

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

Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie 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'inhibition de la carboxylestérase
du foie du porc en présence de deux colorants alimentaires,
la tartrazine et le colorant vert



Présenté par : **Dahmani Zoheir.**

Soutenu le: **23 juin 2014**, devant le jury composé de:

M^{elle} Didi A. Maître assistante A
M^{elle} MKEDDER I. Maître assistante B
M^{elle} LEMERINI W. Maître assistante A

Présidente
Examinatrice
Rapporteur

Année Universitaire : 2013 - 2014

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

Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie 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'inhibition de la carboxylestérase
du foie du porc en présence de deux colorants alimentaires,
la tartrazine et le colorant vert**

Présenté par : **Dahmani Zoheir.**

Soutenu le: **23 juin 2014**, devant le jury composé de:

M ^{elle} Didi A.	Maître assistante A	Présidente
M ^{elle} MKEDDER I.	Maître assistante B	Examinatrice
M ^{elle} LEMERINI W.	Maître assistante A	Rapporteur

Année Universitaire : 2013 - 2014

Remerciements

Je tiens à remercier, en tout premier lieu, M^{elle} Lemerini Wafaa, Maître assistante à l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen, qui a bien voulu me prendre en charge tout au long de ce mémoire. Son aide et ses précieux conseils m'ont encouragé à poursuivre ce travail avec toujours plus de rigueur. Tout le mérite lui revient de m'avoir guidé dans mes travaux et permis d'avancer avec beaucoup d'ardeur et de courage.

J'aimerais également remercier M^r Arribi Mourad, Professeur à l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen et directeur du laboratoire « BIOMOLIM » qui m'a suivi tout au long de mon cursus universitaire du Master et pour toutes les connaissances qu'il m'a inculquées.

Je remercie aussi tous les membres de mon jury :

M^{elle} Didi Amel, Maître assistante à l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté de présider mon jury.

M^{elle} Mkedder Ilham, Maître assistante à l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

A tous les professeurs qui m'ont enseigné durant toutes les années universitaires.

Mes remerciements vont également à M^r Kajima Mulengi, J. Directeur du laboratoire « COSNA », ainsi que tous les membres de ce laboratoire, et tout particulièrement, M^r Bendiabdellah Djamel et M^r Benariba Hassan, pour toute l'aide permanente qu'ils m'ont apporté tous le long de ma pratique.

Dédicace

Avec l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu achever ce travail que je dédie :

A mon encadreur M^{elle} Lemerini Wafàa qui a été toujours présente tout au long de ce travail.

A mon grand-père Hadj Larbi, qui nous a quitté cette année, que Dieu accueille son âme en son vaste Paradis, à ma grand-mère Hadja Yamna, ma mère qui, grâce à elle j'ai pu continuer mes études avec réussite, mon père toujours présent à mes côtés, mes oncles et mes tantes qui n'ont cessé de m'encourager.

A mon frère Mohamed Driouche qui m'a beaucoup soutenu pendant tout mon cursus, ma sœur Wafàa, toujours là quand j'ai besoin d'elle.

A toute la famille.

A tous mes chers amis, Hocine, Samir, Derouiche Mohamed, Kada, Djamel, Imed, Zakaria, Hamoummi Mohamed, Dahmani Mohamed, Abdelhaq, Hocine Zidouri, Omar, Rabih, Amin, Nabil.

A mes chers camarades de Biologie, Fakhfakh Mohamed Amin, Adnane, Hadj Moussa Ali, Mebaraki Omar, Abdeljalil, Aziz, Moustapha, Réda, Mohamed, Ahmed, Aboubekr, Ayoub, Soufiane, Youssef, Moussa, Sid Ahmed.

