

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

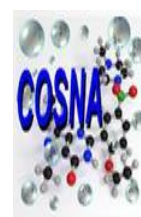
**Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers**  
**Département de Biologie**  
*Laboratoire de Recherche de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)*



## **Thèse**

*En vue d'obtenir le grade de*

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**



**Spécialité** : Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse

## **Thème**

**Contribution à l'étude de l'effet de quelques colorants azoïques  
alimentaires sur l'activité de la carboxylestérase porcine**

*Présentée par* : **Wafaa LEMERINI ep. SEBAA**

*Soutenu le* : 03 novembre 2016, devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> . ATIK Fouzia	Professeur	Université de Tlemcen	Présidente
M <sup>me</sup> . BELARBI Meriem	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
M. DJERIDANE Amar	Professeur	Université de Laghouat	Examineur
M. GOUZI Hicham	Maître de Conférences A	Université de Laghouat	Examineur
M. ARRAR Zoheir	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Directeur de Thèse
M. KAJIMA Mulengi Joseph	Professeur	Université de Tlemcen	Co-Directeur de Thèse

## Avertissement

Afin d'éviter toute confusion, ce travail de thèse a été effectué au laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) à l'université AboubekrBelkaid de Tlemcen, par Mme Lemerini Wafaa ep Sebaa, principale auteur des travaux scientifiques.

Les résultats expérimentaux personnels et antérieurs aux travaux de master, ainsi qu'une bibliographie riche de références, ont été mis à la disposition des étudiants de master de biologie afin de leur permettre une initiation fructueuse à la recherche scientifique avec ma participation effective et une supervision constantes de ma part. Tout cela servait à approfondir ce domaine de recherche, de confirmer et de comparer les résultats obtenus.

Il est bien évident que toute la thématique développée aussi bien dans les mémoires de master ainsi que celle qui est développée dans cette thèse font intégralement partie de mes domaines d'intérêt de recherche. Les différentes questions qui peuvent surgir à la lumière de ce travail constituent également des axes et thèmes à explorer sous ma propre discrétion en vue de leur extension et développements futurs.

Fait à Tlemcen, le 06/11/2016

Mme Sebaa, née Wafaa Lemerini



*« Réussir : c'est aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme »*  
*Winston Churchill*

## Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Zoheir ARRAR et le professeur Joseph KAJIMA Mulengi d'avoir bien voulu accepté d'être les rapporteurs de ce travail dont le mérite leur revient pour l'intérêt qu'ils ont porté par leur soutiens scientifiques et méthodologiques à la discussion et au développement de ce sujet et grâce à leur conseils précieux, leur gratitude ainsi que pour leur gentillesse.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Fouzia ATIK, Professeur à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie profondément Mme Meriem BELARBI, Professeur à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse également mes remerciements les plus respectueux à Mr Amar DJERIDANE, Maître de Conférences A à l'université de Laghouat, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je voudrais aussi adresser un remerciement particulier à Mr Hicham GOUZI, Maître de Conférences A à l'université de Laghouat, pour son aide précieuse, les relectures qu'il a effectuées, et les discussions constructives dont il m'a fait profiter: votre participation à ce jury est pour moi un honneur.

Je tiens à témoigner mon respect et ma reconnaissance au directeur du laboratoire COSNA le professeur Joseph KAJIMA Mulengi pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail, pour m'avoir consacré de son temps malgré toutes ses responsabilités et pour être à l'écoute des besoins de chaque membre du laboratoire. Je le remercie également pour les corrections apportées à ce manuscrit.

Il m'est agréable de remercier Mr Djamel BENDIABDALLAH pour ses concours précieux au cours du déroulement de ma thèse.

Je me dois de remercier le technicien du laboratoire Mr Hassen BENARIBA pour l'aide permanente qu'il m'a apportée tout au long de mon travail.

Je tiens à remercier vivement Mlle Ouassila GAOUAR pour l'énorme contribution apportée au début de la réalisation de ce travail. Merci de m'avoir transmis la rigueur nécessaire à la réussite des essais et surtout merci pour votre gentillesse.

Je n'oublierai pas de remercier tous les membres du laboratoire « COSNA » particulièrement Mme Wassila DRISSI et Mme Naima BOUAZZAOUI d'avoir transformé une « collaboration » en une véritable amitié.

Enfin, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me ressourcer  
d'affection et de bénédictions durant toute ma vie;  
A ceux dont je ne peux oublier le soutien, mes chers frères et sœurs;  
A mes beaux parents pour leur aide continuelle;  
A mon époux pour son soutien affectif, moral et sa patience;  
A mon fils Moncef.*

*Wafâa.S.L*

# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	2
<b>Chapitre 1. Rappels théoriques</b> .....	6
I. La carboxylestérase.....	7
I.1. Généralités.....	7
I.2. Définition.....	8
I.3. Structure.....	9
I.4. Sources.....	12
I.5. Classification des carboxylestérases.....	14
I.6. Mécanisme d'action.....	16
I.7. Propriétés physico-chimiques.....	21
I.7.1. Le pH.....	21
I.7.2. La température.....	22
I.7.3. Le substrat.....	22
I.7.4. Les inhibiteurs.....	24
I.8. Rôles biologiques de la carboxylestérase.....	26
II. Les colorants alimentaires.....	29
II.1. Généralités.....	29
II.2. Définition.....	30
II.3. La tartrazine.....	32
II.3.1. Propriétés physico-chimiques.....	33
II.3.2. Métabolisme de la tartrazine.....	34
II.3.3. Toxicité et effets indésirables de la tartrazine.....	35
II.4. Le colorant vert.....	39
II.4.1. Le rouge ponceau.....	39
II.4.1.1. Propriétés physico-chimiques.....	39
II.4.1.2. Toxicité du rouge ponceau.....	40
II.4.2. Le dioxyde de titane.....	41
II.4.2.1. Propriétés physico-chimiques.....	41
II.4.1.2. Toxicité du dioxyde de titane.....	42
II.4.3. L'indigotine.....	43
II.4.3.1. Structure et nomenclature.....	43
II.4.3.2. Toxicité de l'indigotine.....	43
<b>Chapitre 2. Matériel et méthodes</b> .....	44
I. Préparation de la solution enzymatique de la carboxylestérase commerciale du foie de porc .....	45
II. Dosage des protéines de la solution enzymatique par la méthode du biuret.....	45
II.1. Principe.....	45
II.2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	46

II.3. Calcule de la concentration en protéine de la solution enzymatique de la carboxylestérase.....	47
III. Détermination de l'activité enzymatique.....	49
III.1. Détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse.....	50
III.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique.....	50
III.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique.....	51
IV. Etude de l'influence du pH, de la température et de la concentration en substrat sur l'activité de la carboxylestérase.....	52
IV.1. Influence du pH.....	52
IV.2. Influence de la température.....	53
IV.3. Influence de la concentration en substrat « le butyrate d'éthyle » sur l'activité de la carboxylestérase.....	54
V. Etude de l'influence de la tartrazine (E102) sur l'activité de la carboxylestérase.....	55
V.1. Spectre d'absorption de la tartrazine.....	55
V.2. Effet du pH sur la tartrazine.....	55
V.3. Effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur la tartrazine.....	55
V.4. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine.....	56
V.5. Effet de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase.....	56
VI. Etude de l'influence du colorant (E124-E171) sur l'activité de la carboxylestérase.....	58
VI.1. Spectre d'absorption du colorant vert.....	58
VI.2. Effet du pH sur le colorant vert.....	58
VI.3. Effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur le colorant vert.....	58
VI.4. Effet de la carboxylestérase sur le colorant vert.....	59
VI.5. Effet du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase.....	59
VII. Détermination de la concentration inhibitrice médiane IC <sub>50</sub> .....	59
VIII. Analyse des résultats expérimentaux.....	59
<b>Chapitre 3. Résultats et discussion.....</b>	<b>60</b>
I. Recherche de l'activité « carboxylestérase » dans la préparation enzymatique.....	61
II. Effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase.....	63
III. Effet de la température sur l'activité de la carboxylestérase.....	65
IV. Paramètres cinétiques de la carboxylestérase.....	68
V. Spectres d'absorbance des colorants utilisés.....	75
V.1. Spectre d'absorption de la tartrazine .....	75
V.2. Spectre d'absorption du colorant vert .....	76
VI. Suivi de l'éventuelle interaction du substrat « le butyrate d'éthyle » et de la tartrazine.....	78
VII. Suivi de l'éventuelle interaction du butyrate d'éthyle et du colorant vert.....	79



VIII. Suivi de l'éventuel effet de la carboxylestérase sur la tartrazine et le colorant vert.....	80
VIII.1. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine.....	80
VIII.2. Effet de la carboxylestérase sur le colorant vert.....	81
IX. Effet du pH sur la tartrazine.....	82
X. Effet du pH sur le colorant vert.....	84
XI. Cinétique de la carboxylestérase en présence de la tartrazine et du colorant vert.....	86
XII. Détermination de la concentration inhibitrice IC <sub>50</sub> .....	90
<b>Chapitre 4. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>92</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>96</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>110</b>

## Liste des abréviations

% : Pourcentage

Å : Angström

°C : Degré Celsius

µmol : Micromole

**ACAT** : Acyl-CoA cholestérol-O-acyl transférase

**Acyl-CoA** : Acyl-coenzyme A

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AESA** : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

**Ala** : Alanine

**Arg** : Arginine

**Asp** : Aspartate

**BCRP** : Transporteur d'efflux

**BSA** : Albumine de sérum bovin

**CE** : Carboxylestérase

**CES** : Carboxylestérase

**CES1** : Carboxylestérase 1

**CES1A** : Carboxylestérase 1A

**CES1A1** : Carboxylestérase 1A1

**CES1B** : Carboxylestérase 1B

**CES1C** : Carboxylestérase 1C

**CES1D** : Carboxylestérase 1D

**CES1E** : Carboxylestérase 1E

**CES1F** : Carboxylestérase 1F

**CES1G** : Carboxylestérase 1G

**CES1H** : Carboxylestérase 1H

**CES1H ML1** : Carboxylestérase 1H ML1

**CES1H RL1** : Carboxylestérase 1H RL1

**CES1H 2** : Carboxylestérase 1H 2, hydrolase C

**CES1H 3** : Carboxylestérase 1H 3, hydrolase B

**CES2** : Carboxylestérase 2

**CES2 A1** : Carboxylestérase 2 A1 (humaine hCES)

**CES2 A6** : Carboxylestérase 2 A6 de la souris (mCES2)

**CES2 A10** : Carboxylestérase 2 A10 du lapin (rCES2)  
**CES2 A11** : Carboxylestérase 2 A11 du hamster  
**CES3** : Carboxylestérase 3  
**CES3 A1** : Carboxylestérase 3 A1 (humaine hCES)  
**CES3 A3** : Carboxylestérase 3 A3 mâle  
**CES4** : Carboxylestérase 4  
**CES4 A2** : Carboxylestérase 4 A2 (protéine excrétée dans les urines du chat)  
**CES5** : Carboxylestérase 5  
**CES6** : Carboxylestérase 6  
**CI 16255** : rouge cochenille (pour les produits cosmétiques)  
**C.I.N°73015** : Indigotine  
**CIRC** : Centre International de Recherche sur le Cancer  
**CPT-11** : Carbonyl-oxy-camptothécine  
**CSAH** : Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine  
**Cys** : Cystéine  
**DJA** : Dose journalière admissible  
**DL<sub>50</sub>** : Dose létale médiane  
**et al.** : et autres auteurs  
**E** : Enzyme  
**E'** : Complexe acyl-enzyme  
**E102** : Tartrazine commerciale  
**E104** : Jaune de quinoléine  
**E110** : Jaune orangé  
**E122** : Azorubine  
**E124** : Rouge cochenille A (rouge ponceau)  
**E129** : Rouge allura  
**E131** : Bleu patenté V  
**E132** : Indigotine  
**E171** : Dioxyde de titane  
**E124-E171** : Colorant alimentaire vert  
**E210** : Acide benzoïque  
**E211** : Benzoate de sodium  
**Ea** : Energie d'activation  
**EC** : *Enzyme commission*  
**exp** : exponentielle

**FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

**FDA** : *Food and Drug Administration*

**FD&C** : *Food, Drug and Cosmetic*

**FD&C bleu N°2** : *Food, Drug and Cosmetic N°2* (l'indigotine)

**FD&C N°5** : *Food, Drug and Cosmetic N°5* (la tartrazine)

**g** : Gramme

**Glu** : Glutamate

**Gly** : Glycine

**GSH-Px** : Glutathion peroxydase

**hCE1** : *Human Carboxylesterase*

**hCES1** : *Human intestinal Carboxylesterase*

**hCES** : *Human intestinal Carboxylesterase*

**hCES2** : *Human Carboxylesterase*

**HCl** : Chlorure d'hydrogène

**His** : Histidine

**IgE** : Immunoglobuline E

**Ile** : Isoleucine

**kcat** : Constante de la vitesse de réaction

**KCl** : Chlorure de potassium

**kDa** : Kilodalton

**KDEL** : Séquence des protéines solubles nécessaires au fonctionnement du réticulum endoplasmique

**Kg** : Kilogramme

**KI** : Iodure de potassium

**KJ** : Kilojoule

**l** : Litre

**Leu** : Leucine

**Lys** : Lysine

**mM** : Millimolaire

**M**: Molaire

**mCES2** : *Mouse intestinal Carboxylesterase*

**Met** : Méthionine

**mg** : Milligramme

**min** : Minute

**ml** : Millilitre

**mol** : Mole  
**mmol** : Millimole  
**MRP2** : Transporteur d'efflux  
**N** : Atome d'azote « *nitrogenium* »  
**NH** : Groupement amine  
**NH<sub>2</sub>** : Fonction amine  
**nm** : Nanomètre  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**4PP** : 4- piperidino-piperidine  
**Phe** : Phenylalanine  
**Pro** : Proline  
**r<sup>2</sup>** : Coefficient de corrélation  
**rCES** : *Rabbit liver Carboxylesterase*  
**R'-OH** : Alcools  
**R-COOH** : Acide carboxylique  
**R-COOR'** : Ester carboxylique  
**Ser** : Sérine  
**SN-38** : 7-éthyle-10-hydroxycamptothécine  
**SOD** : Superoxyde dismutase  
**T** : Température  
**TDAAH** : Trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité  
**Thr** : Thréonine  
**TiO<sub>2</sub>** : Dioxyde de titane  
**Tyr** : Tyrosine  
**UDP** : Uridine diphosphate  
**UGP-G** : Uridine 5'-diphospho-glucuronosyl- Glucuronic acid  
**UGT** : Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase  
**UI** : Unité internationale  
**Val** : Valine

## Table des figures

<b>Figure 1:</b> Réaction d'hydrolyse du butyrate d'éthyle par la carboxylestérase	8
<b>Figure 2:</b> Schéma du repliement $\alpha/\beta$ : La structure secondaire est indiquée par des flèches grises pour les feuillets $\beta$ et des cylindres pour les hélices $\alpha$ . La localisation de la triade catalytique est indiquée par les points noirs. Les lignes pointillées indiquent l'emplacement des insertions possibles (Nardini et Dijkstra, 1999).....	9
<b>Figure 3:</b> Interaction carboxylestérase-UGT dans la face luminale du réticulum endoplasmique et interaction carboxylestérase-transporteur dans la cellule (Hosokawa, 2010).....	10
<b>Figure 4:</b> Structure cristalline de la <b>hCES1</b> et de la <b>rCES</b> (Liu, 2007; Fleming et al., 2005).....	12
<b>Figure 5:</b> Reconnaissance spécifique de l'enzyme et du substrat. Modèle de la « clé dans la serrure ». Modèle de l'ajustement induit (Mouranche., 1985)...	17
<b>Figure 6:</b> Mécanisme d'action de la carboxylestérase (Sato et Hosokawa, 2010; Antoniotti, 2008; Godet, 2008).....	20
<b>Figure 7:</b> Les Différents substrats de la carboxylestérase (Wheelock et al., 2008).....	24
<b>Figure 8:</b> Inhibiteurs de la carboxylestérase (Potter et Hatfield, 2011; Wheelock et al., 2008; Redinbo et Potter, 2005).....	26
<b>Figure 9:</b> Rôles biologiques de la carboxylestérase (Redinbo et Potter, 2005)...	28
<b>Figure 10:</b> La tartrazine commerciale utilisée dans cette recherche.....	33
<b>Figure 11:</b> Structure chimique en trois dimensions de la tartrazine (Kapor et al., 2001).....	34
<b>Figure 12:</b> Structure moléculaire en deux dimensions de la tartrazine (Agité et de Saint Blanquat, 2002).....	34
<b>Figure 13:</b> Le colorant vert commercial utilisé dans cette recherche.....	39
<b>Figure 14 :</b> Structure moléculaire du rouge ponceau (Wang et al., 2014).....	40
<b>Figure 15 :</b> Structure moléculaire d'indigotine (Mittal et al., 2006).....	43

<b>Figure 16 :</b> Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret. (Absorbance = 0,048 x [protéines]; $r^2 = 0,999$ ).....	47
<b>Figure 17 :</b> Cinétique d'hydrolyse du butyrate d'éthyle en présence (▲) et en absence (◆) de la préparation enzymatique de la carboxylestérase ([Butyrate d'éthyle]= $3 \cdot 10^{-2}$ M; solution tampon Borax/HCl 0,125M- pH 8 ; 25°C).....	61
<b>Figure 18 :</b> Effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase. ([Butyrate d'éthyle]= $3 \cdot 10^{-2}$ M; durée de la réaction: 5 min; 25°C).....	63
<b>Figure 19:</b> Effet de la température sur l'activité de la carboxylestérase. ([Butyrate d'éthyle]= $3 \cdot 10^{-2}$ M; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M-pH 8; durée de la réaction : 5 min).....	66
<b>Figure 20 :</b> Graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de la carboxylestérase.....	67
<b>Figure 21 :</b> Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon l'équation de Michaelis-Menten. (25°C; solution tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1 M (pH 8,00)).....	69
<b>Figure 22:</b> Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase. (cf. figure 21 pour les conditions opératoires).....	70
<b>Figure 23:</b> Effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la carboxylestérase. (cf. figure 21 pour les conditions opératoires).....	71
<b>Figure 24:</b> Spectre d'absorption de la tartrazine .....	75
<b>Figure 25:</b> Spectre d'absorption du colorant vert .....	77
<b>Figure 26:</b> Evolution de l'absorbance de la tartrazine en présence de différentes [Butyrate d'éthyle].....	78
<b>Figure 27:</b> Evolution de l'absorbance du colorant vert en présence de différentes [Butyrate d'éthyle].....	79
<b>Figure 28:</b> Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence et en absence de la carboxylestérase .....	80
<b>Figure 29:</b> Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance du colorant vert en présence et en absence de la carboxylestérase .....	81

<b>Figure 30:</b> Effet du pH sur l'absorbance de la tartrazine.....	82
<b>Figure 31:</b> Effet du pH sur l'absorption maximale de la tartrazine.....	83
<b>Figure 32:</b> Effet du pH sur l'absorbance du colorant vert.....	84
<b>Figure 33:</b> Effet du pH sur l'absorption maximale du colorant vert.....	85
<b>Figure 34:</b> Représentation de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase en absence et présence de [Tartrazine]= 0(◆), 0,1(■), 0,2(▲), 0,5(●) mM.....	87
<b>Figure 35:</b> Représentation de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase en absence et présence du [colorant vert]= 0(◆), 0,4(■), 0,5(▲), 0,7(●) mM.....	87
<b>Figure 36:</b> Effet de la [Tartrazine] sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase.....	90
<b>Figure 37:</b> Effet de la [Colorant vert] sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase.....	90



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> La composition en acides aminés des carboxylestérases hépatiques (Scott et Zerner, 1975).....	13
<b>Tableau 2:</b> Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité croissante (Servais, 1999).....	31
<b>Tableau 3:</b> Dilutions de la solution mère de l'albumine du sérum bovin (BSA).....	46
<b>Tableau 4:</b> Dilutions de la solution mère enzymatique.....	47
<b>Tableau 5:</b> Paramètres cinétiques de la carboxylestérase.....	73
<b>Tableau 6:</b> Paramètres cinétiques de la carboxylestérase déterminés en absence et en présence de la tartrazine et du colorant vert.....	89

# *Introduction Générale*

**A**u cours des dernières décennies, notre vie a très rapidement changé. En effet, la profonde modification de la nature et de la composition des aliments et de nos habitudes alimentaires est inévitablement venue perturber notre métabolisme. En outre, notre monde moderne nous inonde de produits chimiques auxquels nous sommes exposés quotidiennement et qui génèrent insidieusement des toxines dans notre organisme difficiles à éliminer. D'autre part, le consommateur d'aujourd'hui est de mieux en mieux averti et s'intéresse davantage à son alimentation. Cependant, il est continuellement exposé à des annonces sur les risques associés avec les aliments, avec les additifs alimentaires, principalement les colorants de synthèse, ou avec les différentes pratiques diététiques. Ces avertissements sont souvent sans fondement scientifique, génèrent la peur et influent sur les attitudes du consommateur vis-à-vis des aliments. Le public est aussi mal informé sur des bénéfices de certains aliments ou suppléments.

Tous les organismes vivants sont exposés en permanence à une variété de substances exogènes d'origines diverses, rassemblées sous le terme de xénobiotiques. Ces dernières comprennent à la fois des produits naturels et synthétiques tels que les médicaments, les pesticides, les produits chimiques industriels, les polluants, les métabolites secondaires des végétaux, les toxines produites par les moisissures, les plantes et les animaux (**Liska, 1998; Heymann, 1982**). De nombreux xénobiotiques peuvent être absorbés par la peau, les poumons ou le tractus gastro-intestinal grâce à leur caractère lipophile qui est un obstacle à leur élimination (**Parkinson, 2001**). En effet, ils ont une tendance naturelle à s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires engendrant ainsi une toxicité, voire une mort cellulaire inéluctable. Pour cela, les organismes vivants ont perfectionné des outils visant à favoriser l'élimination des xénobiotiques, ce qui constitue, en quelque sorte, un moyen de défense contre l'action néfaste de certains d'entre eux. Le processus de biotransformation est l'un de ces outils. La biotransformation désigne l'ensemble des réactions qui se traduisent en des modifications, par l'intermédiaire d'enzymes, de la structure chimique d'un xénobiotique. Ces réactions ont pour effet de rendre les xénobiotiques, qui sont plutôt

liposolubles au départ, plus polaires (ionisables) et ainsi plus facilement excrétés dans les urines.

Le foie est le principal organe impliqué dans la biotransformation des xénobiotiques, bien que la peau, le rein, la muqueuse intestinale et le poumon puissent également métaboliser certaines substances. En règle générale, les réactions de biotransformation ont pour effet de diminuer, voire d'annuler complètement la toxicité d'un xénobiotique (détoxication) (**Damon et Guillouzo, 1996**). Cependant, il existe de plus en plus d'exemples montrant que la biotransformation rend, au contraire, certaines substances plus toxiques ou leur confère, dans certains cas, une toxicité nouvelle comparativement à celle qui est associée à la substance mère (bioactivation).

La conception classique du métabolisme des xénobiotiques suit un caractère bi-phasique comportant une première phase de « fonctionnalisation » qui a pour but d'augmenter la polarité de ces substances et les préparer à subir d'autres transformations au cours des réactions de la deuxième phase dites de « conjugaison ». Cette dernière permet l'ajout d'un radical chimique hydrophile tel que le glutathion ou le groupement acétyle, soit directement sur le xénobiotique inchangé, soit sur les métabolites fonctionnalisés générés par la première phase. L'élimination de ces produits conjugués hydrophiles s'effectue par des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des produits de la deuxième phase, hors de la cellule (**Viau et Tardif, 2003; Dean et al., 1995**).

Ainsi, les deux phases réactionnelles principales constituant les étapes de détoxication ne sont possibles que par l'intervention de systèmes enzymatiques spécifiques. Etant donné la grande diversité des xénobiotiques aux quels l'organisme est exposé, il existe une multitude d'enzymes présentant des spécificités variées. Parmi les principaux enzymes qui sont impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques, les carboxylestérases (EC 3.1.1.1), appartenant à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases et qui font partie des enzymes des réactions de la première phase métabolisant les xénobiotiques.

Ces enzymes peuvent hydrolyser une variété de médicaments et des pro-médicaments contenant des esters, tels que : les inhibiteurs d'enzymes de conversion de l'angiotensine (Témocapril, Cilazapril, Quinapril et Imidapril), des médicaments anticancéreux (CPT-11, capécitabine) et des stupéfiants (la cocaïne, l'héroïne et la mépéridine) (**Hosokawa, 2008**).

Notre thème de recherche consiste à étudier l'effet de deux colorants azoïques alimentaires, sachant que leurs produits de dégradation sont des dérivés aminés aromatiques réputés cancérigènes (**Chetioui, 2010**), sur l'activité de l'estérase hépatique porcine. Cette enzyme joue un rôle important dans le processus de détoxification de l'organisme et elle est capable d'agir sur de nombreux substrats (**Wheelock et al., 2008**). L'estérase a été choisie pour mener une étude d'interaction enzyme-colorant afin de savoir si l'enzyme a un effet sur les colorants choisis et par conséquent, il faut caractériser les produits formés et estimer leur nocivité, ou au contraire les colorants peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur sur l'activité de l'enzyme.

En effet, de nombreuses substances colorées sont des substrats ou des produits de réactions enzymatiques. On désigne par le terme colorant toute substance colorée utilisée pour changer la couleur d'un support (textile, papier, aliment,...). L'origine des colorants peut être naturelle ou synthétique et, parmi ces derniers, on trouve les colorants azoïques. Les azo-composés constituent la famille la plus importante tant sur le plan des applications, puisqu'ils représentent plus de la moitié des colorants préparés dans le monde. Ces structures caractérisées par le groupe fonctionnel azo ( $-N=N-$ ) portant deux radicaux alkyle ou aryle identiques ou non (azoïques symétriques et dissymétriques) (**Maclaren, 1985**). Le groupe azo peut être répété dans une même molécule : on a affaire à des diazoïques, des triazoïques et plus généralement à des polyazoïques.

Les colorants alimentaires de synthèse choisis pour mener cette étude sont la tartrazine (**E102**) et le colorant vert (**E124-E171**). La tartrazine est un colorant alimentaire monoazoïque jaune, très soluble dans l'eau, pouvant provoquer des allergies. Elle est très employée dans le domaine alimentaire et pharmaceutique. Ce colorant est aussi utilisé pour la coloration de certaines fibres textiles comme la

laine et la soie (**Jain, 2003**). D'autre part, le colorant vert est aussi utilisé pour donner une couleur verte à certains produits alimentaires et pharmaceutiques.

Par conséquent, notre travail est consacré à la recherche d'un éventuel effet de deux colorants alimentaires de synthèse sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase du foie de porc. Nous avons donc procédé de la manière suivante:

- ✓ La détermination des conditions optimales et des paramètres cinétiques de la carboxylestérase.
- ✓ Tester l'effet de deux colorants alimentaires sur l'activité de la carboxylestérase en utilisant le butyrate d'éthyle comme substrat de réaction.

Ainsi, la présente thèse commence par une introduction générale abordant la problématique du travail, suivie de quatre chapitres :

Le premier chapitre est consacré aux rappels théoriques sur la carboxylésterase et les colorants azoïques alimentaires testés. Ensuite, les différentes expériences effectuées au cours de ce travail sont abordées dans le second chapitre.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus ainsi que leur interprétation.

Le dernier chapitre regroupe une conclusion générale pour restituer les principaux résultats obtenus et les perspectives afin de compléter et d'améliorer ce travail.

*Chapitre 1.*  
*Rappels Théoriques*

## I. La carboxylestérase

### I.1. Généralités

Toutes les réactions chimiques qui permettent le fonctionnement des êtres vivants sont catalysées par des protéines particulières, les enzymes. Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité et d'une spécificité fonctionnelle remarquables. Elles interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction **(Mouranche, 1985)**. Deux grands groupes d'hydrolases sont d'une importance capitale, les estérases et les lipases. Les lipases sont principalement actives contre les substrats insolubles dans l'eau tels que les triglycérides constitués par de longues chaînes d'acides gras, tandis que les estérases hydrolysent préférentiellement les esters simples généralement composés par des triglycérides à chaînes plus courtes. Les estérases (EC 3.1.1.X) constituent un groupe diversifié d'hydrolases qui catalysent la formation et le clivage des liaisons ester **(Bornscheuer, 2002)**. Ces enzymes présentent également une grande stéréospécificité, ce qui en fait des biocatalyseurs attrayant dans la production de composés chimiques optiquement purs destinés soit à la recherche et/ou à des applications biologiques et thérapeutiques **(Barata et al., 2004)**.

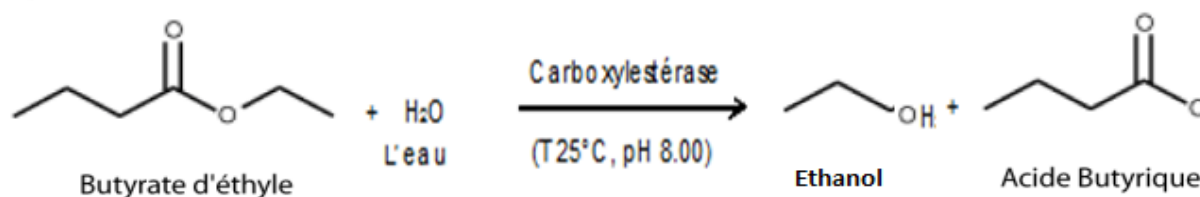
De nombreux produits chimiques de synthèse, y compris les pesticides, les médicaments, sont des esters et dérivés, leur hydrolyse est catalysée par des estérases **(Kyeong et al., 1997)**.

Les estérases d'acides carboxyliques sont un groupe d'enzymes largement distribuées dans la nature, on les trouve chez la plupart des organismes vivants. Elles peuvent être classées selon la spécificité au substrat et la sensibilité aux inhibiteurs en deux groupes : les arylestérases (A-estérases) (EC 3.1.1.2) et les aliéstérases (B-estérase), le dernier groupe comprend les cholinestérases (EC 3.1.1.7 et EC 3.1.1.8) et les carboxylestérases (EC 3.1.1.1) **(Einarsson et al., 1996)**.



