

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Et des Sciences de la Terre et de l'Univers**

**Département de Biologie**

**Mémoire**

**Pour l'obtention du diplôme de master en Biologie**

**Option : Alimentation et Nutrition**

**Thème**

**Contribution à l'étude de l'activité enzymatique  
de la carboxylestérase  
en présence d'un colorant alimentaire azoïque**

Présenté par : **Mr Khelifi Nadjib**

Soutenu le : **22 Septembre 2013**, devant le jury composé de :

Mr BELYAGOUBI L.	Maitre assistant A	<b>Président</b>
Melle BELKACEM N.	Maitre assistant A	<b>Examineur</b>
Melle LEMERINI W.	Maitre assistant A	<b>Rapporteur</b>

Année Universitaire : 2012-2013

## Remerciement

*Au terme de ce travail, il m'est agréable d'adresser mes plus vifs remerciements à tout ce qui ont contribué à sa réalisation.*

*Je remercie Melle Lemerini Wafaa Maitre assistante à l'université de Tlemcen pour son encadrement, pour sa précieuse aide et de n'avoir négligé aucun effort pour m'apporter soutien et recommandation. Ces précieux conseils et ces qualités de rigueurs scientifiques ont largement contribué à mon travail.*

*J'adresse mes remerciements aux membres de mon jury, notamment Mr Belyagoubi Larbi d'avoir présider mon jury, ainsi que Melle Belkacem Nacera d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce manuscrit.*

*Je remercie également Mr J. Kajima Mulengi, directeur du laboratoire « COSNA » pour m'avoir permis de suivre ma pratique au sein de son laboratoire.*

*Mes remerciement vont aussi à Mr Benariba Hassane, Mr Dahmani Zoheir, et particulièrement Melle Sahraoui Souad.*

## *Dédicace*

*Grâce à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mes parents en témoignage de ma reconnaissance pour tout ce que je leur dois. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon amour.*

*A ma grand-mère hadja fatma, ainsi qu'à mes sœurs, mon frère, mon neveu Hamoud, et ma nièce Hadjer,*

*A Melle Lemerini Wafaa, qui ma beaucoup aidé et soutenue tout au long de ce travail.*

*A mes chers camarades de biologie, Sahraoui Souad, Mebkhouti Mohammed et Mohammedi Meriem..*

*Ainsi qu'à tout mes amis, en particuliers Sadji Merouane .*

*A ma grande famille.*

*Nadjib*

# Table de matière

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>5</b>
I. La carboxylestérase.....	6
I.1. Généralité.....	6
I.2. Définition.....	7
I.3. Classifications.....	10
I.4. Sources .....	11
I.5. Mécanisme d'action.....	12
I.6. Propriétés physico-chimiques.....	15
I.6.1. La température.....	15
I.6.2. Le pH.....	16
I.6.3. Le substrat.....	17
I.6.4. Les inhibiteurs de la carboxylestérase.....	19
I.7. Rôles biologiques et nutritionnel.....	20
II. la Tartrazine.....	21
II.1. Structure .....	21
II.2. Propriétés physico-chimiques.....	22
II.3. Effet de la tartrazine sur la santé.....	23
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>25</b>
I. Réactifs utilisés.....	26
II. Dosage des protéines par la méthode du biuret.....	27
II.1. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	28
II.2. Calcul de la concentration en protéine de la préparation enzymatique de la carboxylestérase.....	29
III. Détermination de l'activité enzymatique.....	30
III.1. Détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse.....	31
III.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique	32
III.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique	33
IV. Etude de l'influence du pH et la température sur l'activité de la carboxylestérase.....	33
IV.1. Influence du pH.....	33

IV.2. Influence de la température.....	<b>34</b>
V. Etude de l'influence de la concentration en substrat (l'éthyle butyrate) sur l'activité de la carboxylestérase.....	<b>35</b>
VI. Etude de l'influence de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase.....	<b>37</b>
VI.1. L'effet de la concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine.....	<b>37</b>
VI.2. L'effet de la carboxylestérase sur la tartrazine.....	<b>37</b>
VI.3. Effet de pH sur la tartrazine.....	<b>38</b>
VI.4. L'étude de l'effet de la tartrazine sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase.....	<b>39</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>40</b>
I. Mesure des activités volumique et spécifique de l'enzyme....	<b>41</b>
II. Recherche de l'activité carboxylestérase de la préparation enzymatique.....	<b>42</b>
III.L'influence du pH sur l'activité de la carboxylestérase.....	<b>43</b>
IV. L'influence de la température sur l'activité de la carboxylestérase.....	<b>45</b>
V.Spectre d'absorption de la tartrazine (E102) diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).....	<b>48</b>
VI. L'effet de concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine..	<b>49</b>
VII. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine.....	<b>50</b>
VIII. L'effet du pH sur la tartrazine.....	<b>51</b>
IX. Détermination des paramètres cinétiques de la carboxylestérase.....	<b>53</b>
IX.1. Cinétique d'hydrolyse de la carboxylestérase en absence de tartrazine.....	<b>53</b>
IX.2. Cinétique de la carboxylestérase en présence de la tartrazine.....	<b>57</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>60</b>

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>61</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>67</b>
I. Préparation des solutions tampons.....	<b>68</b>
I.1. Solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00)....	<b>68</b>
<b>RESUMES.....</b>	<b>69</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>71</b>



# *Introduction*



**D**e part notre environnement, l'homme est quotidiennement exposé à une grande variété de substances exogènes d'origines diverses, rassemblées sous le terme de xénobiotiques. Il peut s'agir de produits naturels, des médicaments, des polluants de l'environnement comme les toxines végétales et animales, les additifs alimentaires, les herbicides, les pesticides, les dérivés des combustibles domestiques et industriels, les solvants et les colorants **(Heymann, 1982)**.

Ces xénobiotiques sont généralement des substances hydrophobes, peu volatiles et peu précipitables. Ces propriétés rendent difficiles leur élimination urinaire. 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 éviter cette accumulation, tous les organismes vivants ont développés, au cours de l'évolution, des systèmes enzymatiques de biotransformation et de détoxification. En effet, le processus de détoxification représente l'ensemble des réactions biochimiques que subissent les substances endogènes et exogènes (xénobiotiques) dans le but de faciliter leur biotransformation et leur excrétion hors de l'organisme.

La conception classique de ce métabolisme suit un caractère bi-phasique comportant une première phase de « fonctionnalisation » qui a pour but d'augmenter la polarité de ces substances et les préparées à subir d'autres transformations au cours des réactions de la deuxième phase dites de « conjugaison ». En effet, 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 phase « I ». L'élimination de ces produits conjugués hydrophiles s'effectue par des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des produits de la phase « II » hors de la cellule **(Dean et al., 1995)**.

Un xénobiotique subit donc plusieurs étapes de biotransformations simultanées ou successives dont les principaux sites sont les tissus situés à l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur, à savoir : le tube digestif, l'appareil respiratoire, le rein et le foie. Ce dernier étant fonctionnellement le plus important.

Les deux phases réactionnelles principales constituant les étapes de détoxification ne sont possibles que par l'intervention de systèmes enzymatiques spécifiques. Etant donné la grande diversité des xénobiotiques au quel l'organisme est exposé, il existe une multitude d'enzymes présentant des spécificités variées. Parmi les enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques, on a les carboxylestérases qui appartiennent à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases et qui font partie des enzymes des réactions de la phase « I » métabolisant les xénobiotiques. Ces enzymes peuvent hydrolyser une grande variété de médicament contenant des esters tels que les anti-tumoraux (capecitabine, CPT-11) et les stupéfiants (la cocaïne et l'héroïne), **(Dean et al., 1995)**

En effet, une partie de notre travail s'intéresse à l'étude de l'interaction de la carboxylestérase avec un colorant alimentaire « la tartrazine ». Ce dernier est un composé azoïque utilisé comme colorant alimentaire de couleur jaune orange. C'est une poudre obtenue par synthèse chimique, soluble dans l'eau et très utilisé dans les produits alimentaires, son code de classification est le **E 102**.

Ce travail est une étude de l'activité enzymatique de la carboxylestérase du foie du porc en présence d'un colorant azoïque alimentaire la tartrazine. Nous avons procéder de la manière suivante :

- ✚ La détermination des paramètres cinétiques de la carboxylestérase.
- ✚ L'étude de l'interaction entre la carboxylestérase et un colorant azoïque alimentaire la tartrazine.

*Rappels  
Théoriques*

## I. La carboxylestérase :

### I.1. Généralité :

Les hydrolases sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H (hydrogène) et OH (hydroxyde) de l'eau sur les valences libérés. Ce sont des enzymes qui ne nécessitent pas en général de coenzymes. Elles sont activées par des cations.

Les hydrolases catalysent l'hydrolyse des fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes et C-N des amides. Deux grandes classes d'hydrolases sont d'une importance capitale, les estérases et les lipases (**Bornscheuer, 2002**). 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 composée par les triglycérides d'acides gras à chaînes plus courtes. Les estérases (CE 3.1.1.X) constituent un groupe diversifié d'hydrolases qui catalysent le clivage et la formation de liaisons ester. Ils sont largement distribués chez les animaux, les plantes et les microorganismes. Beaucoup d'entre eux montrent une large gamme de substrats possibles, ce qui laisse supposer qu'ils ont évolué pour permettre l'accès à des sources de carbone ou d'être impliqués dans les voies cataboliques. Ces enzymes présentent également une grande stéréo-spécificité, ce qui les rend des biocatalyseurs attrayants dans la production de composés optiquement purs dans la synthèse de produits chimiques fins (**Barata et al., 2004**).

En effet, Les lipases et les estérases font partie de la superfamille des hydrolases qui se caractérisent par un repliement  $\alpha/\beta$ , qui est constitué par un noyau central formé de huit feuillets « $\beta$ » et d'une enveloppe de six hélices « $\alpha$ ». Les enzymes possèdent ce type de repliement ont toutes une triade catalytique de type : nucléophile-histidine-acide (**Fickers et al., 2007**).

## **1.2. Définition :**

La carboxylestérase des mammifères est une enzyme qui appartient au groupe des  $\alpha/\beta$  hydrolases, la superfamille de sérine estérase qui comprend également les cholinestérases, les époxydes hydrolases et les phosphotriestérases (**Newman et al., 2005; Hotelier et al., 2004**). Elle catalyse l'hydrolyse des divers xénobiotiques dont les substrats endogènes tels que l'ester de Cholestérol, l'acyle carnitine, l'amide et le thioester ; et les substrats exogènes comme les médicaments, les pesticides, les composés de l'environnement et les additifs alimentaires (**Wang et al., 2009; Hosokawa, 2008**).

La carboxylestérase humaine hCES-1 est une enzyme de 180 kDa comportant trois sous-unités, chaque sous-unité est de 60 kDa. La carboxylestérase humaine hCES-2 est constituée d'une seule sous-unité de 60 kDa (**Imai., 2006**). Cependant, la carboxylestérase extraite du foie du porc comporte trois sous-unité  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , d'un poids moléculaire de 58,2 kDa, 59,7 kDa et 61,4 kDa respectivement (**Bornscheuer et al., 2006**).

Le nom officiel de la carboxylestérase est : Ester carboxylique hydrolase (EC 3.1.1.1) avec :

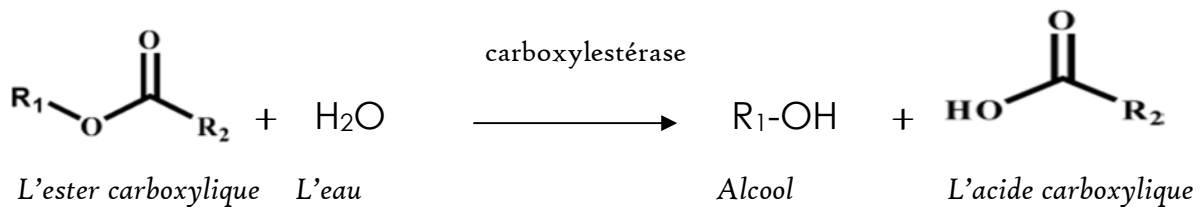
3 : Classe des hydrolases.

1 : Agissant sur les liaisons esters.

1 : Hydrolases d'ester carboxylique.

1 : Carboxylestérase (**Satoh et Hosokawa, 2010 ; Kyeong et al, 1997**).

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des esters carboxyliques par l'addition de l'eau en acide carboxylique et en alcool selon la réaction suivante :



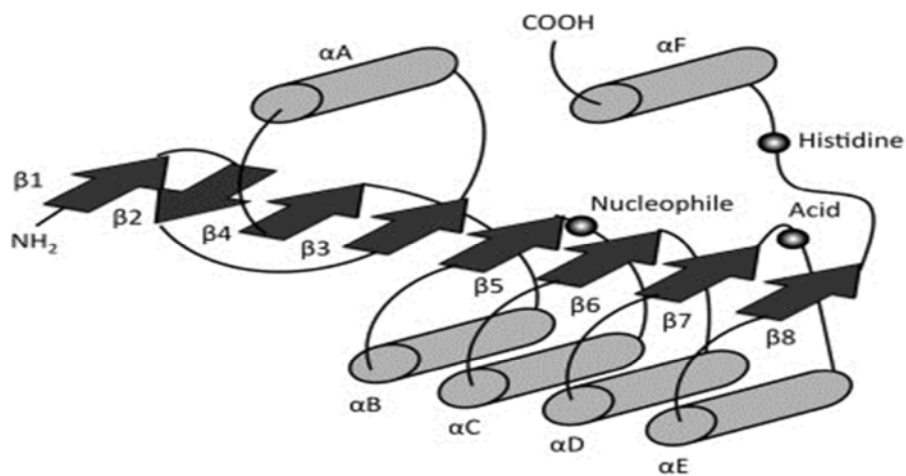
**Figure1** : Réaction d'hydrolyse de l'ester carboxylique par la carboxylestérase.

