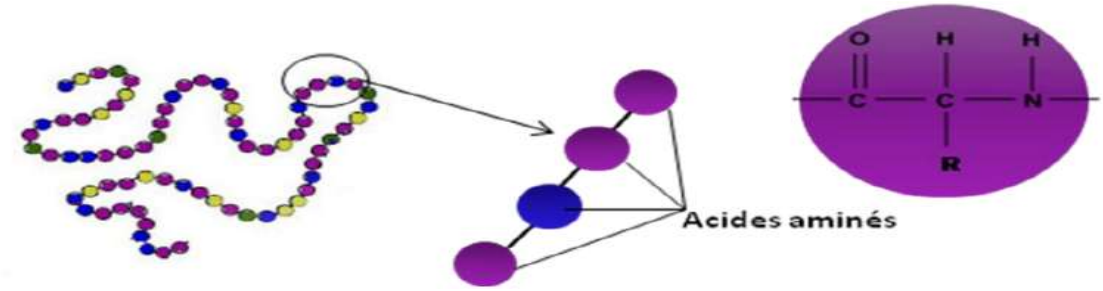


Figure I. 1 : Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine [7].

- Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β (Figure I.2) ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes [7].

On retrouve souvent deux motifs réguliers de repliement dans certaines parties des protéines : le premier motif, l'hélice α, est stabilisé par des liaisons hydrogènes intracaténaires, et le second motif, appelé feuillet β, est stabilisé par des liaisons hydrogènes formées entre deux chaînes polypeptidiques, Figure I.2[8].

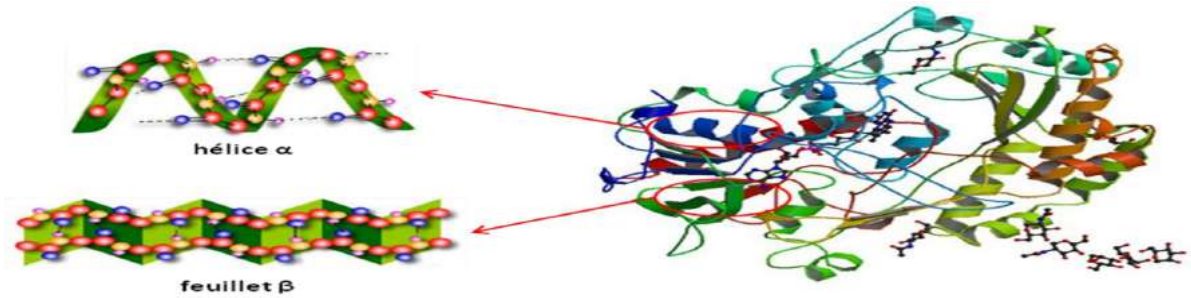


Figure I. 2 : Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine [7].

- L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres formes une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures figure. I. 3 [7].

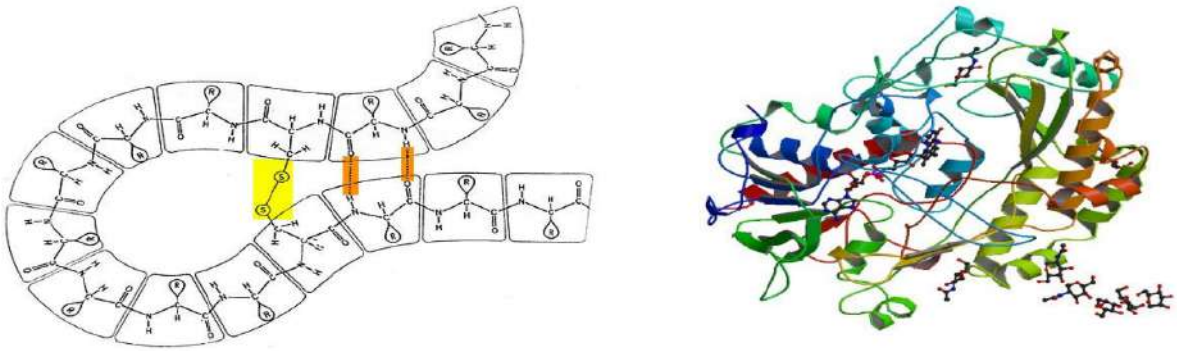


Figure I. 3 : Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (glucose oxydase).

➢ Si l'enzyme est formée d'un complexe constitué de plusieurs chaînes polypeptidiques (appelées monomères), la structure globale est désignée par le terme de structure quaternaire figure I.4 [8].

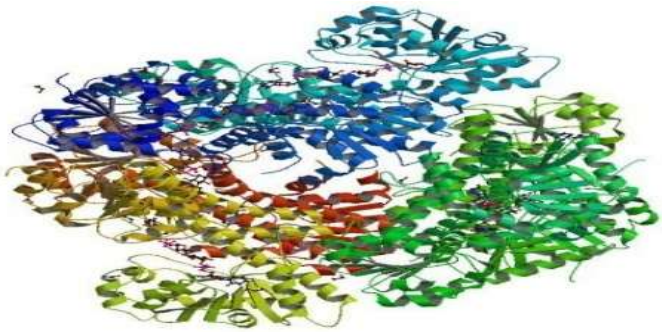


Figure I. 4 : structure quaternaire d'une protéine (glucose déshydrogénase) [7].

5.2. **Les sites actifs**

Le site (ou centre) actif d'un enzyme est la région ou se fixe (ent) le(s) substrat(s) et (le cas échéant) le coenzyme, et ou a lieu la réaction. Le site actif joue un double rôle : celui de site de fixation du substrat et celui de site catalytique. Le site actif est localisé au fond d'une poche de zone interne hydrophobe de la protéine.

Les liaisons entre enzyme (au niveau des chaines latérales, le plus souvent polaires, des quelques acides aminés constitutifs du site actif et substrat (s) ne sont pas de nature covalente, même si transitoirement de telles liaisons peuvent se former au cours de la catalyse. La spécificité de l'enzyme pour son substrat est l'une des caractéristiques de la catalyse enzymatique [9].

5.3. Nature de site actif :

a) Le site de reconnaissance

Un site de reconnaissance : reconnaissance et maintien du substrat avec des liaisons faibles (constitué de certains acides aminés) [10].

b) Le site cataytique

Clé-serrure: La forme du site actif est complémentaire à celle du substrat



Figure. I. 5 : forme clé-serrure. [11].

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



Figure. I. 6 : forme induite. [11].

6) Classification des enzymes

La stéréospécificité d'action des enzymes permet de les dénommer et de les classer selon les réactions qu'ils catalysent .Quelques enzymes, le plus souvent parmi les premiers à avoir été décrits, ont reçu un nom commun, tel que trypsine, chymotrypsine, papaïne qui est encore couramment utilisé. Cependant, la plupart des enzymes sont désignés en ajoutant le suffixe ase au nom du substrat sur lequel ils agissent : DNase, … ou à un terme décrivant la réaction catalysée : glucose 6-phosphate déshydrogénase, pyruvate carboxylase, par exemple [4].

Chaque enzyme possède une matricule (EC $X_1.X_2.X_3.X_4$) comportent 4 nombre dont :

X_1 : type de réaction, X_2 : sous classe de l'enzyme suivant son mécanisme d'action

X_3: nature du cible (substrat = accepteur/liaison etc) et X_4: identifiant du cible [12].

Tableau I.1 : Classification des enzymes [12].

E.C (classe)	**Classification**	**Type de réaction catalysée**
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels.
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse.
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons.
E.C.5	Isomérases	Isomérisation.
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP.

.

7) Dénaturation des enzymes

La dénaturation des enzymes est un cas particulier de dénaturation des protéines. Le plus facile, pour dénaturer une enzyme, consiste à la soumettre à une température trop élevée. Ce faisant, on permet à la protéine de prendre des conformations anormales, bouleversant l'architecture enzymatique, s'il s'agit d'une enzyme à sous –unités, les rapports entre ces dernières sont modifiés, ce qui rend une éventuelle régulation allostérique impossible. Si le centre actif est constitué par des résidus d'acides aminés appartenant à plusieurs chaines polypeptidiques ou encore situés à distance les uns des autres sur une même chaine dont le repliement les rapproche dans les conditions de structure spatiale normales, la dénaturation le désorganise. De même, la dénaturation de la protéine peut rendre impossible la fixation du coenzyme, ou d'un ion minéral s'il sert de cofacteur. La dénaturation s'accompagne le plus souvent de la perte de la solubilité de la protéine. Il en résulte une diminution de la probabilité de rencontre avec le substrat qui diminue encore le pouvoir catalytique. [6]

8) Diverses causes de dénaturation des enzymes

La chaleur est la principale mais n'est pas la seule. L'action de certains réactifs très acides ou très basiques est identique : la molécule protéique perd sa structure dans l'espace parce qu'aux pH extrêmes, les liaisons physiques qui maintiennent les chaines polypeptidiques dans l'espace, sont rompues. L'exposition à certaines solutions de métaux lourds (sels de mercure)

Provoque aussi la dénaturation. L'action de ce type de réactifs est beaucoup plus localisée dans l'espace et montre que la dénaturation peut porter seulement sur une partie de la molécule d'enzyme [6].

Il faut faire une mention spéciale pour deux réactifs très utilisés pour l'analyse des protéines des enzymes : le chlortrydaire de guanidinium et l'urée en solution concentrée (6 à 8 M), qui provoquent une dénaturation complète par rupture des liaisons physiques stabilisant les structures secondaires et tertiaire. Ils échangent des liaisons H natives. Ils font régresser les liaisons hydrophobes. Ils font prendre aux protéines une conformation en pelote statistique. En outre, ils sont capables de solubiliser des protéines insolubles [6].

Les détergents, comme le dodécyl-sulfate de sodium qui est un dérivé du pétrole, possèdent un fort pouvoir dénaturant. Ils ressemblent aux acides gras, ayant une extrémité polaire et une chaine alcanique. Toutefois, leurs fonction polaire est plus hydrophile que celle des acides gras, ce qui leurs permet d'entrainer dans l'eau des particules fortement hydrophobes [6].

9) Application des enzymes dans l'indusutrie

Il n'était pas surprenant que les industriels se trouvent parmi les premiers à reconnaître et exploiter l'énorme potentiel des enzymes, car ils ont compris que s'il était possible d'accélérer les réactions, les procédés de production pourraient être réalisés en beaucoup moins de temps, à des températures et des pressions plus basses ou avec des matières premières moins chères [13] le Tableau I. 2 représente l'application de certains enzymes.

Tableau I. 2 : exemples d'enzymes employé dans différent secteur industrielle :

Secteurs	Enzymes utilisés	Application	Référence
Industrie de détergent	Protéase	Enlèvement des taches protéique	[14]
	Amylase	la dégradation des chaînes d'amidon.	[15]
	Lipase	Elimination des graisses	[13]
	Cellulase	Nettoyage, clarification des couleurs	[14]
		Dégradation de cellulose	[15]

Industrie textile	Peroxydase Cellulase amylases Lipase Péctate lyase	Elimination des colorants -Elimination des microfibres - Délavage des jeans le désencollage contrôle de la poix du contaminant lessivage	[16] [13] [13] [15][14] [14]
Industrie pate et papier	Xylanases - Laccase	Blanchiment Désencrage, amélioration de drainage	[13 [16] [14] [15]
Industrie de cuir	Trypsine les lipases	Assouplissement –poils	[13]
Industrie pharmaceutique	Peroxydase Glucose oxydase Amyloglucosidases	Propriétés antimicrobien Blanchiment Propriétés antimicrobien Propriétés antimicrobien	[14] [14] [14]
Industrie de l'amidon	Amyloglucosidases Glucose isomérase Amylase	Hydrolyse total Conservation de glucose en fructose Liquéfaction de l'amidon	[13] [14] [14]
Industrie alimentaire	Lactase Lipase Pectinase Cellulase Transglutaminase	Hydrolyse du lactase (laitier) Aromes des fromages dégradation enzymatique de la pectine des fruits dans l'élaboration des jus de fruits Clairification Renforcement de la pate feuilletée	[14] [13] [15] [13] [14]

10) Cinétique enzymatique

La cinetique est la science qui a pour objet l'étude de la vitesse des réactions chimiques. La cinétique enzymatique englobe le role biologique des catalyseurs enzymatiques et les mécanismes qui permettent leurs extraordinaire activité catalytique.Avec la cinétique enzymatique nous cherchons à déterminer la vitesse maximale de la reaction que l'enzyme catalyse et à mesurer son affinité pour les substrats et les inhibiteurs. L'analyse de l'influence des conditions de la reaction sur sa vitesse, couplée à l'etude de la structure et des proprietes chimiques de l'enzyme, donne des informations sur la nature du mécanisme de l'activité catalytique. Ces informations sont essentielles pour la compréhension globale du métabolisme[1].

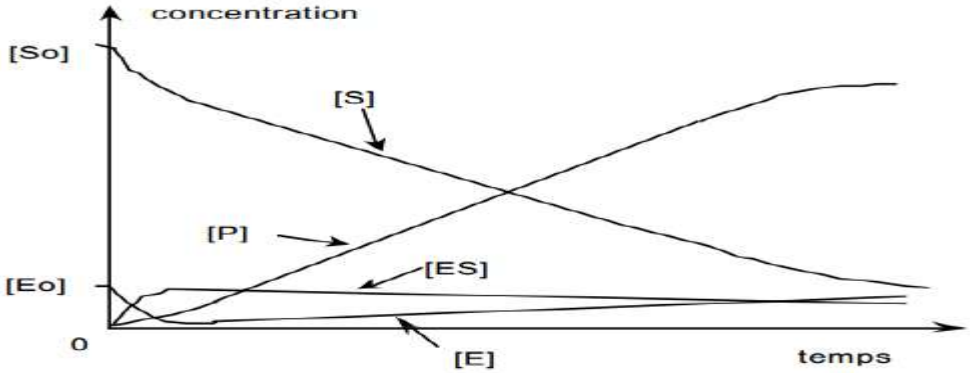


Figure.I.7 : Evolution de la concentration du substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E) en fonction du temps [4].

10.1. L'activité enzymatique

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

Ses modes d'expression sont :

- L'IUPAC et l'IUB recommandent l'adoption d'une unité internationale: U.I [17]. qui représente la quantité d'enzyme permettent la transformation d'une micromole de substrat par min [18] ;
- les katals (ou kat) : kat représente la quantité d'enzyme transformant une mole de substrat par seconde

Cette activité est classiquement ramenée à:

- l'unité de volume de la solution enzymatique (concentration d'activité catalytique ou CAC encore appelée concentration d'activité enzymatique ou CAE, en UI par unité e volume ou kat par unité de volume).
- la masse d'enzyme (activité spécifique ou AS en UI par unité de masse ou kat par unité de masse).
- la quantité de matière transformée par mole d'enzyme (activité enzymatique molaire ou AEM, encore appelée activité molaire spécifique ou AMS [18].