## I.2. Définition

La carboxylestérase (EC 3.1.1.1) compte parmi les principaux enzymes impliqués dans la détoxification et le métabolisme des xénobiotiques, elle permet l'hydrolyse de leurs esters carboxyliques (R-COOR') en alcools (R'-OH) et en acides carboxyliques (R-COOH) comme l'indique la réaction suivante :

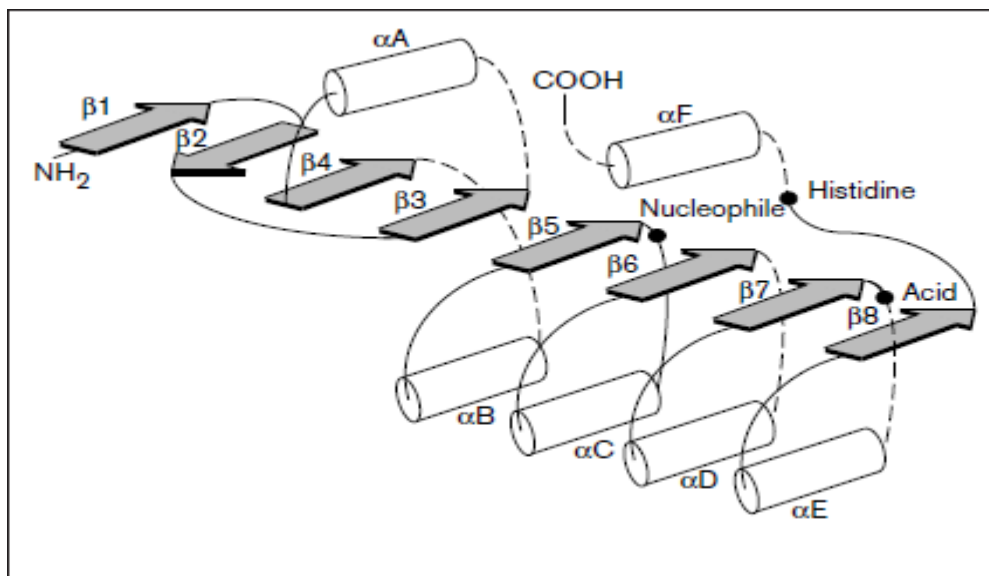


**Figure 1** : Réaction d'hydrolyse du butyrate d'éthyle par la carboxylestérase.

La carboxylestérase appartient à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases et à la superfamille des sérine estérases et son nom officiel est l'ester carboxylique hydrolase (EC 3.1.1.1) (**Satoh et Hosokawa, 2010; Wang et al., 2009 ; Wheelock et al., 2008 ; Newman et al., 2005 ; Hotelier et al., 2004**). L'activité et l'expression de cette enzyme varient selon les tissus et les organismes (**Lima et al., 2013**). La plupart des carboxylestérases ont été étudiées à partir des tissus des mammifères confirmant leur rôle important dans la biotransformation hydrolytique d'un grand nombre de médicaments (**Pesaresi et al., 2005**). En effet, les carboxylestérases se trouvent dans de nombreux tissus y compris le foie, le cœur, le cerveau, le rein, l'intestin grêle, les poumons, les muscles ainsi que dans le tissu adipeux, les tissus des voies respiratoires et les leucocytes du sang. Cependant, l'axe hépato-intestinal est d'une importance particulière pour l'expression des carboxylestérases en raison de la concentration élevée des toxines contenant des esters qui peuvent être ingérés par voie orale (**Ross et al., 2010**).

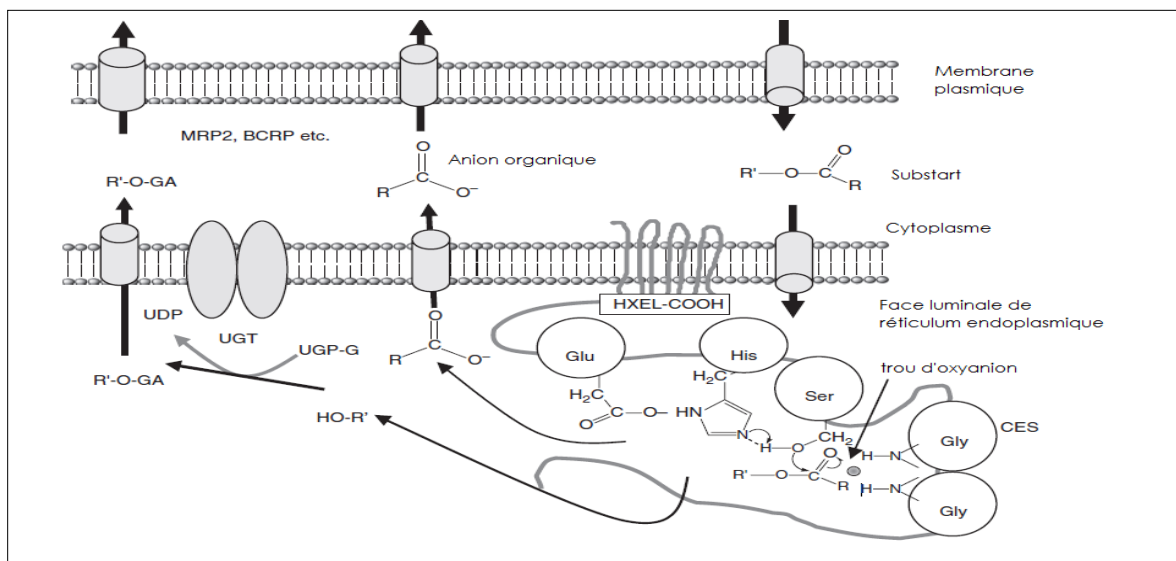
### I.3. Structure

Les estérases, les lipases, les protéases, les déshalogénases, les peroxydases et les époxydes hydrolases font partie des hydrolases qui se caractérisent par les repliements  $\alpha/\beta$ , constitués par un noyau central formé de huit feuilletts  $\beta$  parallèles (seul le deuxième feuillet  $\beta$  est antiparallèle) et d'une enveloppe de six hélices  $\alpha$ . Autour de ce domaine central, viennent se greffer diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme ainsi que de sa spécificité vis-à-vis du substrat (**Fickers et al., 2008 ; Nardini et Dijkstra, 1999**).



**Figure 2** : Schéma du repliement  $\alpha/\beta$  : La structure secondaire est indiquée par des flèches grises pour les feuilletts  $\beta$  et des cylindres pour les hélices  $\alpha$ . La localisation de la triade catalytique est indiquée par les points noirs. Les lignes pointillées indiquent l'emplacement des insertions possibles (**Nardini et Dijkstra, 1999**).

Comme de nombreuses hydrolases, le repliement  $\alpha/\beta$  est le motif structural de base des carboxylestérases (**Fickers et al., 2008**). Les carboxylestérases des mammifères sont localisées dans le réticulum endoplasmique de nombreux tissus, elles possèdent un peptide signal hydrophobe de 17 à 22 résidus d'acides aminés près de l'extrémité N-terminal qui les marque pour le transport à travers le réticulum endoplasmique. En outre, la séquence His-X-Glu-Leu, présente à l'extrémité C-terminal de la protéine, peut se lier avec le récepteur KDEL pour la rétention dans le site luminaire du réticulum endoplasmique (figure 3) (**Imai, 2006**).



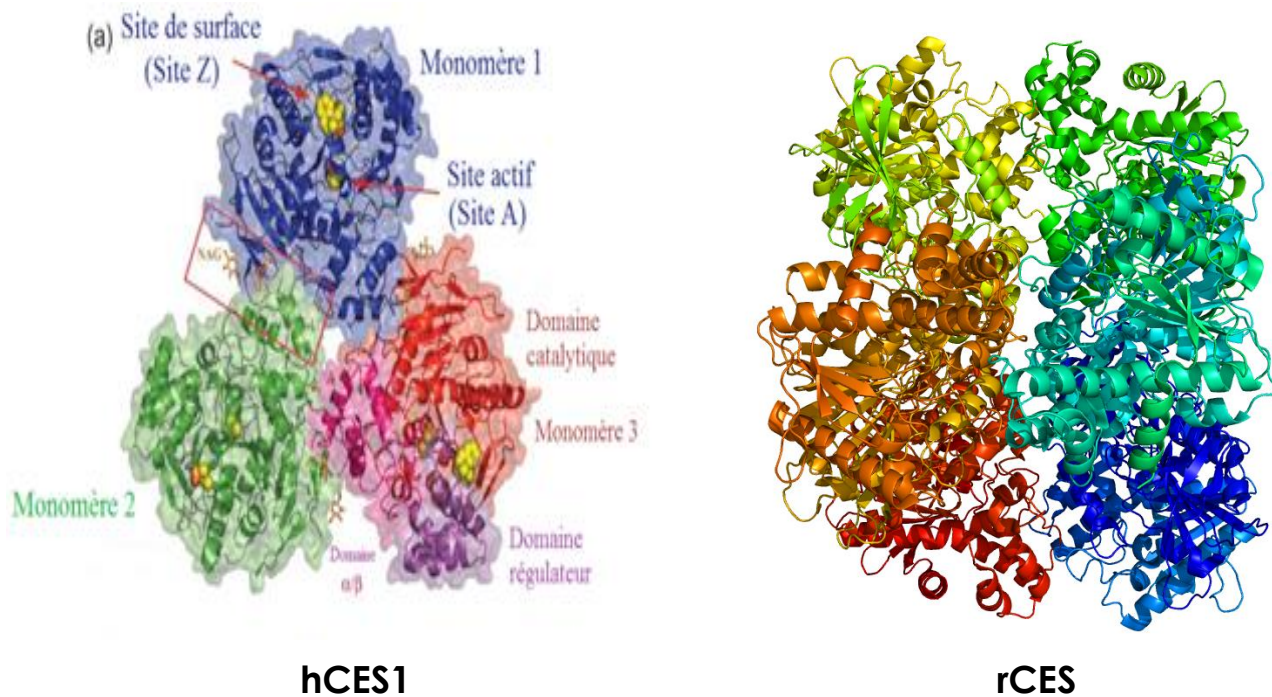
**Figure 3** : Interaction carboxylestérase-UGT dans la face luminale du réticulum endoplasmique et interaction carboxylestérase-transporteur dans la cellule (**Hosokawa, 2010**).

Les carboxylestérases adaptent une triade catalytique composée de Ser, His et Glu ou Asp. D'autre part, les carboxylestérases ont quatre résidus Cys qui peuvent être impliqués dans les liaisons disulfures spécifiques. Parmi eux, la Cys98 est le résidu le plus hautement conservé dans de nombreux isoenzymes des carboxylestérases (**Hosokawa, 2010**). La triade catalytique est située en bas d'environ 25Å de profondeur du site actif, approximativement au centre de la molécule et comprend une grande poche flexible d'un côté, Ser203, et une petite poche rigide du côté opposé.

L'orientation et l'emplacement du site actif fournissent un environnement hydrophobe idéal pour l'hydrolyse d'une grande variété de substrats hydrophobes. La petite poche rigide du site actif est à côté du trou d'oxyanion constitué par Gly123-124 et rayée par plusieurs résidus hydrophobes. La plus grande poche souple du site actif est bordée par plusieurs résidus non polaires et pourrait s'adapter à de plus grandes ou polycycliques molécules tels que le cholestérol. La grande poche est à côté d'une région secondaire qui permettrait à des petites molécules (des substrats et des produits de réaction) d'entrer et de sortir du site actif **(Sato et Hosokawa, 2010)**.

Trois structures cristallines de la carboxylestérase humaine (hCE1) et du foie de lapin (rCES) ont été rapportées à ce jour **(Djeridane et al., 2007)**. La hCE1 existe sous forme de trimères, chaque monomère est constitué d'un domaine catalytique, un domaine  $\alpha/\beta$  typique d'hydrolases, et un domaine de régulation qui contient le site (Z) de liaison à un ligand de surface de faible affinité **(Fleming et al., 2005)**. La carboxylestérase humaine partage une identité de séquence de 81% avec la carboxylestérase du foie de lapin **(Liu, 2007)** et de 80% avec la carboxylestérase du foie de porc **(Djeridane et al., 2007)**.

La carboxylestérase extraite du foie de porc comporte trois sous-unités  $\alpha, \beta$  et  $\gamma$  d'un poids moléculaire de 58,2 kDa, 59,7 kDa et 61,4 kDa respectivement **(Bornscheuer et al., 2006)**. Cependant, la carboxylestérase humaine hCES1 est une enzyme de 180 kDa comportant trois sous-unités, chaque sous-unité est de 60 kDa. La carboxylestérase humaine hCES2 est constituée d'une seule sous-unité de 60 kDa **(Imai, 2006)**. D'autre part, la carboxylestérase synthétisée par des microorganismes du genre *Bacillus* a un poids moléculaire de 32KDa **(Morana et al., 2002)**.



**Figure 4** : Structure cristalline de la **hCES1** et de la **rCES** (Liu, 2007; Fleming et al., 2005).

#### I.4. Sources

Les carboxylestérases sont des enzymes ubiquitaires identifiées dans différentes espèces (Redinbo et Potter, 2005). Cependant, les carboxylestérases purifiées à partir des mammifères ont été bien étudiées par rapport à celles des plantes et des micro-organismes. En effet, l'extrait aqueux du pois fut le premier à être séparé et purifié. Par la suite, cette enzyme a été purifiée à partir d'autres sources végétales telles que l'orge, les haricots verts, le sorgho, les feuilles de *Festuca pratensis* (Fétuque des prés) et la pomme (Upadhya et al., 1985). La carboxylestérase est aussi synthétisée par les microorganismes tel que *Sulfolobus sulfataricus*, *Acinetobacter lwoffii* et *Pseudomonas spp* (Pesaresi et al., 2005). Une enzyme hydrolytique de l'acétate d'isoamyle semblait être une carboxylestérase ; elle a été purifiée à partir de la levure *Kyokai* et est impliquée dans la résistance aux insecticides organophosphorés. Cette enzyme a été purifiée et caractérisée à partir du moustique *Culex quinquefasciatus* (Ketterman et al., 1992; Wakai et al., 1990).

Parmi les carboxylestérases purifiées d'origine animale, on trouve la carboxylestérase hépatique de l'homme, celle du poulet, du cheval, du bœuf, du mouton et celle du porc. Cette dernière est la plus étudiée. Le tableau 1 représente la composition en acides aminés de la carboxylestérase hépatique extraite de différentes espèces (**Scott et Zerner, 1975**).

**Tableau 1** : La composition en acides aminés des carboxylestérases hépatiques (**Scott et Zerner, 1975**).

Acides aminés	Poulet	Bœuf	Mouton	Cheval	Porc
Résidus/mol					
Asp	49,46	56,07	56,21	46,75	52,87
Thr	24,52	29,93	30,29	32,14	34,87
Ser	37,60	42,75	39,62	41,67	40,50
Glu	78,08	55,39	55,58	64,80	60,52
Pro	29,12	46,41	47,71	43,19	45,67
Gly	45,40	46,10	51,16	53,56	55,34
Ala	55,39	47,58	47,21	51,06	48,82
Cys	07,26	05,98	05,21	06,07	04,27
Val	50,54	45,12	48,13	49,65	50,62
Met	15,14	16,09	14,81	19,16	13,50
Ile	28,90	24,14	22,76	26,10	20,02
Leu	48,56	64,84	67,15	55,07	61,64
Tyr	21,39	16,08	18,30	14,33	15,97
Phe	32,34	32,74	31,22	34,62	32,62
Lys	39,24	37,58	35,09	42,30	37,12
His	11,07	16,35	15,19	16,50	14,17
Arg	26,07	20,77	20,57	13,99	20,25
Trp	9,20	11,20	11,32	10,30	12,00

### **I.5. Classification des carboxylestérases**

Les carboxylestérases des mammifères comprennent une famille multigénique signalée dans la base de données de l'organisation du génome humain, bien que les gènes qui codent l'expression de la carboxylestérase CES1 et CES2 soient les mieux caractérisés des gènes humains. En effet, la majorité des carboxylestérases impliquées dans la détoxification des xénobiotiques appartiennent à la famille CES1 et CES2. Ces deux familles partagent une identité de 40 à 50% de la séquence d'acides aminés mais qui ont des spécificités de substrats différentes. Les CES1 des mammifères sont hautement exprimées dans la plupart des organes, tandis que les CES2 sont exprimées en un nombre limité d'organes, tels que l'intestin, le foie et les reins (**Taketani et al., 2007**).

L'union internationale de biochimie de classification a proposé de classer les carboxylestérases selon l'homologie et l'alignement de séquence d'acides aminés des gènes codant en cinq familles d'isoenzymes (CES1, CES2, CES3, CES4 et CES5). Chaque famille est également divisée en sous familles (**Imai, 2010; Hosokawa, 2008**).

- **La famille des CES1** comprend les principales formes d'isoenzymes de la carboxylestérase (plus de 60% d'homologie avec la CES1A1 humaine). Ainsi, elle peut être divisée en huit sous familles (CES1 A, B, C, D, E, F, G et H). La plupart de la famille des CES1, à l'exception de CES1G, sont principalement exprimées dans le foie. A titre d'exemple, la sous famille CES1A comprend les principales formes de la carboxylestérase de l'homme, du singe et du lapin ; la CES1B comprend les isoformes majeures de la carboxylestérase du rat, de la souris et du hamster ; la CES1C comprend les isoformes de la carboxylestérase du chien, du chat et du porc et la sous famille CES1H comprend RL1, ML1 et l'hydrolase B (CES1H 3) et C (CES1H2) qui catalysent l'hydrolyse des longues chaînes acyl-CoA. Cette famille a une spécificité pour l'ester de méthyle de la cocaïne, elle hydrolyse aussi l'ester d'éthyle de la temocapril, la mépéridine et l'oseltamivir (**Hosokawa, 2008**).

• **La famille des CES2** comprend quatre sous familles selon l'espèce CES2A1 (humaine hCES), CES2A6 (de la souris mCES2), CES2A10 (du lapin rCES2), CES2A11 (du hamster). Il s'agit d'une enzyme exprimée principalement dans l'intestin grêle. Mais on peut aussi la trouver dans le foie, les poumons et les reins. Elle hydrolyse les esters de benzoyle de la cocaïne, de l'héroïne et du CPT-11 (Irinotécan). Ce dernier est l'un des médicaments anti-tumoraux les plus utilisés dans le traitement des cancers colorectaux avancés et qui nécessite une activation par la carboxylestérase CES2 (**Charasson et al., 2005**).

• **La famille des CES3** inclut la CES mâle (CES3A2) et la CES humaine (CES3A1). Cette dernière a environ 40% d'identité d'acides aminés avec les CES1A et CES2A1, et est exprimée dans le tractus gastro-intestinal et du foie avec une expression faible par rapport au CES1A et CES2A1. Selon **Sanghani et al. (2009)**, l'expression des gènes de la carboxylestérase CES1A, CES2 et CES3 est détectée dans les tumeurs du côlon humain.

• **La famille des CES4** inclut essentiellement la CES4A2, il s'agit d'une protéine urinaire majeure excrétée dans les urines du chat (**Hosokawa, 2008**).

• **La famille des CES5** comprend des isoenzymes de 46,5 KDa, qui ont une structure différente de celle des autres isoenzymes de la carboxylestérase (**Hosokawa, 2008**).

Une nouvelle classe de gènes de la carboxylestérase désignée par CES6, est située dans des régions spécifiques du cerveau, y compris le cervelet. La CES6 peut jouer un rôle dans la détoxification des médicaments et des xénobiotiques dans le tissu nerveux, le liquide céphalo-rachidien et d'autres parties du corps (**Holmes et al., 2009**).

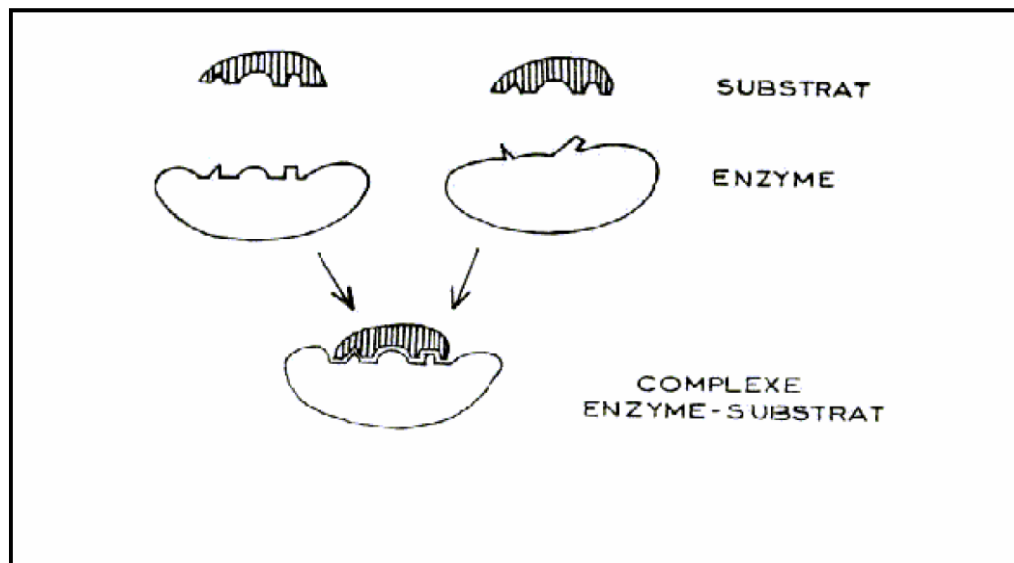


Il existe une classification de la carboxylestérase selon Aldridge (1993) : ainsi, les isoenzymes de la carboxylestérase ont été initialement classés selon leur spécificité au substrat et le point isoélectrique en super famille des sérines estérases qui comprend l'acétylcholine-estérase, la butyrylcholine-estérase et la carboxylestérase qui, toutes, appartiennent à la famille  $\beta$ -estérase. Cependant, cette classification est moins précise à cause du chevauchement des spécificités du substrat. En effet, une seule réaction isoélectrique est souvent véhiculée par plusieurs types d'enzymes (**Satoh et Hosokawa, 2010; Hosokawa, 2010; Hosokawa, 2008**).

### **1.6. Mécanisme d'action**

La reconnaissance spécifique enzyme-substrat selon le modèle de Fisher, avec sa célèbre image de la « clé dans la serrure », posait dès 1894 les fondements de la complémentarité structurale entre la partie du substrat transformée et une cavité de la macromolécule enzymatique appelée « site actif ». Le substrat y est piégé dans une position favorable à la déstabilisation de certaines de ses liaisons par certains radicaux de l'enzyme.

La figure « 5 » illustre la formation du complexe enzyme-substrat par le modèle de simple complémentarité stérique et conformationnelle, et par le modèle de l'ajustement induit. En effet, les protéines sont douées d'une certaine plasticité conformationnelle et l'approche d'un ligand peut induire une modification de la géométrie du site actif plus favorable à une bonne orientation des groupements réactionnels (**Mouranche, 1985; Palmer, 1985**).



**Figure 5** : Reconnaissance spécifique de l'enzyme et du substrat  
 - Modèle de la « clé dans la serrure ».  
 - Modèle de l'ajustement induit. (**Mouranche, 1985**).

L'enzyme et son substrat, associés par des interactions de forces diverses, constituent un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instables qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction; la vitesse de la réaction est liée à la différence d'énergie libre entre l'état de transition et l'état fondamental; on l'appelle énergie d'activation «  $E_a$  » ou barrière de potentiel.

Dans les réactions enzymatiques, l'étude d'un mécanisme catalytique suppose de préciser les résidus du site actif impliqués, la nature et le type de liaison des intermédiaires, les échanges de protons, électrons et radicaux fonctionnels et les changements conformationnels.

Quel que soit le type de réaction catalysée, un cycle catalytique enzymatique se déroule toujours en quatre étapes successives :

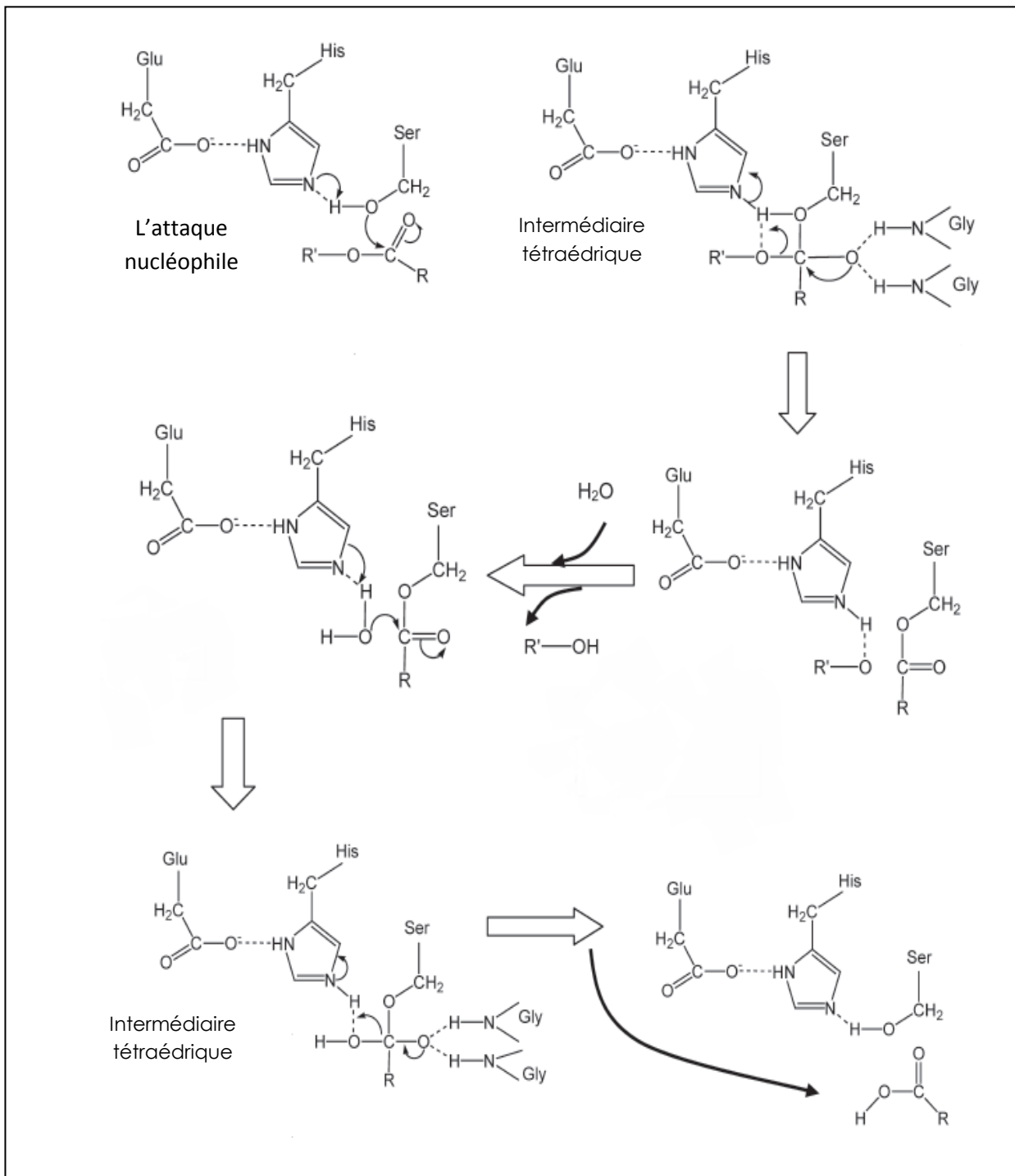
- La diffusion des réactifs dans le milieu;
- La reconnaissance spécifique enzyme-substrat;
- La catalyse par des mécanismes appropriés;
- L'expulsion des produits formés qui libère l'enzyme et la rend fonctionnelle pour un nouveau cycle catalytique.

Le mécanisme catalytique par lequel les estérases hydrolysent leurs substrats comprend une triade catalytique, constituée par une Ser, His et soit un résidu Glu ou Asp. Les carboxylestérases clivent les esters via un processus en deux étapes qui implique la formation et la dégradation d'un intermédiaire acyl-enzyme (**Wheelock et al., 2005**).

Le mécanisme d'action de la carboxylestérase pourrait être divisé en étapes suivantes :

- La formation du complexe enzyme-substrat par la position du substrat dans l'orientation correcte pour la réaction.
- L'hydrolyse de la liaison ester commence par une attaque par l'atome de l'oxygène du groupe hydroxyle de la Ser<sub>203</sub> sur l'atome du carbone carbonyle de la liaison ester.
- Les liaisons hydrogènes entre l'oxygène chargé négativement de l'intermédiaire tétraédrique et le groupement NH de la Gly<sub>123</sub> et la Gly<sub>124</sub> stabilisent l'oxygène chargé négativement. Cette configuration est appelée trou d'oxyanion. La liaison ester se clive et le groupe partant prend un proton de l'ion d'imidazolium de l'His<sub>450</sub>. La partie acyle de l'ester d'origine est liée à l'enzyme comme intermédiaire enzyme-acyle. Le composant d'alcool diffuse, complétant l'étape d'acylation de la réaction d'hydrolyse.
- Une molécule d'eau attaque l'intermédiaire acyle-enzyme pour donner un second intermédiaire tétraédrique.
- L'His<sub>450</sub> donne alors le proton à l'atome d'oxygène de la Ser<sub>203</sub>, qui libère ainsi le composant acide de substrat. Le composant acide diffuse plus loin, accompagné par la régénération de l'enzyme (**Satoh et Hosokawa, 2010; Fickers et al., 2008; Godet, 2008**).

La réaction catalysée par la carboxylestérase suit un mécanisme réactionnel linéaire (substrat et produits se fixent et se détachent selon un ordre obligatoire) dit : ping-pong, dans lequel la réaction met en jeu des complexes binaires. L'acte catalytique se réalise en deux phases, on parle de réaction par double déplacement. Le principe du mécanisme ping-pong a été initialement proposé par Cleland et raffiné par Cornish-Bowden. Il est le suivant : les deux substrats A et B ne peuvent jamais se trouver en même temps sur l'enzyme. Il s'agit d'un transfert entre A et B où A laisse sur l'enzyme un groupement qui sera renvoyé ultérieurement sur B ou vice versa (**Pelmont, 1993**). Dans un premier temps, il y a fixation du substrat A (l'ester carboxylique) sur l'enzyme pour former le complexe EA avec libération du premier produit (l'alcool). Le complexe acyl-enzyme E' subit une attaque nucléophile par un second substrat B (l'eau) pour aboutir au complexe E'B. Ce dernier subit un réarrangement pour libérer le second produit Q (l'acide) et l'enzyme E est régénérée (**Fickers et al., 2008**). La figure 6 représente les principales étapes du mécanisme d'action de la carboxylestérase :



**Figure 6** : Mécanisme d'action de la carboxylestérase (**Satoh et Hosokawa, 2010; Antoniotti, 2008; Godet, 2008**).

## 1.7. Propriétés physico-chimiques

### 1.7.1. Le pH

Les enzymes présentent un pH optimum caractéristique, pH auquel leur activité enzymatique est maximale. En dessous ou au-dessus de ce pH, l'activité enzymatique décroît (**Lehninger, 1977**). En effet, la plupart des réactions biologiques se déroulent à un pH neutre et beaucoup d'enzymes sont inactivés en dehors d'un pH compris entre 5 et 9 (**Coutouly et al., 1991**).