Les carboxylestérases sont d'une importance clinique en raison de leur grande abondance, la capacité d'hydrolyser de nombreux produits pharmaceutiques et son emplacement dans les différents tissus y compris le foie, le plasma sanguin, les poumons, l'intestin grêle, le cerveau, l'estomac, la rate, le cœur, les testicules, la prostate, le pancréas, le côlon, les macrophages et les monocytes. Elles hydrolysent un large éventail de médicaments et des xénobiotiques, y compris l'a-bloquants Flestolol et Esmolol, la cocaïne et l'héroïne ; et jouent un rôle important dans la réaction de trans-estérification de la mépéridine (Demerol) et du méthylphénidate (Ritalin) (**Bourland et Martin, 1997**). Aussi, Ces enzymes jouent un rôle dans le métabolisme et la détoxification de nombreux produits agrochimiques et pharmaceutiques.

Ces enzymes présentent plusieurs isoenzymes qui varient à la fois du tissu et de l'organisme ce qui rend la nomenclature compliquée (**Imai, 2006 ; Hosokawa et al., 1995**) .

Les carboxylestérases des mammifères sont localisées dans le réticulum endoplasmique de nombreux tissus. Elles contiennent un peptide signal hydrophobe de 17 à 22 résidus d'acides aminés près de l'extrémité N-terminal. En plus, une séquence His-X-Glu-Leu présentée à l'extrémité C-terminal de la protéine (**Imai, 2006**).

Comme de nombreuses hydrolases, les lipases et les acétylcholinestérases, le repliement  $\alpha/\beta$  est le motif de base des carboxylestérases. Ces enzymes ont tout en commun un domaine structural central typique formé par huit brins «  $\beta$  » connectés par six hélices «  $\alpha$  » formant un repliement dit  $\alpha/\beta$ . 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., 2007**).



**Figure 2** : Schéma du repliement  $\alpha/\beta$  : la structure secondaire est indiquée par des flèches pour les brins «  $\beta$  » et des cylindres pour les hélices «  $\alpha$  ».

### **I.3. Classification des carboxylestérases :**

Il existe une classification de la carboxylestérase selon Aldridge, ainsi, les isozymes de la carboxylestérase ont d'abord été classés selon leurs spécificités du substrat et leurs point isoélectrique en superfamille des serines estérases qui comprends trois enzymes : l'Acétylcholinestérase, la ButyrylCholinestrase et la Carboxylestérase, elles appartiennent au groupe des B-estérase ; cependant, cette classification est moins précise à cause du chevauchement des spécificités du substrat. En effet, une seule réaction iso-électrique est souvent véhiculée par plusieurs types d'enzymes. Des études récentes sur les estérases, comme sur d'autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques, ont donné des preuves de multiples formes **(Satoh et Hosokawa, 2010)**.

L'Union nationale de biochimie (UIB) de classification, a proposé de classer ces hydrolases selon l'homologie et l'alignement de séquence d'acides aminés des gènes codant, en cinq familles, CES1, CES2, CES3, CES4 et CES5. Chaque famille est également divisée en sous-familles **(Satoh et Hosokawa, 2006; Mentlein et al., (1984)**,

Il existe des différences entre ces familles en termes de spécificité de substrat, la distribution tissulaire, propriétés immunologiques et la régulation des gènes. La majorité des carboxylestérases qui ont été identifiées appartiennent à la famille CES1 ou CES2.

**I.3.1. La famille CES 1 :** Comprend la principale forme des isoenzymes de la carboxylestérase (Plus de 60% d'homologie avec la CES1A1 humaine). Ainsi, elle pourrait être divisée en huit sous-familles A, B, C, D, E, F, G, H. La plupart de la famille CES1, à l'exception de la CES1G, sont principalement exprimées dans le foie. 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.



**I.3.2. La famille CES 2** : Elle hydrolyse les esters de benzoyle de la cocaïne, de l'héroïne et le CPT-11 (Irinotécan). En effet, l'irinotécan est l'un des médicaments anti-tumoraux les plus utilisés dans le traitement des cancers colorectaux. Cette famille comprend quatre sous familles (CES2A1, CES2A6, CES2A10, CES2A11), elle est la forme dominante dans l'intestin grêle.

**I.3.3. La famille CES 3** : Elle inclut la CES3A2 et la CES3A1. En effet, la CES3 humaine (CES3A1) a environ 40% d'identité de la séquence d'acides aminés avec la CES1A1 et la CES2A1, elle est exprimée dans le foie et le tractus gastro-intestinal avec une faible expression par rapport au CES1A1 et CES2A1.

**I.3.4. La famille CES 4** : Elle inclut la CES4A2, il s'agit d'une protéine urinaire majeure excrétée dans les urines du chat.

**I.3.5. La famille CES 5** : Elle inclut des isoenzymes de poids moléculaire de 46,5 kDa, qui ont une structure différente de celle des autres isoenzymes de la carboxylestérase.

Il existe d'autre classe des isoenzymes de la carboxylestérase désignée par la CES6, située dans des régions spécifiques du cerveau. Elle peut jouer un rôle dans la détoxification des xénobiotiques dans les tissus neuraux.

#### **I.4. Sources de la carboxylestérase :**

La carboxylestérase est une enzyme avec une large spécificité du substrat, très répandue dans la nature, elle est synthétisée par les mammifères, les insectes, les plantes et les microorganismes. En effet, l'extrait aqueux du pois fut le premier à être séparé et purifié, par la suite la carboxylestérase a été purifiée à partir d'autres sources végétaux telles que : l'orge, l'haricot vert, le sorgho, les feuilles de *Festuca pratensis* (Fétuque des prés) et les pommes (**Upadhya et al., 1985**).

Cette enzyme est aussi synthétisée par un grand nombre de microorganismes tels que : *Sulfolobus sulfataricus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus steathermophilus*.

#### **I.5. 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.

Dans les réactions enzymatiques, l'étude d'un mécanisme catalytique suppose de préciser les résidus du site actif impliquée, 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.

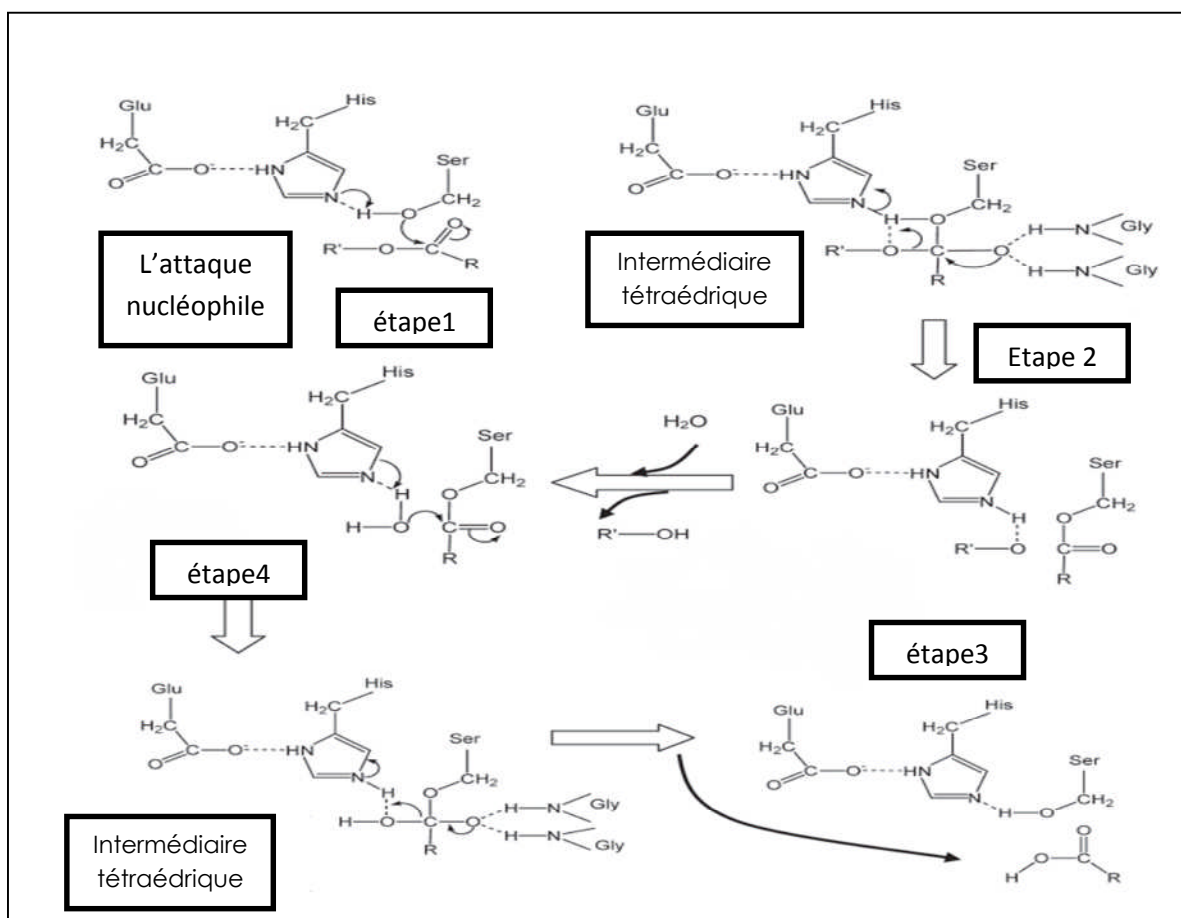
Le mécanisme par lequel les estérases hydrolysent leurs substrats a été examiné en utilisant des moyens à la fois biochimiques et structurels par un certain nombre de groupe de recherche. Le mécanisme général catalytique comprend une triade catalytique, constituée par une Ser, His et soit un résidu Glu ou Asp. Les carboxylestérases clivent les esters via un processus en deux étapes qui implique la formation et la dégradation d'un intermédiaire acyle-enzyme (**Wheelock et al., 2005**). Le mécanisme d'action de la carboxylestérase pourrait être divisé selon les 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 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 Gly<sub>123</sub> et Gly<sub>124</sub> stabilisent l'oxygène chargé négativement. Cette configuration est appelée trou d'oxyanion. La liaison ester se clive et le groupe portant 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 alors le composant acide de substrat. Le composant acide

diffuse plus loin accompagné par la régénération de l'enzyme (**Satoh et Hosokawa, 2010**).

Le mécanisme décrivant le mieux les cinétiques des réactions catalysées par les carboxylestérases est un mécanisme de type ping-pong. Dans ce mécanisme, il y a dans un premier temps fixation du substrat A (l'ester carboxylique) sur l'enzyme pour former le complexe EA avec libération du premier produit d'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., 2007**).

La figure 3 représente les principales étapes du mécanisme d'action de la carboxylestérase :



**Figure 3** : Mécanisme d'action de la carboxylestérase (**Satoh et Hosokawa , 2008**).

## **I.6. Propriétés physico-chimiques :**

L'activité de la carboxylestérase peut être influencée par les paramètres suivants :

### **I.6.1. 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 :

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

Avec :

**C** : Constante,

**T** : Température en Kelvin,

**R** : Constante des gaz parfait,

**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. Selon **Wang et al ., (2009)** la carboxylestérase présente une activité maximale à environ 40°C.

### 1.6.2. Le pH :

Les enzymes présentent un pH optimum caractéristique, le pH auquel leur activité enzymatique est maximale. En dessous ou au dessus de ce pH, l'activité enzymatique diminue. 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 (**Lehninger, 1977**). En effet, les variations du pH peuvent avoir un effet :

- Au niveau de l'enzyme, en provoquant des modifications 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 (groupement appartenant à des aminoacides du site actif), soit au maintien de la conformation tridimensionnelle native de la protéine enzymatique (groupement pouvant appartenir à des aminoacides situés en dehors du site actif, à travers des endroits de la molécule).
- Au niveau du substrat, en changeant son degré d'ionisation, ce qui peut favoriser 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**)).