*Dahmani
Zoheir*

Table des matières

INTRODUCTION.....	2
RAPPELS THEORIQUES.....	5
I. La carboxylestérase.....	6
I.1. Définition.....	6
I.2. Structure de la carboxylestérase.....	8
I.3. Classification des carboxylestérases.....	12
I.4. Sources.....	14
I.5. Mécanisme d'action.....	15
I.6. Propriétés physico-chimiques	19
I.6.1. La température.....	19
I.6.2. Le pH.....	20
I.6.3. Le substrat.....	21
I.6.4. Les inhibiteurs de la carboxylestérase.....	23
I.7. Le rôle biologique de la carboxylestérase.....	25
I.7.1. Le métabolisme des xénobiotiques.....	25
I.7.1.1. Le métabolisme des médicaments.....	25
I.7.1.2. L'activation des promédicaments.....	25
I.7.2. Le métabolisme des endobiotiques.....	25
I.7.2.1. L'homéostasie du cholestérol.....	26
I.7.2.2. Génération d'esters éthyliques d'acides gras..	26
II. Les colorants alimentaires.....	28
II.1. La tartrazine.....	28
II.1.1. Structure et nomenclature.....	29
II.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	30
II.1.3. Effet de la tartrazine sur la santé.....	30

II.2. Le colorant vert.....	31
II.2.1. Le rouge ponceau.....	32
II.2.1.1. Structure et nomenclature.....	32
II.2.1.2. Toxicité du rouge ponceau.....	33
II.2.2. Le dioxyde de titane.....	33
II.2.3. Remarque.....	34
II.2.4. L'indigotine.....	34
II.2.4.1. Structure et nomenclature.....	34
II.2.4.2. Toxicité de l'indigotine.....	35
MATERIEL ET METHODES.....	36
I. Réactifs utilisés.....	37
II. Dosage des protéines par la méthode du biuret.....	38
II.1. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	39
II.2. Calcule de la concentration en protéine de la préparation enzymatique de la carboxylestérase.....	40
III. Détermination de l'activité enzymatique.....	42
III.1. Détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse.....	43
III.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique.....	43
III.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique.....	44
IV. Etude de l'influence du pH et la température sur l'activité de la carboxylestérase.....	45
IV.1. Influence de pH.....	45
IV.2. Influence de la température.....	46
V. Etude de l'influence de la concentration en substrat (l'éthyle butyrate) sur l'activité de la carboxylestérase.....	47
VI. Etude de l'influence de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase.....	48
VI.1. Spectre d'absorption de la tartrazine.....	48

VI.2. Effet de la concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine.....	48
VI.3. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine.....	49
VI.4. Effet de pH sur la tartrazine.....	50
VI.5. Effet de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase.....	50
VII. Etude de l'influence du colorant vert (E124-E171) sur l'activité de la carboxylestérase.....	52
VII.1. Spectre d'absorption du colorant vert.....	52
VII.2. Effet de la concentration en éthyle butyrate sur le colorant vert.....	52
VII.3. Effet de la carboxylestérase sur le colorant vert.....	52
VII.4. Effet de pH sur le colorant vert.....	53
VII.5. Effet du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase.....	54
VIII. Détermination de la concentration d'inhibition médiane IC_{50}	55
RESULTATS ET DISCUSSION.....	56
I. Mesure des activités volumique et spécifique de l'enzyme.....	57
II. Recherche de l'activité carboxylestérase de la préparation enzymatique.....	58
III. L'influence de pH sur l'activité de la carboxylestérase.....	59
IV. L'influence de la température sur l'activité de la carboxylestérase.....	61
V. La tartrazine (E102).....	64
V.1. Spectre d'absorption de la tartrazine (E102) diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).....	64
V.2. L'effet de concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine.....	65

V.3. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine.....	65
V.4. Effet du pH sur la tartrazine.....	67
VI. Le colorant vert (E124-E171).....	69
VI.1. Spectre d'absorption de colorant vert (E124-E171) diluée dans du tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1 M (pH 8,00)	69
VI.2. L'effet de concentration en éthyle butyrate sur le colorant vert.....	70
VI.3. L'effet de la carboxylestérase sur le colorant vert.....	71
VI.4. L'effet du pH sur le colorant vert.....	72
VII. Détermination des paramètres cinétiques.....	74
VII.1. Cinétique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase.....	74
VII.2. Cinétique de la carboxylestérase en présence de la tartrazine et du colorant vert.....	79
VII.3. Détermination de la concentration d'inhibition médiane IC ₅₀	83
CONCLUSION	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	88