10.2. Equation de Michaelis- Menten

Les principes généraux de cinétique chimique s'applique aux réactions catalysée par les enzymes, cependant, ces dernier possède un caractère particulier : c'est le phénomène de saturation par le substrat, sur la figure I.8, se trouve la représentation dite Michaelis –Menten, nous voyons que la vitesse de la réaction est proportionnelle a la concentration du substrat lorsque cette dernier est très basse. Cependant, si la concentration de substrat augmente d'avantage, la relation dévie de la linéarité et la vitesse augmente moins rapidement que la concentration de substrat, jusqu'au point où, à une concentration suffisamment haute (ou saturante), la vitesse tends à une valeur limitant (ou asymptotique) dernier se décompose dans une deuxième étape pour régénérer l'enzyme et libérer le produit P. [12]

La théorie de Michaelis Menten admet que l'enzyme E réagit dans une premier étape avec le substrat S pour former le complexe enzyme –Substrat ES.

Le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit ainsi :

$$E+S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{K_{-2}}{\overset{K_2}{\rightleftharpoons}} E+P$$

Où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit et K_i sont les constants de vitesse des réactions élémentaires [12].

10.3. Expression algébrique da la vitesse

En 1913, suite aux travaux de Victor Henry, Maud Menten et Leonor Michaëlis et qui travaillaient sur le système réactionnel en posant les hypothèses simplificatrices suivantes, suggérées par les études expérimentales :

- Les mesures de cinétique seront toujours fait pour des concentrations de produit très faible : c'est la mesure de la vitesse initiale (v_0) pour [P]=0et [S]=$[S]_0$ où $[S]_0$ est la

concentration de substrat à l'instant initial. Cette hypothèse permet de négliger la réaction élémentaire

$$E+P \xrightarrow{K1} ES$$

- La concentration totale du substrat $[S_0]$ est grande (>>) devant celle de l'enzyme $[E]_0$.
- des additions de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libre de l'enzyme, du substrat et du complexe (appelé complexe de Michaëlis), on parle l'hypothèse du quasi-équilibre ou pré-équilibre

Le schéma réactionnel s'écrit ain

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{-1}}{\rightleftarrows}} E.S \xrightarrow{K_{-1}} E+P$$

Cette hypothèse permet d'établir l'expression de la vitesse de la réaction enzymatique qui donnée par l'équation suivante

$$V0 = \frac{VM[S]0}{KM+[S]0} \quad \text{.....(1)}$$

Ce qui fait apparaître la vitesse $V_{max} = K_{cal}.[E]_0$ et la constante de Michaelis Km ayant pour formule **[12] :**

$$Km = \frac{K_{-1}+K_2}{K_1} \quad \text{.....(2)}$$

Cette démonstration met au point plusieurs conclus

1. La représentation V0= f ([S] 0) est de type hyperbolique Figure I8
2. La vitesse maximale initiale Vm atteinte pour une concentration $[E]_0$ et pour une concentration très grande de $[S]_0$ devant Km .
3. La constante de Michaelis-menten est égale à la concentration de substrat S correspondant à VM/2 [13]

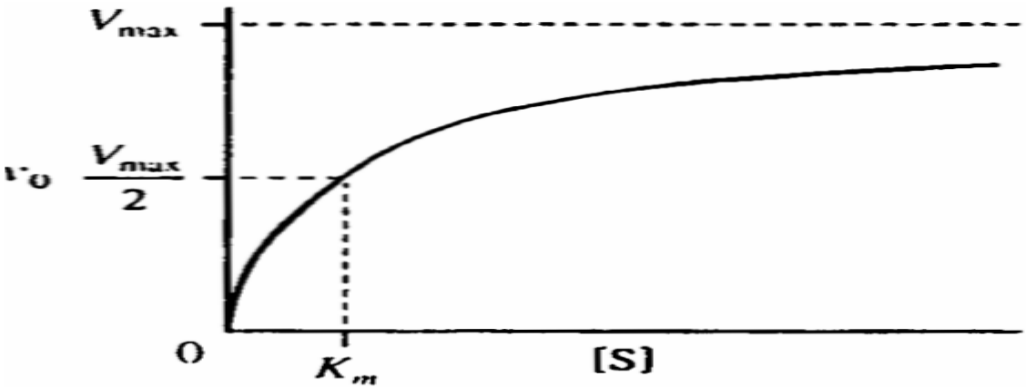


Figure I. 8 : Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne [12].

10.4. Signification des constantes cinétiques

- V_{max} est la vitesse de la réaction lorsque l'enzyme est à saturation. Ou ,lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat.

- K_M est la concentration du substrat lorsque l'enzyme est à demi- saturation.

K_M est donc l'inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat [9].

10.5. Facteurs influençant la vitesse des réactions enzymatique

1) Influence de la Température : toute enzyme peut être inactivé par les basses température, de manière réversible, une augmentation de la T :

- Augmente la vitesse de la réaction chimique.
- Augmente la vitesse de la dénaturation de l'enzyme, diminution ainsi de son activité catalytique

La somme de ces deux effet donne une courbe caractéristique que l'activité enzymatique-température qui passe par un maximum, montré aussi l'existence d'une T^0 optimal [4].

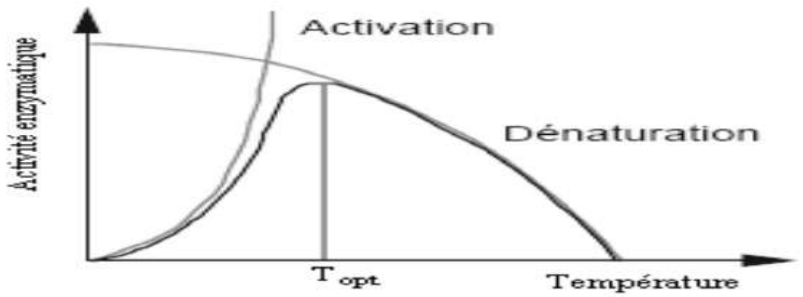


Figure I.9 : L'activité enzymatique en fonction de la température.

2) Influence du pH sur la vitesse de réaction

Les pH extrêmes, inferieurs à 2ou supérieurs à 11, provoquent la dénaturation de la protéine enzymatique, irréversible si l'exposition à ces pH dépasse quelques secondes.

Dans la zone de pH situés entre 2 et 11, les vitesses des réactions enzymatiques sont très sensibles aux variations de pH par ce que celles-ci peuvent agir sur le substrat et sur l'enzyme, le pH modifie l'ionisation du substrat s'il s'agit d'une molécule ionisable (acides faible , bases faible, acides aminés, peptides, protéines) , le pH a surtout une action sur la protéine enzymatique : il modifie le degré d'ionisation des chaines latérales des résidus d'acides aminés, en particulier au niveau du site actif, d'où une modification des liaisons ioniques, des liaisons H ou des forces de van der Waals l'unissant au substrat. Les autres centres actifs sont également modifiés, d'où la possibilité de changements dans le contrôle de l'activité de l'enzyme par ses effecteurs allostériques. Dans le cas des enzymes oligomeriques, les forces unissant les monomères sont modifiées, ce qui transforme le comportement des enzymes

allostérique. En outre, les modifications de pH entrainent des modifications en profondeur de la protéine enzymatique, changement les conditions de transport des électrons ou ions H^+ à l'intérieurs de celle-ci d'où l'apparition de différences de réactivité [6].

3) Effecteurs de la réaction enzymatique

On vient de voir que la vitesse des réactions enzymatiques déponde à la fois de la concentration en enzyme et de la concentration en substrat présents dans le milieu de réaction, les cellules sont effectivement capables de modifier l'une et l'autre de ces deux valeurs pour adapter la vitesse de production de molécules à leurs besoins.Il y a d'autres variables susceptibles de modifier la vitesse de réactions enzymatique. On peut les grouper sous le terme d'effecteurs. Les uns sont surtout efficaces in vitro.Il interviennent dans l'etude experimentale des enzymes en dehors des organismes vivants, par example lord des dosages d'activité enzymaiqueréalisés pour les besoins médicaux. Les autres agissent in vitro et adaptent le travail des enzymes à leurs environnement biologique.

D'autres agissent seulement dans une zone étroite de pH, si on trace le graphique de la variation d'activité. [6].

a) **Les activateurs :** Ils sont de natures diverses :

- Activation par les ions métalliques : ils peuvent favoriser une bonne conformation de l'enzyme, la fixation du substrat sur l'enzyme ou participer directement à la catalyse (e.g. toutes les kinases sont activées par le Mg^{2+}) [9].

-Activation par protéolyse limitée (irréversible), i.e. clivage spécifique d'une ou plusieurs liaisons peptidiques, d'un proenzyme (ou zymogène) inactif, révélant ou créant le site catalytique (e.g. les enzymes digestifs, les facteurs plasmatiques de la coagulation) [6].

- Activation par modification covalente (réversible) :l'enzyme coexiste sous 2 formes interconvertible, l'une phosphorylée, l'autre non phosphorylée : pour un enzyme donnée, l'une est active et l'autre inactive. Selon l'enzyme, la forme active est phosphorylée ou non. La conversion enzymatique de l'une en l'autre forme, diversement contrôlée. Permet l'activation ou l'inactivation de l'enzyme. (Il existe d'autres modifications covalentes que la phosphorylation.) [6].

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

b) Les inhibiteurs

On ne parle pas ici des inhibiteurs non spécifiques que sont les agents dénaturants des protéines.

Les inhibiteurs spécifiques ralentissent la vitesse de la réaction enzymatique, jusqu'à la stopper. Cette inhibition peut être levée dans des conditions réactionnelles particulières (inhibiteurs réversibles) ou ne pas l'être (inhibiteurs irréversibles).

1. Types d'inhibitions :

a- Inhibition compétitive :

Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur se combine avec l'enzyme libre et entre ainsi en compétition avec le substrat au niveau du site actif.

Inhibiteur compétitif réagit réversiblement avec l'enzyme pour former un complexe enzyme – inhibiteur EI analogue au complexe E-S on a donc :

$$E_L + I \rightleftharpoons EI$$

On peut définit une constant d'inhibiteur K_L analogue a la constant K_M : K_L=E.I/EI

L'expression de vitesse initial devient $v = v_{max} .S/ [K (1+I/K_I) +S]$ ……..(3)

Tout se passe en présence d'inhibiteur comme si la valeur de la constant K_m était accrue, sans qu'il y ait variation da la constant v_{max}.

V_{max}=cst et $K'_M > K_M$.

Si l'on pose $K'_m=K_M (1+I/KI)$, l'expression de Lineweaver et Burk devient :

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K M}{V M}\right)\frac{1}{S} + \frac{1}{VM}$$ [12]……..… (4)

b- Inhibition incompétitive :

L'inhibiteur ne se combine pas avec l'enzyme libre et n'affect pas la réaction de celui-ci avec son substrat mais il se fixe sur le complexe E-S-inhibiteur inactif qui ne peut plus fournir le produit normal de la réaction. $ES + I \rightleftharpoons ESI$.

Le constant d'inhibiteur K_L devient ESI.I / ESI.

Tout se passe comme si le rapport K_M/v_{max} ne changeait pas mais K_M et v_{max} diminue .Des droit parallèle sont obtenue dans la représentation de Lineweaver et Burk [12].

c- Inhibition non compétitive

Un inhibiteur non compétitif peut se combiner, en limitant leur action, à la foit avec l'enzyme libre et avec le complexe E-S .Les inhibiteurs non compétitifs se fixe sur l'enzyme au niveau d'un site qui est différent de site actif.

Tout se passe comme si K_M restait constant alors que v_{max} diminuent [12].

11) Système a deux substrats et deux produits

Les réactions enzymatiques impliquant deux substrats et deux produits représentent 60%des réactions biochimiques connues. La théorie dans ce cas devient un peu plus compliquée, Il faut en particulier distinguer différents mécanismes selon l'ordre de fixation et de largage des différents substrats et produits ; ou selon l'influence de la concentration d'un substrat sur Vmax et K_M de l'autre substrat. Il y a deux classifications mécanistiques majeures [18] :

a. **Réactions séquentielles** : où tous les substrats doivent combiner avec l'enzyme avant qu'il y ait transformation de substrat en produit. Ce type de réaction est connu sous le nom de réactions à déplacement simple [18].

Il y a deux sortes de réactions dans l'addition des substrats [18].

b. **Mécanisme séquentiel au hasard** : Si les sites de fixation sont les deux accessibles à la surface de l'enzyme, l'ordre de fixation importe peu.

Mécanisme ordonné ou obligatoire : Si le site actif de l'enzyme a la forme d'une Poche, l'un des substrats doit pénétrer en premier.

c. **Réactions ping-pong** : où un ou plusieurs produits sont libérés avant que tous les substrats aient participé dans la réaction. ces réactions connues sous le nom déplacement double impliquent une modification de l'enzyme et les deux substrats, A et B, ne se rencontrent pas sur la surface de l'enzyme [18].

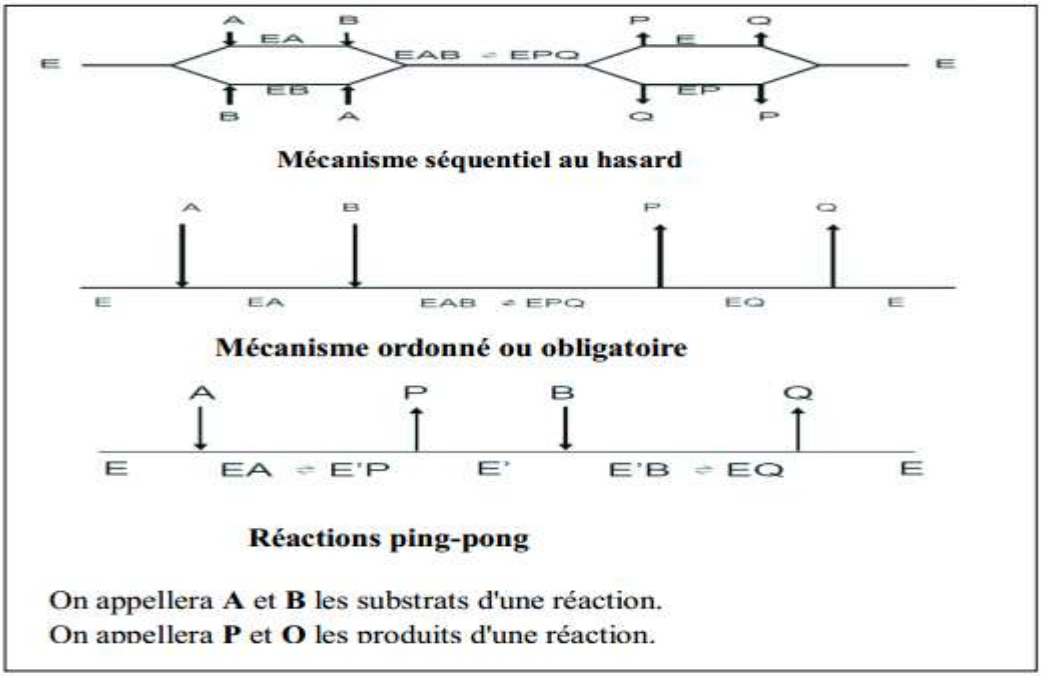


Figure I. 10 : Différents mécanismes de réactions enzymatiques à deux substrats [19].