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

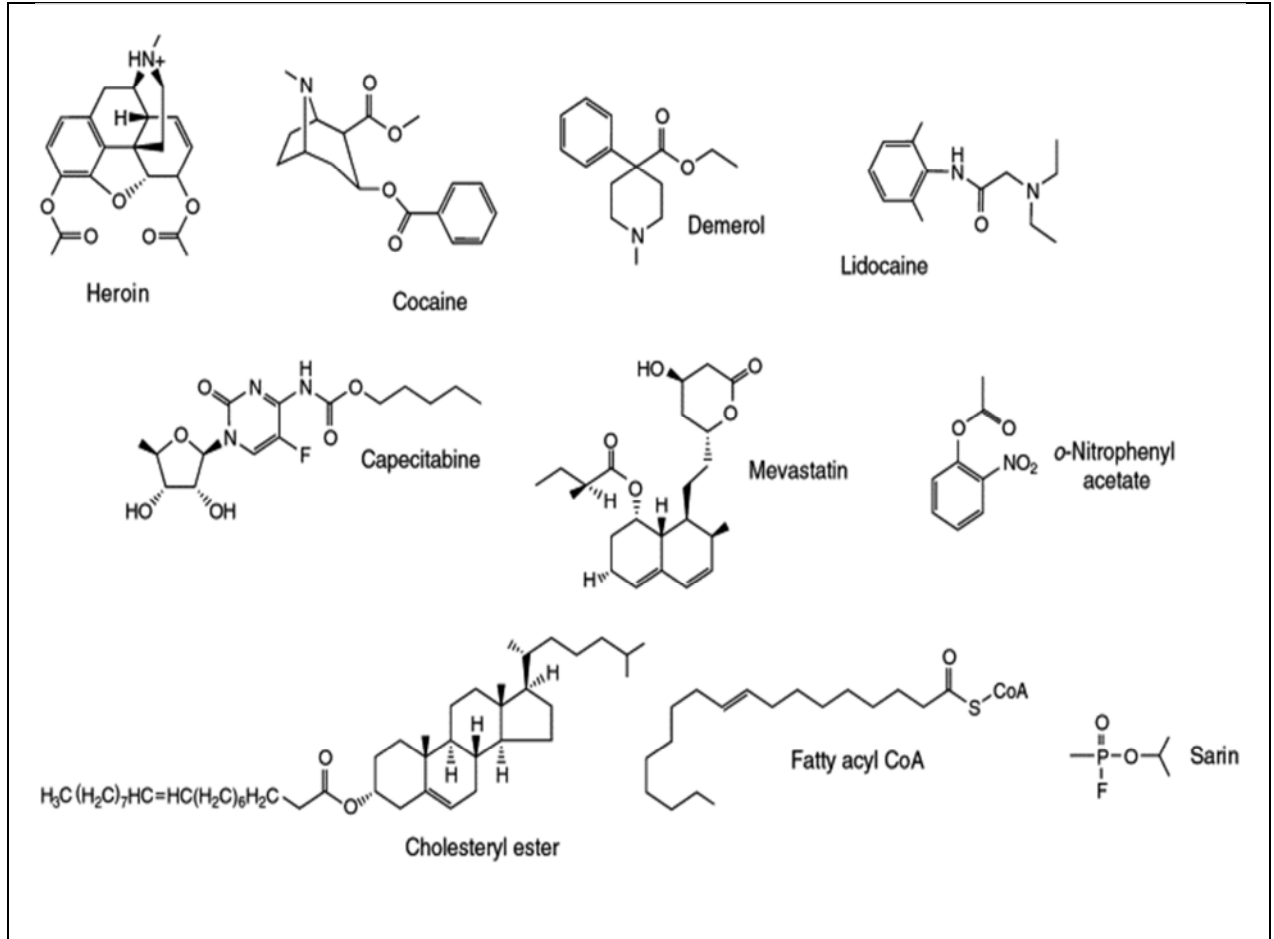
### **I.6.3. Le substrat :**

Les carboxylestérases du foie des mammifères forment un groupe d'enzymes étroitement apparenté notamment en ce qui concerne leurs propriétés moléculaires. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse d'une grande variété d'esters d'acides carboxyliques comme l'esmolol et les thiolesters comme la spironolaclole et aussi certains amides aromatiques. Les meilleurs substrats semblent être des simples esters aliphatiques et aromatiques de n-alkyle d'acides gras.

Les carboxylestérases sont responsables de l'hydrolyse de nombreux composés exogènes, dont les conséquences sont à la fois l'inactivation des médicaments et l'activation des pro-médicaments. Par exemple, la carboxylestérase du foie humain et du plasma active la lovastatine qui réduit le taux du cholestérol et assure la conversion d'une pro-drogue de la prostaglandine F<sub>2a</sub>, d'autres substrats incluent les salicylates, la cocaïne et les stéroïdes (**Satoh et Hosokawa, 1998**). Par conséquent, ces enzymes sont des déterminants majeurs du comportement pharmacocinétique de la plupart des agents thérapeutiques contenant des liaisons ester ou amide.

Elles peuvent hydrolyser aussi un grand nombre de substrats agrochimiques tel que les carbamates et les organophosphates. Elles sont également important dans le métabolisme des traitements, y compris la mépéridine analgésique narcotique, la cocaïne, l'héroïne et la lidocaïne, l'antiviral l'oseltamivir (**Wheelock et al., 2008**).

La figure 4 représente les différents substrats hydrolysés par la carboxylestérase :



**Figure 4 :** Différents substrats hydrolysés par la carboxylestérase (Wheelock, 2008).



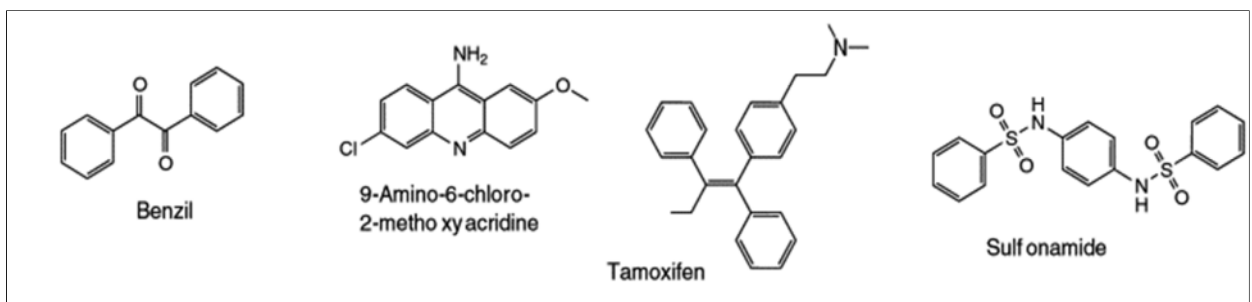
#### 1.6.4. Les inhibiteurs :

Plusieurs produits chimiques inhibent l'activité hydrolytique de la carboxylestérase tels que les dérivés organophosphorés, les carbamates et les sulfamides (**Wheelock, 2008**).

Les inhibiteurs les plus puissants des carboxylestérases trouvés à ce jour sont un groupe de composés appelés collectivement trifluorométhylcétone (TFK).

Cette enzyme peut être aussi inhibée par des concentrations élevées du substrat, par exemple : l'éthyle butyrate, le méthyle butyrate, l'acétate de phényle, etc...

La figure 5 représente des différents inhibiteurs de la carboxylestérase :



**Figure 5** : Différents inhibiteurs de la carboxylestérase (**Wheelock, 2008**).

### **I.7. Rôle biologique et nutritionnel de la carboxylestérase :**

Les enzymes participent à la synthèse des molécules biochimiques, à des opérations de technologie alimentaire et à l'élaboration de nouvelles techniques analytiques, à la fois rapides et spécifiques. L'utilisation des enzymes est selon le cas destinée à faciliter le procédé, améliorer la conservation et / ou les caractéristiques organoleptiques ou nutritionnelles de certains produits alimentaires.

Les fonctions biologiques spécifiques n'ont pas été définies pour beaucoup de carboxylestérases en raison de leur grande spécificité de substrat. Les carboxylestérases jouent un rôle dans le traitement des composés endobiotiques, par exemple, dans l'homéostasie du cholestérol. Bien que le cholestérol soit essentiel à l'intégrité structurelle des membranes plasmiques, il est toxique s'il est présent en excès. Ainsi, la circulation systémique du cholestérol est cruciale pour le métabolisme de ce composé. Les acides gras sont ajoutés à la position « 3 » du cholestérol par la carboxylestérase pour créer l'ester de cholestérol.

Les carboxylestérases permettent l'hydrolyse de plusieurs substrats endogènes et exogènes, comme exemple de substrats endogènes : le triacylglycérol, l'acyl-carnitine et comme substrats exogènes : les médicaments, le palmitoyl-coenzyme A, l'halopéridol, l'imidapril, les alcaloïdes de pyrrolizidine, les stéroïdes, les pesticides, les composés de l'environnement et les additifs alimentaires (**Streit, 2008**).

Les carboxylestérases sont impliquées dans les réactions d'hydrolyse de précurseurs CPT-11 et de la capécitabine, les groupes ester sont enlevés pour améliorer leur solubilité dans l'eau, ce qui entraîne une activité anti-tumorale élevée. Par conséquent, ces carboxylestérases ont un rôle potentiel dans la thérapie génique du cancer.

## II. La Tartrazine :

Les colorants alimentaires sont des additifs qui permettent d'améliorer et/ou de modifier l'aspect d'un aliment. Ils n'ont aucune valeur nutritive mais permettent, en améliorant l'aspect, de donner envie de consommer cet aliment. Car, ce sont la forme et la couleur qui permettent en premier de reconnaître un aliment. En effet, la couleur a une très grande influence sur notre perception subjective de l'aliment.

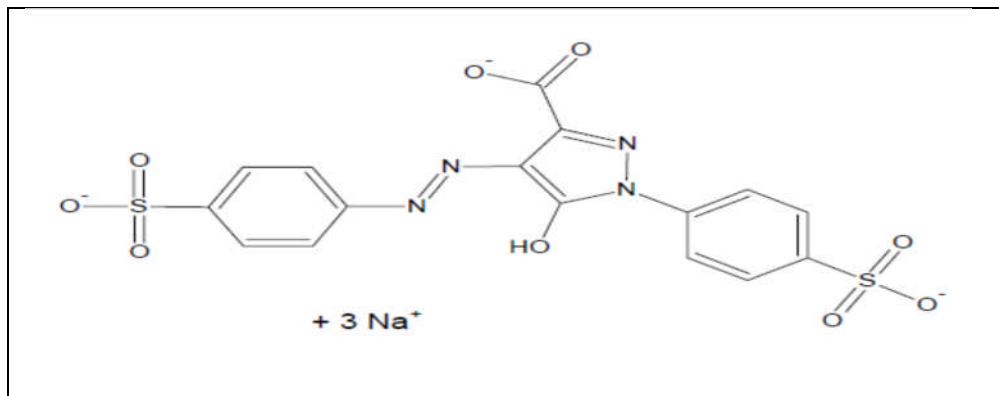
Parmi les colorants alimentaires les plus utilisés la tartrazine (**E102**). Ce colorant jaune orange est utilisé pour donner de belles couleurs aux chips, mélanges apéritifs, soupes instantanées, moutarde, sirops de menthe (mêlé à du bleu), petits pois en conserve, couscous, crèmes pâtisseries, glaces, confiseries (enrobages de sucreries), boissons à goût d'orange.

La tartrazine est également utilisée dans les produits cosmétiques en tant que base pour les colorants capillaires sous l'appellation "**CI 19140**" et dans certains produits pharmaceutiques comme agent colorant. (**Dutau , 2012**) .

La dose journalière admissible de la tartrazine est de 7,5 mg/kg du poids corporel.

## II.1. Structure :

La tartrazine est un colorant jaune, mono-azoïque d'origine synthétique, c'est le sel tri-sodique d'hydroxy-5-(sulfo-4-phényl)-1-(sulfo-4-phénylazo)-4-H-pyrazole-carboxylate-3. Sa formule brute est :  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$  et sa formule développée est représentée dans la figure 6 :



**Figure 6** : Structure chimique de la tartrazine.

## II.2. Propriétés :

La tartrazine est élaborée à partir d'acide amino-4-benzène sulfonique di-azoté au moyen d'acide chlorhydrique et de nitrite de sodium. La teinture ainsi obtenue est purifiée et isolée sous la forme de sel de sodium.

La tartrazine est essentiellement constituée de sel tri-sodique d'hydroxy-5-(sulfo-4-phényl)-1-(sulfo-4-phénylazo)-4-H-pyrazole-carboxylate-3 et de matières colorantes accessoires associées à des composants non colorés, principalement du chlorure de sodium et/ou du sulfate de sodium.

### **II.3. Effet de la tartrazine sur la santé :**

La tartrazine est un colorant qui peut causer de graves crises chez les asthmatiques en plus des crises d'urticaire et d'eczéma. La tartrazine fait partie des six colorants européens qui doivent porter la mention « Peut avoir des effets indésirables sur l'activité et l'attention chez les enfants ». En effet, il existe une sensibilité croisée entre la tartrazine et l'acide acétylsalicylique (aspirine) ; comme plusieurs enfants hyperactifs réagissent déjà mal aux salicylates naturels (raisins, pommes, tomates, concombres...), la prise de tartrazine semble provoquer le même type de comportement suite à son ingestion.

De plus, il a été noté que ce colorant peut entraîner une déficience en vitamine B<sub>6</sub> et en Zinc. La vitamine B<sub>6</sub> est une vitamine essentielle pour le bon fonctionnement des neurones. Le zinc est quant à lui impliqué dans pas moins de deux cent réactions enzymatiques diverses, entre autres dans la régulation de la dopamine, un neurotransmetteur présent en moins grande quantité chez les enfants hyperactifs (**Dutau , 2012**).

La tartrazine pure ingérée à petite dose mais régulièrement a permis d'observer une possibilité de prurit, d'urticaire, d'œdème du visage, des lèvres, de la langue et de la lèvre (peut être accompagné d'une sensation de brûlure et de démangeaison), de bronchospasme et de mortalité (effets chroniques sur des cobayes).