Liste des tableaux

Tableau 1 : Activités volumique et spécifique de la carboxylestérase dans les conditions standards.....	57
Tableau 2 : Les paramètres cinétiques de la carboxylestérase.....	78
Tableau 3 : Les paramètres cinétiques de la carboxylestérase déterminés en absence et en présence de la tartrazine et du colorant vert.....	82

Liste des tableaux

Tableau 1 : Activités volumique et spécifique de la carboxylestérase dans les conditions standards.....	57
Tableau 2 : Les paramètres cinétiques de la carboxylestérase.....	78
Tableau 3 : Les paramètres cinétiques de la carboxylestérase déterminés en absence et en présence de la tartrazine et du colorant vert.....	82

Liste des figures

Figure 1: Réaction d'hydrolyse de l'ester carboxylique par la carboxylestérase.....	7
Figure 2 : Schéma du repliement α/β	9
Figure 3 : Interaction carboxylestérase-UGT dans la face luminale de réticulum endoplasmique et interaction carboxylestérase-transporteur dans la cellule.....	10
Figure 4 : La structure cristalline de la rCES et de la hCES1.....	11
Figure 5 : Reconnaissance spécifique de l'enzyme et du substrat.....	15
Figure 6 : Mécanisme d'action de la carboxylestérase.....	18
Figure 7 : Les Différents substrats agrochimiques et pharmaceutiques de la carboxylestérase.....	22
Figure 8 : Structures chimiques des inhibiteurs de la carboxylestérase	24
Figure 9 : Les fonctions biologiques de la carboxylestérase.....	27
Figure 10 : La tartrazine.....	29
Figure 11 : Structure chimique de la tartrazine.....	30
Figure 12 : Le colorant vert.....	31
Figure 13 : Structure moléculaire de rouge ponceau.....	32
Figure 14 : Structure moléculaire d'indigotine.....	35
Figure 15 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret.....	40
Figure 16 : Cinétique d'hydrolyse d'éthyle butyrate en présence et en absence de la préparation d'enzyme de la carboxylestérase.....	58
Figure 17 : Effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase.....	59
Figure 18 : Effet de la température sur l'activité de la carboxylestérase..	61
Figure 19 : Représentation graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de la carboxylestérase.....	63
Figure 20 : Spectre d'absorption de la tartrazine diluée dans du tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1 M (pH 8,00).....	64
Figure 21 : Evolution de l'absorbance de la tartrazine en présence de différentes concentrations d'éthyle butyrate.....	65
Figure 22 : Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence et en absence de la carboxylestérase en fonction du temps.....	66
Figure 23 : Effet du pH sur l'absorbance du tartrazine.....	67
Figure 24 : Effet du pH sur le maximum d'absorption du tartrazine.....	68
Figure 25 : Spectre d'absorption du colorant vert dilué dans du tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1 M (pH 8,00).....	69

Figure 26 : Evolution de l'absorbance du colorant vert en présence de différentes concentrations d'éthyle butyrate.....	70
Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance du colorant vert en présence et en absence de la carboxylestérase en fonction du temps.....	71
Figure 28 : Effet du pH sur l'absorbance du colorant vert.....	72
Figure 29 : Effet du pH sur le maximum d'absorption du colorant vert....	73
Figure 30 : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en éthyle butyrate selon l'équation de Michaelis-Menten	75
Figure 31: Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase.....	76
Figure 32 : Effet de la concentration de l'éthyle butyrate sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la carboxylestérase.....	77
Figure 33 : Représentation de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase en absence et présence de la tartrazine (A) et le colorant vert (B).....	80
Figure 34 : Effet de la concentration de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase.....	83
Figure 35 : Effet de la concentration du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase.....	83

Liste des abréviations

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

Asp: Aspartate.

BSA: L'albumine de sérum bovin.

CES: Carboxylestérase.