1) Introduction :

Les peroxydases firent partie des premières enzymes étudiées lorsque Schonbein, en 1855, observa l'apparition d'une coloration intense en présence de peroxyde d'hydrogène (H202), de gaïacol et d'extraits animaux ou végétaux. C'est en 1898 que Linossier introduisit le nom de 'peroxydase' : « je propose, pour éviter toute confusion, de réserver le nom d'oxydase aux corps capables de fixer sur un corps oxydable I 'oxygène de l'air et de donner le nom de peroxydase aux corps dont la fonction est de décomposer le peroxyde d'hydrogène ou autres peroxydes analogues et provoquer ainsi des oxydations » [20].

2) Définition :

La peroxydase est une protéine héminique c'est-à-dire qu'elle contient une partie non protéique plane d'hème, caractérisée par la présence d'un Fe III (donc en réalité hémine et non hème) au centre d'une porphyrine Figure .II.1 [21].

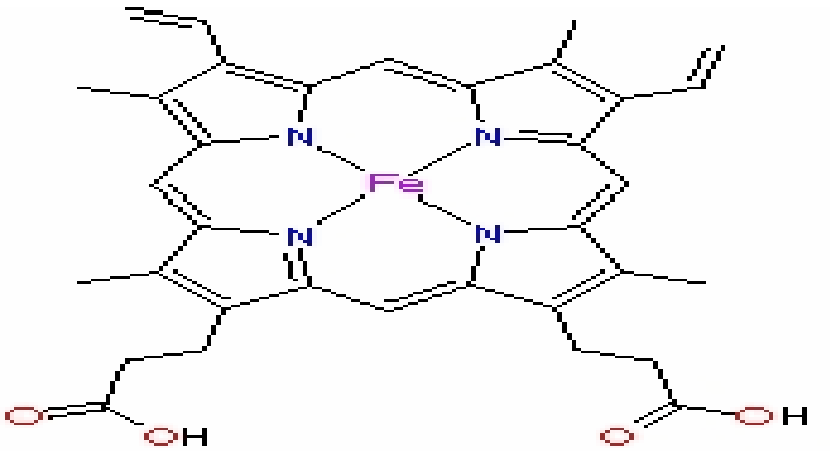


Figure. II. 1 : Structure de l'hémine

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

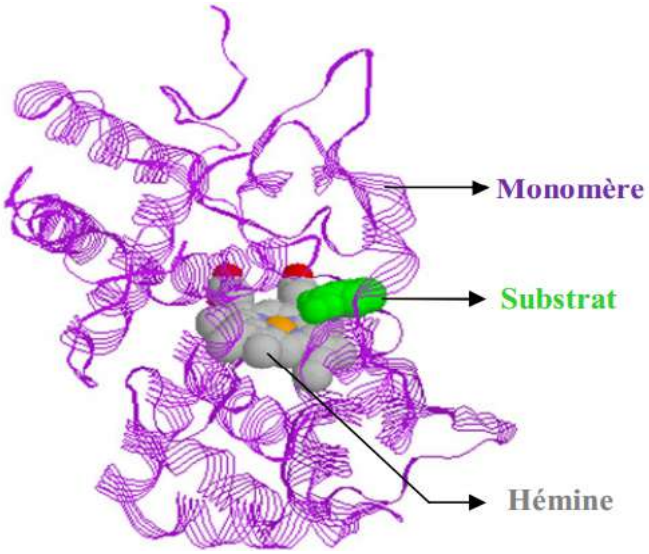


Figure. II. 2 : Structure de la peroxydase du radis(HRP) [22].

3) La spécificité de substrat

La définition du substrat physiologique d'une enzyme est souvent une étape importante dans l'élucidation de son rôle. Dans le cas des peroxydases, la réaction de peroxydation implique un substrat oxydant, en général l'H_2O_2, ou des molécules contenant un groupement peroxyde telles que les peracides (peroxyde d'éthyle ou de méthyle) ; deux substrats réducteurs différents, ou non, qui sont, pour la plupart, de petits composes aromatiques tels que des phénols, des hydroquinones, des amines aromatiques, ce qui constitue un groupe très vaste de molécules impliquées dans le métabolisme secondaire

4) Structure du site actif

Le site actif des peroxydases est centre autour de I 'hème qui est une protoporphyrine IX associée a un a tome de fer ferrique, Fe3+ (Fig. I). 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 (numérotations HRPC), très conservée chez les peroxydases. Sur la cote distale de l'hème se trouvent trois acides amines conserves : arginine 38, phénylalanine 41 et histidine 42. Ces trois résidus servent de site de fixation de l'H_20_2 et interviennent dans la catalyse. Ces quatre acides amines sont situes sur deux hélices a conservées, parallèles au plan de l'hème : l'hélice 8 (Arg 38, Phe 41 et His 42) et l'hélice F (His 170) [20].

Sur le cote proximal, un aspartate conserve (Asp 247) établit une liaison hydrogène avec l'histidine 170 et dont le rôle est important dans le mécanisme de réaction. Enfin plusieurs molécules d'eau présentes au niveau du site actif établissent un réseau de liaisons hydrogènes entre elles et avec l'hème et les acides amines proches stabilisant ainsi la structure [20].

5) Le mécanisme réactionnel de la peroxydase

Tout d'abord, un équivalent de peroxyde d'hydrogène réagit avec l'enzyme pour donner le composé I, c'est à dire un cation radical porphyrine, l'enzyme réagit avec un atome de fer tétravalent.

Cela constitue une réaction d'oxydo/réduction où le H2O2 est réduit en H2O et l'enzyme est oxydé. Un équivalent oxydant réside sur le fer, générant le oxyferryl (FeIV=O) comme intermédiaire.

Le composé I oxyde le substrat pour donner le radical (·AH). Il subit une seconde oxydation générant l e composé II qui contient un centre oxyferryl coordonné à un ligand porphyrique normal (dianionique). Finalement, le composé II est réduit à l'état ferrique natif. La charge nette du composé I est +1 alors que celle du composé II est neutre [23].

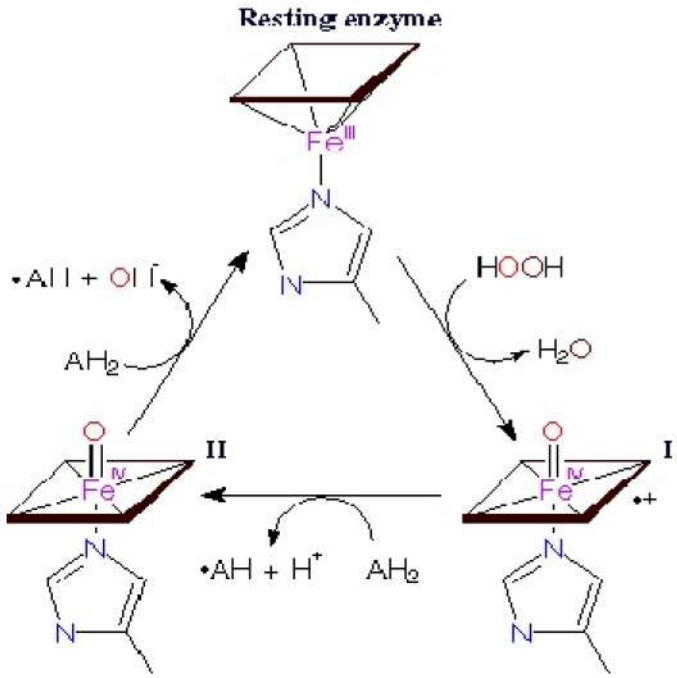


Figure. II. 3 : Mécanisme réactionnel de la peroxydase [24].

Ce mécanisme peut être simplifié par les réactions d'oxydoréduction suivantes [25] :

Peroxydase + H_2O_2 ⟶ Composé I + H_2O

Composé I + AH_2 ⟶ Composé II + AH•

Composé II + AH_2 ⟶ Peroxydase + AH•+ H_2O

2 AH• ⟶ A + AH_2 (or AH-AH)

En cas d'excès de H_2O_2 :

Composé II + H_2O_2 ⟶ Composé III

6) Classification :

Les peroxydases sont des enzymes intra ou extracellulaires, qui se secrètent par les microorganismes, les animaux et les plantes. Elles sont classées en trois familles [25] selon la classification de l'Union internationa1e de biochimie et de bio1ogie moléculaire (IUBMB)

Elle est basée sur les mécanismes de réactions et les substrats mis en jeu. Elle est disponible sur le site internet de I'IUBMB avec des mises à jour récentes [20].

1. Peroxydases animales (classe I) : se sont des peroxydases intracellulaires, on cite : cytochrome c peroxidase, ascorbate peroxydase les peroxydases bactériennes, [25].

2. Peroxydases fongiques extracellulaires (classe II) : ce type de peroxydase est isolé de différents mycètes, particulièrement (WRF). La Manganèse peroxydase (MnP) et la Lignin peroxydase(LiP) sont des glycoprotéines, les plus impliquées dans la transformation des colorants synthétiquees, leurs sources peuvent êtres différentes, [25].

3. **Peroxydases des plantes (classe III) :**

Ils sont appelées aussi peroxydases de classe III, catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce sont des glycoprotéines contenant de la ferriprotoporphyrine IX comme site actif. Le poids moléculaire de cette classe de peroxydase, est compris entres (32 à 42 kDa) se sont distribuées dans le raifort (HRP), le navet, la courgette (BGP), les grains de Soja, tomate, etc. ainsi, cette classe de peroxydase est très impliquée dans le domaine de biotechnologie : en médecine,

biologie, et en chimie. Depuis plusieurs années, des études ont montrés leur capacité de décolorer et de transformer les phénols et les colorants textiles efficacement [25].

La peroxydes a été extraite de plusieurs plantes, y compris de raifort (*Armoracia rusticana*), pêcher (*Prunus persica*), l'igname (*Alocasia macrorhiza*), le manioc *(Manihot utilissima*), l'artichaut (*Cynara L.*), la patate douce (Ipomoea batatasex L., Lam). Navet (*Brassica campestre rapifera*), la courgette (*Cucurbita pepo*) et d'autres. Pour les légumes et les fruits des différents types de isoperoxydases, y compris les types anioniques et cationiques avec des valeurs de points isoélectriques bas et haut, respectivement [26].

7) Les applications de la peroxydase

7.1. L'élimination des contaminants phénoliques et des composés aromatique :

La plupart des composés aromatiques sont toxiques et doivent être éliminés des eaux résiduaires avant leur rejet dans l'environnement. Les composes aromatique comme les phénols et les amines aromatique représente l'une des principales classes de polluants, ils sont trouvent dans les eaux usée de plusieurs usines (de le raffinage du pétrole, des résines et des plastiques, préservation du bois, revêtement métallique, colorants et autres produits chimiques, les textiles, L'extraction minière …ext [27].

Les peroxydases qui ont été utilisés pour le traitement des contaminants aromatiques aqueuses et décoloration de colorants comprennent la peroxydase de raifort (HRP), la peroxydase de lignine (PIL) et un certain nombre d'autres peroxydases provenant de sources différentes [27].

7.2. Dégradation des colorants :

Le traitement enzymatique a été employé comme étape de traitement combiné pour enlever un ou plusieurs composés qui peuvent interférer suivant processus de traitement. Par exemple, si des composés inhibiteurs ou toxiques peuvent être enlevés sélectivement, la partie du matériel organique pourrait être traitée biologiquement, réduisant au minimum de ce fait le coût du traitement [28].

- Les colorants azoïques:

Ces colorants sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Cette catégorie de

colorants est actuellement la plus répondue sur le plan de l'application, puisqu'ils représentent plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes [29].

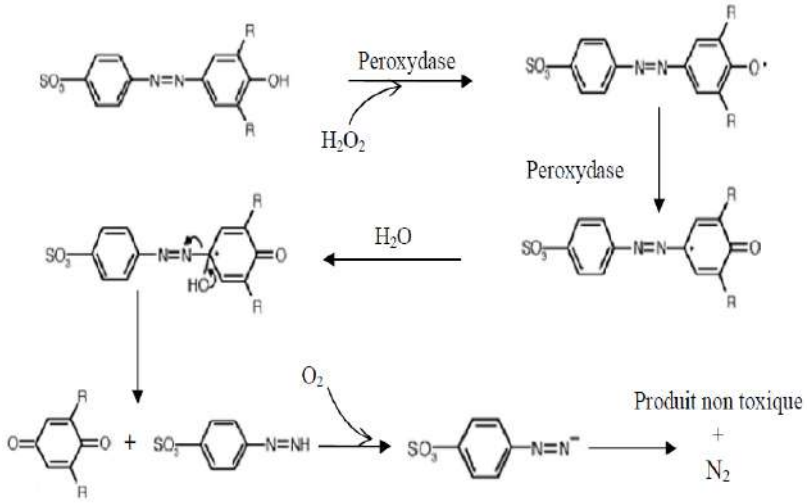


Figure. II. 4: Le mécanisme d'oxydation des colorants azoïques par la peroxydase [30].

7.3. La production des colorants alimentaires :

De plus, la peroxydase surtout celle des plantes est utilisée pour produire des colorants alimentaires basés sur les phénols naturels, pour modifier les colorations des jus, du thé, les parfums industriels…etc [25].

7.4. Dans l'industrie laitière

Il existe un papier test spécifique pour la détection de lactoperoxydase (enzyme) dans le lait. Dans 'industrie laitière, ce test s'emploie pour vérifier rapidement et facilement si le traitement à ultra-haute température du lait est bien achevé. Contrairement aux méthodes optionnelles .Il suffit de déposer une goutte de lait sur le papier. S'il reste blanc, le lait ne contient pas de lactopéroxydase, ce qui indique que le traitement thermique a été réalisé correctement.