La tartrazine peut contenir des dérivés de benzène, comme l'aminobenzène aromatique qui est toxique pour l'homme et pour l'environnement. Ce colorant est un toxique multiple, mutagène, neurotoxique potentiel, immunotoxique , inhibiteur de la respiration. Toutefois, ce colorant n'a jamais donné de cancers dans les études sur les animaux.

*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*

**I. Réactifs utilisés :**

- Acide citrique  $C_6H_8O_7$  (Mm = 192,12 g/mol).
- Albumine sérique bovine (BSA), Sigma prod.NoA3912-100G.19K1526. Poudre lyophilisée.
- Ethyle Butyrate  $CH_3(CH_2)_2CO_2C_2H_5$  (99%, d = 0,875).
- La Carboxylestérase du foie du porc : Sigma prod. No E3019-20KU. 028K7005. 1176,5 mg solide .17 unités/mg.
- Chlorure d'hydrogène HCl (37%, d = 1,19).
- Chlorure de potassium KCl (Mm = 74,55 g/mol).
- Hydroxyde de sodium NaOH.
- Potassium phosphate monobasique  $KH_2PO_4$  (Mm = 141,96 g/mol).
- Réactif du Biuret.
- Sodium phosphate dibasique  $Na_2HPO_4$  (Mm = 136,09 g/mol).
- La Tartrazine commerciale : Colorant alimentaire synthétique, N°14.888.
- Tétraborate de sodium  $Na_2B_4O_7$  (Mm = 381,37 g/mol).

## **II. Dosage des protéines par la méthode du biuret :**

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

Développée par Gornall 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 :  $(\text{-NH-CHR-CO-NH-CHR'-CO-NH-CHR''-CO-})_n$  offre de très nombreux groupements de ces deux radicaux.

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 une des méthodes les plus fiables, pratiques et rapides utilisées pour le dosage des protéines totales d'un milieu biologique.

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**).



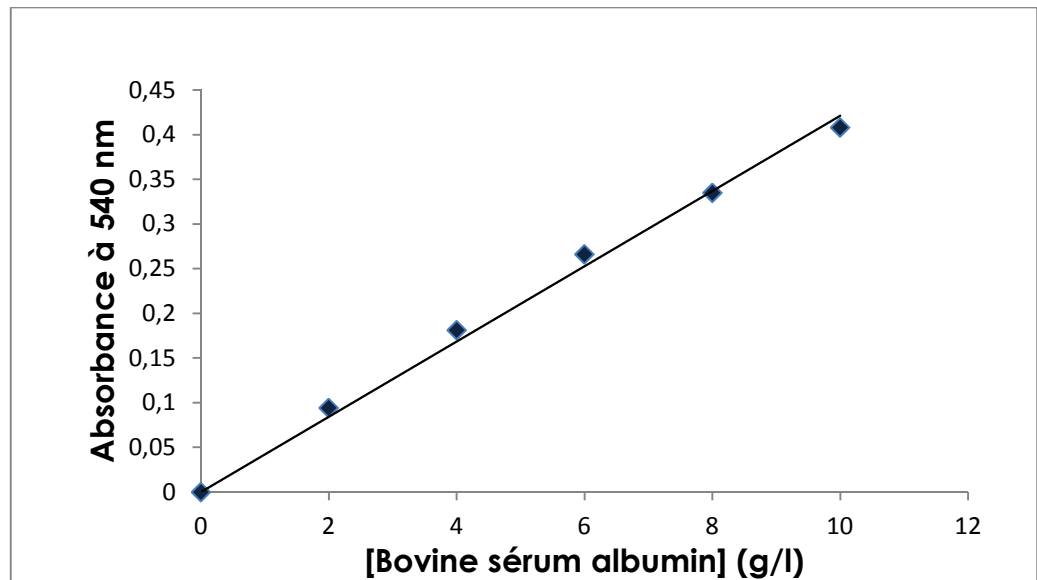
## II.2. Préparation de la gamme d'étalonnage :

- On prépare une solution mère de l'albumine sérique bovine (protéine étalon) à 10 g/l.
- Dans une série de 18 tubes à essais (6 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes :

Numéro de tubes	1	2	3	4	5	6
Volume de la solution mère de BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Volume de la solution tampon (borax-HCl/pH 8,00) (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactif du Biuret (ml)	4	4	4	4	4	4
Concentration finale en protéine (g/l)	0	2	4	6	8	10

- Après avoir ajouté 4ml du réactif du Biuret à chaque tube à essais , 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 réactif.

A partir des absorbances obtenue, on trace la droite d'étalonnage représenté dans la figure 7.



**Figure 7** : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret.

(Absorbance = 0,042 x [protéines] ;  $r^2 = 0,996$ ).

### **II.3 Calcul de la concentration en protéine de la préparation enzymatique de la carboxylestérase :**

- On dissout 0,05g d'estérase du foie du porc dans 10ml du tampon (borax-HCl).
- Dans une série de 6 tubes à essais, on effectue les dilutions mentionnées dans le tableau ci-dessous et on ajoute 4ml du réactif du biuret à chaque tube. On les laisse incuber pendant 30min à température ambiante et à l'abri de la lumière. (chaque dilution est répétée 3 fois).

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
Volume du réactif du biuret(ml)	4	4	4	4	4	4

- On mesure la densité optique par un spectrophotomètre contre un blanc réactif à 540nm.
- On calcule la concentration en protéine par la formule suivante

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

La concentration en protéine de la préparation de la carboxylestérase est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue .On la calcule en prenant la moyenne des cinq concentrations déterminées expérimentalement.

### **III. Détermination de l'activité enzymatique :**

Pour la détermination de l'activité de la carboxylestérase vis-à-vis de son substrat l'éthyle butyrate, on procède de la manière suivante :

- On prépare dans un bécher 25ml de la solution d'éthyle butyrate (0,1ml d'éthyle butyrate concentré dans 100ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- On met le bécher dans un bain-marie réglé à 25°C puis on ajoute 0,025ml d'éthyle butyrate concentré.
- On ajuste le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (10mM) puis on ajoute 0,1ml de la solution enzymatique (0,0029g d'estérase du foie du porc dans 1ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- On déclenche le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00.
- On laisse la réaction pendant 1min puis on fait plonger le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes pour arrêter la réaction.
- On maintient le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 par l'addition de faibles volumes de NaOH (10mM).
- On note le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8,00 et le temps nécessaire pour consommer le réactif NaOH.
- On répète 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.

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

La vitesse initiale d'hydrolyse du substrat (l'éthyle butyrate) par la carboxylestérase est la quantité de substrat transformé (ou de produit formé) par unité de temps et par unité de volume de 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 de l'éthyle butyrate (μmol de substrat transformé. L<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>).

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

**t** : Temps de réaction (min).

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

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

L'activité enzymatique volumique est la quantité d'enzyme pouvant transformer une quantité de matière par unité du 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 :

$$AV = \frac{(\text{Molarité}_{\text{NaOH}})(V_{\text{NaOH}})(1000)(df)}{(T)(Ve)}$$

Avec :

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

**V<sub>NaOH</sub>** : Volume en 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 8,00.

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

### 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 :

$$AS = \frac{AV}{[\text{Protéine}]}$$

Avec :

**AS** : Activité spécifique (U/mg).

**AV** : Activité volumique (U/ml).

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

#### **IV. Étude de l'influence du pH et la température sur l'activité de la carboxylestérase :**

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

Pour déterminer le pH optimum de la carboxylestérase, on procède de la manière suivante :

- On Prépare dans un bécher 25ml de la solution d'éthyle butyrate (0,1ml d'éthyle butyrate concentré dans 100ml de différentes solutions tampon de pH allant de 6,5 à 10).
- On met le bécher dans un bain-marie réglé à 25°C puis on ajoute 0,025ml d'éthyle butyrate concentré.
- On Ajuste le pH à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (10mM), puis on ajoute 0,1ml de la solution enzymatique (0,0029g d'estérase du foie du porc dans 1ml de solution tampon borax/HCl à pH 8).
- On déclenche le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00.
- On laisse la réaction pendant 5 min puis on fait plonger 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 des faibles volumes d'environ 0,05ml de NaOH (10mM) en notant le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8,00 et le temps nécessaire pour consommer le réactif NaOH.

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

La vitesse de la plupart des réactions enzymatiques est influencée par la température. Pour déterminer la température optimale, on suit les étapes suivantes :

- On prépare dans un bécher 25ml de la solution d'éthyle butyrate (0,1ml d'éthyle butyrate concentré dans 100ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- On met le bécher dans un bain-marie réglé à 25°C puis on ajoute 0,025ml d'éthyle butyrate concentré.
- On ajuste le pH de cette solution à pH 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (10mM) puis on ajoute 0,1ml de la solution d'enzyme (0,0029g d'estérase du foie du porc dans 1ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- On déclenche le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00.
- On laisse la réaction pendant 5 min puis on plonge 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 des faibles volumes d'environ 0,05ml de NaOH (10mM).
- On note le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8,00 et le temps nécessaire pour consommer le réactif NaOH.
- On refait ensuite la même manipulation avec les mêmes conditions pour les différentes valeurs de températures testées : 25°C ; 30°C ; 37°C ; 40°C ; 45°C ; 50°C ; 55°C ; 60°C ; 65°C ; 70°C.



## **V. Étude de l'influence de la concentration en substrat (l'éthyle butyrate) sur l'activité de la carboxylestérase :**

Pour déterminer les paramètres cinétiques de la carboxylestérase, on doit étudier l'influence de la concentration d'éthyle butyrate sur son activité de la manière suivante :

- On prépare dans un bécher 25ml de la solution d'éthyle butyrate (0,1ml d'éthyle butyrate concentré dans 100ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- On met le bécher dans un bain-marie réglé à 25°C puis on ajoute 0,025ml d'éthyle butyrate concentré.
- On ajuste le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (10mM) puis on ajoute 0,1ml de la solution enzymatique (0,0029g de carboxylestérase dans 1ml de la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- On déclenche le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00.
- On laisse la réaction pendant 5 min puis on plonge 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 de 0,05ml de NaOH (10mM).
- On note le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8,00 et le temps nécessaire pour consommer le réactif NaOH.
- On refait la même manipulation avec les mêmes conditions opératoires en augmentant la concentration du substrat d'éthyle butyrate selon la gamme suivante de concentration :  $9,41 \times 10^{-5}$  ;  $1,69 \times 10^{-4}$  ;  $2,44 \times 10^{-4}$  ;  $3,2 \times 10^{-4}$  ;  $3,95 \times 10^{-4}$  ;  $4,70 \times 10^{-4}$  ;  $5,46 \times 10^{-4}$ M.

## **VI. Étude de l'influence de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase :**

### **VI.1. L'effet de la concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine :**

Pour savoir s'il y a un effet de la concentration de l'éthyle butyrate sur la tartrazine, on va procéder de la manière suivante :

- Dans une série de 4 tubes à essais, on met dans chacun 5 ml de solution tampon (Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00), 5 ml de la solution d'éthyle butyrate préparé dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00 (dont les concentrations étaient de :  $9,41 \times 10^{-5}$  ;  $1,69 \times 10^{-4}$  ;  $2,44 \times 10^{-4}$  ;  $3,2 \times 10^{-4}$  ;  $3,95 \times 10^{-4}$  mol/l respectivement), et 2 ml de la solution de tartrazine (0,1mmol/l).
- On mesure les absorbances de ces tubes à l'aide d'un spectrophotomètre après 90 minutes d'incubation.

### **VI.2. L'effet de la carboxylestérase sur la tartrazine :**

Pour savoir s'il y a un éventuel effet de la carboxylestérase sur la tartrazine, on procède de la manière suivante :

- Afin de faire un spectre de ce colorant, on prépare une solution de tartrazine à 0,0025g/ml d'eau distillée. Cette solution est diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00 au 1/10.
- On prépare 200 ml de la solution de tartrazine à 0,027g/l dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00.
- On met dans un grand bécher 100 ml de cette solution et on le place dans un bain-marie réglé à 25°C pendant tout le suivi. Puis on ajoute 1 ml de la solution d'enzyme et on suit l'évolution de l'absorbance dans un spectrophotomètre à 421 nm durant 3 heures

(en faisant des prélèvements toutes les 10 min dans la première heure et toutes les 15 min dans les 2 heures restantes).

- On met dans un autre bécher 100ml de la solution de tartrazine qui reste et on suit l'évolution de l'absorbance en parallèle avec la solution contenant le colorant et l'enzyme dans les mêmes conditions de température (dans un bain-marie à 25°C) et pendant la même durée de temps (3 heure), pour voir s'il y a un changement significatif dans les absorbances.

### **VI.3. Effet du pH sur la tartrazine :**

Pour savoir s'il y a un éventuel effet du pH sur le colorant alimentaire la tartrazine, on procède de la manière suivante :

- On prépare une solution de tartrazine à 0,0025g/ml dans de l'eau distillée.
- On dilue ensuite cette solution au 1/10 dans une Solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M à différent pH (6 - 6,5 - 7 - 7,5 - 8 - 8,5 - 9 - 9,5 et 10).
- On passe ensuite à la mesure de la longueur d'onde dont laquelle l'absorbance est maximale à l'aide d'un spectrophotomètre de chaque dilution.