CPT-11: Carbonyloxycamptothécine.

Cys: Cystéine.

DJA: La dose journalière admissible.

DL₅₀: La dose létale 50.

Glu: Glutamate.

Gly: Glycine.

GSH-Px: La peroxydase de glutathion.

hCES: Carboxylestérase intestinale humaine.

His: Histidine.

Leu: Leucine.

mCES2 : Carboxylestérase intestinale du rat.

rCES: Carboxylestérase du foie de lapin.

Ser: Sérine.

SN-38: 7-éthyle-10-hydroxycamptothécine.

SOD: La dismutase de superoxyde.

Introduction

Tous les organismes vivants sont exposés en permanence à des produits chimiques étrangers appelés xénobiotiques, qui comprennent à la fois des produits naturels et synthétiques tels que les médicaments, les pesticides, les produits chimiques industriels, les polluants, les alcaloïdes, les métabolites secondaires des végétaux, les toxines produites par les moisissures, les plantes et les animaux, etc...

La propriété physique permettant à de nombreux xénobiotiques d'être absorbés par la peau, les poumons ou le tractus gastro-intestinal grâce à leur caractère lipophile, est un obstacle à leur élimination (**Parkinson, 2001**), pour cela, les organismes vivants ont perfectionné des outils visant à favoriser l'élimination de ces 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 résultent 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), les rendant plus solubles dans l'eau 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). 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).

Les réactions catalysées par les enzymes de biotransformation des xénobiotiques sont généralement divisées en deux groupes, les réactions de phase I et les réactions de phase II. Les réactions de phase I impliquent l'hydrolyse, la réduction et l'oxydation, ces réactions entraînent généralement seulement une faible augmentation de l'hydrophilie.

Les réactions de la phase II confèrent également un caractère hydrosoluble aux molécules et facilitent d'autant leur excrétion, sauf pour les réactions d'acétylation et de méthylation. Les réactions de la phase II ont souvent comme substrat un produit de biotransformation de la phase I. Cependant, certains produits (tels que la bilirubine, la morphine, la buprénorphine) peuvent être directement impliqués dans une réaction de phase II. Ces réactions produisent des molécules conjuguées suite au couplage entre un xénobiotique (ou un métabolite) et un produit endogène déjà présent dans l'organisme. Les réactions de la phase II sont la glucuronoconjugaison (glucuronyl-transférase), la sulfoconjugaison (sulfotransférase), la conjugaison avec le glutathion (glutathion transférase), la conjugaison avec des acides aminés (acyltransférase), l'acétylation (N-acétyltransférase) et la méthylation (N ou O-méthyltransférase) **(Viau et Tardif, 2003)**.

Parmi les principaux enzymes qui sont impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques, les carboxylestérases (EC 3.1.1.1) qui appartiennent à la famille des α/β hydrolases et qui font partie des enzymes des réactions de la phase I 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)**.

En effet, une partie de notre travail s'intéresse à l'étude de l'interaction de la carboxylestérase du foie du porc avec deux colorants alimentaires de synthèse, la tartrazine (**E102**) et le colorant vert (**E124-E171**). La tartrazine est un colorant alimentaire azoïque, il s'agit d'une poudre orange soluble dans l'eau, elle est largement utilisée dans les produits alimentaires, les médicaments, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques. D'autre part, le colorant vert est aussi utilisé pour donner une couleur verte à certains produits alimentaires et pharmaceutiques.

Ce travail est une contribution à l'étude de l'inhibition de la carboxylestérase du foie du porc par deux colorants alimentaires de synthèse, la tartrazine (**E102**) et le colorant vert (**E124-E171**). Nous avons procédé de la manière suivante :

- ✓ La détermination des paramètres cinétiques de la carboxylestérase.
- ✓ L'étude de l'interaction entre la carboxylestérase et les deux colorants azoïques alimentaires.

*Rappels
théoriques*

I. La carboxylestérase :

I.1. Définition :

Toutes les réactions chimiques qui permettent le fonctionnement des êtres vivants sont catalysées par des protéines particulières appelées les enzymes, ces dernières 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)**.