En cas d'apparition d'une coloration bleue dans les 2 minutes qui suivent, le test est positif et indique que la lactopéroxydase n'a pas encore été totalement inactivée et que le traitement UHT n'est donc pas complet [31].

7.5. Des produits cosmétiques protecteurs de la peau :

La peau utilise un ensemble de mécanismes protecteurs pour se défendre contre les attaques de l'environnement. Un des mécanismes protecteurs les plus étudiés est le système de pièges à radicaux libres. Les pièges à radicaux libres aident à protéger la peau en neutralisant les substances dangereuses qui peuvent être produites par l'exposition au soleil et la pollution.

La peroxydase qui provient d'un extrait aqueux de fenouil (*Foeniculum vulgare*) a la capacité de réduire l'érythème provoqué par les UV. La capacité à réduire l'érythème est une mesure des capacités apaisantes, qui peuvent aussi être considérées comme une capacité à piéger les radicaux libres. Lorsque la peroxydase est présente, elle peut agir pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène, apportant ainsi un spectre total de protection contre les radicaux libres [32].

7.6. Biocapteurs à base du Peroxydase :

Un domaine qui offre du grand potentiel pour les applications de la peroxydase est que les biocapteurs électrochimiques comprenant. Récemment, les électrodes à base de la peroxydase sont largement utilisées dans les systèmes d'analyse pour la détermination de peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organique [32].

7.7. Application de la peroxydase dans le domaine médicale

a) Teste de glycémie :

Le dosage du glucose sérique est basé sur une technique enzymatique colorimétrique par Kit-Prochima par la méthode de Trinder (1969). Le D-glucose est transformé par la glucose oxydase en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène lequel oxyde, en présence de la peroxydase, le phénol en un complexe chromogène coloré en rouge dont l'absorbance est mesurée à 505 nm. [33].

- **Principe**

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose oxydase}} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{phénol} + 4\text{AAP} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{quinonéimine} + 4\,H_2O$$

b) **Dosage du cholestérol :**

Ce dosage se fait par un Kit, par la méthode de Fasce (1982). Les esters de cholestérol sont hydrolysés par un cholestérol ester hydrolase en acides gras et cholestérol. Ce dernier et celui préexistant sont oxydés par un cholestérol oxydase en A^4-cholestenone et peroxyde d'hydrogène, celui-ci, en présence de peroxydase, oxyde le chromogène amino-4- antipyrine en un composé coloré en rouge d'absorbance maximale à 505 nm [33].

La méthode enzymatique est décrite selon le schéma réactionnel suivant :

Cholestérol estérifié $\xrightarrow{\text{Cholestérol oxydase}}$ cholestérol+ acides gras libre

Cholestérol + O_2 $\xrightarrow{\text{Cholestérol estérase}}$ Cholestene-3-one + H_2O_2

2 H_2O_2 + phénol+4AAP $\xrightarrow{\text{Peroxydase}}$ Quinoneimine (rose) + $4H_2O_2$

c) **Dosages des triglycérides :**

Le glycérol libéré par hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase est transformé en glycérol-3-phosphate par la glycérokinase. Le glycérol 3-phosphate subit l'action du glycérol phosphate oxydase pour former la dehydroxyacétone phosphate et du peroxyde d'hydrogène. Celui ci en présence de la peroxydase oxyde un groupement chromogène 4-Aminoantipyrine / phénol pour former un composé coloré en rouge. Ce dosage se fait par Kit selon la méthode de Fassati et Prencipe (1982) [33].

Introduction

La caractérisation de la peroxydase faisant l'objet de notre travail. La peroxydase a été extraite à partir d'une source végétale, le navet blanc (*Brassica rapa*).

Pour cela, la stratégie expérimentale adoptée consiste à extraire l'enzyme brute et la purifier par la suite en utilisant la méthode de précipitation à l'aide d'un solvant organique.

La caractérisation de la peroxydase purifiée a été réalisée à travers l'étude des effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique et la détermination des valeurs optimales pour lesquelles cette activité devient maximale.

MATERIEL ET REACTIFS

- **Equipement :**
  - Agitateur.
  - Centrifugeuse.
  - pH-mètre.
  - Mixeur.
  - Spectrophotomètre UV –Vis
  - Balance.
  - Etuve.
  - La hotte.
  - Chronomètre.
- **Verreries :**
  - Tubes à essai.
  - Fioles jaugées (5, 10, 25, 50, 100, 250 ml).
  - Pipettes (1, 5, 10,20 ml).
  - Cristallisoir.
  - Béchers.
  - Burette.
- **REACTIFS**
  - Acetone (**C_3H_6O, M = 58, 0791 g/mol**).
  - 4aminoantypiryne (**$C_{11}H_{13}N_3$, M=203,27g/mol**).
  - Ferricyanure de potassium **(K_3 [$Fe(CN)_6$], M=329,244g/mol).**
  - Chlorure de Calcium (**$CaCl_2$ M=110.98g/mol).**
  - Glucose (**$C_6H_{12}O_6$ M= 180, 1559 g/mol**).
  - Sulfate de fer (**$FeSO_4$ M=151.91g/mol**).
  - Hydroxyde de sodium **(NaOH M=39.997g/mol).**
  - Chlorure de zinc **($Zncl_2$ M=136.31g/mol).**
  - Chlorure de magnesium ($Mgcl_2$)
  - Dodécylsulfate de sodium **(SDS M=288. 379g/mol).**
  - Ethylène Diamine Tétra-Acétique **(EDTA M=292.242g/mol)**
  - Urée **(CO (NH_2)$_2$ M=60.0553g/mol).**
  - Chlorure de sodium **(NaCl 58.443g/mol).**
  - Solution tampon de pH 3 à 10.

- Phosphate mono potassique **(KH_2PO_4 M=136.085g/mol).**
- Chlorure de potassium **(KCl M=74.551g/mol).**
- Chlorure d'hydrogène **(HCl M=36.461g/mol).**
- biphtalate de potassium (**$C_8H_5KO_4$ M=204 g/mol**)
- colorants azoïques **:** noir d'eriochrome **($C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$. M=461,38 g/mol)**
- Glucose oxydase.

❖ **Substrats :**

- **Peroxyde d'hydrogène : 30% et 10%**
  - ✓ **Formule :** H_2O_2.
  - ✓ **Masse molaire :** 34.01g/mol.
- **Phénol :**
  - ✓ **Formule brute:** C_6H_6O.
  - ✓ **La masse molaire :** 94,1112 ± 0,0055 g/mol.
  - ✓ **T° fusion** : 43 °C.
  - ✓ **T° ébullition** : 182 °C.
  - ✓ **Solubilité** : 98 g/L d'eau.
  - ✓ **Masse volumique** : 1,073 g·cm-3.

I. Procédure de Préparation de la peroxydase

a) extraction de peroxydase :

Pour réaliser une extraction plus soignée de la peroxydase en vue de purification éventuelle : toutes les verreries utilisées, le pot du mixer, et le morceau de navet, ainsi l'eau distillé sont introduit dans le congélateur. …Après 15 min de congélation, on fait sortir le morceau de navet et ensuite le navet a été épluché et coupé en petits morceaux [34].

Le broyage de 100g de navet blanc avec l'ajout 100ml d'eau distillée est réalisé à l'aide d'un mixeur à bras.

b) Séparation de la peroxydase :

La séparation est réalisée par filtration à l'aide d'une gaze pour obtenir un extrait brut .qui est conservé dans le réfrigérateur.

c) Purification :

La purification partielle de la peroxydase de navet a été réalisée par la méthode de précipitation à l'acétone selon le protocole suivant [35] :
Placer un erlenmeyer contenant 75ml de l'extrait brut au congélateur pendant 15 min.
Après 15mn au congélateur, faire sortir le bécher contenant l'extrait brut et le disposer sous agitation magnétique dans un cristallisoir contenant de la glace pilée, puis ajouter à la solution enzymatique 225 ml d'acétone glaciale, goutte à goutte à l'aide d'une burette.

Laisser le mélange (extrait brut-acétone) dans le réfrigérateur pendant 2 heures. Il se forme alors, un précipité blanc qui pourra être récupéré par centrifugation à 30000 rpm pendant 15min.
Dissoudre le culot dans 25ml de tampon phosphate pH7 : La solution obtenue est de l'extrait enzymatique de la peroxydase partiellement purifiée (EEPP).



1-Prendre 100 g de navet après avoir les éplucher



2- Le navet pesé est coupé en petits morceaux.



3- Broyage des morceaux du navet dans un mixeur avec 200 ml d'eau distillé.



4- Filtration de mélange obtenu avec une gaze



5- Obtention d'un extrait enzymatique brut(EEB) conservé à basse température



6- Le dispositif de purification de l'extrait brut de navet par l'acétone



7- Il se forme un précipite après 2 heures dans le Réfrigérateur



8- Centrifugation de l'extrait purifié à 3000rpm pendant 15 min



9- Dissolution de culot dans 25 ml de tampon pH 7.0 ; la solution obtenue est l'EEPP

Figure III. 1 : préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase de *Brassica rapa*

II. Teste d'activité enzymatique

L'activité enzymatique des extraits a été dosée en se basant sur la réaction entre le phénol et la peroxydase d'hydrogène (H_2O_2) en présence de 4-Amino-antipyrine [35]. Le produit formé au cours de cette réaction est un chromogène de Quinoneimine (Fig.III.2).

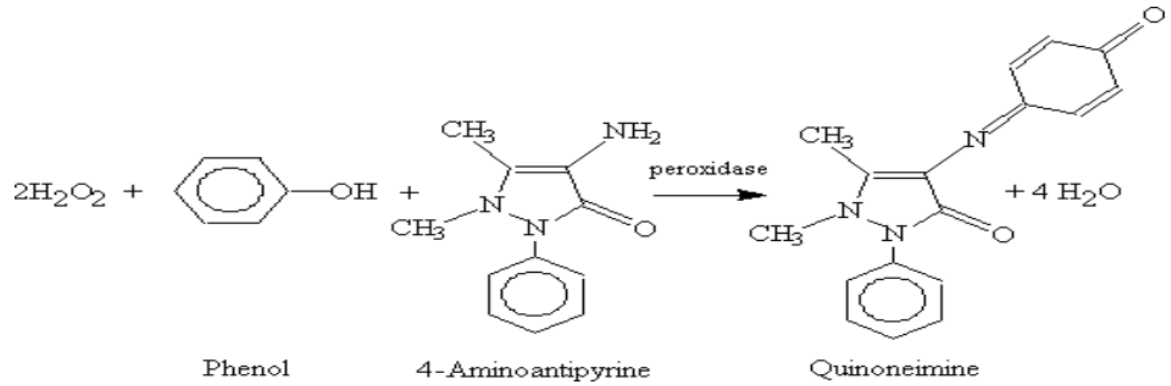


Figure. III. 2 : Réaction entre le phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase.

La Quinoneimine présente des caractéristiques d'absorption particulières dans la gamme visible à la longueur d'onde maximale de 510 à 512 nm.

a) Procédure :

Le protocole de mesure est réalisé comme suit [36] :

- Prélever 0.5ml de la solution d' H_2O_2 à 0.0017M (10%) et mettre dans 25ml de la solution tampon phosphaté à pH=7. (solution 1)

Mélangez 25ml de 4-Aminoantypirine(0.0025M) avec 20ml de phénol(0.17M) (solution 2)

- Prendre 1.5ml de la solution1 avec 1.4ml de la solution 2, et mettez dans la cuve. (c'est le mélange réactionnel)
- La longueur d'onde du spectrophotomètre UV-vis est ajustée à 510 nm.
- Le zéro d'absorbance est obtenu à l'aide du blanc qui est le mélange réactionnel sans enzyme.

La réaction se déclenche avec l'ajout de 0.1ml d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée en fonction du temps jusqu'à l'obtention d'une valeur constante. (Annexe1 et 2)

- Pour calculer l'activité enzymatique AE, la relation suivante a été utilisée :

$$AE\ (U/ml) = \frac{\Delta C \cdot 1000 \cdot V mélange\ réactionnel}{\Delta t \cdot volume\ d'enzyme}$$ [18]……....(5)

Où:

Δt= variation de temps (min)

V réactionnel=3ml.

V d'enzyme=0.1ml

ΔC= variation de concentration $\Delta C = \frac{\Delta DO}{\varepsilon}$ (mol/l)

ε= coefficient d'extinction (l/mol.cm)

Pour calculer la variation de concentration du H_2O_2, il faut d'abord déterminer la valeur de ε (coefficient d'extinction) par la courbe d'étalonnage de l'eau oxygéné.

III. La courbe d'étalonnage de l'eau oxygénée

a) Procédure

Tout d'abord on prépare une gamme de dilutions a différent concentration de l'eau oxygénée pour (30%), avec une concentration de [4AAp]=0.0025M et de [phénol]=0.17M.

En suite on prend de chaque concentration de H_2O_2 (0.1ml) et mettre dans une fiole de 10ml et on complète avec une solution tampon à pH 7 (mélange 1).

D'autre part, dans un flacon on met 10ml de phénol (0.17M) +12.5ml de 4AAP (0.0025m) (mélange 2).