La relation entre le pH et l'activité d'une enzyme donnée dépend du comportement acido-basique de l'enzyme et de son substrat ainsi que de nombreux autres facteurs souvent difficiles à analyser de façon quantitative.

Les variations du pH peuvent avoir un effet :

- au niveau de l'enzyme, en provoquant la modification du degré d'ionisation de certains groupements fonctionnels dont la charge, positive ou négative, est nécessaire, soit à la formation et à la transformation du complexe enzyme-substrat (il s'agit alors de groupements appartenant à des aminoacides du site actif), soit au maintien de la conformation tridimensionnelle native de la protéine enzymatique (il s'agit alors de groupements pouvant appartenir à des aminoacides situés en dehors du site actif).
- au niveau du substrat, en changeant son degré d'ionisation, ce qui peut permettre ou au contraire empêcher la formation du complexe enzyme-substrat, si le substrat doit être sous une forme ionisée donnée pour pouvoir se fixer sur le site actif de l'enzyme, en d'autres termes le substrat réel de l'enzyme n'est présent dans ce cas que dans un intervalle de pH convenable (**Weil, 2005**).

La carboxylestérase présente une forte activité dans une gamme de pH allant de 6,5 à 8. Avec un optimum de 8,1 (**Levine et al., 2008; Bertram et Krish, 1969**).

### I.7.2. La température

Comme dans le cas de la plupart des réactions chimiques, la vitesse des réactions enzymatiques augmente avec la température dans l'intervalle des températures où l'enzyme reste stable et garde sa pleine activité selon la loi d'Arrhenius :

Avec :

$$K_{cat} = C \times \exp^{-E_a/RT}$$

**C** : Constante,

**T** : Température en Kelvin,

**R** : Constante des gaz parfaits,

**E<sub>a</sub>**: Energie d'activation de la réaction (au sens d'Arrhenius) (**Loncle, 1992**).

La vitesse de la plupart des réactions enzymatiques double approximativement quand la température augmente de 10°C (**Lehninger, 1977**). La température optimale d'une enzyme résulte d'un compromis entre l'augmentation d'activité accompagnant l'élévation de la température et la dénaturation ou l'inactivation de la protéine enzymatique par la chaleur. La carboxylestérase présente une activité maximale à environ 40°C (**Wang et al., 2009; Wynne et al., 1973**).

### I.7.3. Le substrat

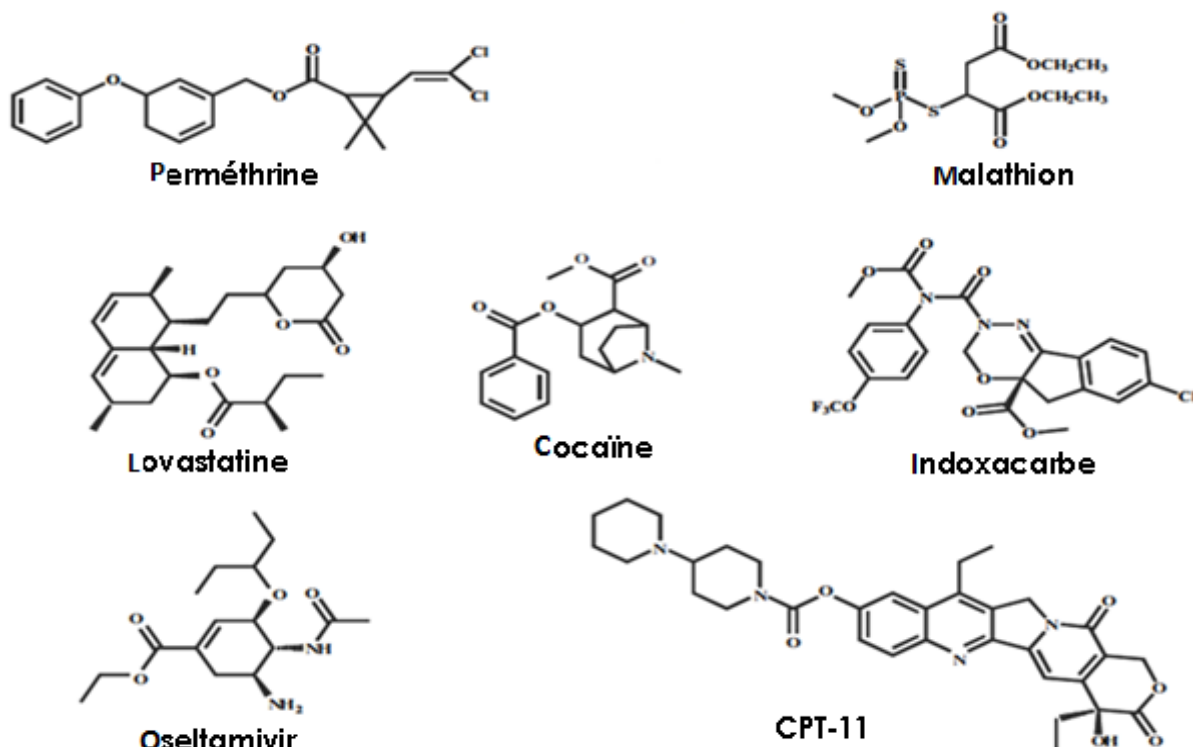
L'un des caractères les plus évidents de l'action catalytique des enzymes est la spécificité. Chaque enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction et agit exclusivement sur un seul substrat ou sur une classe de composés possédant en commun certains éléments bien définis d'architecture moléculaire.

Des études récentes ont montré qu'il existe quelques différences entre les familles des carboxylestérases en termes de spécificité vis-à-vis du substrat, la distribution dans les tissus, les propriétés immunologiques et la régulation dans l'expression des gènes (**Holmes et al., 2009**).

Les carboxylestérases des mammifères catalysent les réactions d'hydrolyse et de transestérification avec un large éventail de substrats comme les médicaments et les xénobiotiques. D'une part, les carboxylestérases hydrolysent des composés contenant des groupements fonctionnels tels que l'ester carboxylique, l'amide et le thioester avec des vitesses variables de réaction selon le type du substrat. Par exemple, l'ester carboxylique de la procaine (un anesthésique local), est hydrolysé plus rapidement que son homologue amide, le procainamide, utilisé dans le traitement de l'arythmie cardiaque (**Anzenbacher et al., 2012**). D'autre part, la carboxylestérase hCES1 peut effectuer la réaction de transestérification de la cocaïne avec de l'éthanol pour produire le cocaéthylène qui est plus toxique (**Imai, 2006**).

Les carboxylestérases peuvent hydrolyser un grand nombre de substrats agrochimiques et pharmaceutiques (figure 7). Selon **Wheelock et al. (2008)**, les carboxylestérases hydrolysent les pyréthriinoïdes et les lient stoechiométriquement aux carbamates et aux organophosphates. Les carboxylestérases jouent un rôle important dans le métabolisme d'un grand nombre de médicaments, y compris la lovastatine qui réduit le taux du cholestérol, l'antiviral l'oseltamivir, la mépéridine analgésique narcotique, et certaines drogues comme la cocaïne et l'héroïne. De plus, la carboxylestérase fait partie des enzymes métabolisant les promédicaments (un composé qui, après administration, est métabolisé en un principe actif sur le plan pharmacologique). En effet, chez les cancéreux traités par le 7-éthyle-10-(4-1-pipéridino)-1-pépidino) carbonyloxycompotothécine (CPT-11), la carboxylestérase est responsable d'hydrolyser cette molécule en sa forme active, le 7-éthyle-10-hydroxycompotothécine (SN-38 puissant inhibiteur de la topo-isomérase1) (**Yoon et al., 2004**).





**Figure 7** : Différents substrats de la carboxylestérase (**Wheelock et al., 2008**).

#### I.7.4. Les inhibiteurs

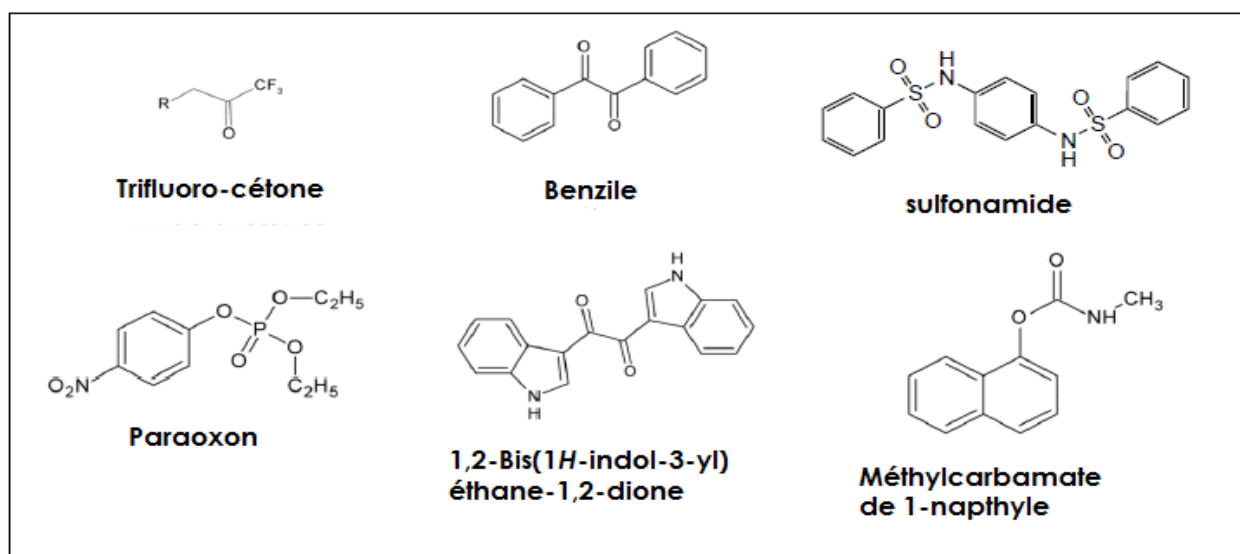
Comme beaucoup d'autres systèmes enzymatiques, l'activité de la carboxylestérase peut être modulée soit par activation ou inhibition. Cependant, l'inhibition a été largement étudiée contrairement à l'activation qui n'est pas bien comprise jusqu'à présent. Plusieurs produits chimiques, tel que la pinacolone, peuvent être à l'origine de l'augmentation de l'activité hydrolytique des carboxylestérases, cette activation a été observée *in vitro* et *in vivo* (**Anzenbacher et al., 2012**).

Pour ce qui concerne l'inhibition, d'une manière générale, on appelle un inhibiteur tout composé dont la fixation sur la molécule enzymatique entraîne son inactivation partielle (ou totale), ce qui se traduit par une diminution (ou une annulation) de la vitesse initiale (**Pelmont, 1993**).

Plusieurs inhibiteurs des carboxylestérases ont été rapportés dans la littérature (figure 8). Les principaux motifs structurels comprennent les cétones trifluorométhylées, les dérivés organophosphorés, les carbamates, les sulfonamides, l'éthane-1,2-diones, les benziles ainsi qu'un certain nombre de dérivés, y compris l'indole-2,3-dione et les fluorobenziles (**Harada et al., 2008**). Chacune de ces classes de composés a été utilisée pour étudier la biochimie et la fonction de la carboxylestérase (**Wheelock et al., 2005**).

Les inhibiteurs les plus efficaces des carboxylestérases sont les cétones trifluorométhylées : elles se lient de manière covalente à l'enzyme, et la liaison covalente est réversible si bien que l'enzyme peut être réactivée au bout de quelques jours à quelques semaines (**Wheelock et al., 2002**). Les formes oxons d'insecticides organophosphorés, comme le paraoxon (*O, O*-diéthyl *p*.nitrophénylphosphate) peuvent être des inhibiteurs très puissants de la carboxylestérase et peuvent conduire potentiellement au vieillissement de l'enzyme après phosphorylation. L'enzyme phosphorylée peut, soit libérer le substrat organophosphoré où il subit une hydrolyse similaire à un groupe acyle, mais avec un rythme beaucoup plus lent, soit il peut subir un vieillissement où l'enzyme est essentiellement catalytiquement inactive, c'est-à-dire, il agit en tant que substrat de suicide. Une réaction similaire peut se produire avec des carbamates, cependant, l'enzyme méthylcarbamoylée est moins stable que l'enzyme phosphorylée, ce qui explique la diminution de la toxicité de certains carbamates par rapport aux organophosphorés. Le caractère réversible de la liaison carbamate les rend utiles pour les études cinétiques (**Wheelock et al., 2005**).

La carboxylestérase est inhibée par les extraits des mimosoïdes, des crotonoïdes, des verbénacées (l'activité est inhibée à 56,20%) ainsi que par les genres *Camara* et *Singueana*. L'activité de la carboxylestérase est inhibée aussi par l'acide ascorbique (**Bangou et al., 2011**).



**Figure 8:** Inhibiteurs de la carboxylestérase (**Hatfield et Potter, 2011; Wheelock et al., 2008; Redinbo et Potter, 2005**).

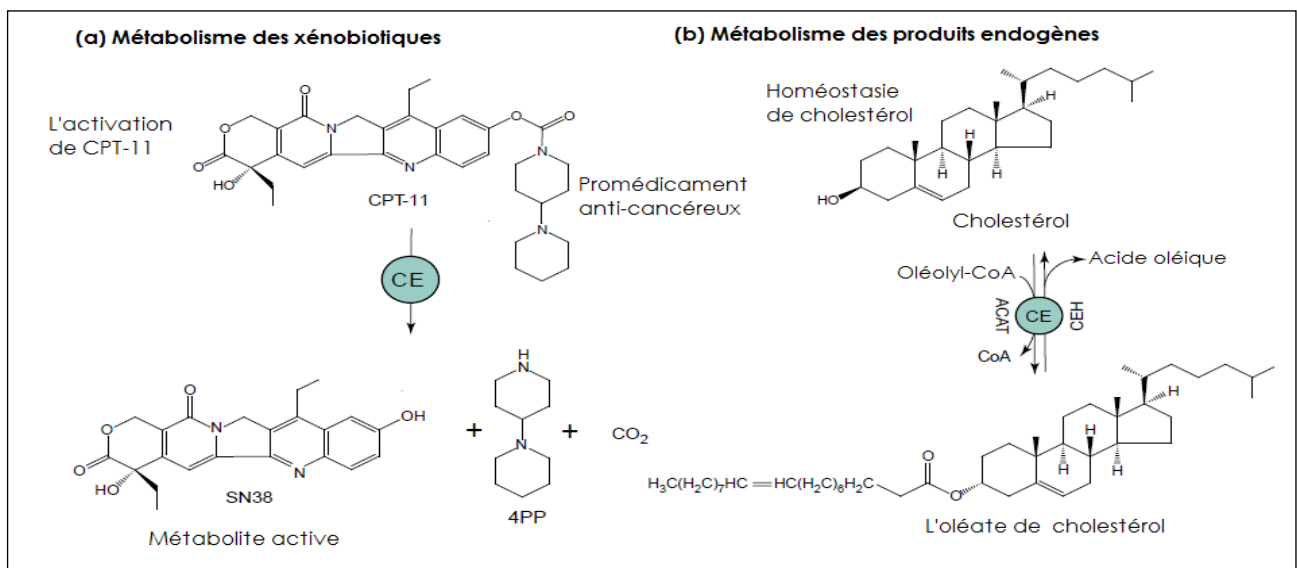
### 1.8. Rôles biologiques de la carboxylestérase

Les carboxylestérases sont une famille d'enzymes utile qui mérite d'être étudiée essentiellement pour les applications de surveillance de l'environnement, et ainsi pour accroître les connaissances sur le rôle biologique fondamental de ces enzymes (**Teruko, 2007**). En effet, les fonctions biologiques spécifiques n'ont pas été définies pour beaucoup de carboxylestérases à cause de leurs spécificités larges de substrat. Parmi les rôles biologiques connus de la carboxylestérase:

➤ La carboxylestérase est parmi les enzymes présentes principalement dans le foie et qui sont impliquées dans la biotransformation d'un grand nombre de produits exogènes et endogènes en produits polaires pour faciliter leur élimination. Cette biotransformation est classée en deux types de réactions (les réactions de phase I et les réactions de phase II). Les carboxylestérases appartiennent aux enzymes de la phase I, elles peuvent hydrolyser une variété de médicaments et des promédicaments contenant des esters, tels que les inhibiteurs d'enzymes de conversion de l'angiotensine (Témocapril, Cilazapril, Quinapril et Imidapril), des anticancéreux et des stupéfiants (la cocaïne, l'héroïne et la mépéridine) (**Hosokawa, 2008**).

- **Le métabolisme des xénobiotiques :** Selon **Streit et al. (2008)**, les carboxylestérases permettent l'hydrolyse de plusieurs substrats exogènes tels que les médicaments, les pesticides, les composés de l'environnement et les additifs alimentaires. Beaucoup de médicaments cliniquement utiles, contenant des groupements esters sont soumis à la catalyse par les carboxylestérases. Ces composés comprennent les médicaments anti-cancéreux (CPT-11 et la capécitabine), le flumazénil, la procaine, l'aspirine, les salicylates, la dipivéfrine, la palmitoyl-coenzyme A, l'halopéridol, l'imidapril, les alcaloïdes de pyrrolizidine et les stéroïdes et une variété d'autres agents (**Liu, 2008; Redinbo et Potter, 2005**).
- **L'activation des pro-drogues** l'irinotécan (CPT-11) et la capécitabine nécessitent une hydrolyse enzymatique pour produire des métabolites actifs. L'agent anti-cancéreux CPT-11 est une pro-drogue activée en un métabolite actif par la carboxylestérase préférentiellement dans le tissu tumoral, le SN-38 inhibant la topoisomérase I (figure 9). L'inhibition de cette enzyme entraîne un blocage de la réplication de l'ADN, ce qui conduit finalement à la mort des cellules (**Humerickhouse et al., 2000**).
- **Le métabolisme des endobiotiques :** Les carboxylestérases permettent l'hydrolyse de plusieurs substrats endogènes tels que: les esters de cholestérol, les acides gras, les triacylglycérols et l'acyl-carnitine (**Streit et al., 2008**).
- **Génération d'esters éthyliques d'acides gras :** Les carboxylestérases peuvent être impliquées dans le métabolisme non oxydatif de l'éthanol suite à une consommation excessive d'alcool. Ces enzymes catalysent une transestérification des acides gras libres par l'éthanol, ce qui conduit à la formation des produits potentiellement toxiques connus sous le nom d'esters éthyliques d'acides gras. Ces composés s'accumulent dans les mitochondries des cellules où ils peuvent entraîner le découplage de la phosphorylation oxydative, ce qui provoque une inefficacité de la production d'énergie (**Beckemeier et Bora, 1998**).

- **L'homéostasie du cholestérol** : Bien que le cholestérol soit essentiel à l'intégrité structurale des membranes plasmiques, il peut être toxique s'il est présent en excès. Ainsi, le transport systémique du cholestérol est crucial au métabolisme et à l'élimination de ce composé. De ce fait, des acides gras sont ajoutés en position 3 du cholestérol pour donner les esters de cholestérol par l'action de la carboxylestérase qui a une activité similaire à celle de l'acyl-CoA cholestérol-O-acyl transférase (ACAT). Cette dernière catalyse la réaction de transestérification (figure 9). Les carboxylestérases permettent aussi l'hydrolyse des esters de cholestérol présents en excès dans la cellule en acides gras libres et du cholestérol (**Redinbo et Potter, 2005**).
- La carboxylestérase est utilisée dans le traitement d'overdose de la cocaïne (**Wang et al., 2009**).
- La carboxylestérase humaine (hCE1) est présente dans les traitements anti-Alzheimer (**Bencharitt et al., 2003**).
- La carboxylestérase peut jouer différents rôles physiologiques en fonction de sa localisation dans le système reproducteur masculin par la création des conditions normales de la production des spermatozoïdes, la libération du sperme et la protection contre divers xénobiotiques (**Redinbo et al., 2003**).



**Figure 9** : Rôles biologiques de la carboxylestérase (**Redinbo et Potter, 2005**).

## II. Les colorants alimentaires

### II.1. Généralités

La plupart des aliments produits industriellement, étant donné les transformations qu'ils subissent, deviennent insipides, d'un aspect peu engageant, d'une valeur nutritive réduite, et d'une conservation limitée. Les industriels recourent aux additifs alimentaires afin de rendre commercialisables ces produits. Les additifs alimentaires sont généralement utilisés dans des produits alimentaires traités pour améliorer l'aspect, la saveur, le goût, la couleur, la valeur nutritive, et la conservation puisque l'aspect visuel est un facteur important pour la sélection du produit par les consommateurs **(Benaissa, 2011)**.

Près de 60% des additifs alimentaires consistent en colorants, agents d'aromatisation et autres, augmentant l'attrait des denrées pour le consommateur. La croissance de la population mondiale et l'accroissement de la demande des aliments représentent le plus grand défi technologique de notre époque. Par conséquent, l'utilisation des substances qui préservent la qualité et diminuent les pertes des aliments est d'importance capitale. Toutefois, le consommateur craint que l'effet cumulatif des additifs puisse mener aux cancers, hyperkinésie ou autres maladies. Étant donné l'utilisation étendue des additifs, leur impact sur la santé des populations est difficile à étudier même si certaines différences observées entre les pays sont attribuées à leur apport alimentaire **(Vobecky, 1982)**. Au milieu du siècle dernier, tous les colorants ajoutés aux aliments étaient d'origine naturelle, comme par exemple : safran, oseille, rouge de betteraves, cochenille, caramel, curcuma et autres. L'emploi de ces dérivés a reculé avec le développement des colorants synthétiques qui sont plus stables et moins chers **(Gallen et Pla, 2013)**. Les colorants alimentaires synthétiques constituent une classe d'additifs essentielle pour l'industrie alimentaire dans la conquête du marché **(Clydesdale, 1993)**.

Les colorants sont ajoutés pour donner une couleur à une denrée alimentaire ou à lui redonner sa couleur naturelle, mais leur usage est réglementé par une législation stricte et rigoureuse. En effet, le premier sens du consommateur sollicité lors de choix d'un aliment est la vue, ce qui explique que la couleur est une caractéristique importante dans le choix des aliments (**Amin et al., 2010**).

## **II.2. Définition**

Depuis le début de l'humanité, les colorants ont été appliqués dans pratiquement toutes les sphères de notre vie quotidienne pour la peinture et la teinture du papier, de la peau, des textiles et des aliments etc. Jusqu'à la moitié du 19ème siècle, les colorants appliqués étaient d'origine naturelle. Ces colorants sont tous des composés aromatiques qui proviennent essentiellement des plantes, tel que l'alizarine et l'indigo (**Zhenwang et al., 2000**).

Les colorants sont définis comme étant des composés chimiques colorés, naturels ou synthétiques, en général organiques, qui ont la propriété de colorer durablement le support sur lequel ils sont appliqués dans certaines conditions. Tout colorant est généralement considéré comme composé organique insaturé et aromatique, en présence de groupes chimiques appelés chromophores qui produit la couleur intrinsèque. Donc une molécule type de colorant est généralement constituée de trois parties : un chromophore, un groupe auxochrome et un groupe solubilisant. Le chromophore est la portion responsable de la couleur du composé. L'auxochrome est la partie influençant l'intensité de la coloration et il fixe avec efficacité le colorant sur le support, et enfin le groupe solubilisant améliore la solubilité du colorant et ainsi, il peut être potentiellement appliqué en milieu aqueux. Le tableau 2 présente quelques groupes chromophores et auxotrophes identifiés.

**Tableau 2:** Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité croissante (Servais, 1999).

<i>Groupes chromophores</i>	<i>Groupes auxochromes</i>
Azo (-N=N-)	Amino (-NH <sub>2</sub> )
Nitroso (-NO ou -N-OH)	Méthylamino (-NHCH <sub>3</sub> )
Carbonyl (=C=O)	Diméthylamino (-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )
Vinyl (-C=C-)	Hydroxyl (-HO)
Nitro (-NO <sub>2</sub> ou =NO-OH)	Alkoxy (-OR)
Sulfure (>C=S)	Groupes donneurs d'électrons

Les principaux modes de classification des colorants reposent, soit sur leurs méthodes d'application aux différents substrats, soit sur leur constitution chimique. Leur noyau aromatique leur confère une grande stabilité à la chaleur et aux variations du pH. On dénombre environ 8000 colorants synthétiques chimiquement différents, répertoriés sous 40000 dénominations commerciales. Ils sont soumis à une législation précise qui régit leur utilisation en agro-alimentaire (**Multon, 2002**).

Les colorants alimentaires sont testés par différents organismes à travers le monde qui donnent parfois des avis différents sur leur innocuité. Aux États-Unis, l'acronyme «FD&C», indique que l'additif est approuvé comme colorant alimentaire, pour les médicaments et les cosmétiques, tandis que l'Union européenne utilise le préfixe E (**Journal officiel n° 197/EU, 1994**) suivi du numéro international. Le chiffre 1 pour les centaines (E1xx) indique que l'additif est un colorant. Les dizaines et unités indiquent la teinte.

La recherche effectuée dans le cadre de ce travail cible essentiellement les colorants de nature azoïques, qui représentent environ 50 % de la production mondiale de matières colorantes et qui forment une gamme étendue de nuances tinctoriales (jaune, bleu, vert et noir). Il s'agit de composés contenant le groupement d'atomes azo (-N=N-). De formule générale (R-N=N-R'). Ils ont pour prototype l'azobenzène (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-N=N-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). Le groupe « azo » a été découvert en 1860 par le chimiste anglais Johann Griess. Il présente la capacité de la répétitivité au sein de la molécule pour former les disazoïques, les trisazoïques, ...etc.



Les colorants azoïques peuvent subir, dans l'organisme, des biodégradations avec l'apparition des amines aromatiques et/ou leurs dérivés, dont on a toujours redouté les effets cancérogènes (**Vobecky, 1982**).

Parmi les colorants alimentaires les plus utilisés, la tartrazine (**E102**) remplace le plus souvent le safran dans les préparations culinaires de nombreux pays, ainsi que le colorant vert utilisé dans beaucoup de produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

### **II.3. La tartrazine**

La tartrazine est un colorant alimentaire synthétique de nature azoïque très largement employé dans le secteur agroalimentaire (boissons aromatisées sans alcool, chips, soupes instantanées, moutardes, sucreries (bonbons, pastillages,...), glaces et crèmes glacées) et dans la fabrication des produits cosmétiques et pharmaceutiques (La vitamine C et l'aspirine) (**Gallen et Pla, 2013**). A titre d'exemple, la tartrazine (**E102**) est utilisée avec le bleu patenté V synthétique (**E131**) pour donner la couleur verte aux sirops de menthe. Ce colorant est employé aussi dans les préparations de l'alcool modifié médical pour le rendre impropre à la consommation.

La tartrazine est autorisée par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA) et par le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH), mais de nombreux pays interdisent ce colorant comme la Suisse et les Etats Unis. La dose journalière admissible (DJA) pour l'être humain est de 7,5 mg/Kg du poids corporel (**Tanaka et al., 2008**). Cependant, ses effets nocifs sur la santé restent encore peu connus, ce qui laisse ouvert un champ d'investigation.

La tartrazine est incriminée dans des réactions comme l'urticaire, l'eczéma, l'hyperactivité infantile et la génotoxicité (**Zhenwang et al., 2000**), ainsi que dans le développement des réactions croisées de type anaphylactique (asthme et rhinites chroniques) chez des sujets présentant une intolérance à l'aspirine et aux anti-inflammatoires non stéroïdiens. Des recherches récentes ont montré que des réactions dues à l'ingestion de la tartrazine ont été rapportées chez des individus sensibles, chez qui elle a provoqué de l'asthme ainsi que d'autres symptômes

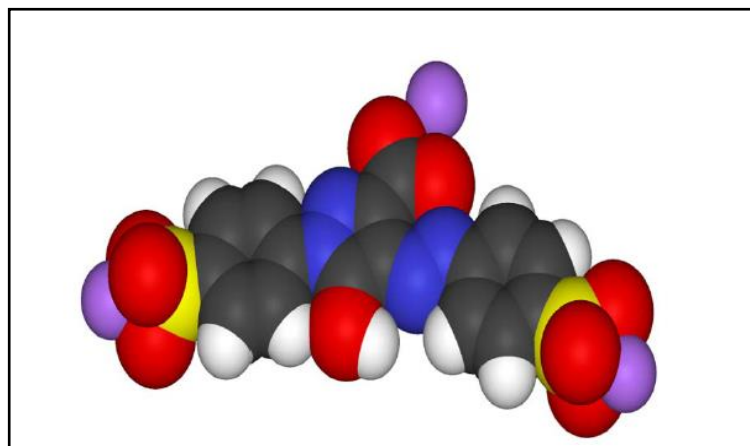
comprenant des éruptions cutanées, une congestion nasale et de l'urticaire (**Moutinho et al., 2007; Inomata et al., 2006**). Il a été prouvé aussi que la tartrazine aboutissait également à des actions mutagéniques et génotoxiques portant sur l'ADN cellulaire (**Sasaki et al., 2002**).



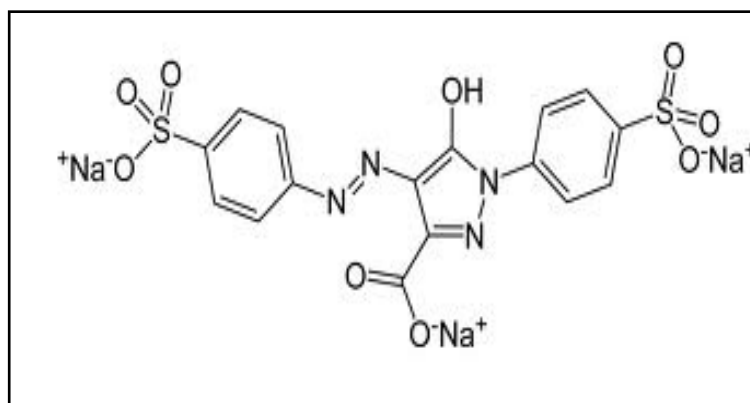
**Figure 10** : La tartrazine commerciale utilisée dans cette recherche.