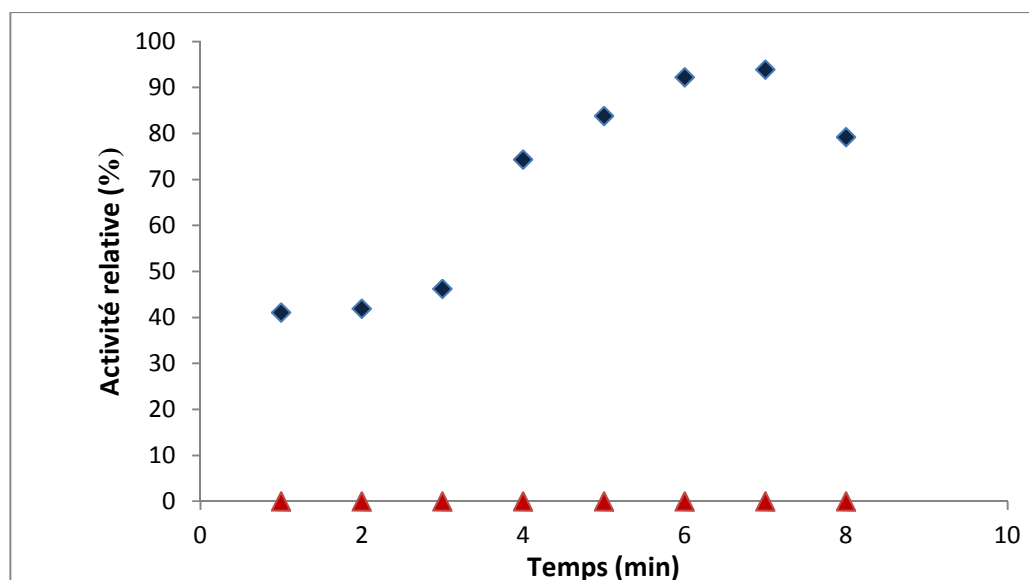
#### **VI.4.L'étude de l'effet de la tartrazine sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase :**

- On prépare une solution de tartrazine (0,0015 g de tartrazine dans 200 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8).
- On met dans un bécher 25 ml de la solution d'éthyle butyrate (0,1 ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml de la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8).
- On met le bécher dans un bain-marie et réglé à 25°C puis on ajoute 0,025 ml d'éthyle butyrate concentrée et 0,05 ml de la solution de tartrazine préparée.
- On ajuste le pH à 8,1 à l'aide d'un pH mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (10 mM), puis 0,1 ml de la solution d'enzyme (0,0029 g de carboxylestérase dans 1 ml du tampon Borax/HCl; pH 8).
- On déclenche le chronomètre lorsque le pH atteint 8,00 et on laisse la réaction pendant 5 min. on plonge ensuite 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 (10 mM).
- On note le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8,00 et le temps nécessaire pour consommer le réactif NaOH.
- On refait la même manipulation et avec les mêmes conditions mais avec des concentrations différentes d'éthyle butyrate selon la gamme suivante: :  $9,41 \times 10^{-5}$  ;  $1,69 \times 10^{-4}$  ;  $2,44 \times 10^{-4}$  ;  $3,2 \times 10^{-4}$  ;  $3,95 \times 10^{-4}$  ;  $4,70 \times 10^{-4}$  ;  $5,46 \times 10^{-4}$ M.

*Résultats*  
*Et*  
*Discussion*

### I. Recherche de l'activité du carboxylestérase de la préparation enzymatique :

La figure 8 permet de constater qu'en présence de la préparation enzymatique de la carboxylestérase, l'éthyle butyrate est hydrolysé en éthanol et en acide butyrique. L'activité atteint un maximum de  $3,22 \cdot 10^4$  UI/ml au-delà de 7 minutes d'incubation. Cette Hydrolyse ne semble pas être spontanée puisque, lors d'essais témoins réalisés en l'absence de l'enzyme, l'éthyle butyrate n'était pas hydrolysé. Il est donc vraisemblable que l'enzyme commerciale est active.



**Figure 8 :** Cinétique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate en présence (♦) et en absence (▲) de la préparation enzymatique de la carboxylestérase ([éthyle butyrate] =  $9,41 \cdot 10^{-5}$  M ; dilution d'enzyme 1/250 (v/v) ; solution tampon Borax 0,025 M / HCl 0,1 M (pH 8,00) ; 25°C).

## **II. Mesure des activités volumique et spécifique de l'enzyme :**

Le tableau ci-dessous présente les valeurs des activités volumique et spécifique dans des conditions opératoires standards ([éthyle butyrate]=  $9,41 \cdot 10^{-5}$  M, Solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00), température : 25°C, durée de la réaction : 8 min), ainsi que la vitesse initiale et la concentration en protéines.

**Tableau 1** : Activité volumique et spécifique de la carboxylestérase dans les conditions standards.

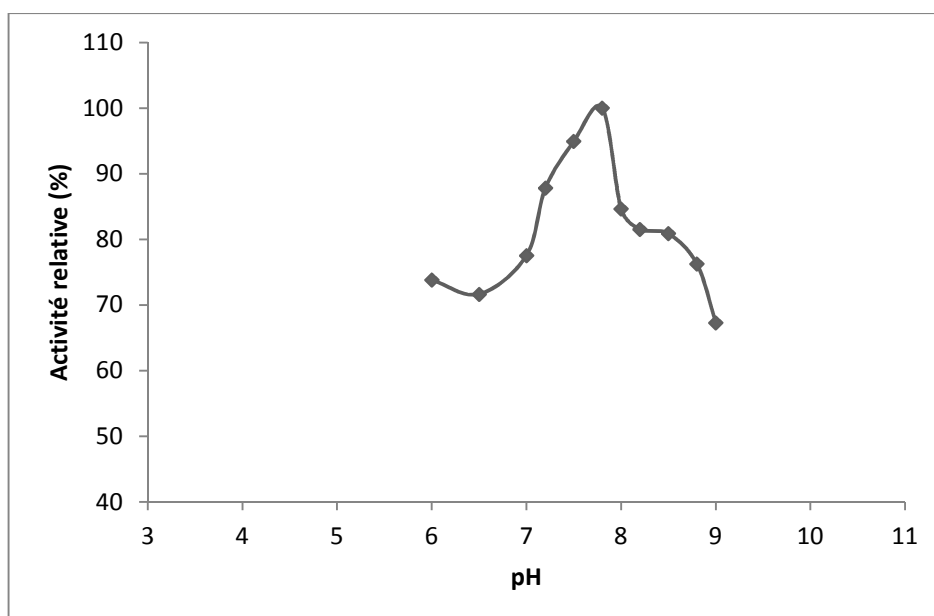
Concentration en protéines (g/l)	Vitesse initial ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ )	Activité volumique (UI/ml)	Activité spécifique (UI/mg)
1,094 $\pm 0,03325$	686,699 $\pm 43,5095$	$1,7237855 \cdot 10^7$ $\pm 5,137 \cdot 10^6$	$1,57567230 \cdot 10^4$ $\pm 5,471 \cdot 10^3$

Avec : ( $\pm$ ) est la valeur d'erreur standard.

### III. L'influence du pH sur l'activité de la carboxylestérase :

L'activité enzymatique est influencée par le pH, de telle sorte que chaque enzyme présente un pH optimum caractéristique. A ce pH l'enzyme possède une conformation bien déterminée qui va lui conférer son activité. Lorsque ce pH varie, la structure de l'enzyme varie et donc son activité diminue. Ainsi, si nous traçons l'activité enzymatique en fonction du pH, nous constatons que cette activité augmente pour atteindre une valeur maximale au pH optimal, en suite elle diminue à des pH fortement basique (**Jawetz et al, 1973**).

La figure ci-dessous est une représentation graphique de l'effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase :



**Figure 9:** Effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase. ([Éthyle butyrate]=  $9,41 \cdot 10^{-5}M$  ; dilution d'enzyme 1/250 (v/v) ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) ; durée de la réaction : 5 min ; 25°C).



Le résultat obtenu fait ressortir un pic caractérisé par une activité maximale de la carboxylestérase ( $20,322 \cdot 10^7$  UI/ml) à un pH de 7,8, ce pH correspond au pH optimum de la carboxylestérase.

Selon **Bertram et al. (1969)**, l'activité enzymatique de la carboxylestérase est maximale à un pH de 8,1.

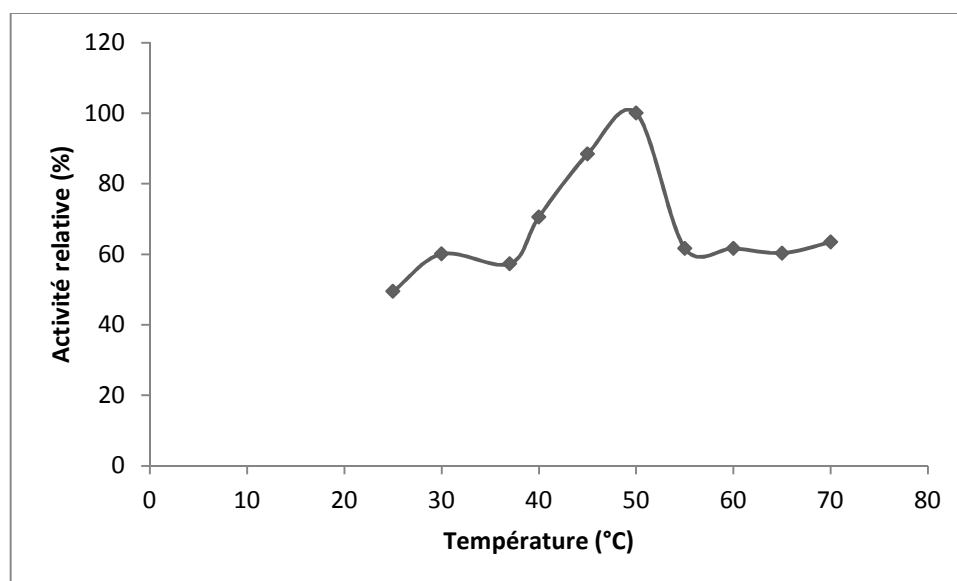
Compte-tenu de nos résultats et de ceux de ces auteurs, nous avons choisi pour la suite de nos expériences de travailler avec une solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M de pH 8,00.

En effet, 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**).

#### IV. L'influence de la température sur l'activité de la carboxylestérase :

La figure ci-dessous est une représentation graphique de l'activité de la carboxylestérase en fonction de la température.



**Figure10 :** Effet de la température sur l'activité de la carboxylestérase. ([Éthyle butyrate]=  $9,41 \cdot 10^{-5} \text{M}$  ; dilution d'enzyme 1/250 (v/v) ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) ; durée de la réaction 5 min ; 25°C).

Cette représentation fait apparaître une allure dissymétrique présentant deux phases bien distinctes qui correspondent à deux phénomènes différents.

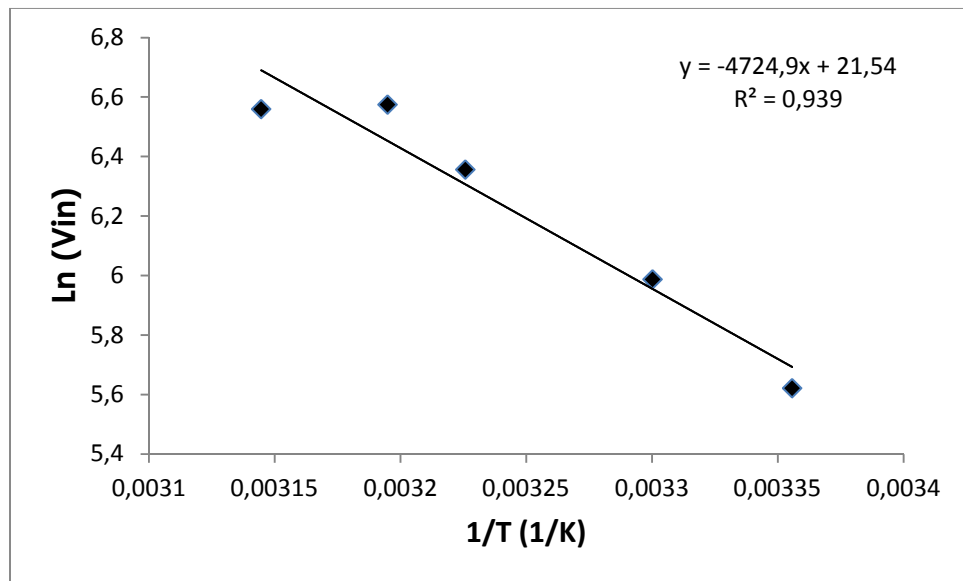
- **La phase ascendante :** de 25 à 45°C, l'activité de la carboxylestérase croît avec la température. Cette augmentation de l'activité de la carboxylestérase peut être expliquée par une augmentation de la concentration du complexe activé lorsqu'on fournit plus d'énergie sous forme thermique au système en réaction. L'activité enzymatique vaut environ  $98,20 \cdot 10^6$  UI/ml à 25°C et  $175,65 \cdot 10^6$  UI/ml à 45°C. Cette partie de la courbe correspond à la courbe d'activation (Weil, 1997).

• **La phase descendante** : au-delà de 45°C, l'activité enzymatique de la carboxylestérase diminue. Cette diminution va entraîner une dénaturation de l'enzyme qui perd sa configuration spatiale par destruction des liaisons faibles (liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, forces de Van der Waals). 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 ( $175,65 \cdot 10^6 \text{ UI/ml}$ ), est la température optimale de la carboxylestérase. Cette température est compromise entre une température favorisant les chocs efficaces et une température pour laquelle la plupart des liaisons faibles, maintenant la conformation tertiaire de la protéine, ne sont pas détruites (**Robert et Vian, 2004**).