Une autre série de tubes est préparée, chacun contenant 1.4 ml de (mélange 2) avec 1.5ml de (mélange 1). Le mélange est versé dans la cuve du spectrophotomètre et l'absorbance (D.O.) est enregistrée à λ=510nm. La courbe obtenue DO=f ([H_2O_2]) est illustrée sur la figure III.3

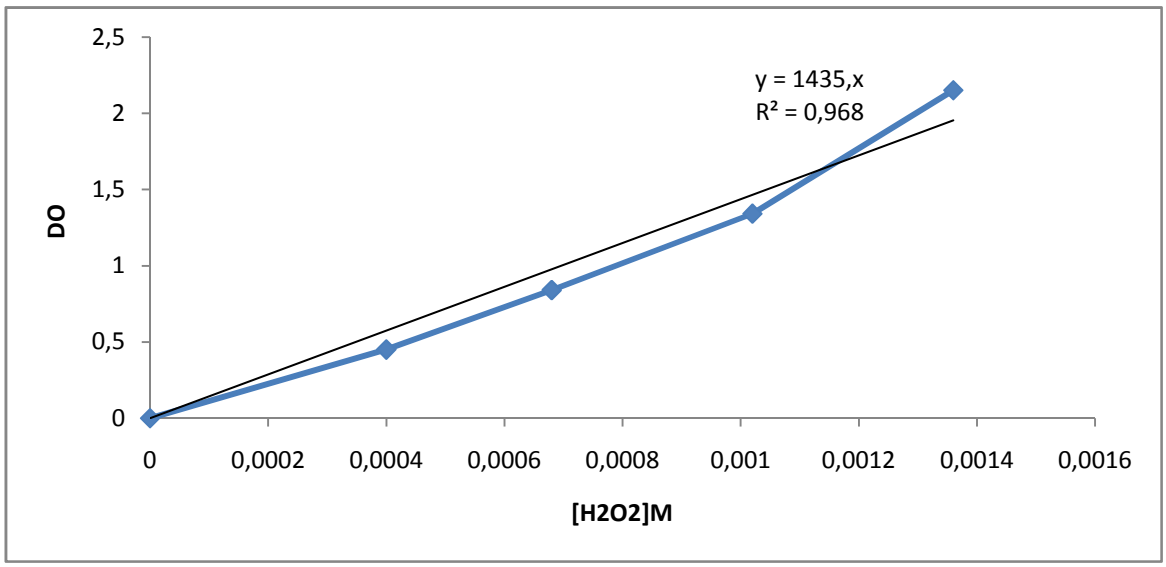


Figure. III. 3 : la courbe d'étalonnage de H_2O_2 (30%) (pH=7 et T ambiante)

Le même procède fait avec H_2O_2 (10%).(figiure III.4)

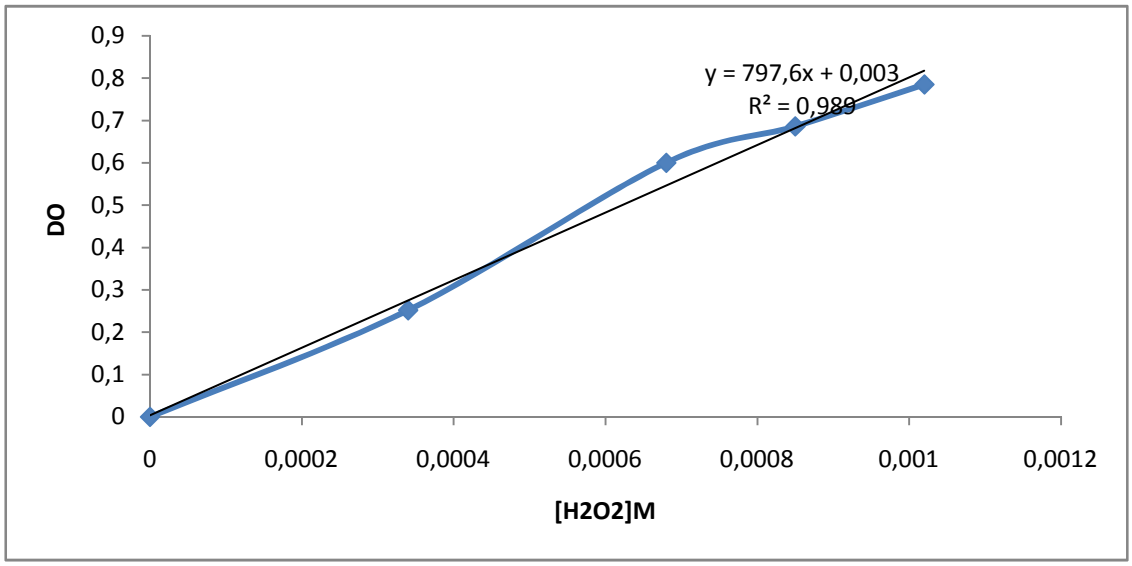


Figure. III. 4 :courbe d'etalonnage de H_2O_2 (10%) (pH=7 et T ambiante)

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau. III. 1: Activité enzymatique des extraits brut et purifié de la peroxydase de navet blanc « *Brassica rapa* ».

Extrait	Activité enzymatique (µmol/ml.min)
brut(EEB)	5.37
Partiellement purifié (EEPP)	4.46

IV. Dosage des protéines

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes. Pour notre travail, la méthode utilisée est celle de Bradford (Annexe 2 : préparation de réactif de Bradford).

a) Procédure

Le protocole de cette méthode est mentionné dans (annexe) :

b) Résultat

La courbe d'étalonnage de l'albumine est présentée dans le graphe suivant(figure III.5) :

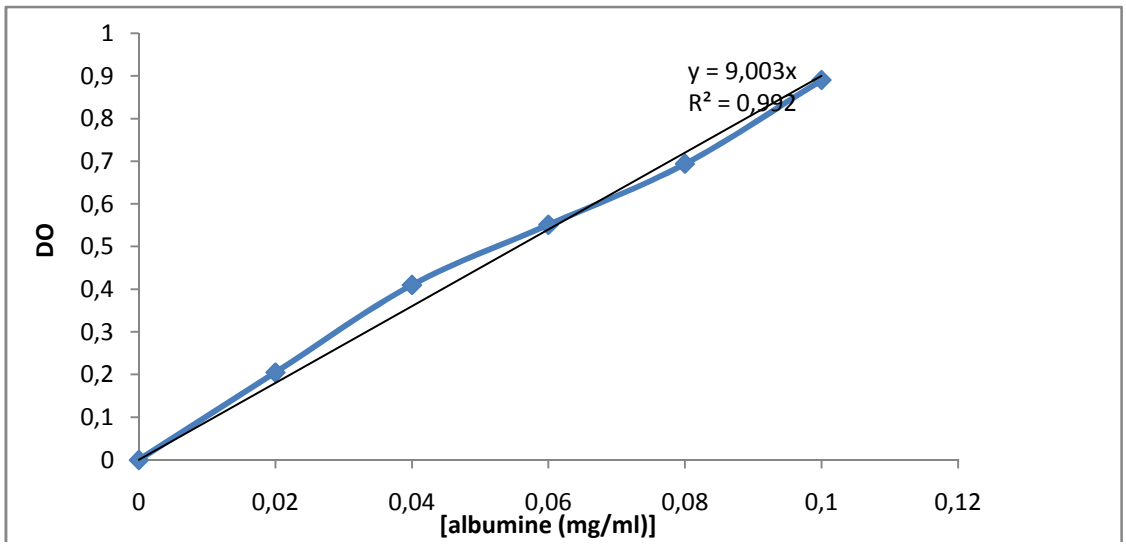


Figure. III. 5 : la courbe d'étalonnage de l'albumine λ=505nm.

Tableau. III. 2 : Concentration des protéines dans les extraits EEB et EEPP

Extrait enzymatique	Protéines (mg/ml)
EEB	0.095
EEPP	0.072

Pour montrer l'efficacité de l'étape de purification il est nécessaire de faire une comparaison entre les deux extraits qui se base sur plusieurs caractères notamment l'activité spécifique définie comme l'activité par mg de protéines.

Le tableau suivant résume ces caractères :

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

Extrait	**Activité enzymatique (UI/ml)**	**[protéines] (mg/ml)**	**Activité spécifique (UI/mg)**	**Volume total (ml)**	**Activité totale (UI)**	**Facteur de purification**	**Rendement (%)**
EEB	5.37	0.09	56.62	80	430.32	1	100%
EEPP	4.46	0.07	63.85	25	111.74	1.20	25.96%

c) Discussion

D'après ces résultats on peut constater que :

- L'extrait enzymatique brut, obtenu à partir du navet (*Brassica rapa.*) est caractérisé par une activité catalytique brute de 5.37 UI/ml.
- La purification par acétone de l'extrait enzymatique brut étudiée n'a pas provoqué une grande chute dans son activité.
- Le rendement diminue après la purification par l'acétone, à cause de la perte d'enzyme durant cette étape ou par dénaturation partielle par l'acétone.
- La quantité de protéines éliminée est d'environ 26.31%.
- Le rendement de purification de 25.96% est une valeur acceptable, ce qui permet d'adopter la méthode de précipitation à l'acétone vue sa simplicité et son efficacité.

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

1) Effet de pH

Le pH est un paramètre essentiel à prendre en compte pour la caractérisation de la peroxydase.

Pour cette raison, et avant l'étude de cette expérience il est nécessaire de préparer des solutions tampons à différent pH :

Les différentes solutions tampons utilisées sont : [37]

pH=3 standard.

pH = 4 (100 ml (0.1M) biphtalate de potassium+0.2 ml HCl (0.1M).

pH = 6 (50ml (0,1M)) KH_2PO_4+ 5,6ml(0,1M) NaOH.

pH = 7 (50ml (0,1M)) KH_2PO4+ 29,1ml (0,1M) NaOH.

pH =8 (50ml (0,1M)) KH_2PO_4+ 46,7ml (0,1M) NaOH.

pH=10 standard.

a) **Procédure**

L'influence de la nature du pH sur l'activité de peroxydase a été étudiée par la préparation des tubes à essai et l'introduction dans chaque tube 0,1ml d'enzyme avec 2ml de solution tampon à différents pH (3, 4, 6, 7, 8 et10). Les tubes sont ensuite incubés à température ambiante pour le déroulement de la réaction pendant 1 heure; le test d'activité est effectué comme suit :

On prend 3ml du milieu réactionnel [4AAP+ Phénol+ H_2O_2] préparé comme suit :

(20ml de phénol (0.17M) +25ml de 4AAP (0.0025M)) (solution1)

25ml de H_2O_2 (10%) (Solution 2).

Ajouter 1.4ml de solution 1 à 1.5 de la solution 2. Mélanger dans la cuve et ajouter à 0.1ml de la solution enzymatique. Mesurer l'activité en mesurant le changement de l'absorbance en fonction du temps à λ =510nm.

b) Résultat :

Les valeurs expérimentales sont converties en activité enzymatique.

Les résultats sont représentés sur la figure III.6 (AE = f (pH)).

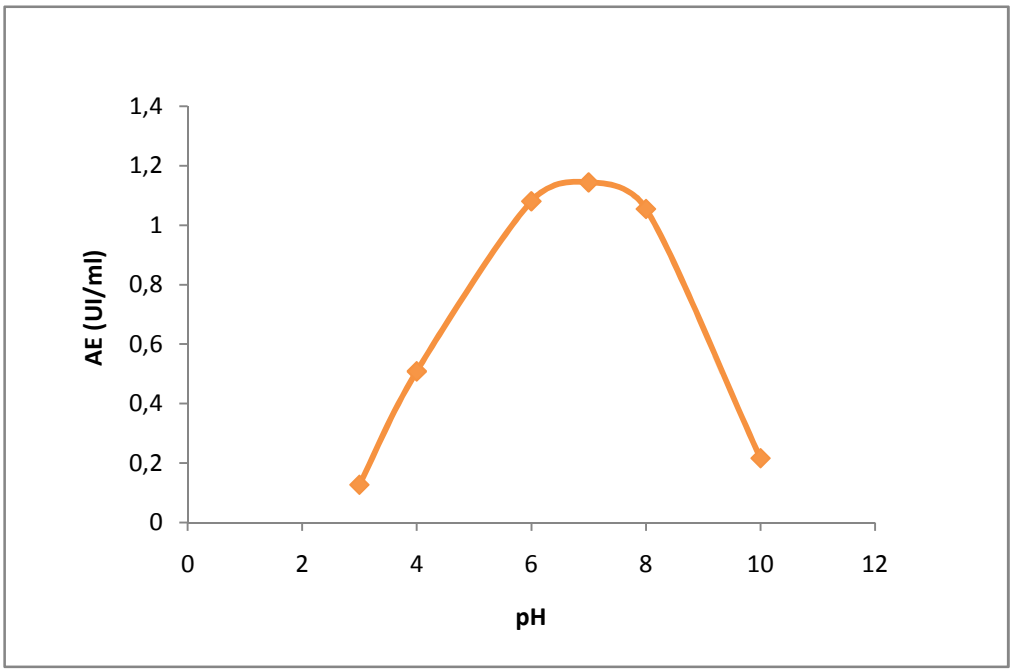


Figure. III. 6 : Effet de pH sur l'activité enzymatique de la peroxydase de «*Brassica rapa* »

a) Interprétation

L'évolution de l'activité enzymatique de la peroxydase en fonction du pH révèle une courbe en cloche faisant une apparition d'une zone de pH optimal entre 6 et 8.

- ✓ Au pH bas pH=3 à pH=4 nous avons observé une diminution de l'activité enzymatique d'environ 89 % et 55% respectivement de la valeur maximale.
- ✓ Aux pH=6 et 8, une diminution insignificative de l'ordre de 5% a été enregistrée, ce qui permet un fonctionnement optimal de l'enzyme dans un large intervalle.
- ✓ L'activité enzymatique maximale de1.14UI/ml est enregistrée pour un pH optimal de 7.

2) Effet de la température

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

a) Procédure

Tout d'abord, préparer une série de tubes à essai chacun contenant 0,1 ml d'enzyme dans une solution tampon pH7.

Incuber pendant 1heure dans l'étuve à différentes température (40, 50, 60,70°C et à température ambiante (T moyenne=19°C)).

Mesurer l'activité enzymatique en ajoutant 0.1 ml de la solution enzymatique correspondant à la température d'incubation au mélange réactionnel phénol-aminoantipyrine- peroxyde d'hydrogène.

b) Résultat

Les résultats sont illustrés sur la figure III.7.

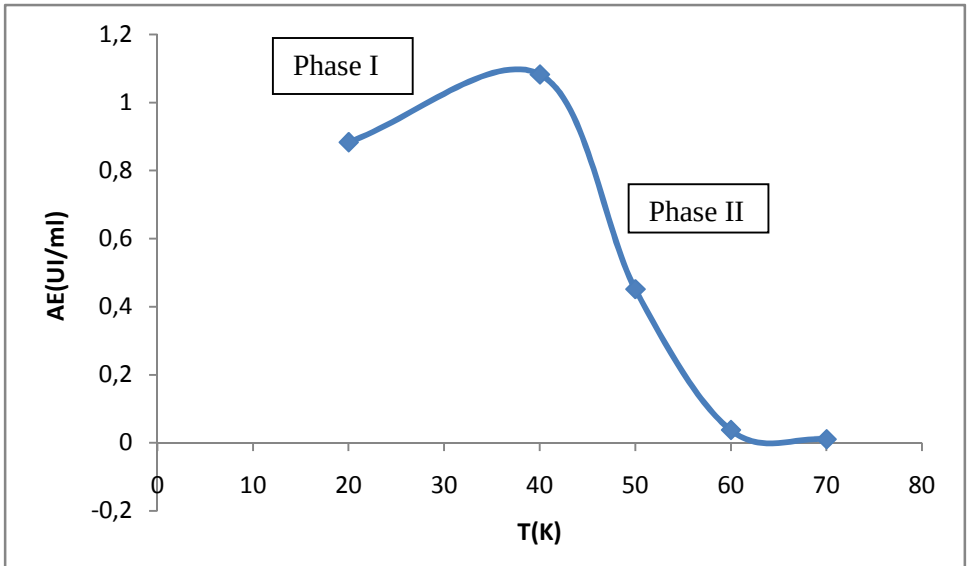


Figure. III. 7 : Effet de la température sur l'activité enzymatique de la peroxydase de *Brassica rapa* à pH=7.

c) Interprétation

A partir de la figure précédente on distingue l'existence de deux phases :

- **Phase de stabilité thermique de la peroxydase (I) :** l'activité enzymatique maximale est obtenue pour une température 40°C.
  Dans la zone de température comprise entre 20°C et 40°C l'activité enzymatique augmente légèrement avec l'augmentation de température.
- **Phase de l'instabilité thermique de la peroxydase (II) :** si on augmente la température au dessus de 40°C, l'enzyme est dénaturée c'est à dire Elle perd sa conformation tridimensionnelle et le site catalytique est ainsi altéré. Une dénaturation totale et irréversible a été enregistrée pour des températures dépassant 60°C.