De nombreux produits chimiques de synthèse y compris les pesticides, les médicaments ainsi que d'autres produits sont des composés d'ester, leur hydrolyse est catalysée par des estérases, **(Kyeong et al., 1997)**.

Les estérases d'acides carboxyliques sont un groupe d'enzymes qui sont largement distribuées dans la nature et ont été trouvées dans la plupart des organismes vivants. Elles peuvent être classées selon la spécificité au substrat et la sensibilité au inhibiteur en deux groupes : arylestérases (A-estérases) (EC 3.1.1.2) et aliestérases (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) **(Einarsso et al., 1996)**.

La carboxylestérase (EC 3.1.1.1) est parmi les principaux enzymes impliquées dans la détoxification et le métabolisme d'un grand nombre de xénobiotiques, elle permet l'hydrolyse de leurs esters carboxyliques (R-COOR'), avec ajout de l'eau, en alcool (R'-OH) et en acide carboxylique (R-COOH) comme l'indique la réaction suivante :



Figure 1 : Réaction d'hydrolyse de l'ester carboxylique par la carboxylestérase (Harada et al., 2009).

La carboxylestérase appartient à la famille α/β hydrolase, son nom officiel est : L'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 (Sato et Hosokawa, 2010).

Ces enzymes sont largement distribuées chez les animaux, les plantes et les micro-organismes, cependant, la plupart de ces enzymes 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).

Les carboxylestérases se trouvent dans de nombreux tissus y compris le foie, les poumons, l'intestin grêle, le cœur, le rein, les muscles et le cerveau ainsi que dans le tissu adipeux, les tissus des voies respiratoires et les leucocytes du sang. Cependant, l'activité et l'expression de cette enzyme varient selon les tissus et les organismes (Lima et al., 2013). 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).

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 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**).

1.2. Structure de la carboxylestérase :

Les repliements les plus souvent trouvés dans la nature sont les domaines α/β , composés des feuilletts β centraux entourés par des hélices α . Parmi ceux qui représentent ce type de repliement la famille α/β hydrolase, qui comprend : les lipases, les protéases, les estérases, les déshalogénases, les peroxydases et les époxydes hydrolases (**Nardini et Dijkstra, 1999**). Ces enzymes ont tous en commun un domaine central typique formé par huit brins parallèles « β » (seulement le deuxième brin β est antiparallèle) connectés par six hélices « α » formant un repliement dit α/β . 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**).

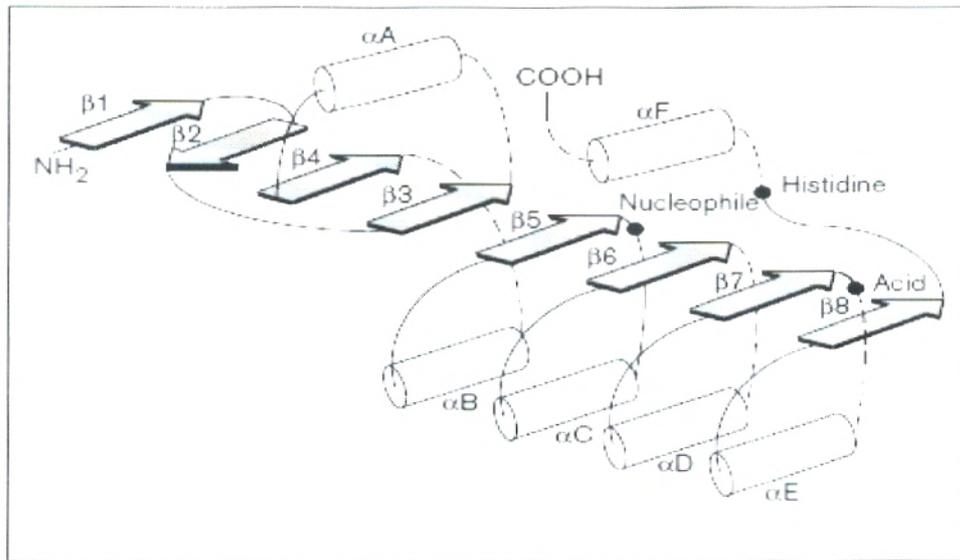


Figure 2 : Schéma du repliement α/β : La structure secondaire est indiquée par des flèches gris pour les brins bêta et des cylindres pour les hélices alpha. La localisation de la triade catalytique est indiquée par les points noirs. Les lignes pointillées indiquent l'emplacement des insertions possibles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