### II.3.1. Propriétés physico-chimiques

La tartrazine est un colorant azoïque, d'origine synthétique et dérivé du goudron. Il s'agit d'un sel trisodique de l'acide (sulfo-4-phénylazo-1)-4-(sulfo-4-phényl)-1-hydroxy-5 pyrazolecarboxylique-3, également connu sous différentes appellations comme **FD&C N°5** aux Etats Unis ou **E102** en Europe. Sa formule moléculaire chimique est  $C_{16}H_9Na_3O_9S_2$  (figures 11 et 12), et sa masse molaire est de 534,36 g/mol. Ce colorant alimentaire appartient à la classe des colorants mono azoïques; il est de couleur jaune orange, fond à 350 °C (**Amin et al., 2010**). Il est très soluble dans l'eau et peu soluble dans l'éthanol, son pH est acide (**Chaveron, 1999**). La pureté est spécifiée par sa composition, en fixant une teneur à pas moins de 85 % de matières colorantes totales. Les 15 % restantes peuvent être pris en compte par le chlorure de sodium ou le sulfate de sodium, cependant, la matière insoluble dans l'eau ne dépasse pas les 0,2 %.



**Figure 11** : Structure chimique en trois dimensions de la tartrazine (Kapor et al., 2001).



**Figure 12** : Structure moléculaire en deux dimensions de la tartrazine (Agité et de Saint Blanquat, 2002).

### II.3.2. Métabolisme de la tartrazine

La tartrazine subit l'action du suc digestif et de la flore intestinale dans le tractus gastro-intestinal. La flore bactérienne possède une activité azo-réductase responsable de la transformation de la liaison azo (-N=N-). Cette transformation débouche sur un clivage réducteur de la liaison azoïque faisant apparaître des amines cycliques qui peuvent alors avoir des cinétiques d'absorption différentes et à différents niveaux (Christie et al., 2003). Les produits issus de cette transformation sont l'acide sulfonique et l'aminopyrazolne (OuldElhkim et al., 2007; Watabe et al., 1980). La vitesse de dégradation est assez rapide, puisque 41% de tartrazine seront dégradés en 4 heures dans la lumière digestive.

Quelques travaux expérimentaux ont confirmé que les molécules de colorants ne sont en général que très peu absorbées, mais il n'en est pas de même pour les métabolites produits au cours de l'azo-réduction microbienne. Ainsi, 95% de la dose orale de tartrazine seraient absorbés par cette voie chez le rat et l'on retrouve dans l'urine de 48 heures, 1% de tartrazine, 22% d'acide p-acétomidobenzène sulfonique et 75% d'acide sulfanilique (**Combes et Haveland-Smith, 1982**).

La réduction de la tartrazine peut avoir lieu également au niveau hépatique, par voie enzymatique. La molécule du colorant alimentaire azoïque est absorbée par la muqueuse intestinale, elle est ensuite transportée par voie sanguine et atteindra très rapidement le foie. Là, elle peut subir des dégradations qui auront lieu essentiellement au niveau des microsomes par le biais des enzymes; ces réactions seront surtout des réductions (**Lepoittevin, 2005**).

### II.3.3. Toxicité et effets indésirables de la tartrazine

La tartrazine est parmi les colorants les plus toxiques : elle est interdite aux Etats Unis et son usage est très réglementé en France. En ce qui concerne les études toxicologiques de ce colorant chez les mammifères, **Davis et al. (1964)** ainsi que **Maekawa et al. (1987)** ont rapporté lors d'une étude toxicologique chronique durant 2 ans chez les rats, que la tartrazine contenue dans l'alimentation (0,5% à 5%) et dans l'eau potable (1% à 2%) n'a pas montré d'effets cancérigènes. Cependant, **Amin et al. (2010)** ont constaté que la tartrazine a un effet défavorable et permet de changer certaines variables biochimiques (par exemple : la peroxydase de glutathion (GSH-Px), la dismutase de superoxyde (SOD) et la catalase dans certains organes vitaux comme le foie et les reins non seulement à des doses élevées mais aussi à faibles doses.

La tartrazine administrée dans le régime alimentaire du rat a aussi été à l'origine de l'inflammation de la muqueuse de l'estomac (augmentation du nombre de lymphocytes et des éosinophiles) pour une période de temps prolongé.

Chez l'homme, une variété de réponses pathologiques ont été attribuées à l'ingestion de la tartrazine y compris l'anxiété, une dépression clinique, des migraines, une vision floue, des démangeaisons, une faiblesse générale, sensation d'étouffement, des plaques violettes sur la peau et des troubles du sommeil (**Gao et al., 2011**). La tartrazine peut aussi être à l'origine des crises d'asthme, de rhinites, d'urticaires, d'eczéma atopique et des chocs anaphylactiques (**Gallen et Pla, 2013**).

Dans les études de **Sasaki et al. (2002)**, des colorants alimentaires azoïques dont la tartrazine, l'amarante, le rouge d'Allura et le nouveau coccine induisent des dommages de la molécule de l'ADN dans le foie et le rein à des doses égales à 500 mg/kg. De ce fait, ces colorants sont reconnus pour être des composés génotoxiques qui figurent parmi les colorants azoïques les plus dangereux pour l'homme.

Les mécanismes pathogéniques de la réaction de la tartrazine sur le système immunitaire restent mal connus (**Moneret-Vautrin et Andre, 1983**). Par ailleurs, des explications le plus souvent proposées suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une action inhibitrice de la tartrazine sur l'enzyme cyclo-oxygénase (Enzyme qui permet la formation des prostaglandines, molécules liposolubles de signalisation, qui activent de nombreux récepteurs membranaires. Les prostaglandines sont des médiateurs chimiques qui possèdent divers effets physiologiques) et, dans ce cas, il ne s'agit pas de réactions allergiques faisant intervenir la production des immunoglobulines IgE, mais plutôt des réactions d'intolérance à la tartrazine, comme cela a été signalé chez 16 à 25% des sujets porteurs d'intolérance à l'aspirine (**Weber et al., 1979**). Dans certains nombres de cas, il semble qu'il y ait une dégranulation des mastocytes et libération de médiateurs chimiques tels que l'histamine. Toutefois, de telles réactions peuvent être développées indépendamment des facteurs immunologiques, c'est-à-dire sans liaison d'antigène à des anticorps spécifiques IgE sur la paroi mastocytaire. En effet, aucune étude n'a pu affirmer à l'heure actuelle l'existence d'une immunoglobuline IgE anti-tartrazine spécifique (**Miller, 1982**).

Parmi les produits de biotransformations de la tartrazine, la benzidine a été l'une des premières substances cancérigènes classées par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Les effets cancérigènes des composés azoïques s'expriment indirectement par leurs dérivés amines. La liaison azo est la portion la plus labile de ces molécules et peut facilement se rompre sous l'action enzymatique des organismes mammifères incluant l'homme, pour se transformer en amines aromatiques mutagéniques et cancérigènes. Cependant, la tartrazine n'a jamais fait l'objet d'observations cancérigènes *in vivo*, mais il faut souligner que la cancérisation dépend aussi de multiples facteurs apparemment non liés, comme l'état nutritionnel.

En association avec les benzoates, la tartrazine serait impliquée dans un grand pourcentage des cas du syndrome d' TDAH (hyperactivité) chez les enfants (**McCann et al., 2007**). Bien qu'une étude n'a montré aucun lien entre le trouble déficitaire de l'attention/hyperactivité et les colorants alimentaires (**Wilens et al., 2002**), une nouvelle étude suggère que six colorants notamment la tartrazine E102, le jaune de quinoléine E104, le jaune orangé E110, l'azorubine E122, le rouge cochenille A E124 et le rouge allura E129 pourraient, lorsqu'ils sont associés à des conservateurs du type benzoates (E210 acide benzoïque, E211 benzoate de sodium,...) modifier les paramètres d'attention des enfants diagnostiqués TDAH.

Entre 1990 et 1998, douze médicaments ont été retirés de la vente : parmi ces produits on trouve la vitamine C Vitascorbol, désormais commercialisée avec une nouvelle formule sans tartrazine. En effet, plusieurs publications établissent un lien entre la prise d'antidépresseurs et d'analgésiques contenant de la tartrazine et des manifestations allergiques ou intolérance chez des patients (**Bhatia, 2000; Volonakis et al., 1992; Rosenhall, 1982**). La tartrazine cause souvent des réactions indésirables aux personnes allergiques aux anti-inflammatoires telles que l'aspirine (**Corder et al., 1995**).

La toxicité des azoïques par exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau. Dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition

prolongée aux colorants azoïques. Depuis, les travaux effectués sur ces colorants ont démontré que ces composés chimiques présentaient des effets cancérigènes pour l'homme et l'animal. Des examens complets de la génotoxicité de la tartrazine ont été mis en évidence pour évaluer le risque de sa consommation.

Dans la plupart des tests à court terme, on n'a pas montré d'effet cancérigène ni génotoxique. Par contre d'autres études de toxicologie génétique ont révélé que la tartrazine possède un effet mutagène. La tartrazine peut inciter des aberrations chromosomiques chez les hamsters chinois (**Ishidate et al., 1981; Ishidate et al., 1984**), dans les cellules somatiques des rats (**Giri et al., 1990**) mais pas dans les cellules des souris. Une augmentation significative est remarquée des échanges de chromatides sœurs et des aberrations chromosomiques chez les souris et des cellules de la moelle osseuse des rats, après l'exposition aiguë et chronique aux fortes doses de la tartrazine (**Giri et al., 1990**). Par ailleurs, elle n'est ni génotoxique ni mutagène aux doses de 50-200 mg/kg sur des souches bactériennes du genre *Salmonella* (**Das et Mukherjee, 2004**).

Les effets mutagéniques des colorants alimentaires ont été recherchés sur *Escherichia Coli* et aucun effet mutagène n'a été noté, pour les produits autorisés, et cela sur une gamme de doses. Les études conduites par **OuldElhkim et al. (2007)** ont conclu qu'un grand nombre d'études de toxicologie génétique ont montré que la tartrazine n'a aucun potentiel mutagène *in vivo* et *in vitro*.

L'ingestion subchronique de la tartrazine à une dose de 1% modifie la réponse immunitaire humorale chez les souris mâles et les organes lymphoïdes cellulaires, ce qui affecte la fonction du système immunitaire (**Mehedi et al., 2013**). Aucun changement carcinogénétique dans une zone gastrique n'a été observé suite à l'ingestion de la tartrazine (**Moutinho et al., 2007**).

Selon **Mehedi et al. (2009)**, la consommation excessive de la tartrazine peut avoir des effets néfastes sur la reproduction masculine.

En raison des effets mentionnés ci-dessus, il est clair que les colorants, essentiellement les azoïques, ne devraient pas envahir notre alimentation.

## II.4. Le colorant vert

L'étiquetage du colorant vert, indiqué dans la figure ci-dessous, montre que ce colorant est constitué de deux colorants, le rouge ponceau (E124) et le dioxyde de titane (E171), ainsi que du dextrose (D-glucose).



**Figure 13** : Le colorant vert commercial utilisé dans cette recherche.

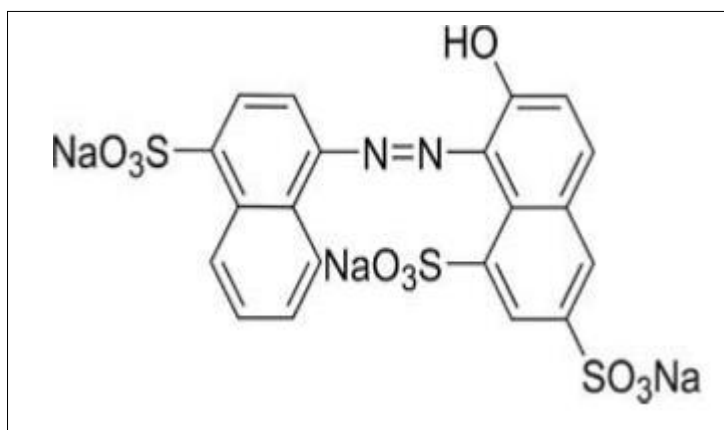
### II.4.1. Le rouge ponceau

#### II.4.1.1. Propriétés physico-chimiques

Le rouge ponceau est un colorant synthétique pétrochimique de couleur rouge brillant, soluble dans l'eau, largement utilisé dans les produits alimentaires (bonbons, gâteaux, biscuits, glaces, sirops, boissons), les médicaments, les cosmétiques et le tabac. Il est connu sous différentes appellations, le rouge cochenille A, E124, CI 16255 (pour les produits cosmétiques), Brilliant Scarlet 4R, C.I. *acid red 18*, *Food red 7*.



Le rouge ponceau est un colorant alimentaire azoïque de synthèse, sa formule chimique est  $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ , il est constitué essentiellement par le sel trisodique de l'acide 2-hydroxy-1-(4-sulfonato-1-naphthylazo) naphthalène-6,8-disulfonique et par des colorants accessoires; on y trouve aussi du chlorure de sodium et/ou du sulfate de sodium comme principaux constituants non colorés (**Wang et al., 2014**). Sa structure moléculaire est représentée dans la figure ci-dessous :



**Figure 14** : Structure moléculaire du rouge ponceau (**Wang et al., 2014**).

#### II.4.1.2. Toxicité du rouge ponceau

La dose journalière admissible (DJA) pour l'homme est de 4 mg/kg du poids corporel (**Li et lei, 2012**). Le rouge ponceau est interdit depuis longtemps dans plusieurs pays, les États-Unis notamment. Dans l'Union Européenne, seul le concept théorique de la dose journalière admissible est revu de 4 à 0,7 mg et depuis 2009 l'additif est étiqueté avec mention « Peut avoir des effets indésirables sur l'activité et l'attention chez les enfants » (ainsi que E102).

Dans les études toxicologiques du rouge ponceau, **Gaunt et al. (1967)** ont rapporté que la  $DL_{50}$  par voie intrapéritonéale chez les rats (mâles et femelles) était de 0,6 g/kg et 2,6 g/kg respectivement, et les valeurs correspondantes chez les souris étaient de 1,9 g/kg et 1,6 g/kg. La  $DL_{50}$  orale a dépassé 8 g/kg chez les deux espèces.

En ce qui concerne les études de toxicité sur la reproduction et le développement, **Meyer et Hancen (1975)** ont constaté que le rouge ponceau n'induit aucun effet embryotoxique chez le rat par gavage (1000-4000 mg/kg par jour). **Momma et al. (1981)** ont rapporté que la présence de ce colorant dans le régime alimentaire (0,05 à 0,7%) au cours de la grossesse chez les souris n'a produit aucun effet tératogène ou un effet sur le développement post-natal.

Les aberrations chromosomiques induites par ce colorant ont été étudiées sur les cellules de la moelle osseuse de souris *in vivo*. Les résultats ont indiqué que le rouge ponceau était clastogène même à faible dose (**Agarwal et al., 1997**).

En 2002, dans une étude publiée dans la revue « toxicological sciences » des chercheurs japonais ont voulu vérifier si le rouge ponceau pouvait être génotoxique, c'est-à-dire susceptible d'endommager le code génétique et conduire au cancer, ils ont administré ce colorant dans le régime alimentaire des souris. Les résultats ont montré que dès la dose de 10 mg/kg, cette substance induisait des dommages sur l'ADN (**Tsuda et al., 2001**).

Les colorants pétrochimiques dont le ponceau 4R fait partie, sont liés à de l'hyperactivité chez l'enfant et l'effet peut être exacerbé avec des conservateurs comme les benzoates.

## II.4.2. Le dioxyde de titane

### II.4.2.1. Propriétés physico-chimiques

Le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) est employé comme additif alimentaire sous la référence E171, utilisé pour donner une couleur blanche à certains aliments, en particulier les confiseries, les sauces blanches ainsi que certains produits alimentaires en poudre (**Chen et al., 2014**). Sa masse molaire est de 79,86 g/mol. Il est hautement stable à la chaleur, à la lumière, à l'oxygène et au pH. De même, il est insoluble dans l'eau, les acides et tous les solvants organiques (**Lomer et al., 2000**).

#### II.4.2.2. Toxicité du dioxyde de titane

Bien qu'il soit abondamment utilisé dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques, l'innocuité du dioxyde de titane est de plus en plus controversée. En effet, le dioxyde de titane est en général mal absorbé chez les mammifères sans pour autant avoir un effet toxicologique ou indésirable sur la santé. Cependant, sa nature chimiquement inerte et son insolubilité dans l'eau ne garantissent pas qu'il soit inoffensif ou biologiquement inactif.

Le dioxyde de titane peut être bien absorbé par le tractus gastro-intestinal et plusieurs études montrent que la présence de ce colorant dans le tissu intestinal humain peut provoquer une réponse anormale qui peut être impliquée dans la pathogénèse de la maladie de Crohn (**Lomer et al., 2000**).

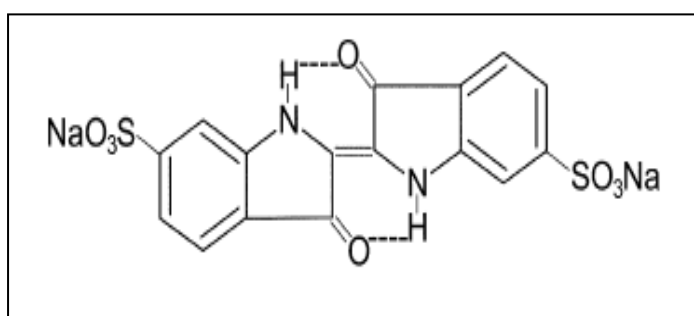
De nombreuses autres études ont montré que le dioxyde de titane entraîne des effets génotoxiques, y compris les dommages d'ADN et des aberrations chromosomiques structurelles dans différentes lignées cellulaires (**Skocaj et al., 2011**). Il est classé comme *peut-être cancérigène pour l'homme* (groupe 2B) au Centre International de Recherches sur le Cancer (CIRC).

**Remarque** : Le colorant vert utilisé dans notre étude ne peut pas être obtenu à partir des deux colorants : le rouge ponceau (E124) et le dioxyde de titane (E171), puisque en matière de couleur le mélange du rouge et du blanc ne donne pas du vert, et donc le colorant vert ne peut être que le résultat de la combinaison du jaune (tartrazine E102) et du bleu (l'indigotine E132). Le résultat obtenu lors de l'étude du spectre d'absorption du colorant vert confirme cette remarque. C'est pour cette raison nous avons développé dans cette partie des rappels théoriques, les propriétés physicochimiques et la toxicité de l'indigotine.

### II.4.3. L'indigotine

#### II.4.3.1. Structure et nomenclature

Le carmin d'indigo appelé aussi l'indigotine et connu sous les références suivantes **FD&C bleu n°2**, **C.I.N°73015** ou le **E132**, est le sel disodique de l'acide 1-indigotine-5,5'-disulfonique, de formule chimique  $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$  (figure 15). Il s'agit d'un colorant artificiel pétrochimique bleu, une imitation approchée du colorant naturel extrait de l'indigotier. De nos jours, la production d'origine naturelle est minoritaire. Il est utilisé comme colorant dans les produits alimentaires, les comprimés et les capsules pharmaceutiques et aussi utilisé à des fins de diagnostic médical (**Hooson et al., 1975**). Il est exclu de la filière d'alimentation biologique dans l'Union Européenne comme aux Etats-Unis; la dose journalière admissible (DJA) pour l'homme est de 5 mg/kg du poids corporel.



**Figure 15** : Structure moléculaire d'indigotine (**Mittal et al., 2006**).

#### II.4.3.2. Toxicité de l'indigotine

L'indigotine est considérée comme une classe indigoïde hautement toxique, son contact avec l'être humain peut lui provoquer des irritations de la peau et des yeux. Il peut aussi causer des lésions permanentes à la cornée et la conjonctive. La consommation des produits alimentaires contenant ce colorant peut se révéler fatale, car il est cancérigène et peut mener à une toxicité reproductrice et développementale. Il a été aussi établi que ce colorant conduit à des tumeurs au niveau du site d'application, comme il peut causer une irritation gastro-intestinale accompagnée de nausées, de vomissement et de diarrhée (**Mittal et al., 2006**).

*Chapitre 2.*  
*Matériel et Méthodes*

## **I. Préparation de la solution enzymatique de la carboxylestérase commerciale du foie de porc**

Afin de déterminer l'activité enzymatique de la carboxylestérase, une solution d'enzyme est préparée pour chaque expérience afin d'éviter des pertes d'activité lors du stockage.

✓ On dissout 0,0029g de carboxylestérase lyophilisée dans 1ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M- pH 8,00.

## **II. Dosage des protéines de la solution enzymatique par la méthode du biuret**

La détermination de l'activité spécifique d'une préparation enzymatique implique d'y doser les protéines (**Loncle, 1992**).

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines. Le choix d'une méthode dépend des besoins et des caractéristiques recherchés: fiabilité, sensibilité, rapidité, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage et la présence de substances interférentes dans l'échantillon. La méthode du biuret est parmi les méthodes de dosage des protéines les plus couramment utilisées (**Gavrilovic et al., 1996**).

### **II.1. Principe**

Développée par **Gornall et al.** en **1949**, la méthode du biuret reste de loin la réaction la plus générale caractéristique de la liaison peptidique. En milieu alcalin, le biuret ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ ) se combine avec le cuivre pour donner une coloration violette. Cette coloration révèle en effet la présence de deux radicaux  $\text{-CO-NH-}$  ou  $\text{-CH-NH-}$  séparés par un atome d'azote ou de carbone. Une chaîne polypeptidique ( $\text{-NH-CHR-CO-NH-CHR'-CO-NH-CHR''-CO-}$ )<sub>n</sub> offre de très nombreux groupements de ces deux radicaux.

En milieu alcalin, on obtient une énolisation de la fonction peptidique qui se lie au cuivre par une liaison covalente. De plus, les atomes d'azote de la chaîne peptidique donnent des liaisons de coordination avec le cuivre. Le complexe résultant présente un maximum d'absorption à 540 nm et l'intensité de la coloration obtenue dépend du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéine à analyser (**Perrier et al., 1997**). Elle est pratiquement indépendante du poids moléculaire des protéines (**Métais et al., 1977**).

La réaction du biuret est assez peu sensible et s'applique difficilement à des solutions diluées de protéine. La zone optimale de concentration se situe entre 2 et 6 g/l. Toutefois c'est l'une des méthodes les plus fiables, pratiques et rapides utilisées pour le dosage des protéines totales d'un milieu biologique (**Gavrilovie et al., 1996**). L'avantage de la méthode réside dans la non influence de la nature des protéines mais l'inconvénient majeur en est la faible sensibilité (**Loncle, 1992**).

## II.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

- ✓ On prépare une solution mère (10 g/l) d'albumine du sérum bovin (BSA) qui présente la protéine étalon.
- ✓ Dans une série de 18 tubes à essais (3 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes :

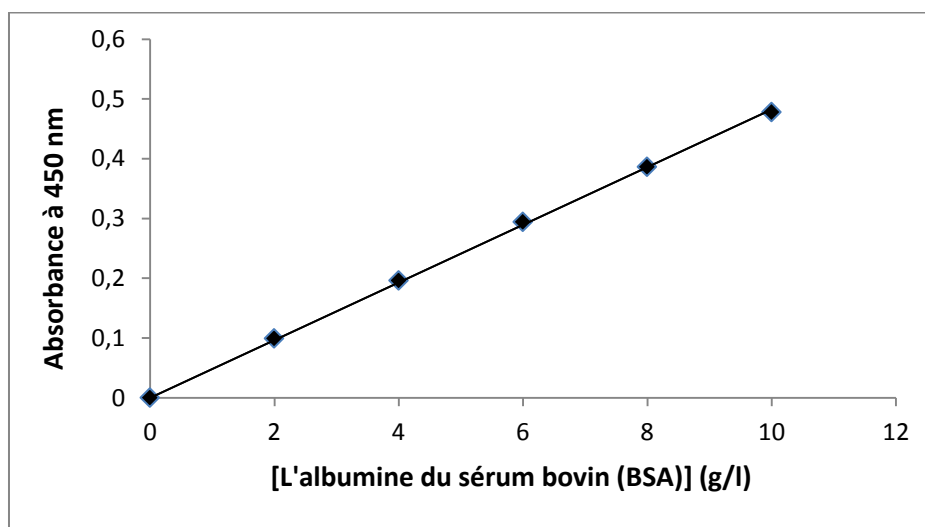
**Tableau 3** : Dilutions de la solution mère de l'albumine du sérum bovin (BSA).

Numéro de tubes	1	2	3	4	5	6
Volume de la solution mère de la BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Volume de la solution tampon (borax-HCl) (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Concentration finale en protéine (g/l)	0	2	4	6	8	10

✓ On ajoute à chaque tube à essais 4 ml du réactif de biuret, ensuite, on les incube pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière (La composition du réactif du biuret est indiquée dans la partie « annexes »).

✓ La densité optique est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc.

La figure 16 représente la droite d'étalonnage typiquement obtenue.



**Figure 16** : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret. (Absorbance = 0,048 x [protéines];  $r^2 = 0,999$ ).

### II.3. Calcul de la concentration en protéine de la solution enzymatique de la carboxylestérase

✓ Dissoudre 0,05g de carboxylestérase hépatique porcine lyophilisée dans 10ml de la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).

✓ Dans une série de 6 grands tubes à essais, on effectue les dilutions suivantes à partir de la solution mère enzymatique (chaque expérience est répétée trois fois).

**Tableau 4** : Dilutions de la solution mère enzymatique.

Numéro de tube	1	2	3	4	5	6
Volume de la solution enzymatique (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Volume de la solution tampon (borax-HCl) (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0



- ✓ On ajoute à chaque tube 4ml du réactif de biuret et on les laisse incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- ✓ On mesure la densité optique à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc.
  
- La concentration en protéines de la préparation enzymatique est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue et la formule qui permet le calcul de la concentration en protéines est la suivante :

$$[\text{Protéine}] \text{ (g/l)} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Pente de la droite d'étalonnage (unité d'absorbance.l.g}^{-1}\text{)}}$$

- La concentration en protéines de la préparation de l'estérase du foie du porc est calculée en prenant la moyenne des cinq concentrations déterminées expérimentalement.

### III. Détermination de l'activité enzymatique

Pour déterminer l'activité de la carboxylestérase, on procède de la manière suivante (**Adler et Kistiakowsky, 1962**) :

- ✓ On prépare dans un bécher 25ml de la solution de substrat (0,2ml de butyrate d'éthyle concentré dans 100ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M; pH 8,00) et on met le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C puis on ajoute 0,05 ml de butyrate d'éthyle concentré.
- ✓ On ajuste le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH 0,1M puis on ajoute 0,1 ml de la solution enzymatique (*cf.* Paragraphe « I » de la partie « matériel et méthodes »).
- ✓ On déclenche le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00 et on laisse la réaction pendant 1 min puis on place le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ On maintient le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 par l'addition de faibles volumes d'environ 0,05ml de NaOH (10mM).
- ✓ On note le volume de NaOH utilisé pour atteindre le pH 8,00 et le temps nécessaire à la consommation du réactif NaOH (10mM).
- ✓ On refait ensuite la même manipulation avec les mêmes étapes en variant à chaque fois le temps de réaction de minute en minute jusqu'à 8 minutes.

**Remarque:** Chaque réaction est répétée 3 fois.

### III. 1. Détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse

La vitesse initiale d'hydrolyse du substrat (butyrate d'éthyle) par la carboxylestérase est la quantité de substrat transformé (ou de produit apparu) par unité de temps et par unité de volume du milieu réactionnel. Elle peut être déterminée par la formule suivante :

$$V_{in} = \frac{N \times 10^3}{t \times V_r}$$

Avec :

**V<sub>in</sub>** : Vitesse initiale d'hydrolyse du butyrate d'éthyle (μmol de substrat transformé. L<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>).

**N** : Nombre de μmol de substrat hydrolysé (μmol).

**t** : Temps de la réaction (min).

**V<sub>r</sub>** : Volume réactionnel (ml).

### III. 2. Détermination de l'activité enzymatique volumique

L'activité enzymatique volumique correspond à la quantité d'enzyme pouvant transformer une quantité de matière donnée par unité de temps. Elle peut être exprimée en unité internationale. Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions définies et si possible optimales. L'activité enzymatique volumique est déterminée par la formule suivante (**Adler et Kistiakowsky, 1962**):

$$AV = \frac{(C_{NaOH})(V_{NaOH})(1000)(df)}{(T)(Ve)}$$

Avec :

**AV** : Activité enzymatique volumique (UI/ml).

**C<sub>NaOH</sub>** : Concentration molaire de NaOH (mmol/l).

**V<sub>NaOH</sub>** : Volume de NaOH (ml).

**1000** : Facteur de conversion de millimoles en micromoles (définition de l'unité).

**df** : Facteur de dilution.

**T** : Temps nécessaire (en minutes) pour consommer le NaOH, tout en maintenant le pH à 8,0.

**Ve**: Volume d'enzyme (0,1ml).

### III. 3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique

L'activité spécifique est le nombre d'unités d'enzyme par unité de masse de protéines (**Pelmont, 1993**). L'activité spécifique traduit le degré de pureté de la préparation enzymatique, elle est maximale lorsque l'enzyme est complètement purifiée (**Loncle, 1992**). L'activité spécifique est déterminée par la formule suivante :

$$\mathbf{AS} = \frac{\mathbf{AV}}{\mathbf{[Protéine]}}$$

Avec :

**AS** : Activité spécifique (UI/mg).

**AV** : Activité volumique (UI/ml).

**[Protéine]** : concentration en protéines (mg/ml).

## **IV. Etude de l'influence du pH, de la température et de la concentration en substrat sur l'activité de la carboxylestérase**

### **IV. 1. Influence du pH**

En pratique, il est important de définir la zone de fonctionnement du système enzymatique dans la gamme des pH. Pour la détermination du pH optimum, on procède de la manière suivante :

✓ En variant le pH du milieu (pH 6; 6,5; 7; 7,2; 7,5; 7,8; 8; 8,2; 8,5; 8,8; 9), on prépare dans un bécher 25ml de la solution de butyrate d'éthyle (0,2ml de butyrate d'éthyle concentré dans 100ml du tampon phosphate (pH 5 à 11) pour la gamme allant de pH « 6 à 7,8 » et du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M pour la gamme allant de pH « 8 à 9 » ) et on met le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C puis on ajoute 0,05 ml de butyrate d'éthyle concentré.

✓ Le même protocole expérimental de la détermination de l'activité enzymatique est réalisé pour l'étude de l'effet du pH (*cf.* Paragraphe « III » de la partie « matériel et méthodes »). Le temps de réaction est de 5min.

## **IV. 2. Influence de la température**

La température affecte la vitesse des réactions enzymatiques. La détermination de la température optimale de la carboxylestérase est effectuée comme suit :

✓ On prépare dans un bécher 25ml de la solution de butyrate d'éthyle à  $2,9 \cdot 10^{-2}$  M et on met le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C et 70°C.

✓ Le même protocole expérimental de la détermination de l'activité enzymatique est réalisé pour l'étude de l'influence de la température (cf. Paragraphe « III » de la partie « matériel et méthodes »). Le temps de réaction est de 5min.