On conclure, la peroxydase possède les propriétés suivantes :

- Un optimum de température égal à 40°C donne une activité maximale de 1.082UI/ml.
- Un domaine de stabilité thermique compris entre 20°C et 40°C.
- La thermolabilité à température basse est aussi une caractéristique importante de la peroxydase de navet puisque la conservation à basse température pendant plusieurs heures n'a pas altéré l'activité enzymatique initiale.

VI. Effet des agents chimique sur l'activité de la peroxydase de *Brassica rapa*

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

a) Procédure

Pour étudier l'effet de ses effecteurs sur l'activité de la peroxydase il faut préparer tout d'abord une solution mère concentrée (0.1 M) pour chacun des effecteurs .Du cette solution ; on ajoute 0.25ml dans 3ml du milieu réactionnel (4AAP+phénol+H_2O_2+tampon). (Le volume des effecteurs ajouté au milieu réactionnel ne dépasse pas 5% du volume global pour éviter l'effet de dilution). Incuber pendant 30 min a température ambiante.

La réaction se déclenche en ajoutant 0,1ml d'enzyme au mélange réactionnel. On laisse la cuve dans la spectroscopie jusqu'à la stabilisation de l'absorbance.

Les taux d'activations et d'inhibitions sont calculés respectivement par l'équation suivante:

$$\text{T (d'inhibition)\%} = \frac{AE(avec\ A) - AE(sans\ A)}{AE\ sans\ A} \quad \text{.....(6)}$$

$$\text{T (d'activation)\%} = \frac{AE(sans\ I) - AE(avecI)}{AE\ sans} \quad \text{.....(6)}$$

Cette étude d'inhibition a été effectuée avec le calcium des ions métalliques(CaCl2), chlorure de sodium (NaCl), le magnésium($MgCl_2$) et des effecteurs organiques : urée, EDTA, glucose, et SDS.

b) Résultat

Les résultats sont illustrés dans les deux tableaux suivants :

Tableau III. 4 : effet des effecteurs organiques sur l'activité de la peroxydase

Effecteurs organiques	Taux d'inhibition ou d'activation(%)
Glucose (0.1M)	6.27
SDS (0.1g/l)	-6.23
Urée (0.1M)	-13.98
EDTA (0.1M)	-10.20

Tableau. III. 5 : effet des effecteurs inorganiques sur l'activité de la peroxydase

Effecteurs inorganiques	Taux d'inhibition ou d'activation(%)
$ZnCl_2$ (0.1M)	15.64
NaCl (0.1M)	-11.99
$CaCl_{2\ (6H2O2)}$(0.1M)	16.79
$MgCl_2$ (0.1M)	8.92
$FeSO_4$ (0.1M)	-77.57

c) Interprétation

Cette étude permet de faire une comparaison entre les effets des effecteurs sur l'activité peroxydasique. Parmi les composés organiques traités le glucose est le seul activateur de la peroxydase avec un taux d'activation égal à 6.17%. Les autres composés sont des inhibiteurs

modérés d'où la possibilité de leur utilisation dans les domaines de l'agroalimentaire et des formulations de détergents ou dans l'industrie du papier.

- Les effecteurs inorganiques : $FeSO_4$ a un pouvoir inhibiteur significatif de 77.57%, suivi de NaCl (12%).
- Donc, l'ion Fe^{+2} est à éliminer du milieu réactionnel en cas de réaction catalysée par la peroxydase de *Brassica rapa.*
- Notre enzyme est sensible aux ions métalliques
- Le $CaCl_2$ est un activateur fort parmi les effecteurs traités.[2]
- L'effet des inhibiteurs diffère selon la nature chimique de ceux-ci.

VII. Stabilité thermique

L'énergie d'activation c'est l'énergie minimale qu'il faut fournir aux réactifs pour déclencher la réaction chimique. L'énergie d'activation est fondamentale dans toutes les réactions biochimiques. Sans les enzymes (qui baissent l'énergie d'activation) la vie ne pourrait exister.

La plupart des réactions sont plus rapides lorsque la température s'élève. Par conséquent si la température augmente, la constante de vitesse augmente. C'est le scientifique suédois Svente Arrhénius (1859-1927) prix Nobel de chimie en 1903 qui a proposé une loi qui rend compte de ce phénomène.

Cette relation appelée loi d'Arrhénius est la suivante :

$$K = A\, e^{-E/RT} \quad \text{.....(7)}$$

K : constante de vitesse (s^{-1})

E : Energie d'activation (joule)

A : facteur de fréquence

R : la constante des gaz parfait (8,314 J $K^{-1}mol^{-1}$)

T : la température en Kelvin

D'où

$$\ln k = \ln A - (Ea / RT) \quad \text{..... (8)}$$

Le graphe d'Arrhénius est un graphe de Ln k en fonction de 1/T. Si le graphe est une droite, on dit alors que la réaction suit la loi d'Arrhénius dans le domaine de température étudié. La pente de cette droite (-Ea/R) permet alors de calculer l'énergie d'activation de la réaction.

Par analogie, la dénaturation ou la désactivation partielle de l'enzyme sous l'effet de la température peut être modélisée avec une loi similaire en considérant que c'est une réaction d'ordre 1 par rapport à l'activité enzymatique.

La vitesse de perte V_D (désactivation ou dénaturation) de l'activité enzymatique AE sera donc égale à :

$$V_D = -\frac{d[AE]}{dt} = k\,[AE] \quad \text{.....(10)}$$

k : constante de désactivation ou de dénaturation (s^{-1}). C'est une fonction de la température d'après la loi d'Arrhenius.

D'où après intégration on obtient :

$$\ln\frac{[AE]}{[AE]_o} = -k\,t \quad \text{.....(11)}$$

Où : [AE]= activité (UI/ml) à t et [AE]o : activité initiale à t=0

a) Procédure :

Préparer des tubes à essai et introduire dans chaque tube 0,1 ml d'enzyme puis incuber dans l'étuve à différent température 50°C, 60°C et 70°C

Pour chaque température on dépose 6 tubes et chaque 20 minute sortie un tube pour chaque température suivie d'un refroidissement à la température ambiante et fait le test d'activité par l'ajout de 3ml de milieu réactionnel (4AAP-phénol-H_2O_2 +tampon) sur 0,1ml d'enzyme incuber à différentes température après on régler la longueur d'onde et on lire le DO ,ainsi pour toutes les autre tubes incubes jusqu'à la stabilisation de la densité optique. λ=510nm.

b) Résultat :

Les résultats expérimentaux sont illustrés dans la figure suivant qui représente AE =f(t) :

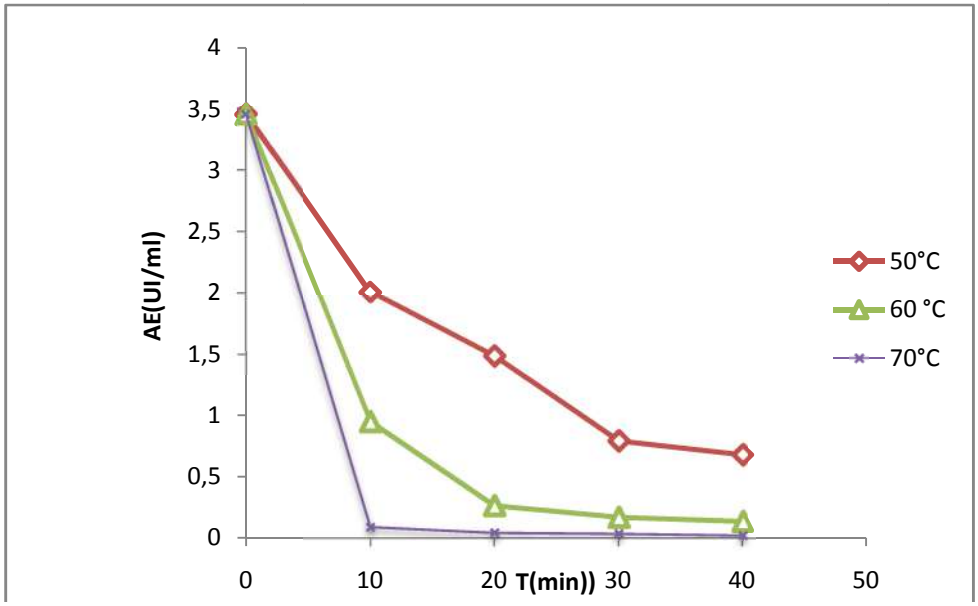


Figure. III. 8 : Variation de l'activité enzymatique de la peroxydase de navet blanc en fonction de temps à différent température (50 °C, 60 °C et 70 °C) pH=7, [phénol]=0.17M [4AAP]=0.0025 M [H_2O_2] (10%)=0.0017M.

❖ **Discussion**

Pour chaque température l'activité enzymatique diminue en fonction de temps.

A T = 70°C l'inactivation est plus rapide que à la T=60°C, et T=50°C.

L'activité enzymatique a T=70°C et a T=60°C diminuer brusquement jusqu'à une valeur minimal. Mais l'activité enzymatique a T= 50°C diminuer légèrement en fonction de temps.

Pour déterminer l'énergie d'inactivation il faut tracer ln (AE/AE0) = f(t) pour chaque température :

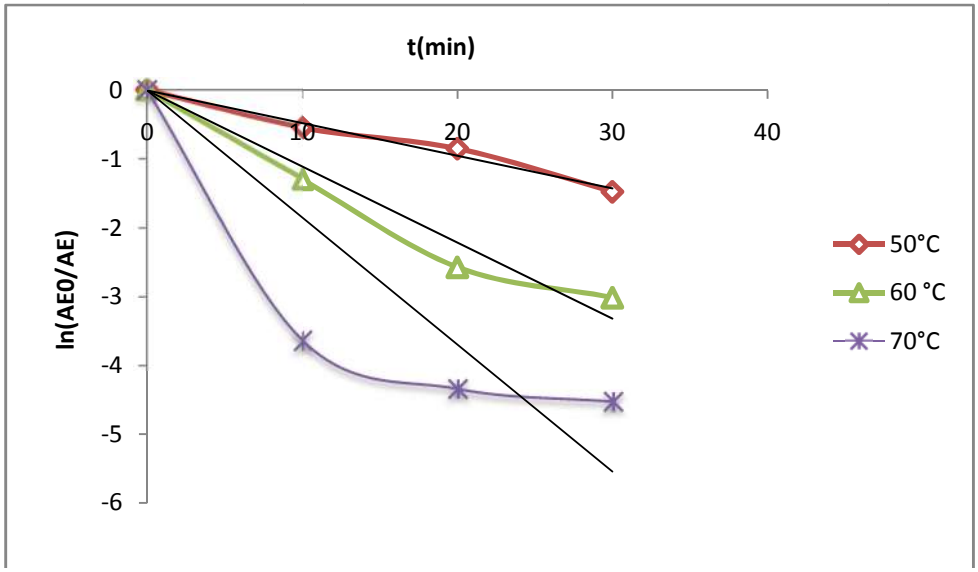


Figure. III .9: ln (AE/AE0) relative on fonction de temps a différent Température et pH=7, [phénol]=0.17M [4AAP]=0.0025 M [H_2O_2]=0.0017M.

Détermination de K :

Pour déterminer l'anergie d'inactivation il faut déterminer la constant de vitesse de chaque réaction a chaque température.

D'après le graphe on tire le constant Ks (constant expérimental) pour chaque température :

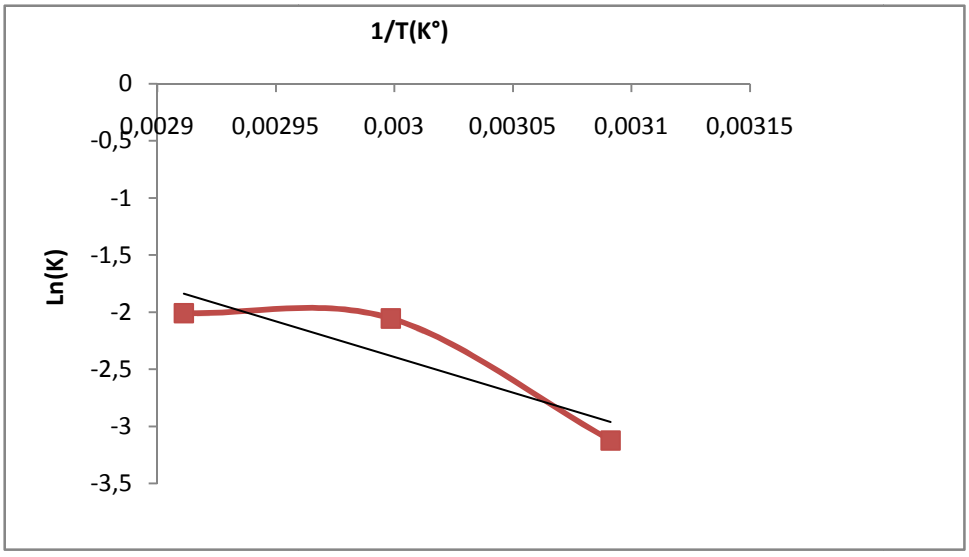


Figure III. 10 : ln(k) on fonction de (1/T) à pH =7, [phénol]=0.17M [4AAp]=0.0025 [H_2O_2]=0.0017M

Détermination de l'énergie d'inactivation

D'après l'équation de droite on peut tirer l'énergie d'inactivation

Ea = 51.895 (KJ/mol)

c) Interprétation :

La stabilité thermique de la peroxydase brute de *Brassica rapa* a été étudiée sur une plage de température de 50 à 70°C.