Selon **Wynne et al, (1972)** la carboxylestérase présente une activité maximale à environ 40°C.

La partie ascendante de la courbe d'activité relative en fonction de la température du milieu réactionnel (figure 10) permet d'estimer l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse de l'éthyle butyrate 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 11). 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 de l'éthyle butyrate et  $R$  est la constante des gaz parfaits (cf. Paragraphe 1.6 .1 de la partie « Rappels théoriques »).



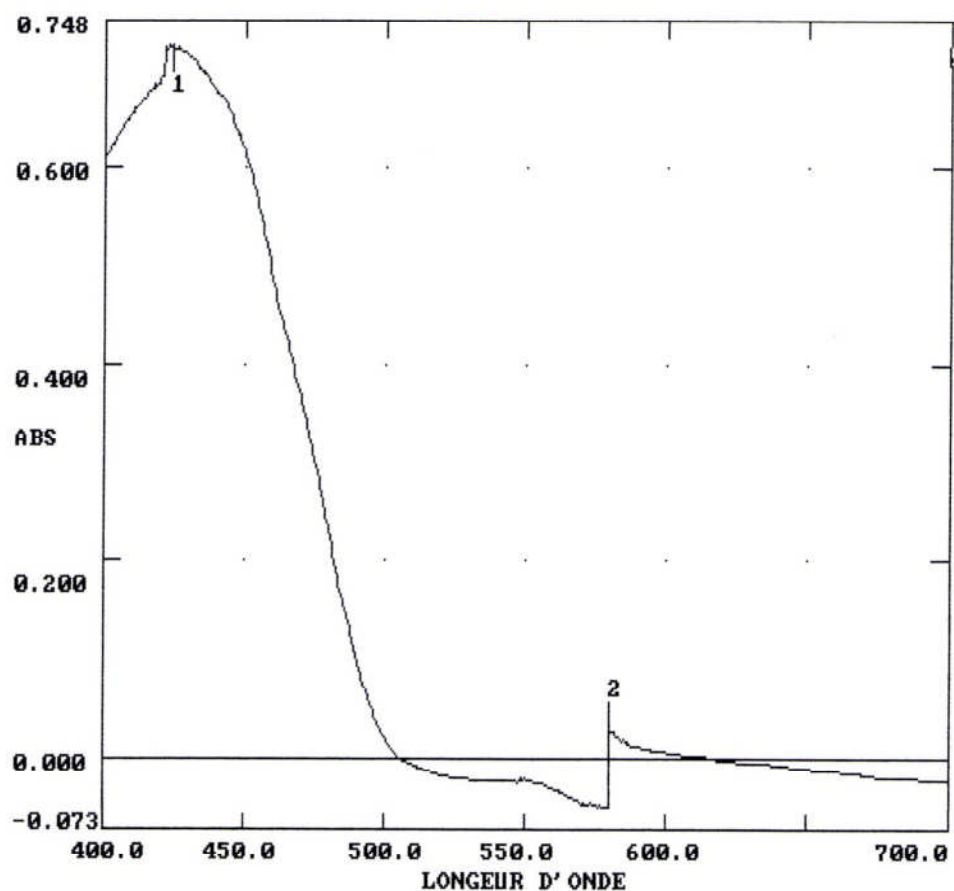
**Figure 11** : Graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de la carboxylestérase.(cf. figure 10 pour les conditions opératoires).

L'énergie d'activation donne parfois des indications intéressantes sur le mécanisme chimique de la réaction au niveau de l'enzyme (**Pelmont, 1993**).

L'énergie d'activation thermique déterminée à partir de la figure (11) est égale à  $39,280 \text{ KJ.mol}^{-1}$ .

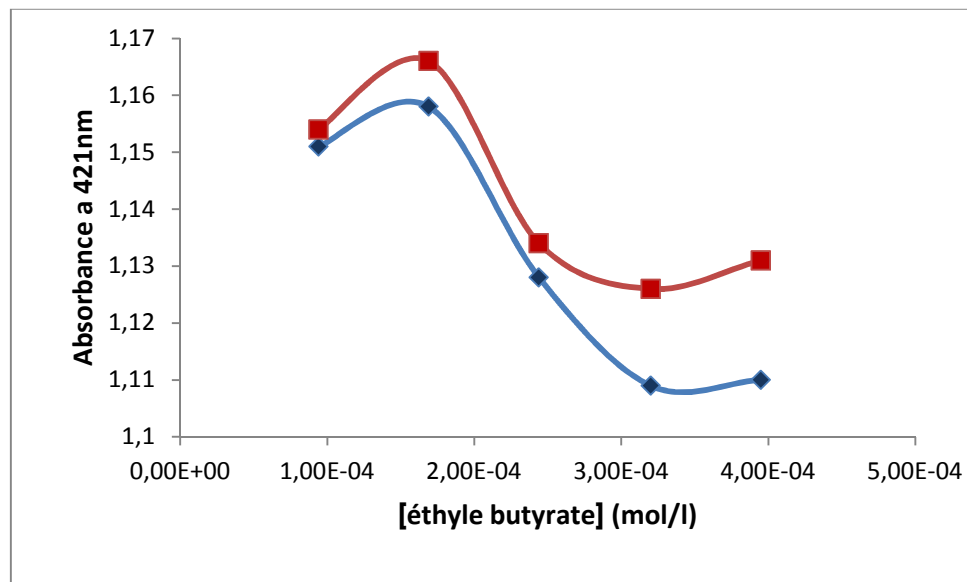
**V. Spectre d'absorption de la tartrazine (E102) diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) :**

D'après la figure (12), le spectre obtenu montre une absorbance maximale de la tartrazine de 0,735 à une longueur d'onde de 421 nm.



**Figure 12 :** Spectre d'absorption de la tartrazine diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).

## VI. L'effet de la concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine:

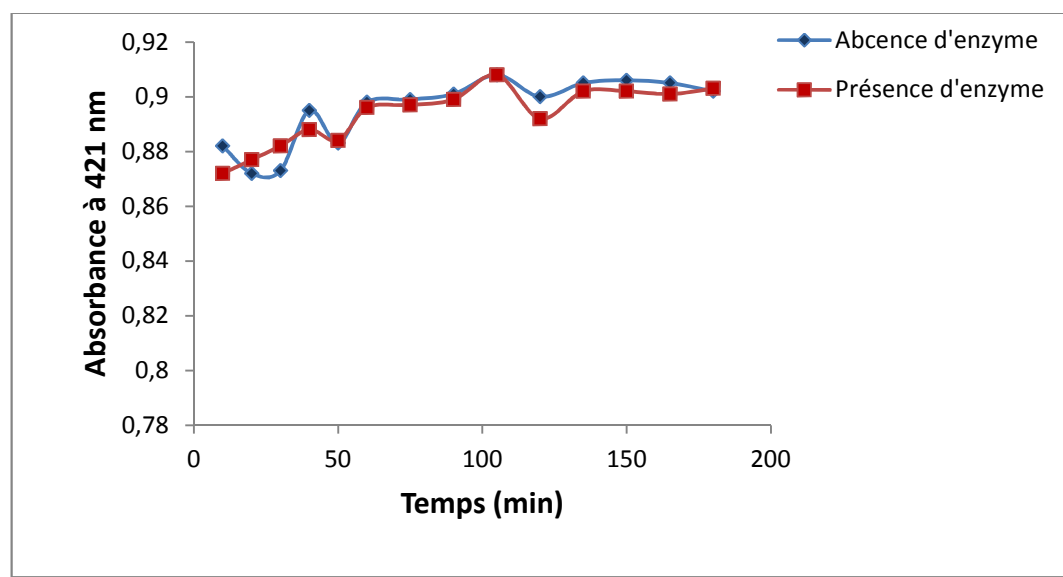


**Figure 13 :** Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence de différentes concentrations d'éthyle butyrate.

Les résultats représentés dans cette figure montrent qu'au cours de 90 min et avec la gamme des concentrations testées en présence de la tartrazine, la concentration de l'éthyle butyrate a une influence sur l'absorbance de la tartrazine en la diminuant.

## VII. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine :

La figure (14) ci-dessous représente l'évolution des absorbances des deux solutions : la tartrazine en présence d'enzyme et du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M - pH 8,00, et la tartrazine en présence du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M - pH 8,00.

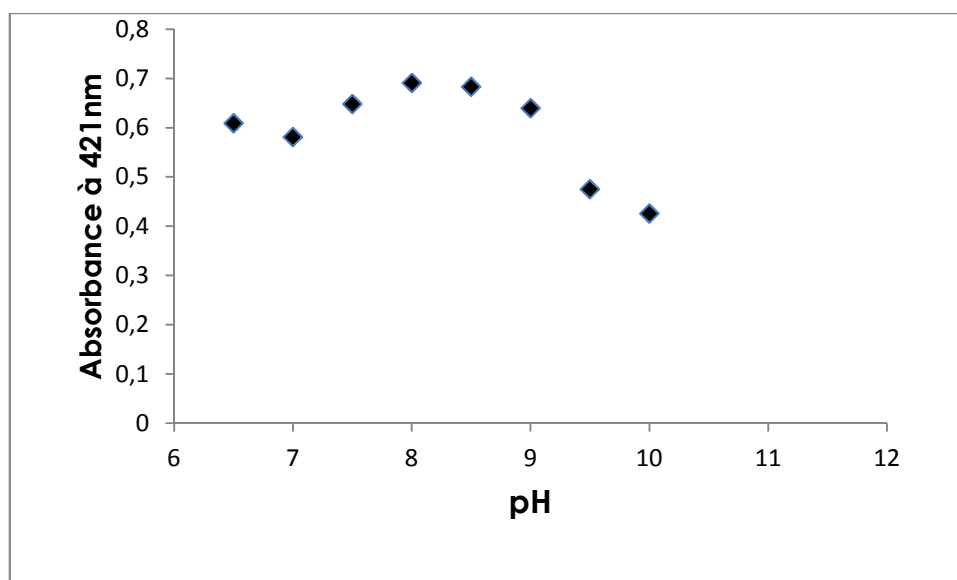


**Figure 14 :** Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence et en absence de la carboxylestérase.

D'après la figure 14, on observe que pendant trois heures du suivi d'absorbance de la préparation contenant l'enzyme et la tartrazine diluée dans la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00), les absorbances n'ont pas changé significativement par rapport à l'échantillon témoin (La tartrazine diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) sans l'enzyme), cela nous informe que la tartrazine n'est influencée ni par l'enzyme (la carboxylestérase) ni par la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00), ce qui nous permettra d'entamer l'étude de l'interaction du colorant au cours de la cinétique enzymatique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase.

### VIII. Effet du pH sur la tartrazine :

La représentation ci-dessous indique l'absorbance de la tartrazine en fonction du pH :

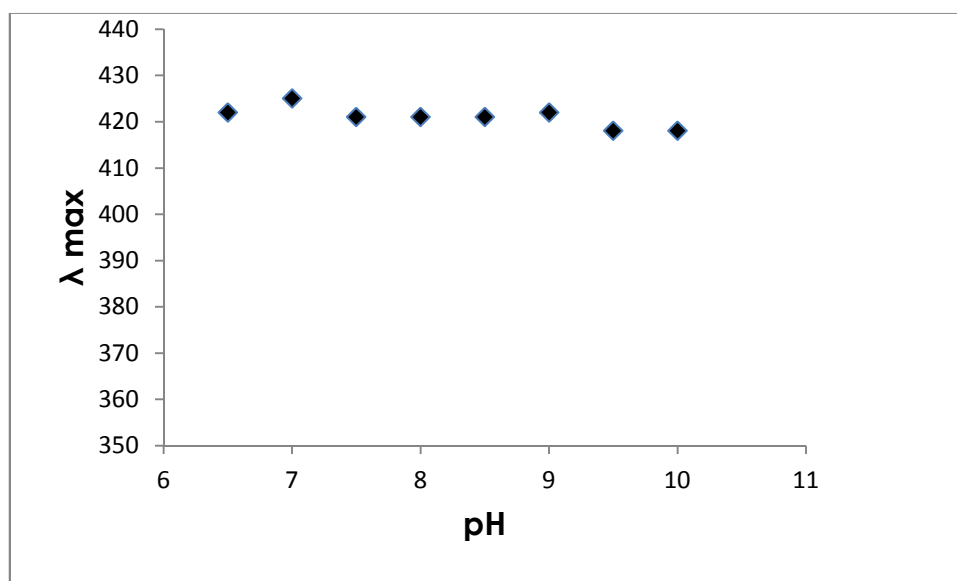


**Figure 15** : Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en fonction du pH.

La figure 15 montre que le pH a un effet sur l'absorbance de la tartrazine à des pH supérieurs à 9 alors que pour les pH inférieurs à 9, l'absorbance est plus ou moins stable.

Chaque valeur d'absorbance représente un maximum d'absorption pour une longueur d'onde bien définie comme le montre la figure 16.





**Figure 16 :** Représentation de la longueur d'onde maximale de la tartrazine pour différente valeur de pH.

D'après cette représentation, nous remarquons que le pH n'a pas une influence sur le maximum d'absorption ou la longueur d'onde de la tartrazine dans une gamme de pH compris entre 6,5 et 9, cependant, l'influence est visible avec une diminution de la longueur d'onde de la tartrazine de 422 nm (pH 6,5) à 418 nm (pH 9,5 et 10). Cette diminution est due au changement d'états d'ionisation des atomes constituant la molécule de tartrazine.