### **IV. 3. Influence de la concentration en substrat « le butyrate d'éthyle » sur l'activité de la carboxylestérase**

L'influence de la concentration en substrat sur l'activité de la carboxylestérase permet de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme  $K_m$  et  $V_{max}$ .

✓ On prépare dans un bécher 25ml de la solution de butyrate d'éthyle à différentes concentrations selon la gamme suivante:  $0,5 \cdot 10^{-2}$ ;  $10^{-2}$ ;  $1,2 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,3 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,5 \cdot 10^{-2}$ ;  $2,3 \cdot 10^{-2}$ ;  $3 \cdot 10^{-2}$ ;  $4,5 \cdot 10^{-2}$ ;  $6 \cdot 10^{-2}$ ;  $7,5 \cdot 10^{-2}$ ;  $9 \cdot 10^{-2}$ ;  $10,5 \cdot 10^{-2}M$ .

✓ Le même protocole expérimental de la détermination de l'activité enzymatique est réalisé pour l'étude de l'influence de la température (*cf.* Paragraphe « III » de la partie « matériel et méthodes »). Le temps de réaction est de 5min.

## **V. Etude de l'influence de la tartrazine (E102) sur l'activité de la carboxylestérase**

### **V.1. Spectre d'absorption de la tartrazine**

Pour établir le spectre d'absorption qui indique la longueur d'onde à laquelle la tartrazine absorbe le plus de lumière, on prépare une solution de ce colorant (0,008g dans 200 ml du tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1M; pH 8,00) et à l'aide d'un spectrophotomètre, on réalise le spectre de ce colorant.

### **V.2. Effet du pH sur la tartrazine**

La tartrazine peut exister sous forme de plusieurs tautomères à des pH différents. Pour cela, on prépare une série de solution tampon de manière à couvrir une large gamme de pH afin de savoir s'il y a un éventuel effet du pH sur le colorant.

- ✓ On prépare une solution de tartrazine à 0,02g/ml dans de l'eau distillée.
- ✓ On dilue ensuite cette solution à 1/1500 dans différentes solutions tampon : Solution tampon KCl/HCl 0,2M (pH 1,2 et 2,0); solution tampon d'acide citrique 0,1M/phosphate disodique 0,2M (pH 3 et 4); Tampon phosphate (pH 5,2; 6; 7; 10 et 10,9) et le tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8; 8,5 et 9).
- ✓ On mesure la longueur d'onde dans laquelle l'absorbance est maximale à l'aide d'un spectrophotomètre pour chaque dilution.

### **V.3. Effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur la tartrazine**

Afin de déceler un éventuel effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur la tartrazine, on procède de la manière suivante :

- ✓ On prépare une série de 5 tubes à essais contenant chacun 5ml de la solution tampon (Borax 0,025M/HCl 0,1M; pH 8), 5ml de la solution de butyrate d'éthyle préparée dans le même tampon dont les concentrations étaient de :  $1,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $3 \cdot 10^{-2}$ ,  $4,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $6 \cdot 10^{-2}$  et  $7,5 \cdot 10^{-2}$  mol.l<sup>-1</sup> respectivement, et 2 ml de la solution de tartrazine (0,1mmol/l).



✓ Après chaque temps d'incubation (45 et 90 min respectivement), on mesure l'absorbance de chaque tube à l'aide d'un spectrophotomètre à 424 nm.

#### **V.4. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine**

Afin de détecter un éventuel effet de la protéine enzymatique « la carboxylestérase » sur la tartrazine, on procède de la manière suivante :

✓ On prépare 200 ml de la solution de tartrazine à 0,03 g/l dans du tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1 M ; pH 8,00.

✓ Dans un erlenmeyer, on incube dans un bain-marie réglé à 25°C et contenant 100 ml de la solution préparée, on ajoute 1ml de la solution enzymatique (cf. Paragraphe « I » de la partie « matériel et méthodes »), puis on suit l'évolution de l'absorbance de cette solution dans un spectrophotomètre à 424 nm durant 3 heures en faisant des prélèvements toutes les 10 min dans la première heure et toutes les 15 min dans les deux heures qui suivent.

✓ On met dans un autre erlenmeyer 100 ml de la solution de tartrazine restante, puis on suit l'évolution de l'absorbance en parallèle avec la solution contenant le colorant et l'enzyme dans les mêmes conditions de température (25°C) et pendant la même durée de temps (3 heures) pour voir s'il y aura un changement significatif dans les absorbances ce qui pourrait fausser nos résultats pour l'étude de l'activité enzymatique en présence du substrat de l'enzyme. En effet, les prélèvements ont été faits simultanément avec ceux de la solution contenant le colorant.

#### **V.5. Effet de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase**

L'étude de l'effet de la tartrazine sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase est faite comme suit :

✓ Dans un bécher, on incube dans un bain-marie à 25°C, on prépare 25 ml d'une solution de butyrate d'éthyle à différentes concentrations ( $1,2 \cdot 10^{-2}$ ,  $1,3 \cdot 10^{-2}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $3 \cdot 10^{-2}$ ,  $4,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $6 \cdot 10^{-2}$  M) et 0,9 ml de la solution de tartrazine (pour chaque concentration en butyrate d'éthyle une concentration de tartrazine est testée selon la gamme suivante : 0,1; 0,2; 0,5 mM).

- ✓ En ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M), on ajuste le pH à 8,1 puis on ajoute 0,1 ml de la solution enzymatique.
- ✓ On déclenche le chronomètre lorsque le pH atteint 8,00 et on laisse la réaction pendant 5 min puis on place le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ On maintient le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 en ajoutant goutte à goutte la solution de NaOH (10mM) en notant le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8 et le temps nécessaire à la consommation du réactif NaOH.

## **VI. Etude de l'influence du colorant (E124-E171) sur l'activité de la carboxylestérase**

### **VI.1. Spectre d'absorption du colorant vert**

Afin d'établir le spectre d'absorption du colorant vert (E124-E171), on prépare une solution de ce colorant à 0,005 g/ml dans de l'eau distillée, cette solution est diluée au 1/10 dans le tampon borax 0,025M/HCl 0,1M; pH 8, puis à l'aide d'un spectrophotomètre, on obtient le spectre d'absorbance qui indique la longueur d'onde où l'absorbance est maximale.

### **VI.2. Effet du pH sur le colorant vert**

Afin d'étudier l'influence du pH sur ce colorant alimentaire, on procède de la manière suivante :

- ✓ On prépare une solution du colorant vert à 0,01 g/ml dans de l'eau distillée.
- ✓ On dilue ensuite cette solution au 1/10 dans différentes solutions tampon: tampon KCl/HCl 0,2M (pH 1,2 et 2,0), tampon citrate 0,1M/phosphate disodique 0,2M (pH 3,00 et 4,00), tampon phosphate (pH 5,2; 6; 7; 10 et 10,9) et le tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8 ; 8,5 et 9).
- ✓ Pour chaque dilution, on mesure la longueur d'onde dans laquelle l'absorbance est maximale.

### **VI.3. Effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur le colorant vert**

Pour étudier l'effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur le colorant alimentaire vert, on suit les étapes suivantes :

- ✓ On prend une série de 5 tubes à essais contenant chacun 5ml de la solution tampon (Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8), 5 ml de la solution de butyrate d'éthyle à différentes concentrations ( $1,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $3 \cdot 10^{-2}$ ,  $4,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $6 \cdot 10^{-2}$  et  $7,5 \cdot 10^{-2}$  mol.l<sup>-1</sup>), et 2 ml de la solution du colorant vert (0,01 g/ml).
- ✓ Après 45 et 90 min d'incubation, on mesure les absorbances de chaque tube à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 611 nm.

#### **VI.4. Effet de la carboxylestérase sur le colorant vert**

Pour savoir s'il y a un éventuel effet de la carboxylestérase sur le colorant vert, on procède de la même manière que pour l'effet de la carboxylestérase sur la tartrazine (*cf.* Paragraphe « V.3 » de la partie « matériel et méthodes ») sauf qu'on prépare 200 ml d'une solution du colorant vert à 0,005 g/ml dans du tampon Borax/HCl et le suivi de l'évolution de l'absorbance durant 3 heures se fait à une longueur d'onde de 611 nm.

#### **VI.5. Effet du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase**

L'influence du colorant vert sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase est effectuée dans les mêmes conditions que celle de l'étude de l'effet de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase (*cf.* Paragraphe « V.5 » de la partie « matériel et méthodes »). En effet, chaque concentration en butyrate d'éthyle est testée pour trois concentration en colorant vert (0,4; 0,5 et 0,7 mM).

#### **VII. Détermination de la concentration inhibitrice médiane IC<sub>50</sub>**

La détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) des deux inhibiteurs de l'activité enzymatique de la carboxylestérase du foie de porc consiste à mesurer l'activité de l'enzyme à 25°C et à pH 8,00 (tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M) à une concentration constante en butyrate d'éthyle ( $3 \cdot 10^{-2}$ M), en absence et en présence des différentes concentrations des deux inhibiteurs (la tartrazine et le colorant vert). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

#### **VIII. Analyse des résultats expérimentaux**

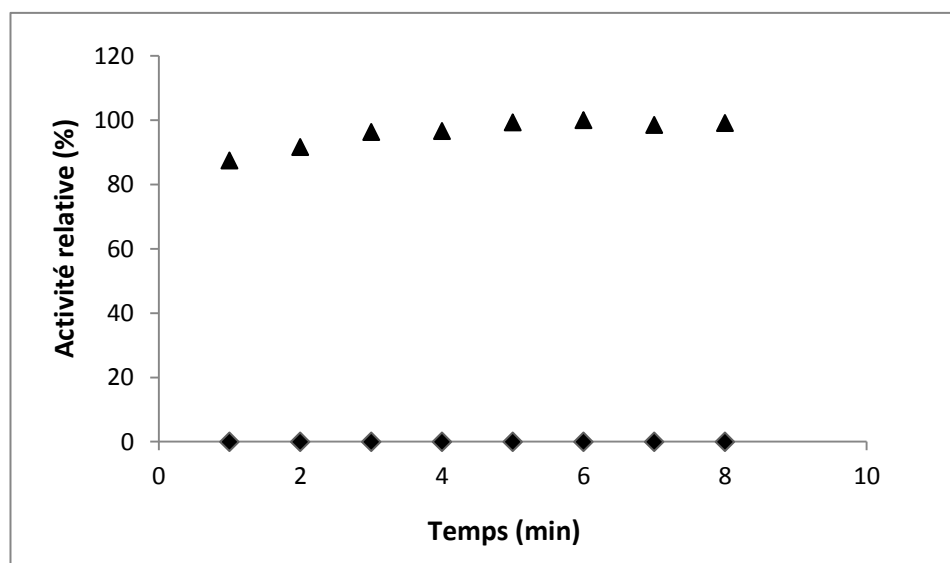
L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2D™ (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 97-2003) et SigmaPlot (Windows Version 12.0 Copyright© 2011 Software, Inc.).

*Chapitre 3.*  
*Résultats et Discussion*

## I. Recherche de l'activité « carboxylestérase » dans la préparation enzymatique

L'enzyme commerciale est convenablement préparée et utilisée pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse de l'ester « butyrate d'éthyle ».

La figure 17 permet de constater qu'en présence de la préparation enzymatique, le butyrate d'éthyle est hydrolysé en acide butyrique et en éthanol. Cette hydrolyse ne semble pas être spontanée puisque, lors d'essais témoins réalisés en l'absence d'enzyme, le butyrate d'éthyle n'était pas hydrolysé. L'activité volumique atteint un maximum de  $401.10^3$  UI/ml au-delà de six minutes d'incubation. Il est donc vraisemblable que l'enzyme commerciale est active. En effet, les carboxylestérases hydrolysent des composés contenant des groupements fonctionnels tels que l'ester carboxylique, l'amide et le thioester avec des vitesses variables de réaction selon le type du substrat (**Anzenbacher et al., 2012**).



**Figure 17 :** Cinétique d'hydrolyse du butyrate d'éthyle en présence (▲) et en absence (◆) de la préparation enzymatique de la carboxylestérase ([Butyrate d'éthyle]=  $3.10^{-2}$  M; solution tampon Borax/HCl 0,125M- pH 8 ; 25°C).

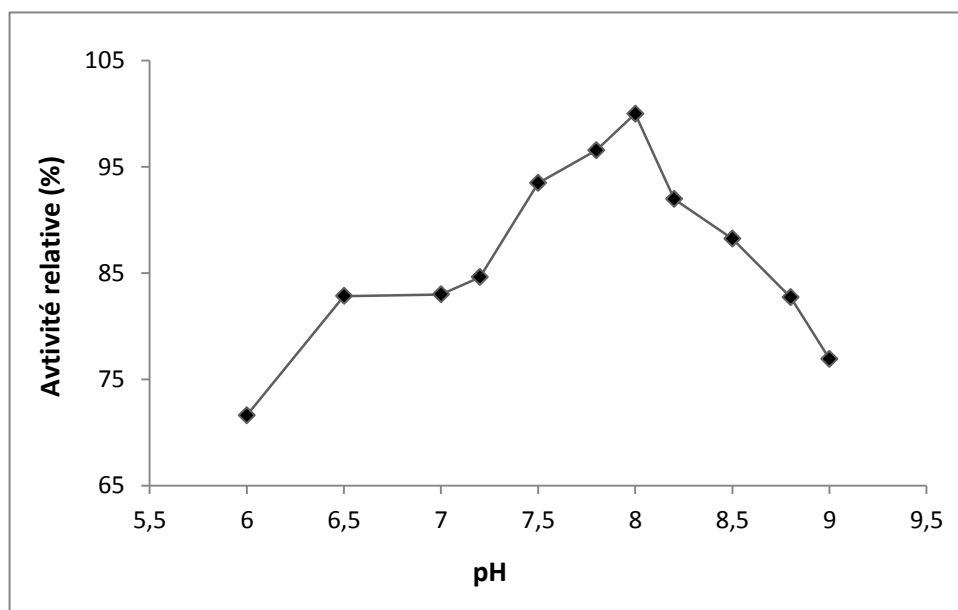
**Remarque:** La concentration en protéines de la préparation enzymatique de la carboxylestérase était  $5,074 \pm 0,08$  mg/ml et l'activité spécifique de la carboxylestérase été estimée à  $79119,6 \pm 4839,3$  UI/mg dans les conditions opératoires standards ([Butyrate d'éthyle] =  $3 \cdot 10^{-2}$  M, solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00), température 25°C, durée de la réaction 5 minutes).

## II. Effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase

L'activité enzymatique est très dépendante du pH. En général, une enzyme possède une zone de pH optimum où son activité catalytique est maximale. De part et d'autre de cette zone, plus ou moins étroite, l'enzyme est progressivement inactivée (**Kamoun, 1997**). Au pH optimum, l'enzyme possède une conformation bien déterminée qui lui confère son activité (**Jawetz et al., 1973**).

Selon **Bertram et al. (1969)** la carboxylestérase présente une activité maximale à un pH de 8,1. Ainsi, **Huang et al. (1996)** ont rapporté que le pH optimum de la carboxylestérase du foie du porc était de 8,00 et 8,5.

Une gamme de solutions de butyrate d'éthyle de pH allant de 6 à 9 est préparée. L'effet du pH sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase est représenté dans la figure 18.



**Figure 18** : Effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase. ([Butyrate d'éthyle]=  $3 \cdot 10^{-2}$  M; durée de la réaction: 5 min; 25°C).



Les résultats obtenus font ressortir un pic caractérisé par une activité maximale de la carboxylestérase ( $390.10^3\text{UI/ml}$ ) à un pH de 8,00; ce pH correspond au pH optimum de la carboxylestérase. De part et d'autre de cette valeur, l'activité enzymatique diminue.

**Wang et al. (2009); Adler et Kistiakowsky (1961)** affirment que l'activité de la carboxylestérase hépatique porcine est maximale à un pH de 8,00. Compte-tenu de nos résultats et de ceux de ces auteurs, nous avons choisi, pour la suite de nos expériences, de travailler avec une solution tampon Borax/HCl 0,125M de pH 8,00.

Le pH du milieu intervient sur l'état d'ionisation de nombreux sites internes de la molécule d'enzyme. Ses effets sont donc multiples:

- Sur la structure de l'enzyme;
- Sur l'association entre enzyme et substrat;
- Sur le mécanisme réactionnel (**Pelmont, 1993**).

En bref, l'effet du pH est souvent complexe : on peut ainsi avoir une modification de l'ionisation de groupements intervenant dans la catalyse ou dans la fixation du substrat, ou encore dans le maintien de la conformation native; l'ionisation du substrat lui-même peut éventuellement être modifiée (**Audigié et Zonszain, 1995; Loncle, 1992**).

### III. Effet de la température sur l'activité de la carboxylestérase

Comme pour la plupart des réactions chimiques, la vitesse des réactions enzymatiques augmente avec la température (**Garrett et Grisham, 2000**). La représentation graphique de l'activité enzymatique de la carboxylestérase en fonction de la température (figure 19) fait apparaître une allure dissymétrique présentant deux phases bien distinctes qui correspondent à deux phénomènes différents.

▪ Dans la **partie ascendante** de cette courbe (de 25°C à 45°C), l'activité croît avec la température. L'augmentation de l'activité avec la température peut s'expliquer par une augmentation de la concentration du complexe activé lorsque l'on fournit plus d'énergie thermique (énergie d'activation) au système en réaction. L'activité enzymatique vaut  $389,5 \cdot 10^3$  UI/ml à 25°C et  $648 \cdot 10^3$  UI/ml à 45°C. Cette partie de la courbe correspond à la courbe d'activation (**Murray et al., 2003; Weil, 1997; Coutouly, 1991**).

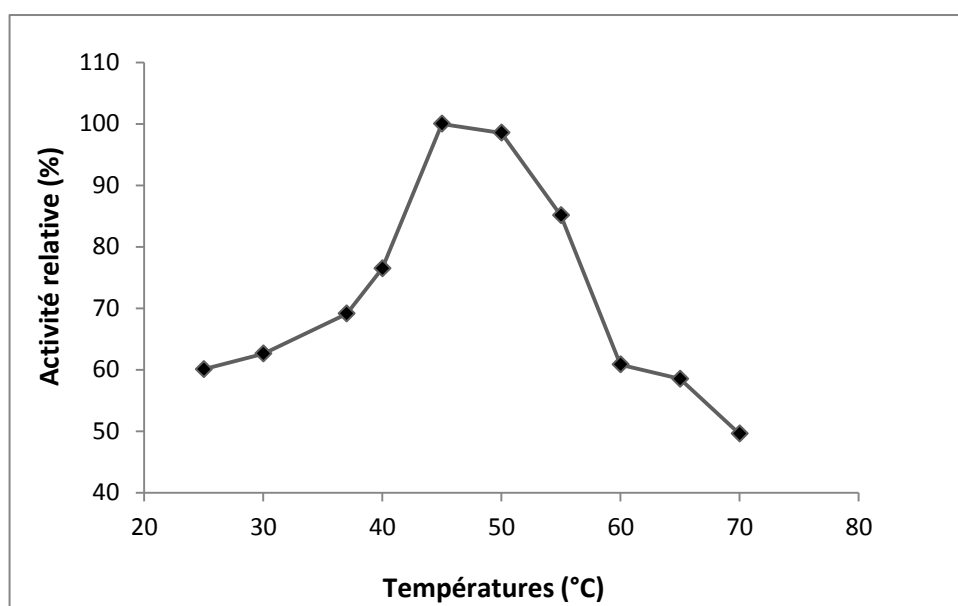
▪ Dans la **partie descendante** de la courbe (au-delà de 45°C), l'activité enzymatique diminue. On assiste alors à une dénaturation thermique. Cette dernière est due à l'agitation moléculaire qui détruit les liaisons faibles (liaisons hydrogènes, ioniques et forces de Van der Waals) stabilisatrices de la structure spatiale de l'enzyme (**Augère, 2001**). Il y a passage d'un état hautement ordonné à un état moins ordonné traduisant une augmentation de l'entropie, correspondant à la désorganisation de la structure de l'enzyme. La dénaturation a pour conséquence une inactivation (**Weil, 1997; Loncle, 1992**).

Dans les conditions de mesures choisies, la température de 45°C à laquelle correspond l'activité enzymatique maximale ( $648 \cdot 10^3$  UI/ml), est la température optimale de la carboxylestérase. Cette température correspond au point d'équilibre entre l'activation et la dénaturation thermique (**Robert et Vian, 2004; Kamoun, 1997**).

**Wynne et al. (1973)** ont mesuré une température optimale de 40°C pour la carboxylestérase.

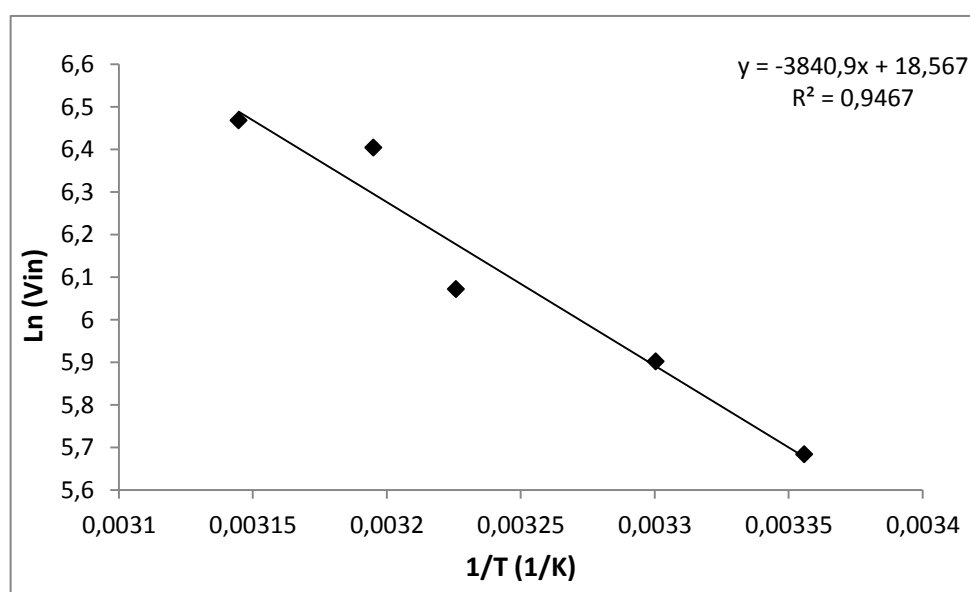
La température optimale à laquelle l'activité enzymatique est maximale est souvent proche de la température critique (température à partir de laquelle l'effet d'inactivation devient visible). C'est pourquoi, lors d'une détermination d'activité, il est souhaitable de travailler à une température inférieure à cette température « optimale » (**Loncle, 1992**).

Pour une enzyme donnée, la température optimale mesurée dépend des conditions expérimentales, et en particulier, du pH et de la force ionique du milieu et également de la durée de réaction. Plus cette durée est courte, plus la température optimale peut être élevée (**Loncle, 1992; Coutouly, 1991**). En fait, la détermination de la température optimale ne donne qu'une indication sur le caractère plus ou moins thermolabile de l'enzyme.



**Figure 19:** Effet de la température sur l'activité de la carboxylestérase. ([Butyrate d'éthyle] =  $3 \cdot 10^{-2}$  M; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M-pH 8; durée de la réaction : 5 min).

La partie ascendante de la courbe d'activité relative en fonction de la température du milieu réactionnel (figure 19) permet d'estimer l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse du butyrate d'éthyle par la carboxylestérase. Pour cela, on représente le logarithme népérien (noté Ln) de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de l'inverse de la température absolue (figure 20). D'après la loi d'Arrhenius, on devrait obtenir une droite de pente «  $-E_a/R$  » ou «  $E_a$  » est l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse du butyrate d'éthyle et «  $R$  » est la constante des gaz parfaits (cf. Paragraphe I.7.2 de la partie « synthèse bibliographique »).



**Figure 20** : Graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de la carboxylestérase.

L'équation d'Arrhenius montre que les molécules ne peuvent prendre part à une réaction que si leur énergie atteint un certain seuil, correspondant à l'énergie d'activation. Cette dernière donne parfois des indications intéressantes sur le mécanisme chimique de la réaction au niveau de l'enzyme (**Cornish-Bowden et al., 2004; Pelmont, 1993**).

L'énergie d'activation thermique déterminée à partir de la courbe d'Arrhenius ci-dessus est de  $32 \text{ KJ.mol}^{-1}$ . Ce résultat est proche de celui obtenu par **Zhou et al. (2001)** qui ont déterminé une énergie d'activation de  $34 \text{ KJ.mol}^{-1}$  pour la carboxylestérase du foie du porc.

#### IV. Paramètres cinétiques de la carboxylestérase

Afin de déterminer les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  de la carboxylestérase, nous avons fait varier de  $0,5 \cdot 10^{-2}M$  à  $3 \cdot 10^{-2}M$  la concentration en butyrate d'éthyle soumis à l'enzyme. La vitesse d'hydrolyse de l'ester a ainsi été mesurée à différentes concentrations en substrat.

En premier lieu, nous avons utilisé l'équation de Michaelis-Menten afin d'évaluer les constantes cinétiques  $k_m$  et  $V_{max}$ . La figure 21 représente la courbe obtenue.

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equation de Michaelis-Menten})$$

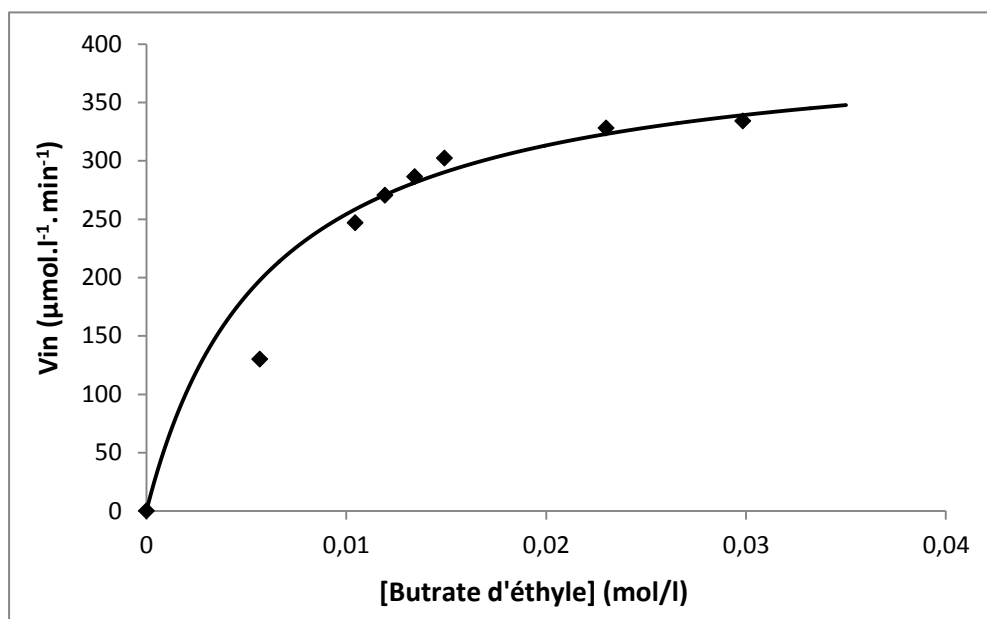
Avec:

**$V_{in}$** : Vitesse initiale d'hydrolyse ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ );

**$V_{max}$** : Vitesse maximale d'hydrolyse ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ );

**$[S]$** : Concentration en substrat (butyrate d'éthyle) ( $\text{mol.l}^{-1}$ );

**$K_m$** : Constante de Michaelis ( $\text{mol.l}^{-1}$ ); elle correspond à la valeur de  $[S]$  pour laquelle  $V_{in} = V_{max}/2$ .



**Figure 21** : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon l'équation de Michaelis-Menten.(25°C; solution tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1 M (pH 8,00)).

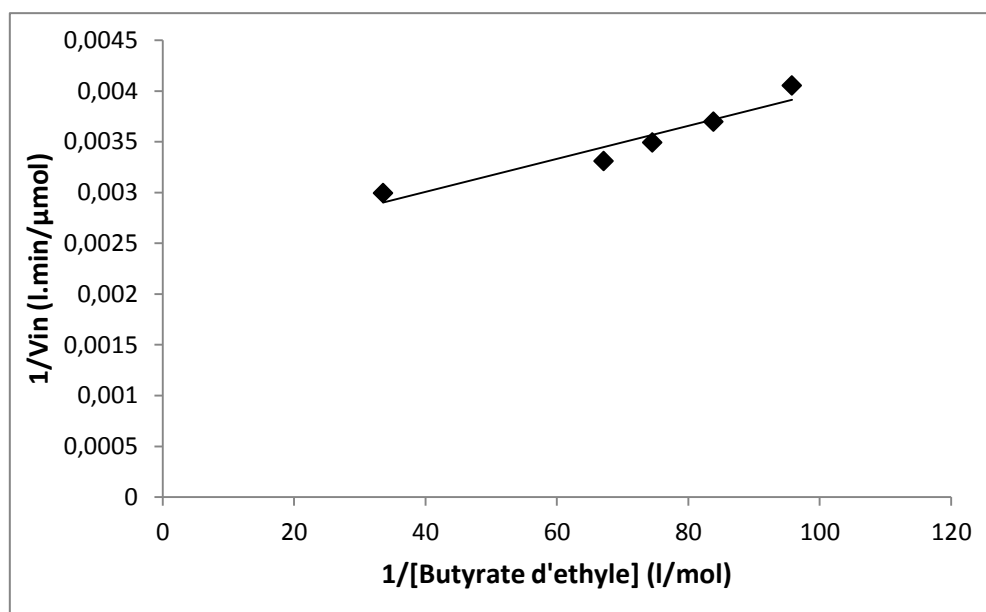
A partir de cette courbe, nous avons obtenu:

$$\mathbf{V_{max}} = 407,8 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$\mathbf{K_m} = 6.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.$$

Afin de déterminer des valeurs plus précises des paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$ , il est préférable d'utiliser l'une des nombreuses représentations graphiques, linéarisant les mesures expérimentales. La représentation en coordonnées inverses (dite de Lineweaver-Burk) pour des concentrations en substrat non saturantes est la plus employée (figure 22) (**Weinman et Méhul, 2004; Burnstein, 2000; Kamoun, 1997; Loncle, 1992; Palmer, 1985**). On a la relation suivante :

$$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Equation de Lineweaver-Burk})$$



**Figure 22:** Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase. (cf. figure 21 pour les conditions opératoires).

A partir de cette représentation, nous avons obtenu :

$$\mathbf{V_{max}} = 424,5 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$\mathbf{K_m} = 7.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.$$

Nous avons ensuite mesuré les vitesses initiales d'hydrolyse du substrat à des concentrations supérieures à  $3.10^{-2}\text{M}$  qui entraînent une inhibition partielle de l'enzyme. A ces concentrations, l'équation cinétique de Michaelis-Menten cesse d'être valable. Afin d'ajuster au mieux les données expérimentales, on utilise un modèle qui prend en compte l'inhibition de l'enzyme par excès de substrat (**Coutouly, 1991**). L'expression de la vitesse initiale devient alors :

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S] + [S]^2/K_s}$$

Avec:

**V<sub>in</sub>** : Vitesse initiale d'hydrolyse ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ );

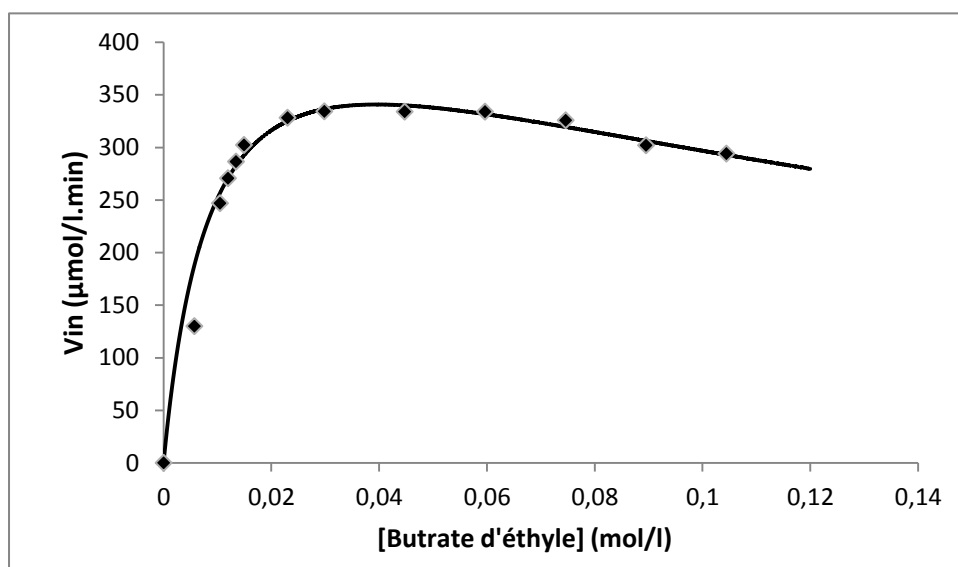
**V<sub>max</sub>** : Vitesse maximale d'hydrolyse ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ );

**[S]** : Concentration en substrat ( $\text{mol.l}^{-1}$ );

**K<sub>m</sub>** : Constante de Michaelis ( $\text{mol.l}^{-1}$ );

**K<sub>s</sub>**: Constante d'inhibition par le substrat ( $\text{mol.l}^{-1}$ ).

La courbe (figure 23)  $V_{in} = f([\text{Butyrate d'éthyle}])$  tracée à l'aide de l'équation ci-dessus fait apparaître une déviation par rapport au modèle michaelien, explicable par une inhibition par excès de substrat.