La peroxydase de *Brassica rapa* est rapidement inactivée lorsqu'elle incubée à des températures supérieures à la température optimle (40°C). Son incubation à 50°C pendant 20min et 40 min a résulté des pertes d'activité enzymatique de 58% et 80%, respectivement.et un pourcentage de conservation de son activité de 1.7 et 1.13% à 70°C p.

A T=60°C notre enzyme conservé 7.62 % de son activité originale après 20min d'incubation, et pendant 40 min la peroxydase conservé 0.7% de son activité . En revanche, et quand on dépasse 40min l'enzyme est complètement inactivée à 70°C : après 40min d'incubation l'enzyme perdre 98% de con activité initial. Nous avons remarqué que l'enzyme est instable à des températures supérieures à 40°C. L'inactivation thermique de la peroxydase de navet blanc est due à la dénaturation des protéines (de sa structure secondaire et tertiaire), Ou à cause de la clandestinité de site. On déduit que la peroxydase montre une thermo stabilité à température (40°C) et sensible au phénomène de dénaturation à des températures supérieures à 40°C. Par comparaison avec des autres études qui fait sur différent source de peroxydase (mangoustanier et pomme de terre et *Rabdosia serra*) [38].

Et considérant la cinétique les valeurs obtenues, la peroxydase de *Brassica rapa* appartient au groupe des enzymes stables à la chaleur.

La relativement haute stabilité thermique de cette enzyme pourrait être prise en compte lors de traitements thermiques sont appliqués pour l'application de peroxydase a hôte température.

VIII. L'effet de concentration de peroxyde d'hydrogène :

a) Procédure

On a étudié l'effet de peroxyde d'hydrogène pour préciser la concentration pour laquelle en aura une autre amélioration de rendement de dégradation de phénol pour cela on a suivie le mode suivant :

On prépare déférentes concentration de H_2O_2 (30%) puis on prendre 1ml de chaque concentration et on mit dans une fiole de 10ml et on ajusté le volume jusqu'à le trait par solution tampon de pH=7 après ; on prendre 1,5 ml de chaque concentration et on verse dans un tube à essai qui contient 1,4 ml de mélange de (phénol +4AAP).

On d'éclanche le chronomètre après l'ajout de 0,1 ml d'enzyme, puis on lire le DO en fonction de temps .avec λ=510nm.

b) Résultat

Les résultats expérimentaux sont représentés sur la figure III. 9.

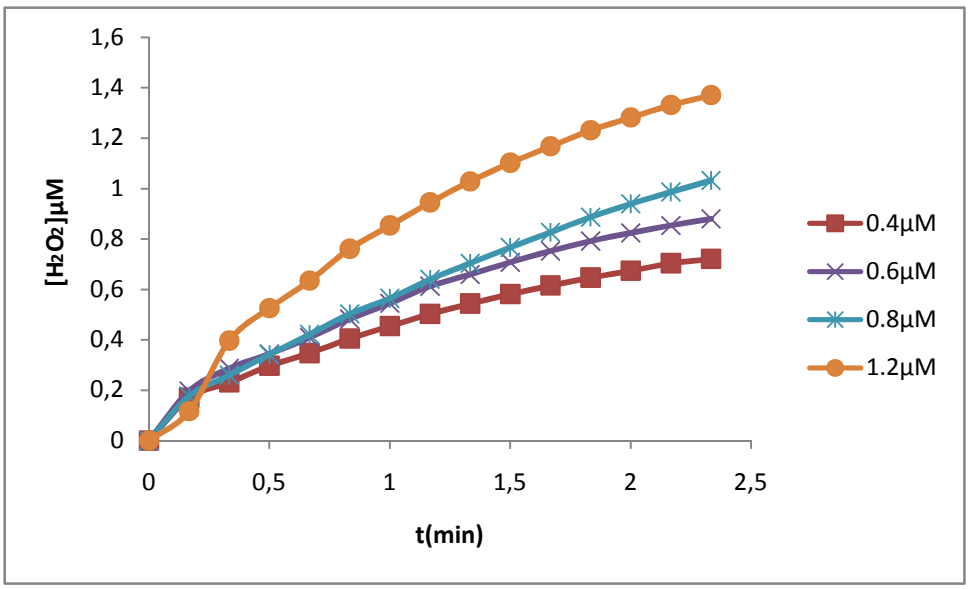


Figure. III .11 : Cinétique de transformation de H_2O_2 on fonction de temps a différent concentration de H_2O_2. [Phénol]=0.17M ; [4AAP]=0.025M ;[AE]=0.76UI/ml

A partir de graphe précédent On détermine vitesse initiale V0 en utilisant les pentes de la partie linéaire ; les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau. III. 6 : les activités enzymatiques pour chaque concentration de H_2O_2

$[H_2O_2]$(µmol/ml)	0.4	0.6	0.8	1.2
V0 (UI/ml)	0.288	0.358	0.424	0.578

La variation de la vitesse initiale nous donne le graphe qui représente la relation de Michaelis Menten V0=f ($[H_2O_2]_0$ suivant.

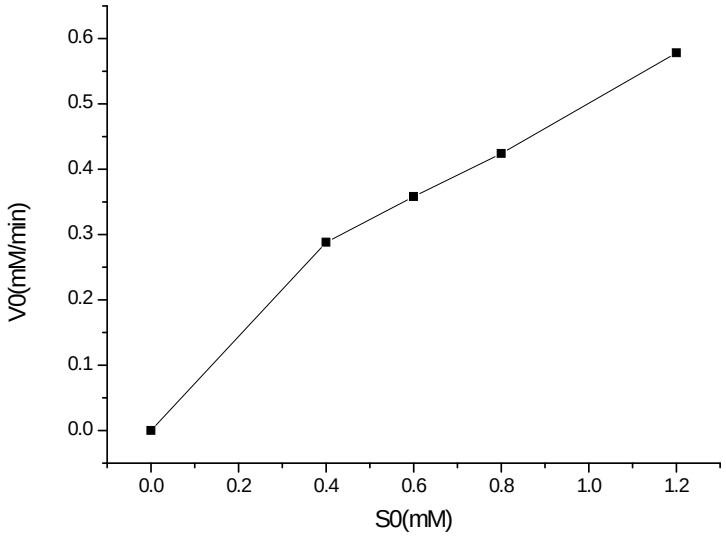


Figure. III. 12 : représentation de Michaelis-Menten V0=f ([H_2O_2] pour la peroxydase.

pour déterminer les constants cinétique Km et V max on fait la linéarisation de Lineweaver-Burk 1/V=f (1/ [H_2O_2] **Fig.III.13 :**

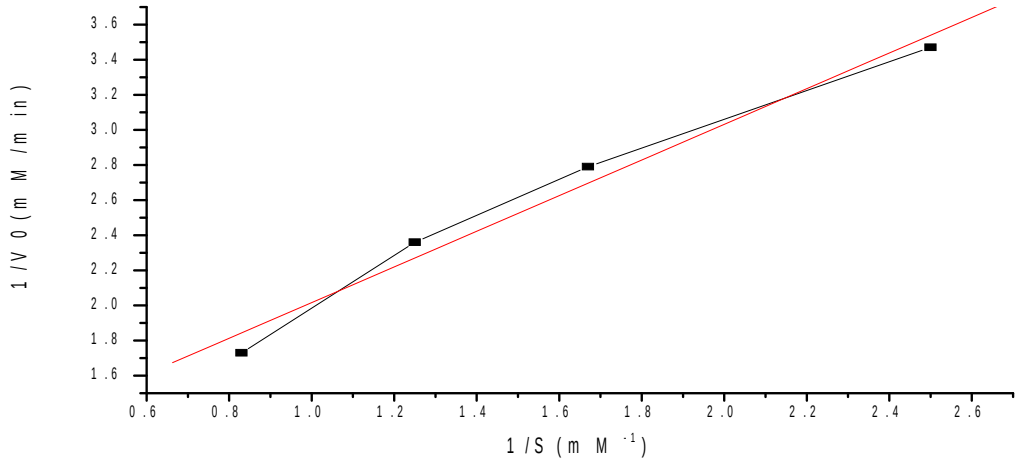


Figure. III. 13 : représentation de Lineaweaver-Burk 1/V0=f (1/[H_2O_2]) pour la peroxydase de *Brassica rapa* [AE]=0.76UI/ml.

c) Interprétation

La courbe obtenue est une droite d'équation 1/V0=1.00076+(1.015* $[H_2O_2]^{-1}$)

La pente égale à K_M/V_M

L'intersection de la droite avec l'axe des ordonné donne 1/ V_M

Donc :

1/V=1.00076 $\Longrightarrow$ Vmax= 0.99 µmol/ml.min

Km/Vmax=1.015 min $\Longrightarrow$ Km=1.01 µmol/ml

X. Application de peroxydase d'extrait de *Brassica rapa*

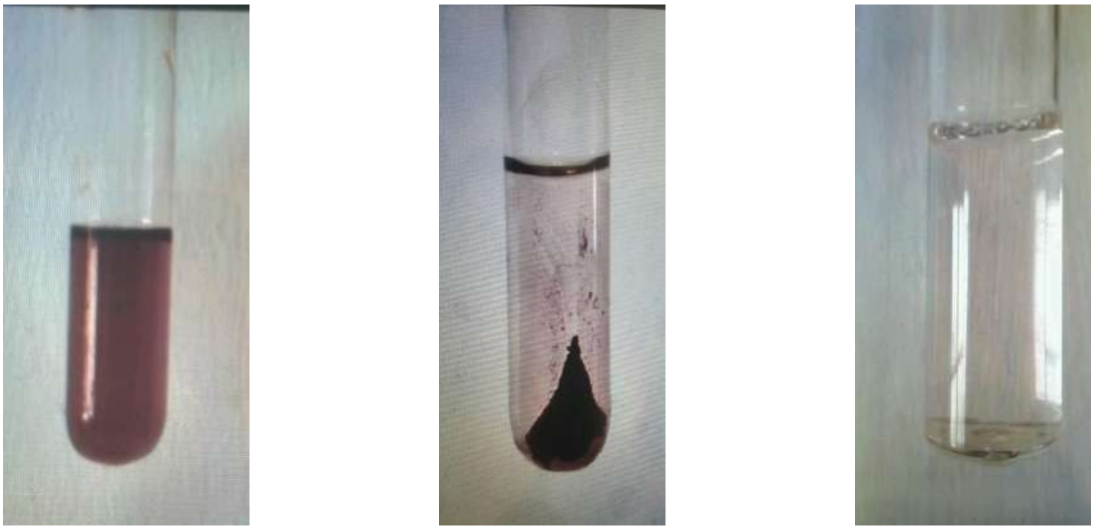
1) Application dans le domaine d'environnement

a) Procédure :

On prépare une solution concentrée de colorant noire d'eriochrome de concentration 100mg /l après dans une fiole de 25ml introduire 12,5 ml de ce colorant avec 4,25ml de H_2O_2 et on ajusté jusqu'à le trait avec solution tampon de pH=2 (v=25ml) puis on prendre 12 ml de ce

mélange avec l'ajout de 0,5 ml d'enzyme (AE=3.02µmol/ml.min), en suite on fait la centrifugation de 40000 rpm pendant 5minute pour avoir l'effet de l'enzyme sur le colorant.

b) Résultat :



Avant **Après3 min** **Après 5 min**

Figure. III. 14 : L'évolution de dégradation de colorant noire d'eriochrome.

On remarque que il y'a une décoloration énorme presque total de colorant noire d'erïochrome

On présence d'enzyme peroxydase c'est- à- dire la peroxydase est responsable a la dégradation de ce colorant.

Calcul de rendement :

Le rendement est déterminé par la relation suivante :

$$R(\%) = \frac{DOi - DOf}{DOi} \times 100 \qquad (12)$$

- R(%) = 83% après 3 min
- R(%) = 96.02% après 5 min

d) Interprétation :

Le traitement de ce colorant azoïque par la peroxydase partiellement purifiée de *Brassica rapa*, avec temps de réaction a été fait au bout de 3 min et 5 min à un pH = 2. Les

rendements de décoloration étaient de 83 % et 96.02 % respectivement , pour une concentration de colorant de 100 mg/l ,[H_2O_2] = 0.0017M, et une activité enzymatique de 3.02(UI/ml).

La dégradation du colorant azoïque par EEPP est une méthode simple et rapide du point de vue technico-économique [35].

2) Application dans le domaine analytique

a) Procédure

Pour réaliser le teste de glycémie if faut préparer le réactif par la méthode suivante :

Dans un volume de 50ml de tampon pH7 on met de glucose oxydes + 4AAP + phénol avec la peroxydase de navet blanc.

En suite, on prépare une série de 3 tubes à essai :

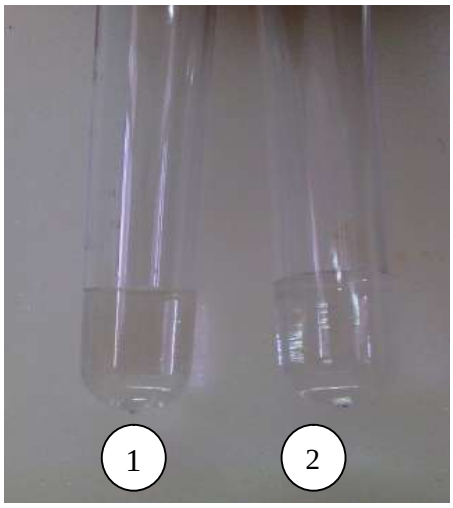
	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	---	10µl	---
Echantillon	---	---	10µl
Réactif de travail (préparer)	1ml	1ml	1ml

Le blanc et le standard sont des réactifs Ce sont des solutions commerciales et l'echantillon c'est le sérum après centrifugation.

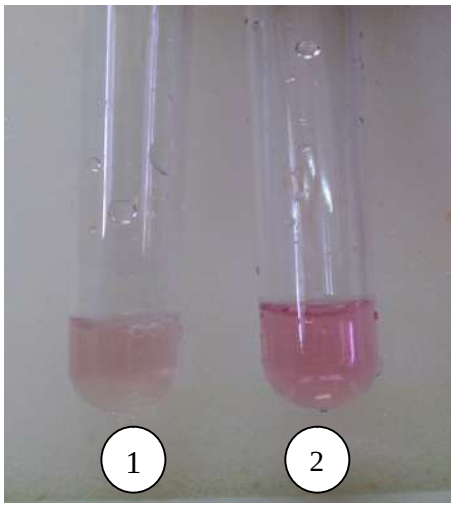
On mélange, et on lire DO après incubation de 10 min à 37°C.