## IX. Détermination des paramètres cinétiques de la carboxylestérase :

### IX.1. Cinétique d'hydrolyse de la carboxylestérase en absence de tartrazine :

Afin de déterminer les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  de la carboxylestérase, nous avons fait varier de  $9,41 \cdot 10^{-5}$  à  $4,7 \cdot 10^{-4} M$  la concentration du substrat soumis à l'enzyme. La vitesse de la réaction d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase 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  $V_{max}$ .

$$V_{in} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Avec:

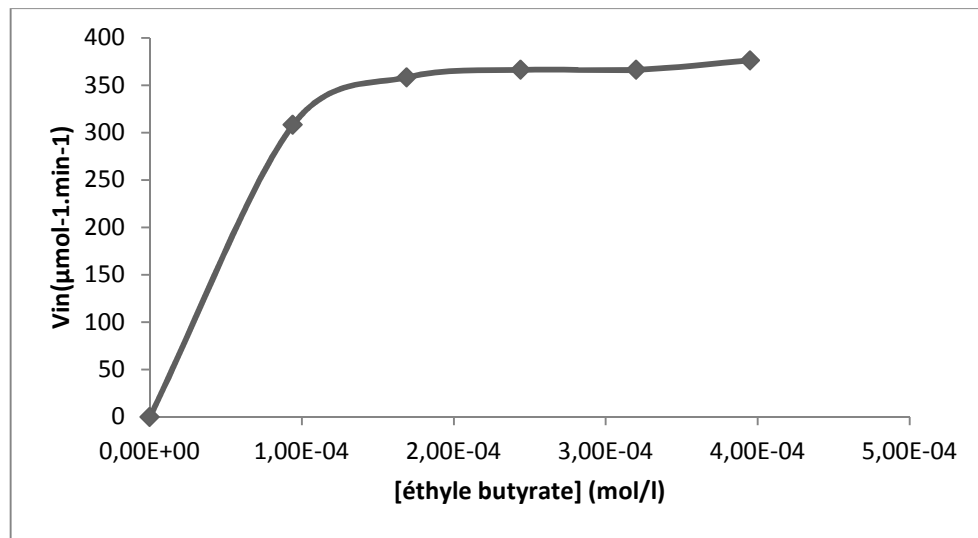
**$V_{in}$**  : Vitesse initiale d'hydrolyse ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) ;

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

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

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

La figure 17 représente la courbe obtenue.



**Figure 17 :** Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon l'équation de Michaelis- Menten. (25°C ; dilution d'enzyme 1/250 (v/v) ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00)).

A partir de cette courbe, nous avons obtenu :

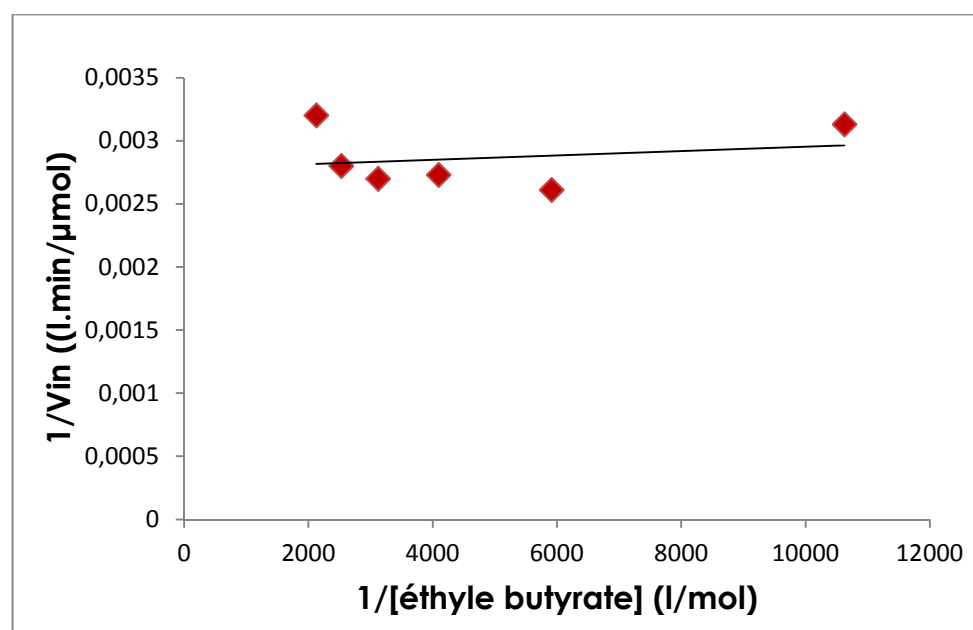
$$V_{\max} = 376,061 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 1,051 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}.$$

$$r^2 = 0,718.$$

Pour une détermination plus précise des paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{\max}$ , il est préférable d'utiliser l'une des nombreuses représentations graphiques, linéarisant des mesures expérimentales. La représentation en coordonnées inverses (dite de Lineweaver-Burk) pour des concentrations en substrat non saturantes est la plus employée (figure 17) (**Burnstein, 2000**). On a la relation suivante :

$$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$



**Figure 18 :** Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk. (cf. figure 17 pour les conditions opératoires) de la cinétique enzymatique de la carboxylestérase en absence de tartrazine.

A partir de cette représentation, nous avons obtenu :

$$V_{\max} = 394,025 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 1,17 \times 10^{-5} \text{ mol/l.}$$

$$r^2 = 0,6385.$$

La vitesse de la réaction d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase est mesurée ensuite à différentes concentrations en substrat comprises entre  $9,41 \cdot 10^{-5}$  et  $5,46 \cdot 10^{-4} \text{M}$ .

L'équation cinétique de Michaelis-Menten cesse d'être valable pour des concentrations en substrat supérieures à  $3,95 \cdot 10^{-4} \text{M}$  qui entraînent une inhibition partielle de l'enzyme.

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 est alors :

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

Avec:

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

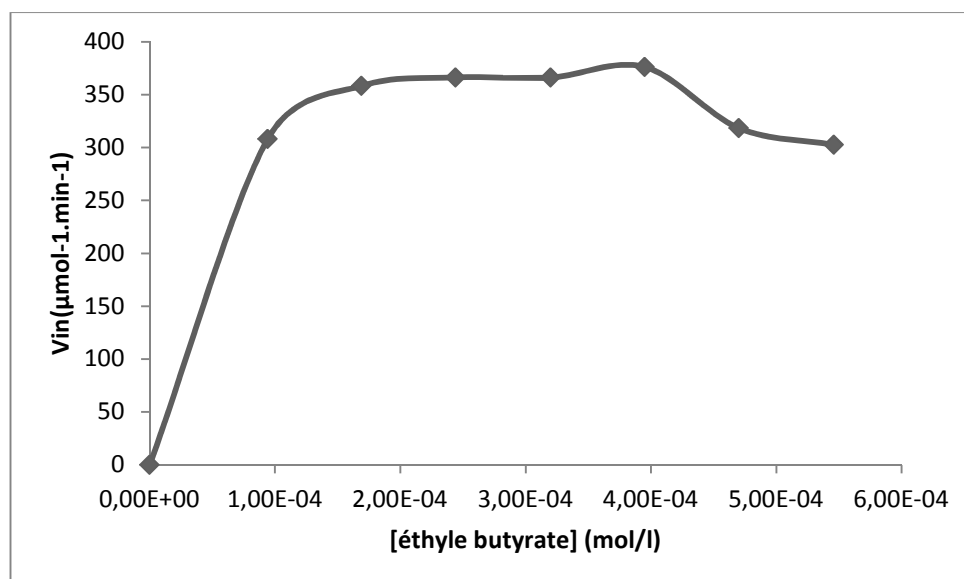
**V<sub>max</sub>** : Vitesse maximale d'hydrolyse ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) ;

**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  $V_{in} = f$  ([éthyle butyrate]) tracée à l'aide de l'équation ci-dessus (figure 19) fait apparaître une déviation par rapport au modèle michaelien, explicable par une inhibition par excès de substrat.



**Figure 19** : Effet de la concentration de l'éthyle butyrate sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la carboxylestérase.

(25°C ; dilution d'enzyme 1/250 (v/v) ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00)).

A partir de cette représentation, nous avons obtenue :

$$\mathbf{V_{max}} = 374,1 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$\mathbf{K_m} = 1,103 \times 10^{-5} \text{mol/l.}$$

$$\mathbf{K_s} = 7,78 \text{ mol/l.}$$

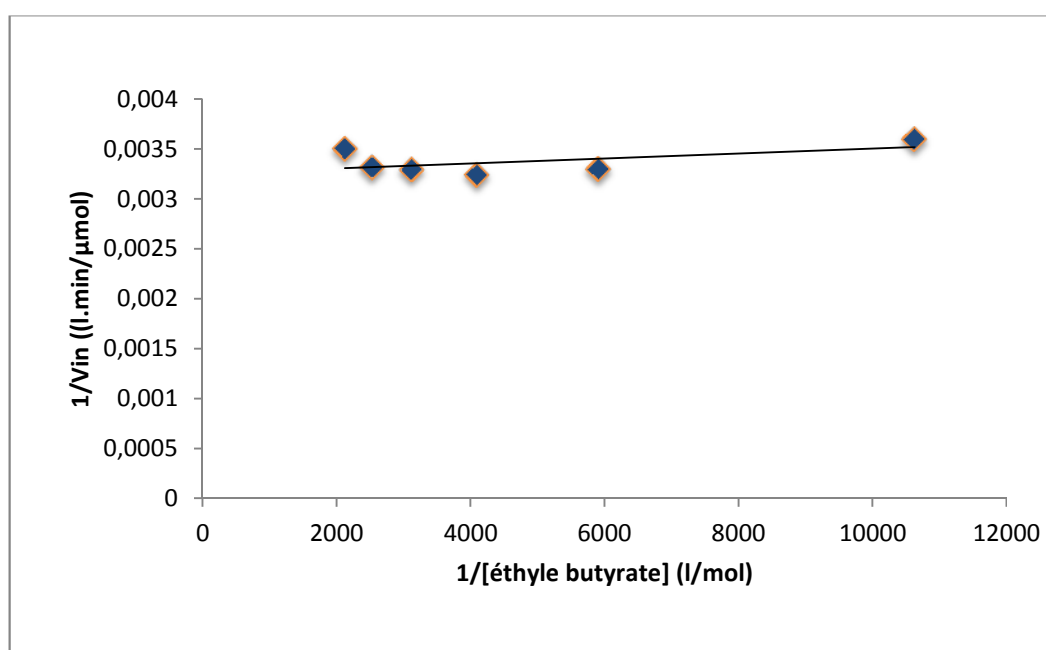
$$\mathbf{r^2} = 0,601.$$

La figure 19 montre que la vitesse initiale d'hydrolyse de l'éthyle butyrate, augmente dans un premier temps, avec la concentration initial de substrat ( $S_0$ ) puis atteint un maximum pour  $S_0 = 3,95 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ . A partir de cette concentration, la vitesse initiale diminue ; cette baisse d'activité enzymatique est peut être due à l'inhibition de la carboxylestérase par excès de substrat.

## IX.2. Cinétique de la carboxylestérase en présence de la tartrazine :

Puisque la tartrazine n'est pas considérée comme un substrat de la carboxylestérase, nous avons essayé de savoir si ce colorant exerce un effet inhibiteur ou activateur sur l'enzyme.

La figure 18 représentée ci-dessous est la représentation de Lineweaver-Burk de la cinétique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase en présence de la tartrazine.



**Figure 20 :** Représentation de Lineweaver et Burk de la cinétique de la carboxylestérase en présence de la tartrazine.

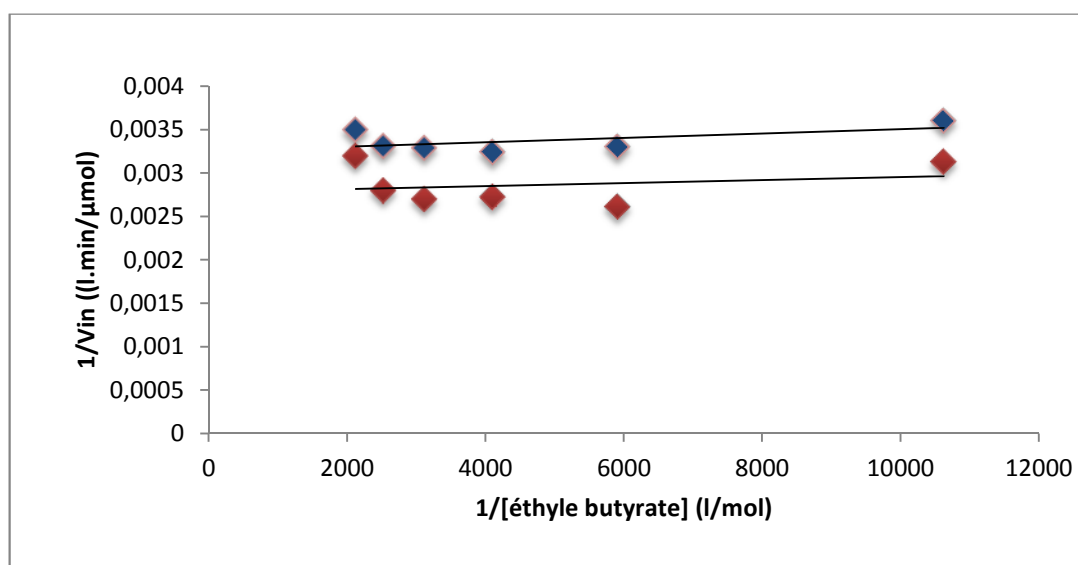
A partir de cette représentation, nous avons obtenu :

$$\mathbf{V_{max}'} = 331,721 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$\mathbf{K_m'} = 9,89 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}.$$

$$\mathbf{r^2} = 0,61818.$$

Afin de comparer la cinétique de la carboxylestérase en absence et en présence de la tartrazine, nous avons superposé les deux représentations afin d'étudier la nature de l'interaction ainsi que l'effet de la tartrazine sur la cinétique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase.