**Figure 23** : Effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la carboxylestérase. (cf. figure 21 pour les conditions opératoires).

Avec un  $r^2 = 0,96$ , ce graphe rend compte avec justesse les données expérimentales obtenues. On en déduit :

**V<sub>max</sub>** =  $504,6 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

**K<sub>m</sub>** =  $9,5 \cdot 10^{-3} \text{mol.l}^{-1}$ .

**K<sub>s</sub>** =  $1,6 \cdot 10^{-1} \text{mol.l}^{-1}$ .



D'après la figure 23, la vitesse initiale d'hydrolyse de l'ester par la carboxylestérase, augmente dans un premier temps avec la concentration initiale de substrat ( $S_0$ ) jusqu'à atteindre un maximum à  $[S_0] = 3.10^{-2}M$ . Au-delà de cette concentration, la vitesse initiale d'hydrolyse diminue, cette baisse d'activité enzymatique peut être due à l'inhibition de la carboxylestérase par un excès de substrat (le butyrate d'éthyle), ou par les produits de la réaction. L'inhibition de la carboxylestérase a été rapportée par d'autres études, d'après **Stoops et al. (1974)**, l'inhibition de la carboxylestérase du foie de porc, de mouton, de bœuf et de lapin a été observée aux fortes concentrations en butyrate d'éthyle.

En effet, pour un système défini en enzyme, pH, température et des concentrations variables en substrat, on constate que la vitesse de la réaction croît avec la concentration en substrat pour tendre vers une limite ( $V_{max}$ ). Ceci signifie que pour des concentrations très élevées en substrat, la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration en substrat (**Métais et al., 1977**).

Aux fortes concentrations en substrat, la vitesse de la réaction décroît progressivement au lieu d'approcher  $V_{max}$ . Il y a inhibition par excès de substrat. Cette inhibition peut recevoir des explications différentes selon le système étudié. Dans certains cas, le substrat à forte concentration peut se loger dans le site actif avec une orientation anormale, interdisant à la réaction de se produire. L'effet correspond à une sorte d'inhibition compétitive du substrat avec lui-même (**Weinman et Méhul, 2004**). Dans d'autres cas, le substrat en excès peut réagir avec des zones de la protéine en dehors du site, provoquant des désordres réversibles ou non (**Pelmont, 1993**).

Selon **Chaplin (2002)** et **Palmer (1985)**, l'inhibition par excès de substrat représente un cas particulier d'inhibition incompétitive. A des concentrations élevées de substrat, plusieurs molécules de substrat se fixent sur le site actif et souvent différentes parties des molécules de substrat sont fixées sur différents sous-sites du site de fixation du substrat.

Par ailleurs, il est important de rappeler que la cinétique enzymatique à deux substrats comporte un grand nombre de cas de figure aboutissant fréquemment à des équations compliquées. Toute tentative de mise en équation part d'un modèle où sont répertoriées toutes les formes d'association prises par l'enzyme (les différents complexes formés avec les substrats et produits) et toutes les réactions partielles faisant passer de l'une à l'autre. Ainsi, on sait que la carboxylestérase suit un mécanisme réactionnel dit ping-pong (**Fickers et al., 2008**) et que ce mécanisme est caractérisé par un mode particulier d'inhibition par les produits de la réaction (**Pelmont, 1993**).

Le tableau 5 récapitule les paramètres cinétiques de la carboxylestérase obtenus à partir des différentes équations.

**Tableau 5:** Paramètres cinétiques de la carboxylestérase.

Equations cinétiques	Paramètres cinétiques de la carboxylestérase		
	Vmax ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	Km ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )	Ks ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )
$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$	407,8	6	–
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$	424,5	7	–
$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S] + [S]^2/K_s}$	504,6	9,5	165,3

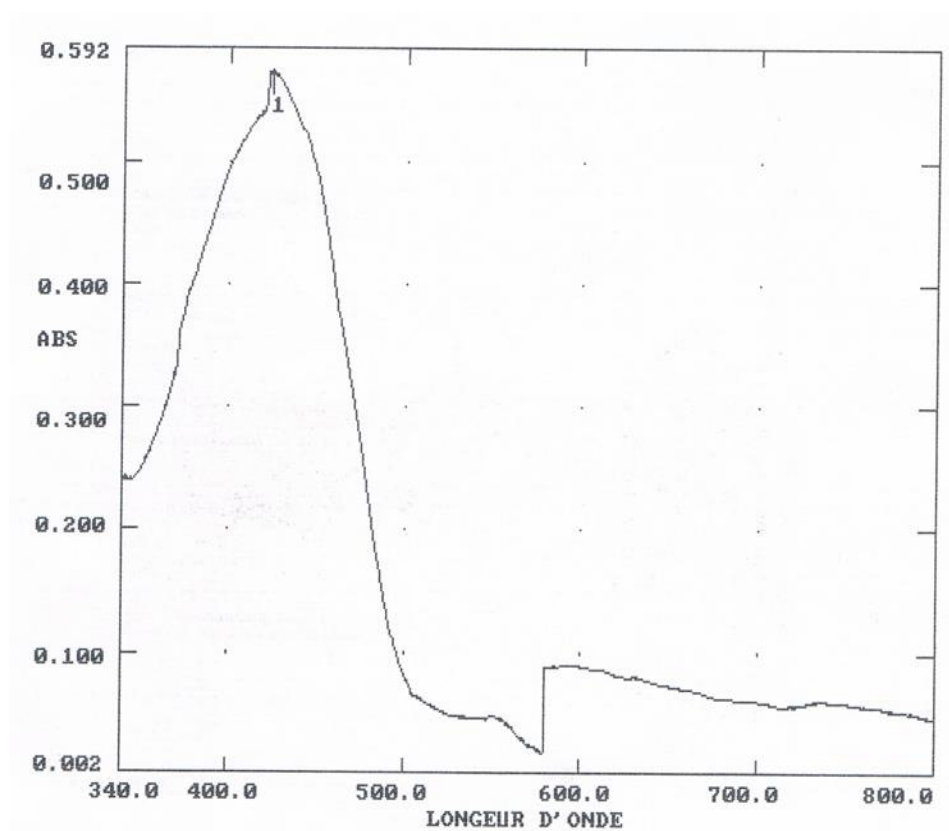
Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  déterminées à partir de l'équation, qui prend en compte l'inhibition de l'enzyme par excès de substrat, sont plus élevées que celles obtenues à partir de l'équation de Michaelis-Menten et de l'équation de Lineweaver-Burk.

Il existe une hétérogénéité dans les valeurs de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de la carboxylestérase rapportées dans la littérature. En effet, les valeurs des constantes cinétiques dépendent énormément de la source, de la pureté des enzymes, mais aussi des conditions opératoires. Ainsi, **Stoops et al. (1974)** ont mesuré une constante de Michaelis,  $K_m = 7,2 \cdot 10^{-4}$  pour la carboxylestérase hépatique porcine.

## V. Spectres d'absorbance des colorants utilisés

### V.1. Spectre d'absorption de la tartrazine

La figure 24 est une représentation du spectre d'absorption caractéristique de la tartrazine. Ce spectre indique que la tartrazine a une absorbance maximale à une longueur d'onde de 424 nm, ce qui correspond au domaine des radiations bleues. Ce colorant sera donc de la couleur complémentaire du bleu, c'est-à-dire jaune. Par conséquent, nous avons utilisé cette longueur d'onde pour les manipulations concernant ce colorant.



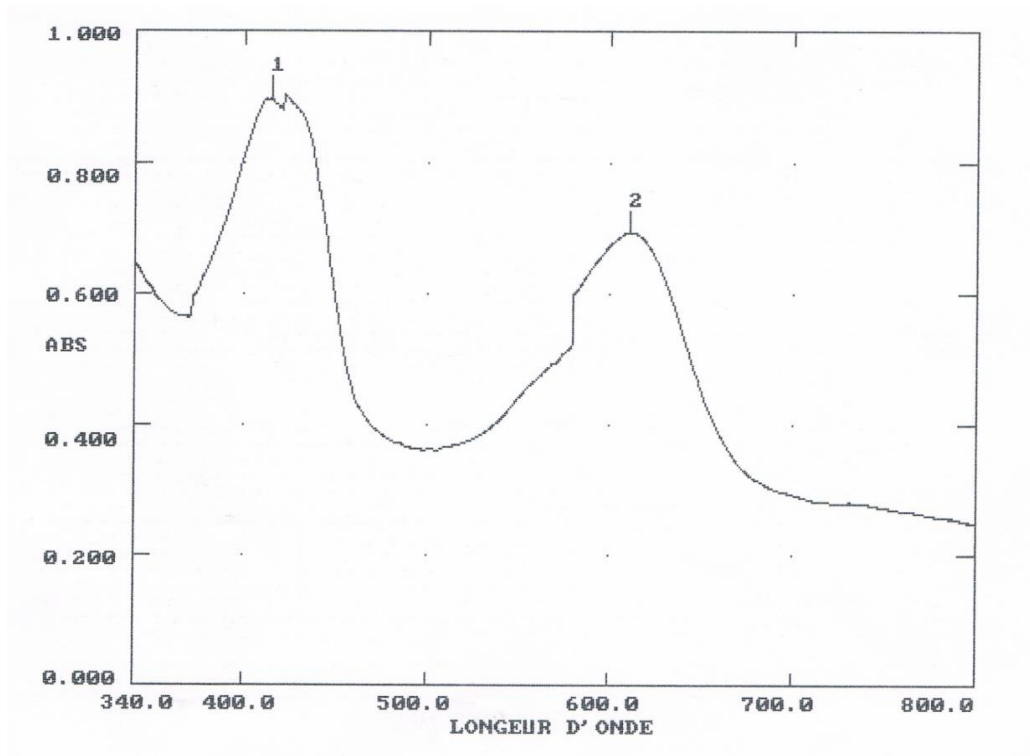
**Figure 24** : Spectre d'absorption de la tartrazine.

## V.2. Spectre d'absorption du colorant vert

Le spectre d'absorption du colorant vert représenté dans la figure 25 indique deux pics d'absorption maximale, ce qui confirme que ce colorant est constitué à base de deux colorants différents: un colorant jaune représentant une absorbance maximale à une longueur d'onde de 414 nm et un colorant bleu où son absorbance maximale se situe à 611 nm.

Donc, le colorant vert ne peut pas être le résultat de la combinaison du rouge ponceau (E124) et du dioxyde de titane (E171) comme l'indique l'étiquetage du produit commercial. Selon **Alturkmani (2011)**, le rouge ponceau absorbe à une longueur d'onde de 503 nm, et le dioxyde de titane n'absorbe pas la lumière dans la région du visible. Par contre, il a la propriété d'adsorber les rayons UV (**Armand, 2011**). De ce fait et selon les données de la littérature, on peut admettre que le colorant est obtenu à partir d'un mélange de tartrazine (E102) (la longueur d'onde maximale (424 nm) de ce colorant est proche de 414 nm) et de l'indigotine (E132) qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 610 nm (**Altinoz et Toptan, 2003**) très proche au résultat obtenu (611 nm).

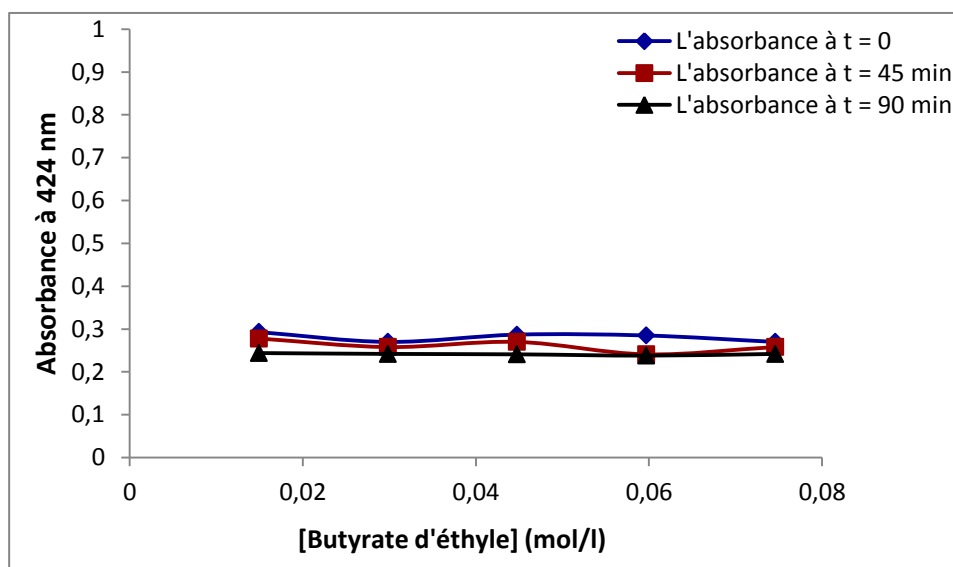
Dans la suite de notre travail, sachant que la tartrazine entre dans la constitution du colorant vert et afin de discerner les effets de l'indigotine et ceux de la tartrazine, nous avons préféré travailler à la longueur d'onde 611 nm plutôt qu'à 414 nm car cette dernière est proche de la longueur d'onde des radiations absorbées par la tartrazine.



**Figure 25** : Spectre d'absorption du colorant vert.

## VI. Suivi de l'éventuelle interaction du substrat « le butyrate d'éthyle » et de la tartrazine

L'effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur l'absorption de la tartrazine est représenté dans la figure ci-dessous :

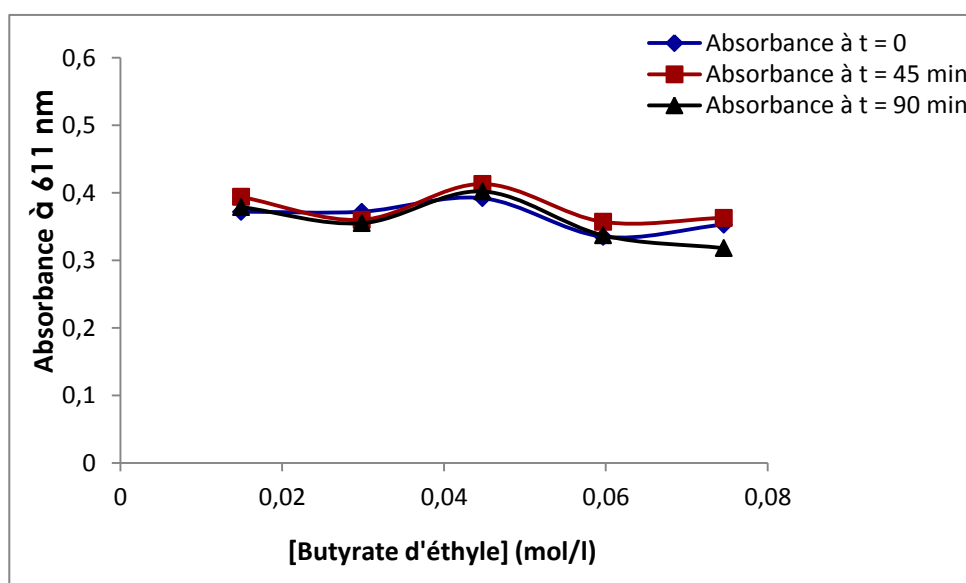


**Figure 26** : Evolution de l'absorbance de la tartrazine en présence de différentes [Butyrate d'éthyle].

Les résultats représentés dans la figure « 26 » montrent qu'il n'y a pas de changement significatif dans l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence de différentes concentrations en butyrate d'éthyle pour les différentes valeurs de temps (0, 45 et 90 minutes). Le butyrate d'éthyle ne présente donc aucun effet sur le colorant.

## VII. Suivi de l'éventuelle interaction du butyrate d'éthyle et du colorant vert

La représentation ci-dessous présente l'effet de la concentration en butyrate d'éthyle sur l'absorbance du colorant vert.



**Figure 27** : Evolution de l'absorbance du colorant vert en présence de différentes [Butyrate d'éthyle].

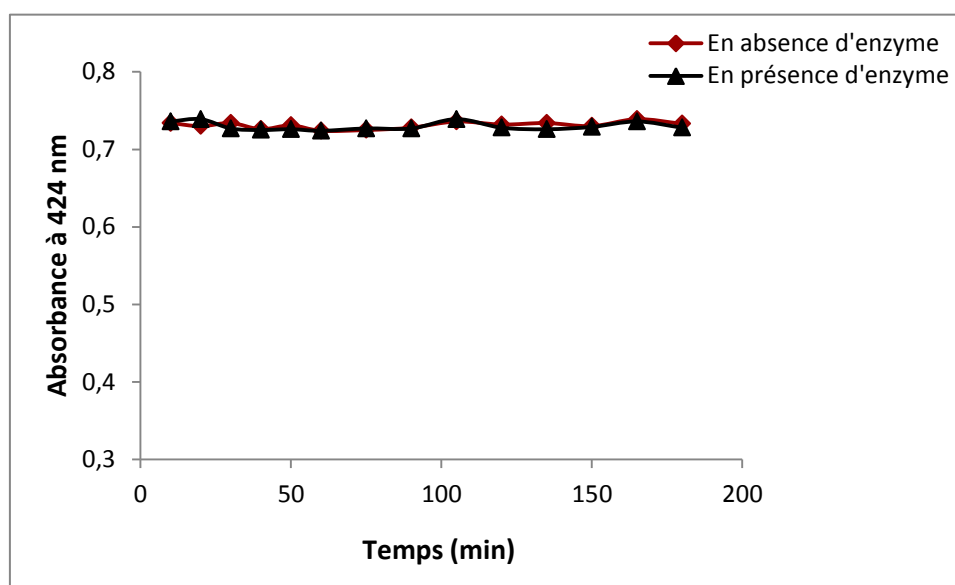
Pendant tout le temps du suivi de 0 à 90 min, les valeurs d'absorbances du colorant vert en présence de différentes concentrations du butyrate d'éthyle sont stables et ne présentent aucun changement significatif, cela explique que le colorant vert n'est pas influencé par le butyrate d'éthyle.



## VIII. Suivi de l'éventuel effet de la carboxylestérase sur la tartrazine et le colorant vert

### VIII.1. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine

La figure 28 est une représentation de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en fonction du temps, en présence et en absence de la carboxylestérase porcine.



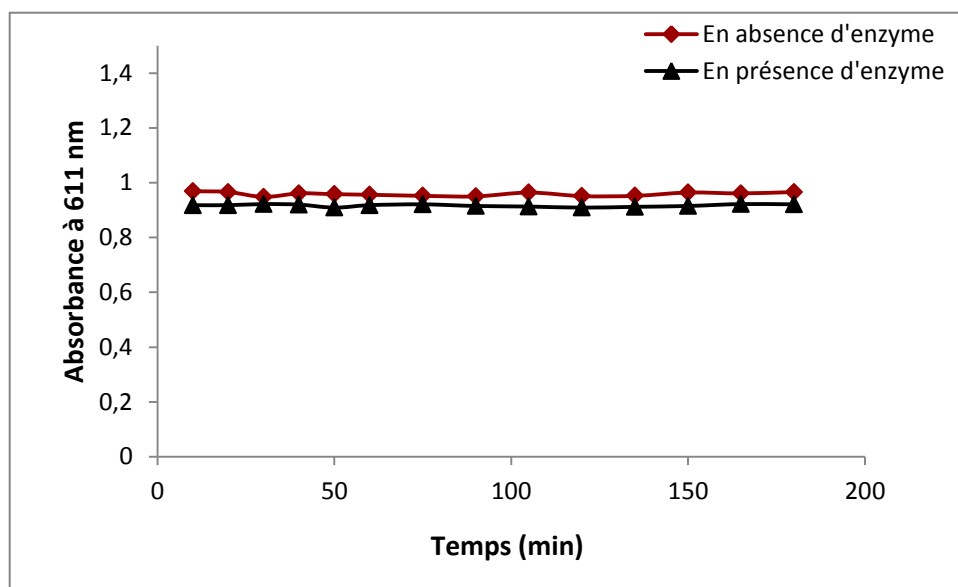
**Figure 28** : Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence et en absence de la carboxylestérase.

Les valeurs de l'absorbance de la solution contenant l'enzyme et la tartrazine diluées dans du tampon Borax/HCl 0,125M (pH 8,00) restent stables pendant tout le temps du suivi. Ces valeurs ne présentent donc aucun changement significatif par rapport à celles obtenues pour la solution témoin (solution de tartrazine seule diluée dans du tampon Borax/HCl).

De ce fait, la carboxylestérase n'a aucun effet sur la tartrazine, c'est-à-dire que ce colorant n'est pas considéré comme un substrat de cette enzyme, ce qui nous permettra d'entamer l'étude de la cinétique enzymatique d'hydrolyse du butyrate d'éthyle par la carboxylestérase en présence de la tartrazine, en sachant que ce colorant est stable dans les conditions opératoires utilisées.

## VIII.2. Effet de la carboxylestérase sur le colorant vert

La figure 29 ci-dessous représente l'évolution des absorbances des deux solutions du colorant vert en absence et en présence de la carboxylestérase.



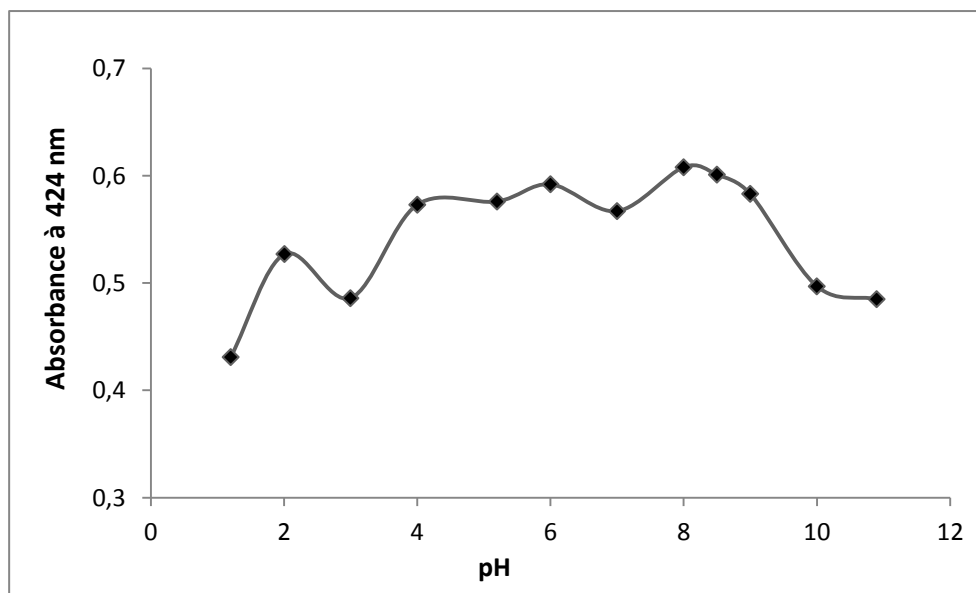
**Figure 29** : Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance du colorant vert en présence et en absence de la carboxylestérase.

Durant les trois heures du suivi, les absorbances des deux solutions contenant la carboxylestérase et le colorant vert, ainsi que celle contenant le colorant seul, restent stables et ne présentent aucun changement significatif. Cela explique que le colorant vert n'est pas influencé par l'enzyme.

Ce résultat montre que le colorant vert est stable dans les conditions opératoires utilisées, ce qui nous aidera à poursuivre l'étude de l'effet de ce colorant sur la cinétique d'hydrolyse du butyrate d'éthyle par la carboxylestérase.

## IX. Effet du pH sur la tartrazine

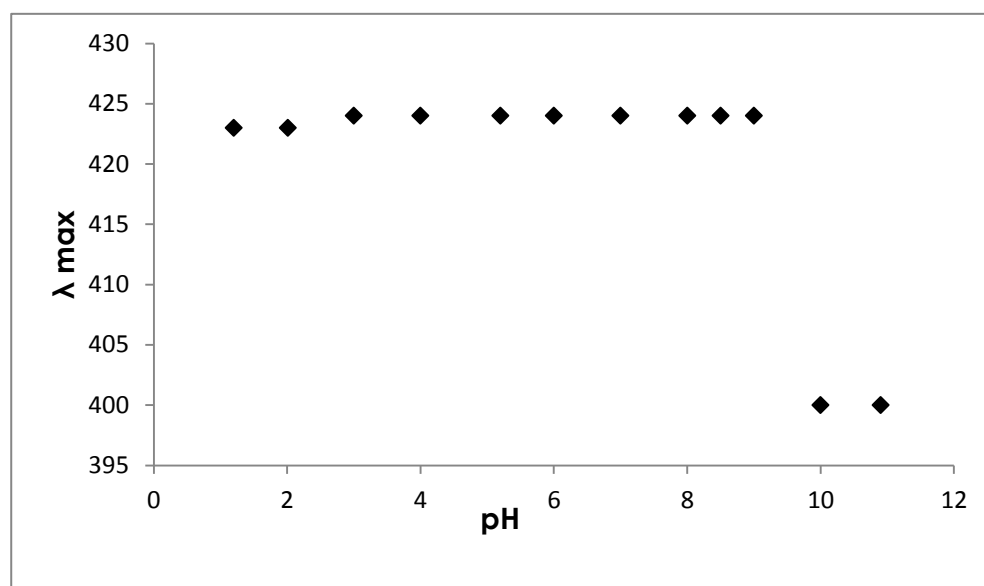
La figure 30 représente l'effet du pH sur l'absorbance de la tartrazine à 424 nm.



**Figure 30** : Effet du pH sur l'absorbance de la tartrazine.

D'après le résultat obtenu, le pH a un effet visible sur l'absorbance de la tartrazine, en effet, le pH diminue dans les intervalles suivants [1,2 - 4] et [9 -10,9], cependant, l'absorbance reste plus ou moins stable dans une gamme de pH compris entre 4 et 9. Selon **Nevado et al. (1998)**, l'absorbance de la tartrazine diminue fortement à des pH supérieur à 9.

L'évolution de la longueur d'onde maximale de la tartrazine en fonction du pH est représentée dans la figure 31 ci-dessous.

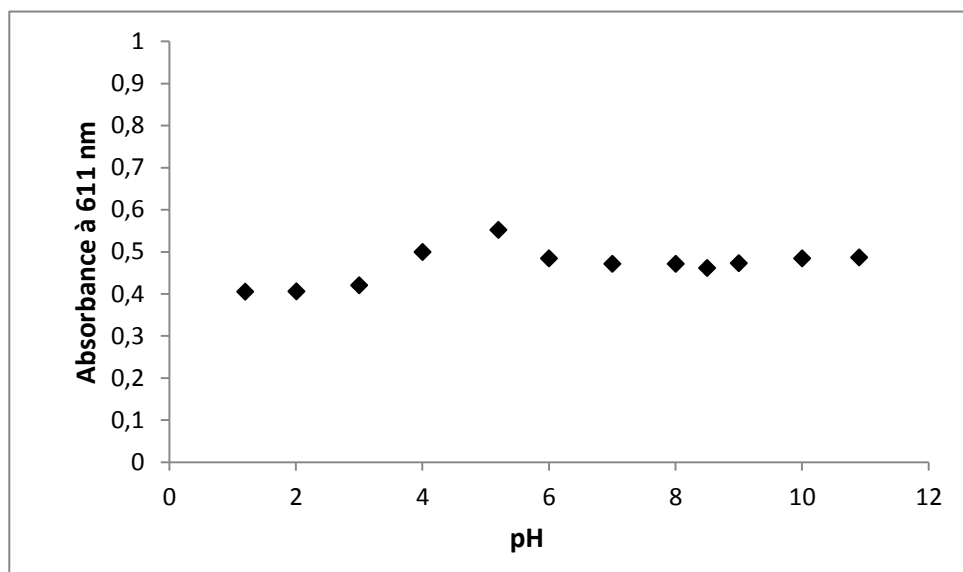


**Figure 31** : Effet du pH sur l'absorption maximale de la tartrazine.

Les valeurs de la longueur d'onde maximale de la tartrazine en fonction du pH sont stables dans une gamme de pH allant de 1,2 à 9, ce qui explique qu'il n'y a pas d'effet du pH. Cependant, au-delà de pH 9, l'influence du pH est visible avec une diminution des valeurs de la longueur d'onde maximale de 424 nm au pH 9 à 400 nm au pH 10 et 10,9. Selon **Blanco et al. (1996)**, une diminution des valeurs de la longueur d'onde maximale a été observée à des valeurs de pH supérieur à 8,8. Cette diminution est due au changement d'ionisation du groupement auxochrome de la tartrazine. Cela traduit l'existence du colorant sous une forme chimique différente de celle qui a prévalu aux autres valeurs de pH, ce qui est généralement le cas pour ce genre de substances.