D'un autre part on prépare une autre série de 3 tubes, et on refaire le même protocole mais, cette fois le réactif de travail utilisé est le réactif commercialisé.

b) Résultats



Avant le traitement enzymatique



Après le traitement enzymatique

Le tube 1 : avec le réactif qui contient la peroxydase de navet blanc

Le tube2 : avec le réactif commercialisé.

c) discussion :

Par comparaison des résultats : Le test avec la peroxydase s'est avéré donc positif avec la peroxydase de navet d'où la possibilité de son application dans le domaine analytique. Cependant, la coloration dans les deux tubes n'est pas identique pour la même concentration en glucose. Ceci peut être dû au degré de pureté de la peroxydase de navet.

Conclusion et perspectives

Notre étude sur la peroxydase de navet a été développée sur trois axes principaux :

- L'extraction et la séparation de la peroxydase de navet blanc *Brassica rapa* .
- La caractérisation à travers l'étude de l'influence de différents paramètres sur le pouvoir catalytique de la peroxydase.
- L'application de notre extrait enzymatique dans le domaine de l'environnement et dans le domaine analytique.

La purification de la peroxydase a été effectuée par la précipitation à l'acétone, une méthode simple et efficace qui nous a donné un rendement de purification82%.

Les résultats des essais de caractérisation ont permit d'un coté de déterminer les conditions physicochimiques de la température de pH sous lesquelles on obtient une activité enzymatique maximale (pH_{opt}= 7 et température optimale de 40°C).

Certaines substances chimiques organiques et inorganiques affectent positivement ou négativement l'activité enzymatique. Les résultats sont à prendre en compte durant les applications lors d'un bioprocédé mettant en œuvre la peroxydase de navet ou lors de la formulation de certains mélanges tels que les formulations de détergents ou les solutions à usage cosmétique. L'étude de la stabilité thermique a montré que l'enzyme perd partiellement son activité lorsqu'elle est soumise à des températures élevées supérieures à la température optimale et que cette désactivation dépend du temps. La détermination de l'énergie désactivation (57.68Kj/mol) rend possible la prévision de l'activité résiduelle suite à un traitement thermique. On a conclue que la peroxydase de navet est une enzyme moyennement stable.

L'étude catalytique d'une enzyme correspondra directement de la détermination des paramètres Michaeliennes V_M et K_M étant d'identité de toute enzyme et qui détermine son affinité et l'activité que pourra atteindre

Enfin, une application relevant du domaine environnemental a été réalisée. Il s'agit de l'élimination ou de la décoloration d'un colorant azoïque (noir d'eriochrome) par un traitement mettant en jeu la peroxydase de navet comme catalyseur, en présence de peroxyde d'hydrogène. Un rendement d'élimination de 96% a été enregistré après 5min de traitement sous conditions de pH2 et de température ambiante.

Il est impératif de compléter les résultats obtenus en suggérant d'autres perspectives de développement ou d'amélioration

Telles que :

Amélioration de purification : utilisation une méthode de filtration (gel filtration par exemple)

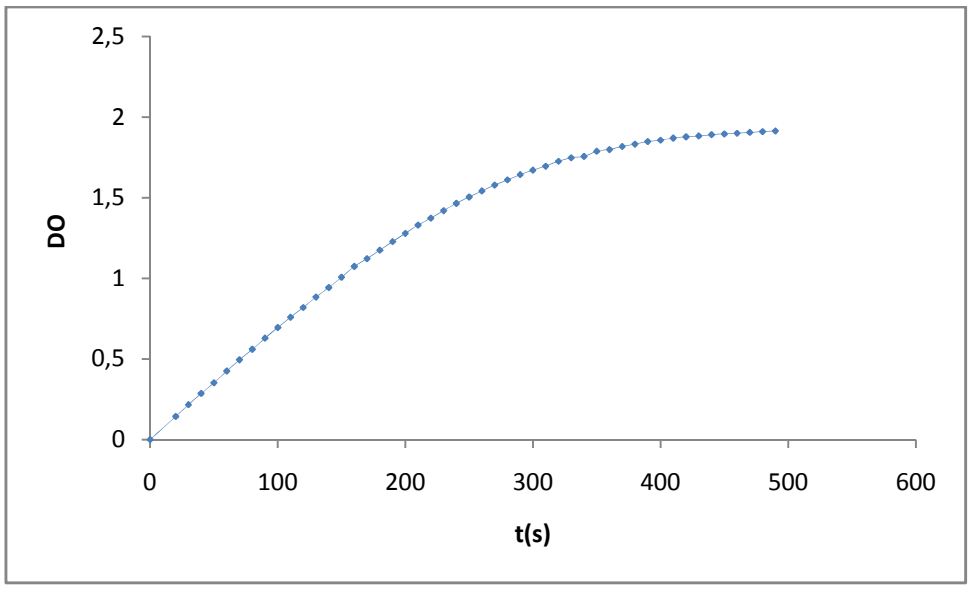
Achèvement de la caractérisation par :

Détermination de pois moléculaire de la peroxydase.

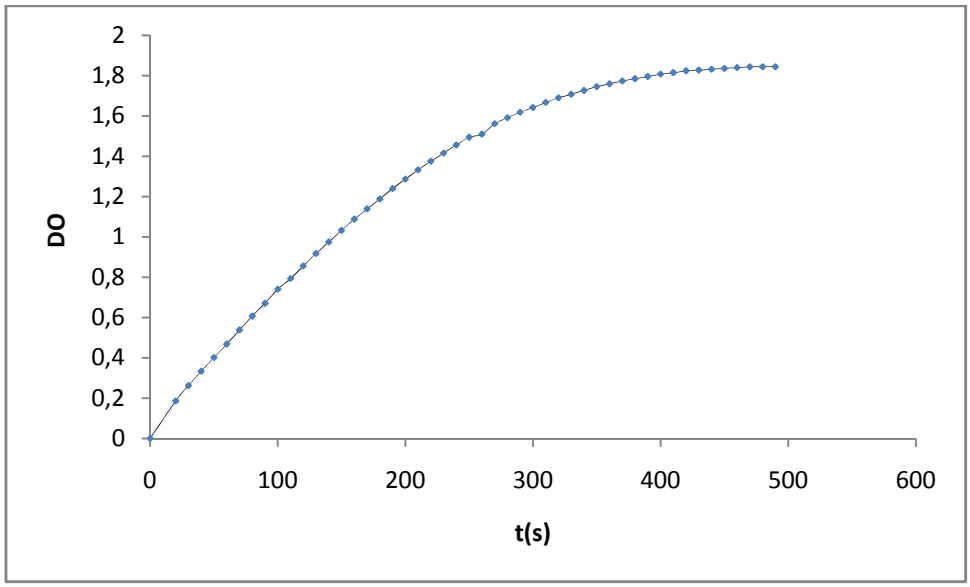
Détermination se la structure.

Détermination de type d'inhibition selon l'application adopté.

Annexe 1 : Variation de Do en fonction de temps pour l'EEB



Annexe2 : Variation de DO en fonction de temps pour l'EEPP.



Annexe 3 :La méthode de Bradford

Principe :

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Contrairement aux autres méthodes de mesure des protéines, la méthode de Bradford est moins sensible aux interférences par divers agents présents dans les échantillons de protéine. Elle est toutefois affectée par les détergents, modifiée par le pH, et donne un résultat positif également aux polyphénols hydrosolubles de haut poids moléculaire (tanins).

Préparation de Bradford :

- Blue de Coomassie Brillant G250 (100mg).
- Acide phosphorique à 85%, V=100ml.
- Ethanol à 95%, V=50ml.

Quand le colorant est complètement dissous ajouter l'eau distillée V=1000ml.

Mode opératoire :

Prendre une gamme d'étalonnage de 5 tubes à essaies :

Numéro de tube	0	1	2	3	4	5	EEB	EEP
[albumine](mg)l)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	X	X
V albumine (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	X	X
V NaOH (1M)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
V réactif de Bradford (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5

Nomenclature et abréviations

AE : Activité enzymatique.

BGP : Calcium-alginate pectin entrapped bitter gourd peroxidase

DO : Densité optique.

Da : dalton

E : enzyme

EA : énergie d'inactivation.

EEB : Extrait enzymatique brute.

EEPP : Extrait enzymatique partiellement purifié.

HRP: Horseradish Peroxidase.

IUBMB : International Union for Biochemistry and Molecular Biology

IUPAC : L'Union internationale de chimie pure et appliquée

K : Constante de vitesse.

K_M : Constante de Michaelis–Menten **(µmol / ml).**

R : la constante des gaz parfait (8,314 J $K^{-1}mol^{-1}$)

R^2 : Coefficient de corrélation.

S : substrat**.**

4AAP :4-Amino-antipyrine.

t : temps **(min).**

T : Température **(°C) (K).**

UHT : Upérisation à Haute Température

UV : ultraviolet

U.I : unité internationnal

V_0 : Vitesse initiale de réaction **(µmol/ml. min).**

Vmax : Vitesse maximale de réaction **(µmol /ml. min).**

Ɛ : Coefficient d'extinction.

λ: Longueur d'onde.

ΔC:variation de concentration **(mol/l).**

Références bibliographiques

[1] : Athel CONISH-BOWDEN, Marc JAMIN et Valdur SAKS, cinétique enzymatique, EDP science.1er édition 2005.

[2] : Graham L. Patrick, chimie pharmaceutique, de boeck, 2é édition 2002.

[3] : Didier COMBES, Pierre MONSAN**,** Biocatalyse ou catalyse enzymatique, .Editions T.I, 2e édition juin 2005

[4] : Serge Weinmaen et Pierre Mihulm, Toute la biochimie, Dunod Paris, 2004.

[5] : Isabelle CLAVERIE et Mireille PANET, Biochimie, porphyre ,2e édition France 2008.

[6] : RANDOUX.A, GILLERY.Ph, BELLON.G, MAQUART.F, LE PEUCH.Ch, MONBOISSE.J ,biochimie dynamique , Bruxelles, 3é édition 2006.

[7] : Haytem JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, thèse de Doctorat, école nationale supérieure de chimie de Montpellier, 2011.

[8] : ThanhThuy NGUYEN BOISSE, microbiocapteurs conductimetrique utilisant des oxydoréductases. Thèse de doctorat, université claude bernardlyon 1, 2013.

[9] : Christian Moussard, biochimie structurale et métabolique, Bruxelles, 3é édition 2006.

[10] : Bernard Augère, les enzymes 'biocatalyseur protéique'. Ellipses, 2001.

[11] : Marie-Hélène PACLET : Biochimie des enzymes, Université de joseph Fourier ,2011.

[12] : E.Hebert ,Biochimie cours exercice corrigés2.ERA(édition Bobert Atlani) paris,2000.

[13] : Simon J.Charnock et Barry V.Mc Cleary, Les enzymes application industrielle et analytique, 2005.

[14] : Kirk O, DAMHUS T, BORCHET TV enzyme applications industrial 5éme édition New York 2005 ; 248-317-889 p

[15] : www. cprac.org/docs/ biotechnologia, FRA Centre d'activités régionales pour la production propre (CAR/PP)

[16]:Académie des technologies BIOTECNOLOGIE ET ENVIRONNEMENT Paris 8édition. Grand Palier des Champs-Elysée Avenue Franclin D. Roosevelt 2010 Paris

[17] : Roger E. David R, Physiologie animale : mécanisme et adaptation, paris. De Boeck. 1999

Auteurs, titre, nom du journal, volume pages, année
Pour les livres
Auteurs, titre du livre, edition , année
[18] : Coutouly.G, Klein.E, Barbieri. E, Kriat. M ,Travaux dirigés de biochimie ;biologie moléculaire et bio informatique ,doin.2010.

[19] : Reginald, H.G. et Gresham, C.M. Biochimie ,2e éd américaine, De Boeck universités, 2000.

[20] : Les peroxydases végétales de classe III. Étienne Delannoy, Philippe Marmey, Claude Penel & Michel Nicole. Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Genève, Quai Ernest-Ansermet 30, CH-121, Genève 4Published online: 27 Apr 2013.

[21] : www.takween.com/molécules-structure.../peroxydase/html

[22] : www.perso.prange .fr/jean-jacques.auclair/exaosite/peroxydase/html.

[23] : http://www.neptune.laptunix.uquan.ca.html.

[24]: www.didier –pol.net/1peroxydase.html

[25]: Arthur D Broadben, Basic Principles of Textile Coloration, 2001Society of Dyers and Colourists, Canada.

[26]: Ila Bania and Rita Mahant evaluation of peroxidasesfrom various plant sources International Journal of Scientific and Research Publications,2 , 2012.

[27]: Hermelinda Penha Freire Maciel e Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa, extracion ,purification and biochemical characterization of peroxidase from *Copaifera langsdorffii* Leaves, Brasil.. Quim. Nova,Vol. 30, No. 5, 1067-1071, 2007

[28]: Mohsina Hamid*, Khalil-ur-Rehman, Potential applications of peroxidases, Food Chemistry, Food Chemistry 115 (2009) 1177–1186

[29]: Gianfreda .L, Rao MA. “Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review”. Enzyme Microbiology Technology , (2004)

[30] : N. BARKA, « L'élimination des colorants de synthèse par adsorption sur un phosphate naturel et par dégradation photocatalytique sur TiO2 supporté », thèse de doctorat, université Ibn Zohr, Agadir. (2008).

[31]: H.S. Freeman and G.N. Mock, "Dye Application, Manufacture of Dye Intermediates and Dyes. Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology,New York , 2012

[32] https://sites.google.com/site/analyseeau/peroxydase-dans-le-lait

[33]C.Regalado, E.B.Garcıa-Almendarez,M.Duarte-Vazquez'Biotechnological 1applications of peroxidases' .Phytochemistry Reviews **3:** 243–256, (2004).

[34]:Mm tassist, cours enzymologie L3, Génie des procèdes, Bioprocédés, 2013, univ Médéa

[35]:Ahmadi .A ; 2010. Transformation enzymatique des colorants azoïques par la peroxydase libre et immobilisée. Mémoire pour l'obtention du titre de Magister en : Génie des Procédés Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

[36]:http://www.worthington-biochem.com

[37] : http://www.csudh.edu/oliver/chemdata/buffers.htm

[38]:MAHSA ZIABAKHSH DEYLAMI, RUSSLY ABDUL RAHMAN, CHIN PING TAN , JAMILAH BAKAR , LASEKAN OLUSEGUN THERMODYNAMICS AND KINETICS OF THERMAL INACTIVATION OF PEROXIDASE FROM MANGOSTEEN (*GARCINIA MANGOSTANA L.*) PERICARP. Journal of Engineering Science and Technology Vol. 9, No. 3 (2014) 374 – 383.