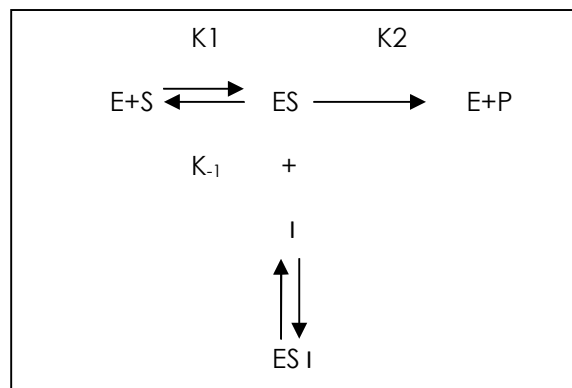


**Figure 21** : Représentation de Lineweaver-Burk des cinétiques de la carboxylestérase en absence (♦) et en présence (◆) de la tartrazine.

La représentation graphique (figure 21) de Lineweaver-Burk des résultats obtenus en absence et en présence de la tartrazine, semble indiquer que la tartrazine exerce une inhibition incompétitive sur la carboxylestérase. En effet, les droites obtenues avec ou sans la tartrazine sont parallèles.

L'inhibition incompétitive peut être représentée par 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.

En effet, l'inhibiteur incompétitif ne se fixe que sur le complexe enzyme-substrat, donc déplace l'équilibre de la réaction enzymatique et abaisse la constante  $K_m$ . Comme une partie de ce complexe reste bloquée sous la forme : enzyme-substrat-inhibiteur, la valeur de  $V_{max}$  est aussi diminuée.

Les paramètres  $K_m$  et  $V_{max}$  apparents, noté  $K_m'$  et  $V_{max}'$  respectivement, diminuent lorsque la concentration en tartrazine augmente, traduisant ainsi l'effet d'un inhibiteur incompétitif.

$$V'_{max} = V_{max} / (1 + [I]/K_i) \Rightarrow K_i = V'_{max} [I] / V_{max} - V'_{max}$$

$$K_i = 355,591 \mu\text{mol.l}^{-1}$$

# *Conclusion*

L'utilisation des enzymes est selon le cas destiné à faciliter le procédé, améliorer la conservation et les caractéristiques organoleptiques ou nutritionnelles de certains produits alimentaires. Elles participent à la synthèse des molécules biochimiques, à des opérations de technologie alimentaire et à l'élaboration de nouvelles techniques analytiques, à la fois rapides et spécifiques.

La première partie de notre travail s'intéresse à l'étude de l'activité catalytique de la carboxylestérase du foie du porc en fonction du temps.

On a étudié ensuite l'effet du pH, de la température sur l'activité de l'enzyme, cela nous a permis d'estimer un pH optimum de 7,8 et une température optimale de 45°C, et une énergie d'activation de 39,28Kj/mol.

En suite, on s'est intéressé à l'étude des paramètres cinétiques de la carboxylestérase et enfin, on a entamé l'étude de l'influence de la tartrazine (colorant alimentaire azoïque) sur l'activité de la carboxylestérase qui nous a permis de savoir le type d'inhibition qu'exerce ce colorant sur la réaction d'hydrolyse d'éthyle butyrate par la carboxylestérase.

Afin d'achever et d'approfondir ce travail, on propose :

- L'extraction de la carboxylestérase d'autres sources telles que les plantes ou les microorganismes et l'étude de paramètres cinétiques.
- L'étude de la cinétique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase en présence d'autres colorants azoïques.

*Références  
Bibliographiques*

1. 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.
2. Bertram, J., Krisch, K. Hydrolysis of vitamin A acetate by unspecified carboxylesterases from liver and kidney. *Eur. J. Biochem.* 1969, Vol. 11, pp. 124.
3. Bourland, J., Martin, D. Carboxylesterases mediated transestérification of mépéridine and Ritalin in presence of ethanol, preliminary in vitro using of rat liver preparation. *J. Pharm. SCI.* 1997. Vol. 86, pp. 1494-1496.
4. Bornscheuer, T. Microbial carboxylesterases : classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, pp. 73-81.
5. Bornscheuer, T., Kazlauskas, J. Hydrolases in organic synthesis. *Reio and Sterioselective Biotransformations.* 2006, pp. 166-167.
6. Burnstein, C. *Biotechnologie enzymatique : industrie alimentaire – Environnement – Médical.* Paris : Economica, 2000, pp. 63-103.
7. Coutouly, G. *Génie enzymatique une introduction.* Paris : Masson et Doin, 1991, pp. 21-38.
8. 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. 965-971.
9. Dutau, G. *Le dictionnaire des allergènes.* 6<sup>ème</sup> édition Phase V edit. 2012, pp. 335.

10. Fickers, P., Destain, J., Thonart, P. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Argon. Soc. Environ.* 2007, Vol. 12, pp. 123-125.
11. Heymann, E. Hydrolysis of carboxylic ester and amides. *Metabolic basis of detoxification.* 1982, pp. 229-245.
12. Hosokawa, M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs, *Molecules*, 2008, Vol. 13, pp. 413-415-416.
13. Hosokawa, M., Endo, T., Fujisawa, M., Hara, S., Iwata, N., Sato, Y., and Satoh, T. Interindividual variation in carboxylesterase levels in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 1995, Vol. 23, pp. 1022-1027.
14. 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.
15. Imai, T. Human carboxylesterase isoenzymes : Catalytic properties and rational drug design, *Drug Metab. Pharmacokinet*, 2006, Vol. 21, pp. 174-176.
16. Jawetz, E., Melnick, L., Adelberg, A. *Microbiologie médicale.* Paris : Laibrairie maloine, 1973, pp. 68.

17. Kyeong, K., Hyun, K., Dong, H., Kwang, Y., Senyon, C. Cristal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity. *Current Biology*, 1997, Vol. 5, pp. 1571-1572.
18. Lehninger, A.L. *Biochimie : Bases moléculaire de la structure et des fonctions cellulaires*. 2<sup>ème</sup> édition. Flammarion, 1977, pp. 191-192.
19. Levine, N., Lavis, D., Raines, T. Trimethyl Lock: A Stable Chromogenic Substrate for Esterases. *Molecules*, 2008, Vol. 13, pp. 205.
20. Loncle, D. *Génie enzymatique*. Paris : Doin, 1992, pp. 3-21.
21. Mentlein, R., Heymann, E. Hydrolysis of ester and amide type drugs by the purified isoenzymes of nonspecific carboxylesterase from rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 1984, Vol. 33, pp. 1243-1248.
22. 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.
23. Pelmont, J. *Enzymes*. Alger : Office des publications universitaires, 1993, pp. 167.
24. Robert, D., Vian, B. *éléments de biologie cellulaire*. 3<sup>ème</sup> édition, Doin, 2004, pp. 74-75.

25. Satoh, T., Hosokawa, M. The mammalian carboxylesterase : From Molecules to Functions. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol, 1998, Vol. 38, pp. 257-258.
26. Satoh, T., Hosokawa, M. From molecules to functions, Chem. Biol. Interact, 2006, pp. 195-211.
27. Satoh, T., Hosokawa, M. Carboxylesterases : structure, fonction and polymorphism in mammals, Journal of pesticide Science. 2010, Vol. 35, pp. 219, 221, 222.
28. Streit, M. Evaluation of the 'side door' in carboxylesterase mediated catalysis and inhibition, Biol. Chem, 2008, Vol. 389, pp. 149.
29. Upadhyya, G., Govardhan, L., Veerabhadrapppa, P.S. Purification and properties of a carboxylesterase from germinated finger millet (*Eleusine coracana Gaertn.*). J. Biosci. 1985, Vol. 7, pp.289-290.



30. Wang, J., Bourgea, J., Patten, C. Expression and characterization of recombinant human carboxylesterase expressed in Baculovirus-Infected high five insect cells. *BD. Biosc*, 2009, Vol. 5, pp. 473.
31. Weil, H.J. *Biochimie générale*. 8<sup>ème</sup> édition. Paris : Masson, 1997, pp. 19-87.
32. Weil, H.J. *Biochimie générale*. 10<sup>ème</sup> édition. Paris : Masson, 2005, pp. 86-88.
33. Wheelock, E., Bryn, M., Brian, S., Jeff, L., Mike, J. Application of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 2008, pp. 119-120.
34. Wynne, D., Ginsburg, S., Shalitin, Y. Beef Liver Esterase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1972, pp. 206.

# *Annexes*

## **I. Préparation des solutions tampons :**

Dans les analyses chimique et biochimique, il est nécessaire de garder le pH d'une solution constant, et pour atteindre ce but on utilise une solution tampon.

Les solutions tampon sont des solutions plutôt concentrées d'un acide faible et de sa base conjuguée qui ne participent pas eux-mêmes à la réaction principale. Si des protons sont libérés au cours de celle-ci, ils réagissent avec la base pour augmenter la concentration de l'acide conjugué. Si des protons sont consommés, l'acide faible se dissocie en donnant la base conjuguée. Lorsqu'on ajoute un acide ou une base à une solution tampon, la variation de pH est très faible en tout cas beaucoup plus faible que lorsqu'on ajoute un acide ou une base à un solvant pur.

### **I.1 Solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) :**

Pour préparer une solution tampon d'acide borique à pH 8 on mélange des volumes donnés de deux solutions **A** et **B**, appelées solution stocks.

- 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  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  dans 1000ml d'eau distillée.
- La solution **B** est une solution de HCl à 0,1M, elle est obtenue après avoir ajouté 8,28ml de HCl dans l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1000ml.

Après avoir préparé les deux solutions **A** et **B**, on mélange 100ml de **A** et 41ml de **B**, puis on ajoute 59ml d'eau distillée pour obtenir un volume final de 200ml de solution tampon d'acide borique à pH 8. Si le pH de cette solution n'est pas à 8 on ajoute quelques gouttes d'HCl 1N ou NaOH 1N pour ajuster cette valeur.

# *Résumés*

## **Résumé :**

Ce travail est une contribution à l'étude des paramètres cinétiques de la carboxylestérase du foie du porc (EC 3.1.1.1) en présence d'un colorant alimentaire la tartrazine sous la référence (E102).

L'activité de la carboxylestérase a été étudiée en fonction du pH, de la température, de la concentration en substrat (l'éthyle butyrate) et en présence d'un additif alimentaire (tartrazine E102). La mesure de la vitesse initiale de l'hydrolyse a conduit aux résultats suivants :

- La carboxylestérase présente une activité maximale à un pH 7,8 et à température de 45°C.
- La carboxylestérase peut subir une inhibition par excès de son substrat l'éthyle butyrate.
- La tartrazine (colorant alimentaire azoïque) a une influence sur la vitesse d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase à 25°C et dans une solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00). En effet, la tartrazine exerce une inhibition incompétitive sur la carboxylestérase. La valeur de la constante  $K_m$  est passée de  $1,17 \times 10^{-5}$  mol/l en absence de tartrazine à  $9,89 \times 10^{-6}$  mol/l en présence de tartrazine et la valeur de  $V_{max}$  est passée de  $394,025 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$  à  $331,721 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$  en absence et en présence de tartrazine respectivement.

**Mots clés :** La carboxylestérase, l'éthyle butyrate, la tartrazine,  $K_m$ ,  $V_{max}$ .

## **Abstract:**

This work is a contribution to the study of kinetic parameters of pig liver carboxylesterase (EC 3.1.1.1) in the presence of a food dye tartrazine (E102).

The carboxylesterase activity was studied as a function of pH, temperature, substrate concentration (ethyl butyrate) and in the presence of a food additive (tartrazine E102). The determination of initial hydrolysis rates gave the following results:

- Carboxylesterase presents a maximum activity at pH 7,8 and at a temperature of 45°C.
- The carboxylesterase undergoes an inhibition by excess substrate ethyl butyrate.
- Tartrazine (food azo dye) has an influence on hydrolysis of ethyl butyrate by the carboxylesterase. Indeed, tartrazine is an uncompetitive inhibitor of carboxylesterase. The value of the constant  $K_m$  increased from  $1,17 \times 10^{-5}$  mol/l in the absence of tartrazine to  $9,89 \times 10^{-6}$  mol/l in the presence of tartrazine;  $V_{max}$  increased from  $394,025 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$  to  $331.721 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$  in the absence and presence of tartrazine respectively.

**Keywords:** Carboxylesterase, Ethyl butyrate, tartrazine,  $K_m$ ,  $V_{max}$ .