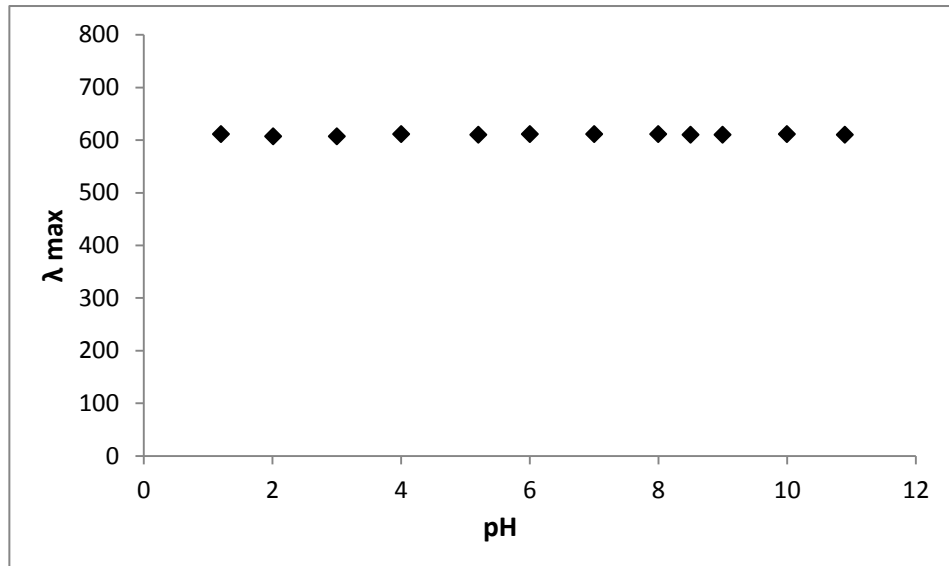
## X. Effet du pH sur le colorant vert

La figure 32 est une représentation de l'effet du pH sur l'absorbance du colorant vert. En effet, les valeurs de l'absorbance du colorant vert à 611 nm se stabilisent à des intervalles de pH allant de [1 à 3] et de [6 à 10,9]. Une légère augmentation est constatée pour les valeurs de pH de 4 et 5,2.



**Figure 32** : Effet du pH sur l'absorbance du colorant vert.

Chaque valeur d'absorbance représente un maximum d'absorption pour une longueur d'onde bien définie comme le montre la figure 33. Le résultat obtenu montre que les longueurs d'ondes maximales sont stables dans toute la gamme de pH testé, ce qui indique que le pH des différentes solutions tampons utilisées n'a aucune influence sur la longueur d'onde maximale du colorant vert.



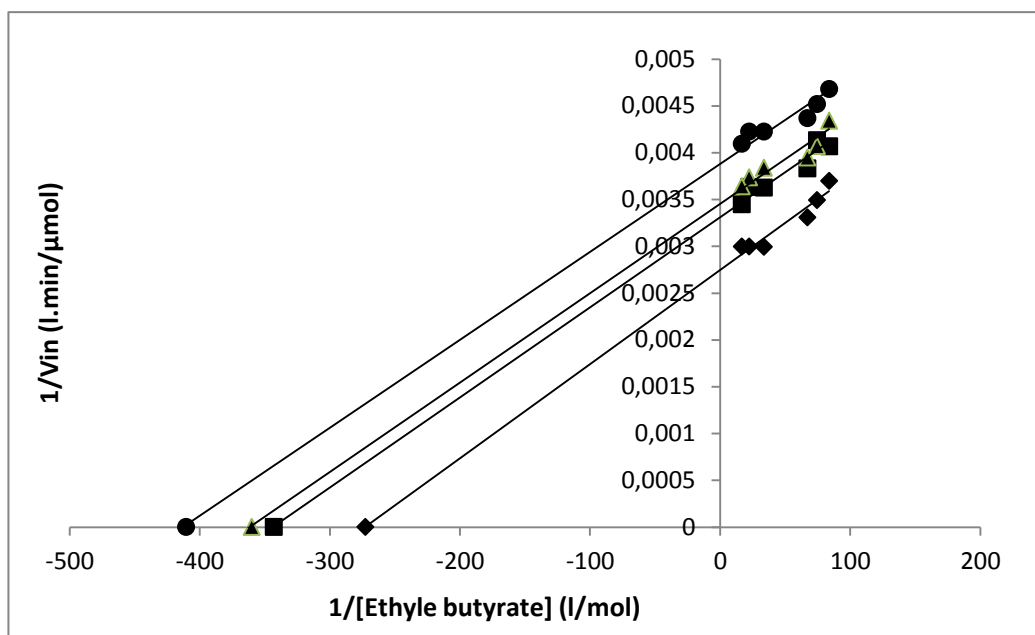
**Figure 33:** Effet du pH sur l'absorption maximale du colorant vert.

## **XI. Cinétique de la carboxylestérase en présence de la tartrazine et du colorant vert**

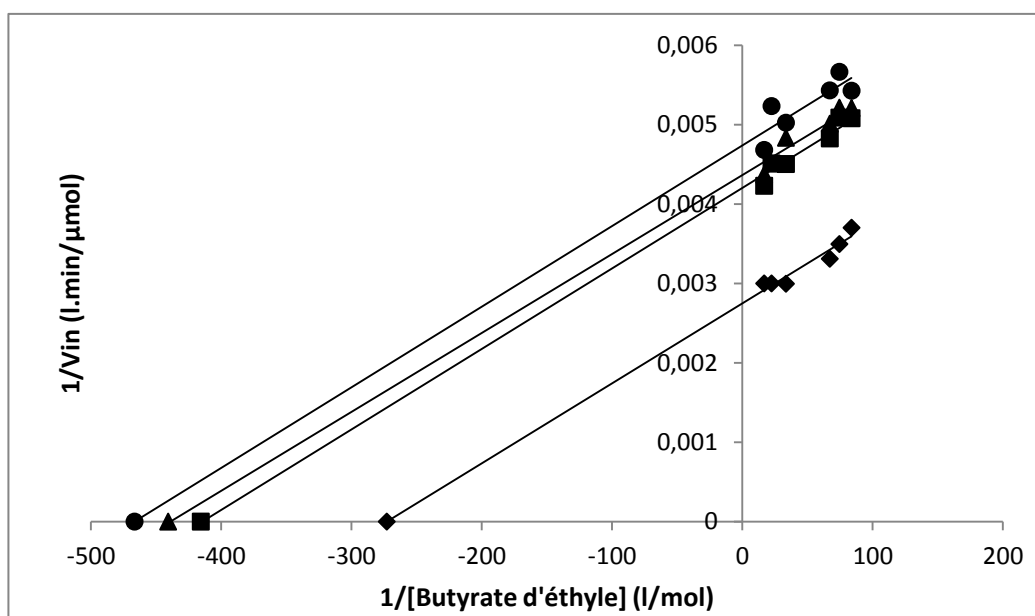
Les inhibiteurs peuvent avoir plusieurs modes d'action qui peuvent être mis en évidence, après étude cinétique de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, par la représentation en double inverse. Le type d'inhibiteur apporte des renseignements sur la spécificité de l'enzyme ou sur le mécanisme de la réaction (**Loncle, 1992**). Les réactifs chimiques des protéines peuvent inhiber irréversiblement l'enzyme, dans la mesure où ils sont capables de donner une liaison covalente stable avec la chaîne latérale d'un (ou de plusieurs) aminoacide(s) impliqué(s) dans la reconnaissance du substrat, dans la catalyse, ou plus simplement dans le maintien de la structure tridimensionnelle active.

Puisque la tartrazine et le colorant vert n'ont pas été considérés comme substrats de la carboxylestérase, nous avons essayé de savoir si ces deux colorants exerçaient un effet inhibiteur ou activateur sur l'activité de cette enzyme. En effet, la littérature fait état d'un certain nombre d'inhibiteurs de la carboxylestérase (cf. Paragraphe I.7.4 de la partie « synthèse bibliographique »). Néanmoins, la tartrazine et le colorant vert ne figurent pas parmi les inhibiteurs habituellement cités.

Pour cela, nous avons examiné l'effet de ces deux colorants en présentant le comportement cinétique de la carboxylestérase en absence et en présence de la tartrazine ainsi que du colorant vert à différentes concentrations (0,1 ; 0,2 et 0,5 mM) et (0,4; 0,5 et 0,7 mM), respectivement, selon la représentation de Lineweaver-Burk (figures 34 et 35).



**Figure 34** : Représentation de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase en absence et présence de [Tartrazine]= 0(♦), 0,1(■), 0,2(▲), 0,5(●) mM.

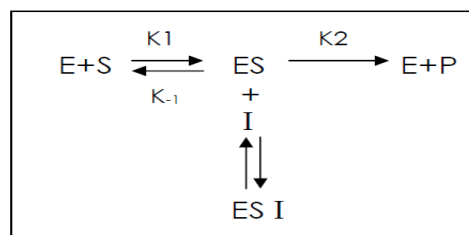


**Figure 35** : Représentation de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase en absence et présence du [colorant vert]= 0(♦), 0,4(■), 0,5(▲), 0,7(●) mM.



La représentation graphique de Lineweaver-Burk des résultats obtenus en absence et en présence de la tartrazine et du colorant vert à différentes concentrations, semble indiquer que les deux colorants exercent une inhibition incompétitive sur la carboxylestérase. En effet, les droites obtenues avec ou sans les deux colorants sont parallèles.

Dans l'inhibition incompétitive, l'inhibiteur se lie directement au complexe enzyme-substrat, sans pouvoir se fixer à l'enzyme libre comme l'indique le schéma suivant :



Avec :

**E** : Forme libre de l'enzyme;

**S** : Substrat de la réaction;

**P** : Produit de la réaction;

**I** : Inhibiteur;

**ES** : Complexe enzyme-substrat;

**ESI** : Complexe enzyme-substrat-inhibiteur;

**K<sub>1</sub>, K<sub>-1</sub>, K<sub>2</sub>** : Constantes de vitesse.

Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur se fixe réversiblement sur le complexe « ES » et déplace l'équilibre de la réaction vers le complexe « ESI », ce qui, en apparence, renforce la fixation du substrat sur l'enzyme. L'action de cet inhibiteur se traduit par une diminution de la vitesse maximale (V<sub>max</sub>) et la constante de Michaelis (K<sub>m</sub>). En augmentant la concentration de la tartrazine ainsi que du colorant vert, les paramètres cinétiques K<sub>m</sub> et V<sub>max</sub> apparentés, notés K<sub>m</sub>' et v<sub>max</sub>' respectivement, diminuent, traduisant ainsi l'effet d'un inhibiteur incompétitif. On a:

$$K_m' = \frac{K_m}{1 + [I]/K_i} \qquad V_{max}' = \frac{V_{max}}{1 + [I]/K_i}$$

L'inhibition incompétitive se rencontre rarement dans les réactions à un seul substrat. Ce type d'inhibition est plus fréquent dans les systèmes à multiples substrats comme c'est le cas de la carboxylestérase (**Weinman et Méhul, 2004**).

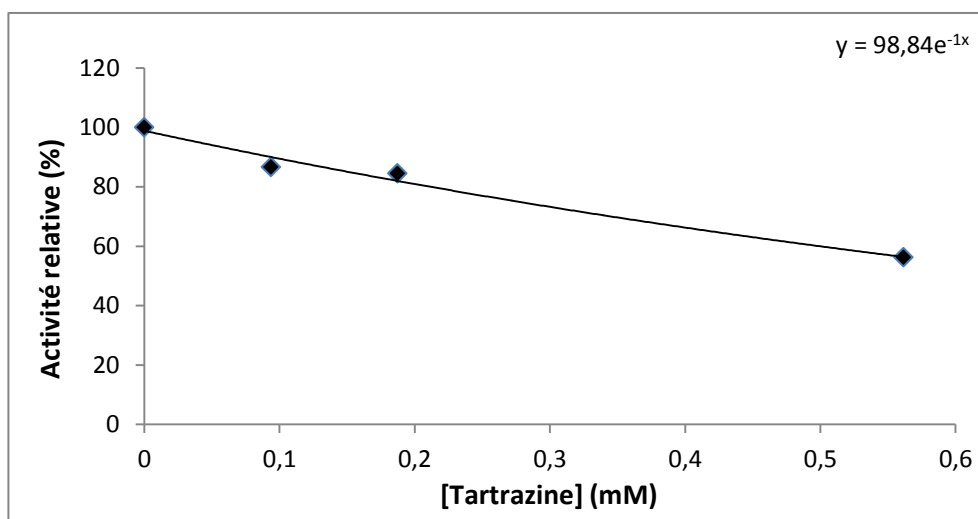
Les valeurs des paramètres cinétiques  $K_m'$  et  $V_{max}'$  ainsi que la constante d'inhibition «  $K_i$  » mesurées à partir des représentations graphiques de Lineweaver-Burk sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6** : Paramètres cinétiques de la carboxylestérase déterminés en absence et en présence de la tartrazine et du colorant vert.

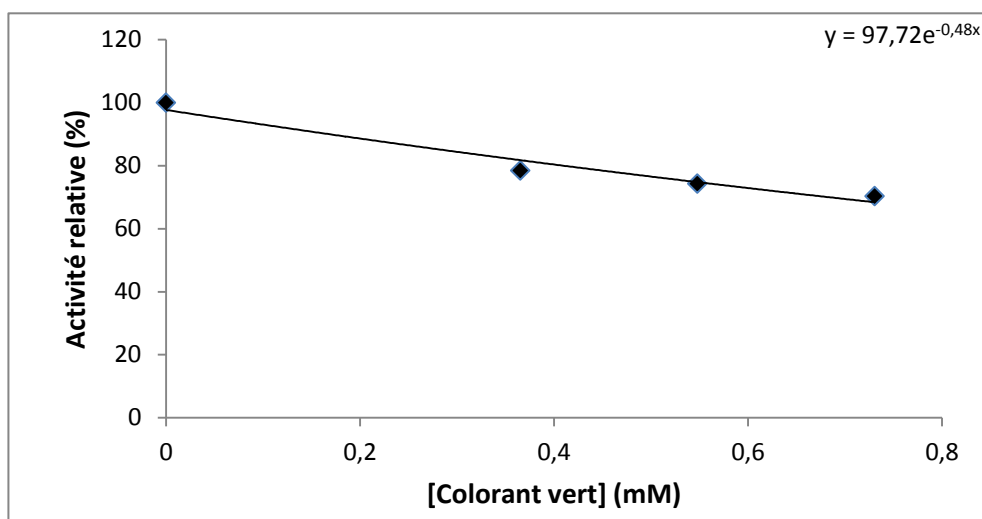
Colorants	Concentration (mM)	Paramètres cinétiques				
		$V_{max}$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	$V_{max}'$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	$K_m'$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	$K_i$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
Tartrazine E102	0	424,5	—	$7.10^{-3}$	—	—
	0,1	—	299	—	$2,6.10^{-3}$	$2.10^{-4}$
	0,2	—	284	—	$2,3.10^{-3}$	$3,8.10^{-4}$
	0,5	—	250	—	$1,8.10^{-3}$	$8.10^{-4}$
Colorant vert E102-E132	0	424,5	—	$7.10^{-3}$	—	—
	0,4	—	242,5	—	$2,8.10^{-3}$	$4,8.10^{-4}$
	0,5	—	234,3	—	$2,7.10^{-3}$	$6,7.10^{-4}$
	0,7	—	211,1	—	$2,1.10^{-3}$	$7,2.10^{-4}$

## XII. Détermination de la concentration inhibitrice IC<sub>50</sub>

L'effet de différentes concentrations des deux colorants de synthèse, la tartrazine et le colorant vert, sur l'hydrolyse du butyrate d'éthyle par la carboxylestérase du foie du porc, est représenté dans les figures 36-37 ci-dessous.



**Figure 36** : Effet de [Tartrazine] sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase.



**Figure 37** : Effet de [Colorant vert] sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase.

D'après les deux figures représentées ci-dessus, l'activité carboxylestérase diminue significativement avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteurs. Afin de comparer le pouvoir inhibiteur de ces deux colorants, nous avons déterminé à partir des deux représentations ci-dessus les valeurs d'IC<sub>50</sub>.

L'IC<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%. Sur les deux colorants testés, la tartrazine présente un effet inhibiteur puissant par rapport au colorant vert. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ainsi obtenues correspondent à 0,7 mM pour la tartrazine et 1,4 mM pour le colorant vert.

*Chapitre 4.*  
*Conclusion et Perspectives*

Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité et d'une spécificité fonctionnelle remarquables. *In vivo*, elles interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction. En effet, l'étude cinétique des enzymes vis-à-vis de plusieurs composés peut améliorer les connaissances concernant leurs mécanismes réactionnels.

Les multiples formes de la carboxylestérase jouent un rôle très important dans la biotransformation hydrolytique d'un grand nombre de xénobiotiques; ces enzymes sont des déterminants majeurs du comportement pharmacocinétique de la plupart des agents thérapeutiques.

La première phase de notre travail a consisté à étudier l'activité enzymatique d'hydrolyse d'un ester, le butyrate d'éthyle, par la carboxylestérase du foie de porc (EC 3.1.1.1) en fonction du temps. Ensuite, nous avons étudié l'influence du pH, de la température et de la concentration en substrat sur l'activité de cette enzyme, ce qui nous a permis d'estimer un pH optimum de 8,00, une température optimale de 45°C, ainsi qu'une énergie d'activation de 32 KJ.mol<sup>-1</sup>. Aussi, la courbe de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat a été décrite en utilisant une équation incluant une constante d'inhibition traduisant que la carboxylestérase est inhibée par un excès de ce substrat. Nous avons obtenu les paramètres cinétiques suivants à une température de 25°C et à pH 8:  $V_{max} = 504,6 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ,  $K_m = 9,5.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $K_s = 1,6.10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$ .

En dernier lieu, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de deux colorants azoïques de synthèse, la tartrazine (**E102**) et le colorant vert, (**E124-E171**) sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase. D'après les résultats obtenus, nous avons pu constater que ces deux colorants exercent une inhibition incompétitive vis-à-vis de la carboxylestérase.

*In vivo*, le foie peut faire subir au colorant un certain nombre d'étapes de dégradation par l'intervention des enzymes de détoxification dont la carboxylestérase. Par conséquent, l'identification de nouveaux agents inhibiteurs de l'activité enzymatique de la carboxylestérase, comme c'est le cas pour les

colorants testés, est très recherchée et a pour utilité de moduler le métabolisme, la distribution et la toxicité des agents qui sont soumis à une hydrolyse enzymatique.

De plus, nous avons constaté que l'étiquetage du colorant vert utilisé au cours de l'expérimentation ne correspond pas à la composition de ce dernier. En effet, l'utilisation des colorants de synthèse en Algérie est apparemment très répandue comme c'est le cas pour les pays industrialisés. Or, les données publiées par les auteurs occidentaux et anglo-saxons ne peuvent être le reflet de la situation en Algérie. Toutefois, l'utilisation de ces substances ne cesse d'augmenter, notamment dans l'industrie alimentaire. A notre connaissance, aucun travail n'a été pratiqué dans ce sens.

Compte tenu de ces observations et des études toxicologiques, une réglementation et un contrôle strict, vérifiant la conformité à la législation en vigueur, de l'usage des colorants de synthèse dans les aliments et dans les médicaments a été mise au point, limitant le nombre des colorants utilisés et précisant la dose journalière admissible (DJA) ainsi que l'indication de la mention « *peut avoir des effets indésirables sur l'activité et l'attention chez les enfants* » sur les étiquettes des produits alimentaires préemballés. Malheureusement, cette législation est loin d'être respectée et d'autres études sont indispensables pour une meilleure évaluation du risque de l'emploi de ces substances.

La biosécurité alimentaire est un sujet sensible et concerne directement la protection de la santé humaine. Pour cela, l'utilisation des colorants alimentaires doit être conforme aux normes internationales codex alimentaires de la (FDA) (Food and Drug Administration) et du comité mixte FAO/OMS (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation Mondiale de la Santé). Aussi, les industriels et les artisans devraient chercher d'autres espèces chimiques, y compris d'origine naturelle dont l'innocuité est avérée, qui pourraient remplacer ces colorants azoïques afin de limiter, dans la mesure du possible, la liste des colorants autorisés aux seules substances offrant le maximum de garanties toxicologiques et d'applications agro-sanito-industrielles potentielles possibles.

Afin de compléter et d'approfondir ce travail, nous proposons :

- ✓ L'extraction et la purification de la carboxylestérase à partir d'autres sources de mammifères, des végétaux et des micro-organismes, et l'étude des paramètres cinétiques.
- ✓ L'étude de la cinétique de la carboxylestérase en présence d'autres substrats ainsi que d'autres colorants de la famille des azoïques afin d'avoir une idée générale sur l'effet de ces colorants et des substances de structure apparentée sur l'activité de la carboxylestérase en tant qu'enzyme de détoxification.
- ✓ L'étude de la nature biologique de l'activité enzymatique et le rôle endogène de la carboxylestérase.
- ✓ L'étude de l'interaction de l'estérase hépatique et la fonction azo du point de vue de la chimie organique et de la pharmacologie, soit pour mettre au point une méthode de synthèse/dégradation d'un composé par voie enzymatique, soit pour concevoir un médicament agissant sur l'estérase.
- ✓ Comparaison entre l'effet des colorants azoïques alimentaires et ceux utilisés en textile dont le passage à travers la peau est prouvé, sur l'activité de la carboxylestérase.



*Références  
Bibliographiques*

1. Adler, A.J. and Kistiakowsky, G.B. Isolation and properties of Pig Liver esterase. *Journal of the American Biological Chemistry*, 1961, Vol. 236, pp. 3240-3245.
2. Adler, A.J. and Kistiakowsky, G.B. Kinetics of Pig Liver Esterase Catalysis. *Journal of the American Chemicals Society*, 1962, Vol. 84, pp. 695-703.
3. Agité, C., De Saint Blanquat, G. Colorants autorisé en alimentation humaine in additifs et auxiliaires de fabrication dans l'industrie agro-alimentaire. Multon Jean-Louis, Ed .Technique et documentation, Lavoisier, 2002, Vol. 17, pp. 357-386.
4. Agarwal,DP. Molecular genetics aspects of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacopsychiatry*, 1997, Vol. 30, pp. 79-84.
5. Altinoz, S., Toptan, S. Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2003, Vol. 16, pp. 517-530.
6. Alturkmani, M D. Approche anthropologique pour analyser les connaissances de chimie mises en jeu lorsque des étudiants conçoivent un protocole avec le logiciel Copex-chimie. Université Joseph Fourier. 2011, 24 p.
7. Amin, A., Abdel hameid, H., Abd elsttar, H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, Vol. 48, pp.2994–2999.
8. Antoniotti, S. Cours de biocatalyseur : Utilisation des enzymes pour la synthèse organique, France, 2008, pp. 55-60.
9. Anzenbacher, P., Zanger, M. Metabolism of drugs and other xenobiotics. *Library of congress card*, 2012, pp. 169 – 170.
10. Armand, L. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métalloprotéases, influence des paramètres physicochimiques. Th. doct. Toxicologie. Paris, Agro Paris Tec. 2011.
11. Audigié, C., Zonszain, F. Biochimie métabolique. 3ème édition, Doin éditeurs, 1995, pp. 58.
12. Augere, B. Les enzymes, biocatalyseurs protéiques. Ellipses édition, 2001, pp. 19.
13. Bangou, IG.,Kiendrebeogo, M., Compaore, M., Coulibaly, AY., Roland Meda N., Abarca, N., Zeba, B., Millogo-Rasolodimby J., Nacoulma, OG. Enzyme

Inhibition Effect and Polyphenolic Content of Medicinal Plant Extracts from Burkina Faso. *Journal of Biological Sciences*, 2011, Vol.11, pp. 31-38.

14. Barata, C., Solayan, A., Porte, C. Role of B-esterase in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol.* 2004, Vol. 66, pp. 125-139.

15. Beckemeier, E., Bora, S. Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, Vol. 30, pp. 2487-2494.

16. Belgaud, J. Les colorants industriels. *Encycl Méd Chir*, 1987, pp.7-5.

17. Bellott, R., Le Morvan, V., Charasson, V., Laurand, A., Colotte, M., Zanger, UM., Klein, K., Smith, D., Bonnet, J, Robert J. Functional study of the 830C>G polymorphism of the human carboxylesterase 2 gene. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008, Vol. 61(3), pp. 481-488.

18. Benaissa, Y. Etude cytogénétique sur du sang de souris après ingestion subchronique de la tartrazine. Th. Magister: Physiologie de la Nutrition et de Sécurité Alimentaire. Université d'Oran Es-Sénia, 2011, pp. 16-23.

19. Bencharit, S., Matthew R. Redinbo. Crystal Structures of Mammalian Carboxylesterases and Their Function in Drug and Xenobiotic Metabolism. *Science Highlight*, 2003, pp. 1-3.

20. Ben Mansour, H., Boughzala, O., Dridi, D., Barillier, D., Chekir-Ghedira, Leila., Mosrati, R. Les colorants textiles sources de contamination de l'eau : CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 2011, Vol. 24, n° 3, pp. 209-238.

21. Bertram, J., Krisch, K. Hydrolysis of Vitamin A Acetate by Unspecific Carboxylesterases from Liver and Kidney. *Eur. J. Biochem*, 1969, Vol. 11, pp. 122-126.

22. Bhatia, MS. Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. *J Clin Psychiatry*. 2000, Vol. 61(7), pp. 473-476.

23. Blanco, C., Campana, G., Barrero, A. Derivative spectrophotometric resolution of mixtures of the food colorants Tartrazine, Amaranth and Curcumin in a micellar medium. *Talanta*, 1996, Vol. 43, pp. 1019-1027.

24. Bornscheuer, T., Bornscheuer, T. Microbial carboxylesterases: classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, pp. 73-81.

25. Bornscheuer, T., Kazlauskas, J. Hydrolases in organic synthesis. Reio- and Stereo selective Biotransformations. 2006, pp. 166-167.

26. Bourrier, T. Intolérances et allergies aux colorants et additifs. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 2006, Vol. 46, pp. 68-79.
27. Brantom, P.G., Stevenson, B.I., Wright, M.G. Long-term toxicity study of Ponceau 4R in rats using animals exposed in utero. *Food Chem. Toxicol*, 1987, Vol. 25, pp. 955-962.
28. Brüsehaber, E., Böttcher, D., Musidlowiska-Persson, A., Albrecht, D., Hecker, M., Doderer, K., Bornscheuer, UT. Identification of pig liver esterase variants by tandem mass spectroscopy analysis and their characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007, Vol. 76(4), 853-859.
29. Burnstein, C. Biotechnologie enzymatique: Mode d'emploi: Industrie alimentaire – Environnement - Médical. Paris: *Economica*, 2000, pp. 63 -103.
30. Chaplin, M. Enzyme inhibition. In enzyme technology. *Cambridge University Press*, 2002, pp. 6 - 7.
31. Charasson, V., Bellot, R., Robert, J. Oncologie, pharmacogénétique de l'irinotécan : la carboxylestérase 2. France, 2005, Vol. 7 (1), pp. 55-61.
32. Chaveron, H. Introduction à la toxicology nutritionnelle. Technique et documentation, 1999, 214 p.
33. Chen, Z., Wang, Y., Ba, T., Li, Y., Pu, J., Chen, T., Song, Y., Gu, Y., Qian, Q., Yang, J., Jia, G. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters*, 2014, Vol. 226, pp. 314-319.
34. Chetioui, S. Structures et propriétés physico-chimiques de substances colorantes de synthèse. Th. Magister: Chimie : Université Mentouri Constantine, 2010, pp. 1-46.
35. Christie, RM., Metcalfe, DD., Sampson, A., Ronald Simon, A. Elimination of tartrazine. *Health & Fitness*, 2003, Vol. 36, 591 p.
36. Clydesdale, F M. Color as a factor in food choice, *crit. Rev. food Sci. nutr*, 1993, pp. 83-101.
37. Combes, R.D., Haveland-Smith, R.B. A review of the genotoxicity of food drug and cosmetic colors and others azo triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutat Res*, 1982, Vol. 98, pp. 101-248.
38. Coope, FJ., Main BG. Biocatalytic resolution of a tertiary quinuclidinol ester using *Pig liver esterase*. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol 6, June 1995, pp. 1393-1398.
39. Corder, EH., Buckley, CE 3rd . Aspirin, salicylate, sulfite and tartrazine induced Broncho constriction. Safe doses and case definition in epidemiological studies. *J Clin Epidemiol*, 1995, Vol. 48(10), pp. 1269-1275.

40. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (3<sup>ème</sup> éd.), Portland Press, 2004, Londres, 422 p.
41. Coutouly, G. Génie enzymatique une introduction. Paris : Masson et Doin, 1991, pp. 21-38.
42. Chung, KT., Stevens, SE., Egan, M., Cerniglia, CE. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit Rev Microbiol*, 1992, Vol. 18(3), pp. 175-90.
43. Damon. M., ET Guillouzo. Clonage de cytochromes p450 2b et analyse génétique de leur régulation par le phenobarbital dans le foie de souris = cloning of cytochromes p450 2b and génétic analysis of their regulation by phenobarbital in mouse liver, Th doc, Université de paris 07 , France, 1996, pp.4-21.
44. Das, A., Mukherrjee, A. Genotoxicity testing of the food colours Amaranth and tartrazine. *J Fd Chem Toxicol*, 2004, Vol. 4, pp. 277-280.
45. Davis, K., Fitzhugh, O., Nelson, A. Chronic rat and dog toxicity studies on tartrazine. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1964, Vol. 6, pp. 621-626.
46. Dean, R., Zhang, J., Brzezinski, M.A. Tissue distribution of cocaine methyl esterase and ethyl transferase activities: correlation with carboxylesterase protein. *J. Pharmacol. Exp.* 1995, pp. 965-969.
47. Djeridane, A., Brunel, JM., Vidal, N., Yousfi, M., Ajandouz, EH., Stocker,P. Inhibition of porcine liver carboxylestérase by new flavone glucoside isolated from *Deverra scoparia*. *Chemico- Biological Interactions*. 2008, Vol. 172, pp. 22-26.
48. Einarsson, J., Sigmundsson, K., Filippusson, H. Purification and some properties of a carboxylesterase from ovine liver. *Comp. Biochem. Physiol*, 1996, Vol. 114, pp. 41-48.
49. Farb, D., Jencks, W. D. Different forms of pig liver esterase, *Arch. Biochem. Biophys*. 1980, Vol. 203, pp. 214-226.
50. Fickers, P., Destain, J., Thonart, P. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 2008, Vol. 12, pp. 119-130.
51. Fleming, D., Bencharit, S., Edwards, C., Hyatt, L., Tsurkan, L., Bai,F., Fraga, C., Morton, L., Howard,L., Potter, M., Redinbo, R. Structural insights into drug processing by Human Carboxylesterase 1: Tamoxifen, Mevastatin and Inhibition by Benzil. *J. Mol, Biol*, 2005, Vol. 352, pp. 165-175.
52. Gallen, C., Pla, J. Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue française d'allergologie*, 2013, Vol. 53, pp. 9-18.
53. Gao, Y., Li, C., Shen, J., Yin, H., An, X., Jin, H. Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats and the possible

- mechanisms involved. *Institute of Food Technologists*, 2011, Vol. 76, pp.125 -129.
54. Garrett, R.H., Grisham, C. M. *Biochimie*. 2<sup>ème</sup> édition, De Boeck Université, 2000, pp. 442.
55. Gaunt, I., Farmer, M., Grasso, P., Gangolli, S. Acute (mouse and rat) and short-term (rat) toxicity studies on Ponceau 4R. *Food Cosmet. Toxicol*, 1967, Vol. 5, pp. 187-194.
56. Gavrilovic, M., Maginot, J., Schwartz, C., Wallach, J. *Manipulations d'analyse biochimique* 3<sup>ème</sup> édition. Doin éditeurs, 1996, pp. 158 – 160.
57. Gershater, MC., Cummins, I., Edwards, R. Role of a carboxylesterase in herbicide bioactivation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 2007, Vol. 282(29), pp. 21460-6.
58. Giri, AK., Das, S.K., Talukder, G., Sharma, A. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations induced by curcumin and tartrazine on mammalian cells in vivo. *Cytobios*, 1990, Vol. 62, pp.111-117.
59. Godet, S. Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la microalgue marine *Isochrysis galbana* (*Prymnesiophyceae*, *Haptophyta*). Th. doct : Biophysiology des Organismes et des Populations. Université du Maine, 2008.
60. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. 1949, pp. 751 - 776.
61. Harada, T., Nakagawa, Y., Wadkings, M., Potter, M., Wheelock, E. Comparison of benzil and trifluoromethyl ketone (TFK)-mediated carboxylesterase inhibition using classical and 3D-quantitative structure–activity relationship analysis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009, Vol. 17, pp. 149-164.
62. Hasenpusch, D., Bornscheuer, UT., Langel W. Simulation on the structure of pig liver esterase. 2011, pp. 1- 24.
63. Hassan, GM. Effects of some synthetic coloring additives on DNA damage and chromosomal aberrations of rats. *Arab J. Biotech*, 2010, Vol. 13, pp. 13-24.
64. Hatfield, M., Potter, M. Carboxylesterase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, Vol. 21, pp. 1159-1171.
65. Heymann, E. Hydrolysis of carboxylic ester and amides. *Metabolic basis of detoxification*. 1982, pp. 229-245.
66. Holmes, R.S., Unecox, L., Vandenberg, J. Une nouvelle classe de carboxylesterase des mammifères CES6. *Comp Biochem Physiol, U.S.A.*, 2009, Vol. 4, N°3, pp. 209- 217.

67. Hooson, J., Gaunt, I. F., Kiss, S., Grasso, P., Butterworth, K.R. *Fd Cosmet. Toxicol*, 1975, Vol. 13, pp. 167-176.
68. Hosakawa, M., Satoh, T. Carboxylesterases: overview, structure, function and polymorphism, 2010, pp. 43-56.
69. Hosokawa, M. Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs, *Molecules*, 2008, Vol. 13, pp. 412-431.
70. Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V. The database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins, *Database issue*. 2004, pp. 145-147.
71. Huang, T., Shiotsuki, T., Uematso, T., Borhan, B., Li, Q., Hammock, B. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of mammalian liver microsomal carboxylesterases. *Pharmaceutical Research*, 1996, Vol. 13, pp. 1495-1500.
72. Humerickhouse, R., Lohrbach, K., LI, L. Characterization of CPT-11 Hydrolysis by Human Liver Carboxylesterase Isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res*, 2000, Vol. 60, pp. 1189-1192.
73. Imai, T. Human carboxylesterase isoenzymes: Catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab. Pharmacokinet*, 2006, Vol. 21, pp. 173 -185.
74. Imai, T. Hydrolysis by carboxylesterase and disposition of prodrug with Ester Moiety. *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Japan*, 2010, Vol. 38(2), pp. 323 – 331.
75. Imai, T., Hosokawa M. Prodrug approach using carboxylesterases activity: catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue. *Journal of Pesticide Science*. 2010, Vol. 35, pp. 229-239.
76. Inkerman, PA., Winzor, DJ., Zerner B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). The molecular sizes of chicken and pig liver carboxylesterases. *Can J Biochem*. 1975, Vol. 53(5), pp.547-60.
77. Inomata, N., Osuna, H., Fujita, H., Ogawa, T., Ikezawa, Z. Multiple chemical sensitivities following intolerance to azo dye in sweets in a 5-years-old girl. *Allergol Int*, 2006, Vol. 55, pp. 203-205.
78. Ishidate, M., Sofuni, J., Yoshikawa, K. Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann. Monogr Cancer Res*, 1981, Vol. 27, pp. 95-108.
79. Ishidate, M., Sofuni, J., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M., Mastuka, A. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, *Food Chem Toxic*, 1984, Vol. 22, pp. 623-636.

80. Jain, R., Bhargava, M., Sharma, N. Electrochemical studies on a pharmaceutical azo dye: Tartrazine. *Applied chemistry. Ind. Eng. Chem. Res.*, 2003. Vol. 42, pp. 243-247.
81. Jawetz, E., Melnick, L., Adelberg, A. *Microbiologie médicale*. Paris : Librairie Maloine, 1973, pp. 68.
82. Journal officiel n° 197/EU, 1994
83. Kamoun, P. *Appareils et méthodes en biochimie*. Paris : Flammarion, Médecine - Sciences, 1997, pp. 199 - 212, 223 - 230, 291 -298.
84. Kapor, MA., Yamanaka, H., Carneiro PA., Zanoni MVB. Eletroanalise de colorantes alimentaires : Determinação de indigo carmine tartrazine. Sao Paulo : Scielo Brazil, 2001, Vol. 26, pp. 100-195.
85. Ketterman, A. J., Jayawardena, K. G., Hemingway, J. Purification et caractérisation d'une carboxylestérase impliquée dans la résistance aux insecticides du moustique *Culex quinquefasciatus*. Royaume Uni, *Biochem. J.*, 1992, Vol. 15, N°287, pp. 355-360.
86. Kyeong, K., Hyun, K., Dong, H., Kwang, Y., Senyon, C., Ook, J., Se, W. Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an  $\alpha/\beta$  hydrolase with broad substrate specificity. *Current Biology*, 1997, Vol. 5, pp. 1571-1572.
87. Lehninger, A.L. *Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires*. 2ème édition. Flammarion, 1977, pp.191-192.
88. Lemerini, W. Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*).Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique. Th. Magister: Substances naturelles, activités biologiques et synthèses. Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, 2006, pp. 14-20, 53-65, 90-105.
89. Lepoittevin, J.P. *Métabolisme cutané: Diagnostic de l'allergie aux médicaments*. Paris : Ed Eurotext, 2005, Vol. 7, pp. 29-40.
90. Levine, N., Lavis, D., Raines, T. Trimethyl Lock: A Stable Chromogenic Substrate for Esterases. *Molecules*, 2008, Vol. 13, pp. 204-211.
91. Levy, M., Ocken, P. Purification and properties of pig liver esterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1969, Vol. 135, pp. 259-264.
92. Li, N., Lei, M. Adsorption of ponceau 4R from aqueous solutions by polyamidoamine-cyclodextrin crosslinked copolymer. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2012, Vol. 74, pp. 167-176.
93. Lima, D., Roque, G., Almeida, E. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Daniorerio*). *Marine Environmental Research*, 2013, Vol. 90, pp. 45-51.



94. Liska, DJ. The Detoxification Enzyme Systems. *Altern Med Rev*, 1998, Vol. 3(3), pp. 187-198.
95. Liu, P. Structural, Kinetic and Mutational Analysis of Two Bacterial Carboxylesterases. *Biology Dissertations*, 2008, pp. 5, 6, 7, 8.
96. Lomer, M., Thompson, R., Commisso, J., Keen, C., Powell, J. Determination of titanium dioxide in foods using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analyst*, 2000, Vol. 125, pp. 2339-2343.
97. Loncle, D. Génie enzymatique. Paris: Doin, 1992, pp. 3 -21, 131-146.
98. Looze, SD., Deimling, OV., Ronai, A. Kinetic studies on esterase 6A, a trimeric esterase of the house mouse (*Mus musculus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1985, Vol. 82, Issue 2, pp. 357-364.
99. Maclaren, K. The Colour Science of Dyes and Pigments. *Boston: Adam Hilger Ltd.*, 1985.
100. Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Kanno J, et al. Lack of carcinogenicity of tartrazine (FD & C Yellow No. 5) in the F344 rat. *Food Chem Toxicol*, 1987, Vol. 25, pp. 891-896.
101. McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, JO., Stevenson, J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2007, Vol. 370(9598), pp.1560-7. Erratum in: *Lancet*. 3 Nov 2007, Vol. 370(9598), 1542 p.
102. Mehedi, N., Ainad-Tabet, S., Mokrane, N., Addou, S., Zaoui, C., Kheroua, O., Saidi, D. Reproductive Toxicology of Tartrazine (FD and C Yellow No. 5) in Swiss Albino Mice. *American Journal of Pharmacology and Toxicolog* , 2009, Vol. 4 (4) , pp. 130-135.
103. Mehedi, N., Mokrane, N., Alami, O., Ainad-Tabet, S., Zaoui, C., Kheroua, O., Saidi, D. A thirteen week *ad libitum* administration toxicity study of tartrazine in Swiss mice. *African Journal of Biotechnology*, 2013, Vol. 12.28, pp. 4519-4529.
104. Metais, P., Agneray, J., Ferard, G., Fruchart, J.C., Jardillier, J.C., Revol, A., Siest, G., Stahl, A. *Biochimie clinique*. Villeurbanne cedex, SIMEP, 1977, pp. 93, 113 -114.
105. Meyer, O., Hansen, E.V. A study of the embryo toxicity of the food colour Ponceau 4R in rats. *Toxicology*, 1975, Vol. 5, pp. 201-207.
106. Michel, V. *Toxicologie*. 3<sup>ème</sup> édition, éditions Wolters Kluwer SA, 2007, pp. 535.

107. Miller, K. Sensitivity to tartrazine. *British medical journal*. 1982, Vol. 285, pp. 1597-1598.
108. Mittal, A., Mittal, J., Kurup, L. Batch and bulk removal of hazardous dye, indigo carmine from wastewater through adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 2006, Vol. 137, pp. 591-602.
109. Momma, J., Kawamata, K., Takada, K., Horiuchi, S., Tobe, M. A study on teratogenicity of new cocchine, Food Red No. 102, in mice. *Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci*, 1981, Vol. 99, pp. 73-78.
110. Moneret-Vautrin, DA., André C. Allergie et intolérance aux additifs. Immunopathologie de l'allergie alimentaire et fausses allergies alimentaires. 1<sup>re</sup> éd. Paris: Masson, 1983, pp. 181-202.
111. Morana, A., Prizito, DI.N., Orilia, V., Rossi, M., Cannio, R. Une carboxylesterase de la hypermophiles Archaeon Sulfolobus Solfataricus : le clonage du gène, la caractérisation de la protéine. Italie, 2002, Vol. 283, pp. 107 - 115.
112. Moutinho, I.L., Bertges, L.C., Assis, R.V. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n°5) and its effects on the gatric mucosa of Wistar rats. *Braz J Biol*, 2007, Vol. 67, pp. 14-15.
113. Mouranche, A. Mode d'action des hydrolases. Hydrolases et dépolymérasés. Enzyme d'intérêt industriel. Coordonateurs : Mouranche, A et Costes, C. Paris : Bordas, Gauthier - Villars, 1985, pp. 38 - 43.
114. Multon, J L. Colorants autorisé en alimentation humaine in additifs et auxiliaires de fabrication dans l'industrie agro-alimentaire. Ed .Technique et documentation, Lavoisier, 2002, Vol. 17, pp. 357-386.
115. Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V. Biochimie de HARPER. 25ème édition. Belgique : De BOECK, 2003, pp. 48 - 136, 627- 641.
116. Nardini, M., Dijkstra, W.  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, Vol. 9, pp. 732-737.
117. Nevado, B., Lores, R., Lerena, V. Simultaneous spectrophotometric determination of Tartrazine, Sunset Yellow and Ponceau 4R in commercial products by partial least squares and principal component regression multivariate calibration methods. *Fresenius J Anal Chem*, 1998, Vol. 361, pp. 465-472.
118. Newman, J.W., Morisseau, C., Hammock, B. Epoxide hydrolases : their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res*. 2005, Vol. 44, pp. 1-51.
119. Ould Elhkim, M., Héraud, F., Bemarh, N., Gauchard, F., Lorino, T., Lambré, C., Frémy, JM., Poul JM. New considerations regarding the risk assesment on Tartrazine; An update toxicological assesment, intolerance reactions and

- maximum theoretical daily intake in France. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2007, Vol. 47, pp. 308-316.
120. Palmer, T. Understanding enzymes. 2ème édition. *Ellis Horwood Limited*. 1985, pp.162 -163.
121. Parkinson, A. Biotransformation of Xenobiotics. *Copyright, The McGraw-Hill Companies*, 2001, pp. 133-150.
122. Pelmont, J. Enzymes. Alger : Office des publications universitaires, 1993, pp. 167-203, 217-240.
123. Perrier, R., Auffrel, T., Zonszain, F. Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques. Doin éditeurs, 1997, pp. 70.
124. Pesaresi, A., Devescovi, G., Lamba, D., Venturi, V., Degrassi, G. Isolation, characterization, and heterologous expression of a carboxylesterase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Current microbiology*, 2005, Vol. 50, pp. 102-109.
125. Redonbo, M.R., Bencharit, S., Potter, P.M. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery. *Department of Chemistry, University of North Carolina, U.S.A*, 2003.
126. Redinbo, R., Potter, M. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, 2005, Vol. 10, pp. 313-325.
127. Robert, D., Vian, B. éléments de biologie cellulaire. 3ème édition, Doin, 2004, pp. 74 -75.
128. Rosenhall, L. Evaluation of intolerance to analgesics, preservatives and food colorants with challenge tests. *Eur. J. Respir. Dis.* 1982, Vol. 63(5), pp.410-419.
129. Ross, K., Streit, M., Herring, L., Xie, S. Carboxylesterases: dual roles in lipid and pesticide metabolism, *Journal of Pesticide Science*. 2010, Vol. 35, pp. 257-264.
130. Sanghani, SP., Quinney, SK., Fredenburg, TB., Sun, Z., Davis, WI., Murry, DJ., Cummings, OW., Seitz, DE., Bosron, WF. Carboxylesterases expressed in human colon tumor tissue and their role in CPT-11 hydrolysis. *Clin Cancer Res*. 2003, Vol. 9(13), pp. 4983-4991.
131. Sanghani, SP., Sanghani, PC., Schiel, MA., Bosron, WF. Carboxylestérases humaines : une mise à jour sur CES1, CES2 et CES3 protéines. *Pept. Lett. USA*, 2009, Vol. 16 (10), pp. 7-14.
132. Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res*, 2002, Vol. 519, pp. 103-109.

133. Satoh, T., Hosokawa, M. Carboxylesterases: structure, function and polymorphism in mammals, *Journal of Pesticide Science*, 2010, Vol. 35, pp. 218-228.
134. Satoh, T., Hosokawa, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, Vol. 162, pp. 195-211.
135. Scott, K., Hamilton, S., Zerner, B. Purification and properties of a carboxylesterase from the liver of tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). *Revue canadienne de biochimie*, 1976, Vol. 54, 453-461.
136. Scott, K., Zerner, B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). Amino acid composition of liver Carboxylesterases. *Can. J. Biochem*, 1975, Vol. 53, pp. 561-564.
137. Servais, P. La matière organique dans les milieux naturels. Presse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, octobre, 1999, pp. 49.
138. Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., Novak, S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol*, 2011, Vol. 45, pp. 227-247.
139. Stoops, J.K., Hamilton, S.E., Zerner, B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). A Comparison of Some Kinetic Properties of Horse, Sheep, Chicken, Pig, and Ox Liver Carboxylesterases. *Can. J. Biocitem.*, 1975, Vol. 53, pp. 565-573.
140. Streit, M., Borazjani, A., Lentz, E., Wierdl, M., Potter, M., Gwaltney, R., Ross, K. Evaluation of the 'side door' in carboxylesterase-mediated catalysis and inhibition, *Biol. Chem*, 2008, Vol. 389, pp. 149-162.
141. Takahashi, S., Katoh, M., Saitoh, T., Nakajima, M., Yokoi, T. Different inhibitory effects in rat and human carboxylesterases. *Drug Metab Dispos.* 2009, Vol. 37(5), pp. 956-61.
142. Taketani, M., Shii, M., Ohura, K., Ninomiya, S., Imai, T. Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life Sciences*, 2007, Vol. 81, pp. 924-932.
143. Tamm, C. Pig liver esterase catalyzed hydrolysis: substrate specificity and stereoselectivity. *Printed In Great Britain IUPAC*. 1992, pp.1187-1191.
144. Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S., Ogata, A. Effects of tartrazine on exploratory behavior in a three-generation toxicity study in mice. *Reproductive Toxicology*, 2008, Vol. 26, pp. 156-163.
145. Teruko, P., L'hydrolyse par la carboxylesterase et la disposition du promédicament avec un groupement ester. 2007 Vol 127, N° 4, pp. 611 – 619.
146. Tsuda, S., Komatsu, H., Imura, Y., Ohori, A., Nagata, y. Distribution and organization of auxotrophic genes on the multichromosomal genome of

*Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *J Bacteriol.* 2001, Vol. 185, pp. 3333-3343.

147. Upadhyaya, G., Govardhan, L., Veerabhadrapa, S. Purification and properties of a carboxylesterase from germinated finger millet (*Eleusinecoracana* Gaertn.). *J. Biosci.* 1985, Vol. 7, pp. 289-301.

148. Viau, C., Tardif, R. Toxicologie. Edisem/tec et doc. Paris, 2003, pp. 119-141.

149. Vobecky, J.S. Les additifs alimentaires: La controverse. *Can Fam Physician*, 1982, Vol. 28, pp.746-751.

150. Voet, D., Veot, J.G. Biochimie ; 2ème édition. De Boeck et Larcier. Bruxelles, 2005, pp. 127 – 129.

151. Volonakis, M., Katsarou-Katsari, A., Stratigou s J. Etiologic factors in childhood chronic urticaria. *Ann. Allergy*, 1992, Vol. 69, pp. 61-65.

152. Wakai, S., Hashimoto, K., Watanabe, N., Inoh, S., Ochiai, C., Nagai, M. Efficacy of closed system drainage in treating chronic subdural hematoma: a prospective comparative study. *Neurosurgery*, 1990, Vol. 26, pp. 771-773.

153. Wang. J., Bourgea. J., Eric. T., Williams, Wong, N., Atten, C. Expression and characterization of recombinant human carboxylesterase 1 and 2 in baculovirus-infected High Five Incect Cells. Presented as a poster, International Society for the Study of Xénobiotic Meeting, 2009, pp.2.

154. Wang, M., Zhang, J., Ding, N., Chen, Z. Detection of Ponceau 4R in foods based on an expanded graphite paste electrode. *Intern. J. Environ. Anal. Chem*, 2014, Vol. 94, pp. 223-232.

155. Watab, T., Ozawa, N., Kobayashi, F., Kurata, H. Reduction of sulphonated water-soluble azo dyes by micro-organismes from human faeces. *Food Cosmet Toxicol*, 1980, Vol. 18, pp. 349-352.

156. Weber, RW., Hoffman, M., Raine, DA., Nelson, HS. Incidence of broncho constriction due to aspirin, azo dyes, no azo dyes, and preservatives in a population of perennial asthmatics. *J Allergy Clin. Immunol*, 1979, Vol. 64, pp. 32-37.

157. Weil, H.J. Biochimie générale. 8ème édition. Paris : Masson, 1997, pp. 19 - 87.

158. Weil, H.J. Biochimie générale. 10ème édition. Paris : Masson, 2005, pp. 86 - 88.

159. Weinman, S., Mehul, P. Toute la biochimie. Dunod, Paris, 2004, pp. 97.

160. Wheelock, E., Bryn, M., Brian, S., Jeff, L., Mike, J., and Bruce, D., application of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 2008, pp. 117-178.
161. Wheelock, E., Colvin, E., Uemura, I., Olmstead, M., Sanborn, R., Nakagawa, Y., Jones, A., Hammock, D. Use of ab Initio calculations to predict the biological potency of Carboxylesterase Inhibitors. *J. Med. Chem*, 2002, Vol. 45, pp. 5576-5593.
162. Wheelock, E., Shan, G., Ottea, J. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 2005, Vol. 30, pp. 75-83.
163. Wilens, TE., Cohen, L., Biederman, J., Abrams, A., Neft, D., Faird, N., Sinha, V. Fluoxetine pharmacokinetics in pediatric patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2002, Vol. 22(6), pp.568-575.
164. Wynne, D., Ginsburg, S., Shalitin, Y. Beef Liver Esterase. Kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1973, Vol. 154, pp. 204-211.
165. Yoon, P., Hyatt, L., Morton, L., Lee, R., Potter, M., Danks, M. Characterization of inhibitors of specific carboxylesterases: Development of carboxylesterase inhibitors for translational application. *Mol cancer*, 2004, Vol. 3, pp. 903-909.
166. Zhenwang, L., Zhenlu, C., Jianyan L. The PT dye molecular structure and its chromophoric luminescences mechanism. 15th World Conference on Non-Destructive Testing, October 2000, pp. 15-21.
167. Zhou, J., Riley, C. M., Schowen, R. L. In vitro metabolism studies of the prodrug, 2', 3', 5'-triacetyl-6-azauridine, utilizing an automated analytical system. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, 2001, Vol. 26, pp. 701-716.

# *Annexes*

## **Annexe 1. Préparation des solutions**

### **I. Composition du réactif de biuret**

- 6 g sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 6 g de tétrate double de sodium et de potassium.
- 30 g d'hydroxyde de sodium.
- 1 g d'iodure de potassium.
- 1000 ml d'eau distillée.

Les réactifs doivent être mélangés dans l'ordre indiqué ci-dessus. Le réactif de biuret doit être conservé à l'abri de la lumière.

### **II. Solution tampon Borax/HCl 0,125M (pH 8,00)**

- La solution « A » est une solution de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  à 0,025M, cette solution est obtenue par dissolution de 9,534g de Tétraborate de sodium dans 1000ml d'eau distillée.
- La solution « B » est une solution de HCl à 0,1M, elle est obtenue après avoir ajouté 8ml d'HCl dans de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1000ml.

Après avoir préparé les deux solutions « A » et « B », on mélange 100ml de la solution A et 41 ml de la solution « B », puis on ajoute 59ml d'eau distillée pour obtenir un volume final de 200ml de solution tampon d'acide borique à pH 8,00.

### **III. Tampon phosphate**

- La solution « A » est obtenue après dissolution de 9,64g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dans 1000ml d'eau distillée.
- La solution « B » est une solution de potassium phosphate, elle est obtenue par dissolution de 9,06g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans 1000ml d'eau distillée.

La solution « B » est stockée dans un bécher de 1000ml, puis on ajoute goutte à goutte la solution « A » jusqu'à obtention du pH désiré (de 5,2 à 10,9).



#### IV. Solution tampon KCl/HCl 0,2M - pH 1,2 - 2,0

- Pour obtenir une solution tampon (KCl/HCl) d'un pH de 1,2 (2,0), on mélange 25ml (5,9ml) de la solution A (KCl 0,2M) et 36ml (50,7ml) de la solution B (HCl 0,2M) puis on complète le volume à 100ml par de l'eau distillée.

#### V. Solution tampon d'acide citrique/phosphate disodique 0, 3M - pH 3 et 4

- Pour obtenir une solution de pH 3 (4), on mélange 80,3ml (62ml) de la solution A (acide citrique 0,1M) et 19,7ml (48ml) de la solution B (phosphate disodique 0,2M).

#### Annexe 2. Publication internationale

Ce travail de thèse a été effectué au sein du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, il a donné lieu à une publication dans une revue renommée internationale à comité de lecture :

**Lemerini, W.**, Arrar, Z., Kajima Mulengi J., Dahmani, Z., Drici, W., Bouazzaoui, N., Bendiabdellah, D. Inhibitory effects of the Food Azo Dyes on Pig Liver Carboxylesterase Activity. *Current Enzyme Inhibition*. 2015. Vol. 11, No 2. pp.147-152.

# *Résumés*

## Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude de l'effet de quelques colorants azoïques (la tartrazine (E102) et le colorant vert (E102-E132)) sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase hépatique porcine.

L'activité de la carboxylestérase a été étudiée en fonction du pH, de la température, de la concentration en substrat (le butyrate d'éthyle) et en présence de la tartrazine et du colorant vert. La mesure de la vitesse initiale de l'hydrolyse a conduit aux résultats suivants : la carboxylestérase présente une activité maximale à un pH de 8,00 et à une température de 45°C. L'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse est estimée à 32 KJ.mol<sup>-1</sup>. Cette enzyme est inhibée par un excès de butyrate d'éthyle et les valeurs des paramètres cinétiques obtenues dans les conditions opératoires standards sont :  $V_{max} = 504,6 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ,  $K_m = 9,5.10^{-3} \text{mol.l}^{-1}$ ,  $K_s = 1,6.10^{-1} \text{mol.l}^{-1}$ .

La tartrazine et le colorant vert exercent une inhibition de type incompétitive sur la carboxylestérase en diminuant les valeurs des paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $K_m$ . Ainsi, la tartrazine a montré un effet inhibiteur élevé par rapport au colorant vert. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues sont 0,7mM pour la tartrazine et 1,4 mM pour le colorant vert.

De plus, on a constaté après des tests spectrophotométriques des colorants que l'étiquetage du colorant vert utilisé au cours de l'expérimentation ne correspondait pas à la composition de ce dernier. Pour cela, la réglementation, en ce qui concerne les colorants, doit être rigoureuse et suivie d'un contrôle strict.

**Mots clés :** Carboxylestérase du foie de porc, estérase, butyrate d'éthyle, colorants azoïques, tartrazine, inhibiteur.

## Summary

This work is a contribution to the study of the effect of some azo dyes (tartrazine (E102) and green dye (E102-E132)) on the enzymatic activity of the pig liver carboxylesterase.

The activity of this enzyme was assessed as a function of pH, temperature, substrate concentration (ethyl butyrate) and conducted in the presence of two dyes, namely tartrazine and green dye. Measuring the initial rate of hydrolysis afforded the following results: the carboxylesterase had a maximum activity at pH 8.00 at 45 ° C. The activation energy for the hydrolysis reaction was found to be 32 KJ.mol<sup>-1</sup>. Moreover, this enzyme was inhibited by an excess of ethyl butyrate and the values found for kinetic parameters in the standard experimental conditions were the following:  $V_{max} = 504,6 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ;  $K_m = 9,5.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ;  $K_s = 1,6.10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$ .

Tartrazine and green dye showed an uncompetitive inhibition on carboxylesterase, thus reducing the kinetic parameters such as  $V_{max}$  and  $K_m$ . Tartrazine had the highest inhibitory effect compared to green dye as seen through  $IC_{50}$  values, with 0,7mM for tartrazine and 1,4 mM for green dye.

In addition, spectral analysis showed that the actual content of the green dye did not correspond to its label found on the can. As a matter of fact, this dye was made of a mixture of two different dyes. Therefore, a strict control should be kept on the use of food dyes whereas regulation should be enforced the closest way possible.

**Keywords:** Pig liver carboxylesterase, esterase, ethyl butyrate, azo dyes, tartrazine, inhibitor.

## ملخص

هذا العمل هو مساهمة لدراسة تأثير بعض الملونات الغذائية (التارترازين (E102) والملون الأخضر (E102-E132)) على النشاط الأنزيمي للكربوكسيل إستيراز المستخلص من كبد الخنزير.

تمت دراسة عمل الكربوكسيل إستيراز بدلالة درجة الحموضة ودرجة الحرارة وتركيز الركازة (Ethyle butyrate) و في وجود ملونين غذائيين وهما التارترازين والملون الأخضر. قياس السرعة الابتدائية للتحلل أعطت النتائج التالية : كان النشاط الأنزيمي الأقصى للكربوكسيل إستيراز في درجة الحموضة 8.00 في 45 درجة مئوية. وطاقة التنشيط للتفاعل التحلل وجد أنه يساوي 32 كج.مول<sup>-1</sup>.

وعلاوة على ذلك، تم تثبيط هذا الإنزيم من خلال إفراط في تركيز الركازة (Ethyle butyrate) في الشروط التجريبية و حسب القيم التالية:  $K_s = 1,6 \cdot 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $V_{\text{max}} = 504,6 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_m = 9,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$

التارترازين (E102) والملون الأخضر (E102-E132) يثبطان عمل الكربوكسيل إستيراز مع انخفاض كل من  $V_{\text{max}}$  و  $K_m$  بنتيبيط من نوع *Incompétitif*. التارترازين لها أعلى تأثير كبح بشكل خاص بالمقارنة مع والملون الأخضر كما يتضح من خلال القيم  $IC_{50}$ ، مع 0,7 mM للتارترازين و 1,4 mM للملون الأخضر.

وبالإضافة إلى ذلك، أظهر التحليل الطيفي للملون الأخضر نتائج لم تتوافق مع التسمية و المعلومات الموجودة على العلبة. كما أن واقع الأمر، أن هذا الملون مصنوع من مزيج من اثنين من الملونات الغذائية. لذلك يجب أن تكون هناك مراقبة صارمة على استخدام الألوان المختلفة.

**كلمات البحث:** الكربوكسيل إستيراز المستخلص من كبد الخنزير ، الإستيراز ، Ethyle butyrate ، أصباغ الأزو، التارترازين، مثبط.