En effet, les carboxylestérases des mammifères semblent avoir un motif structural similaire aux autres enzymes de la famille α/β hydrolase. Ces carboxylestérases sont localisées dans le réticulum endoplasmique de nombreux tissus, elles possèdent un peptide signal N-terminal hydrophobe 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).

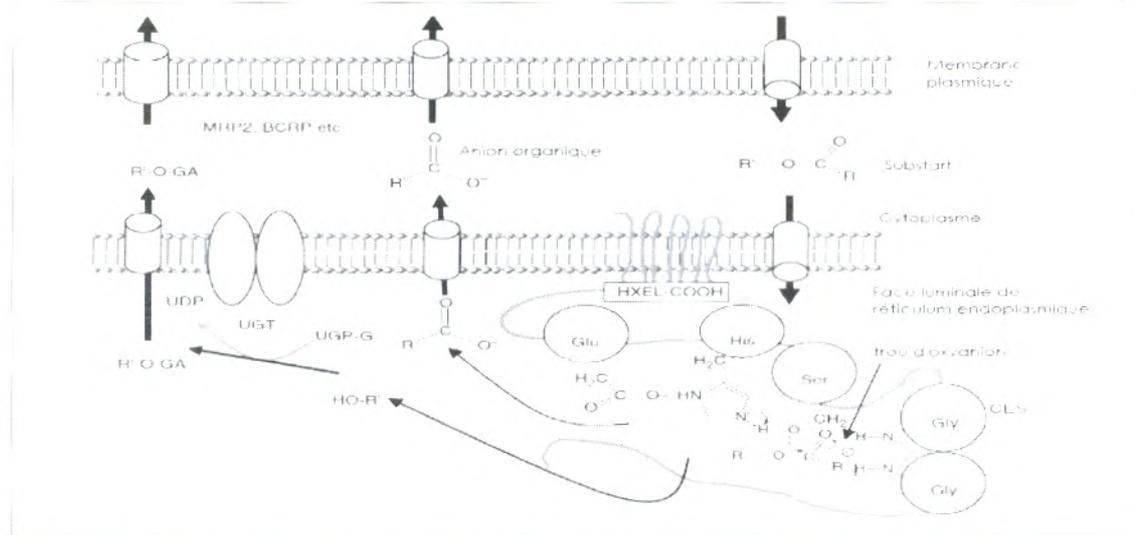


Figure 3 : interaction carboxylestérase-UGT dans la face luminale de réticulum endoplasmique et interaction carboxylestérase-transporteur dans la cellule (**Hosokawa, 2010**).

Les carboxylestérases adaptent une triade catalytique composée de Ser, His et Glu ou Asp, et ont quatre résidus de 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 25 Å de profondeur du site actif, approximativement au centre de la molécule et comprend une grande poche flexible d'un côté de 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 est 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 (**Satoh et Hosokawa, 2010**).

Seules trois structures cristallines de carboxylestérase humaine (hCE1) et une structure de la carboxylestérase du foie de lapin (rCES) ont été rapportées à ce jour. La hCE1 existe sous forme de trimères (figure 4). Chaque monomère est constitué d'un domaine catalytique, un domaine α/β 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**). Ces structures ont révélé que la carboxylestérase partage le repliement observé avec d'autres enzymes telles que la butylcholinestérase et l'acétylcholinestérase. Récemment, la carboxylestérase humaine hCES1a été rapportée, tandis que celle de hCES2 ne l'a pas été (**Imai., 2006**). La rCES et la carboxylestérase humaine partagent une identité de séquence de 81% (**Liu, 2007**).

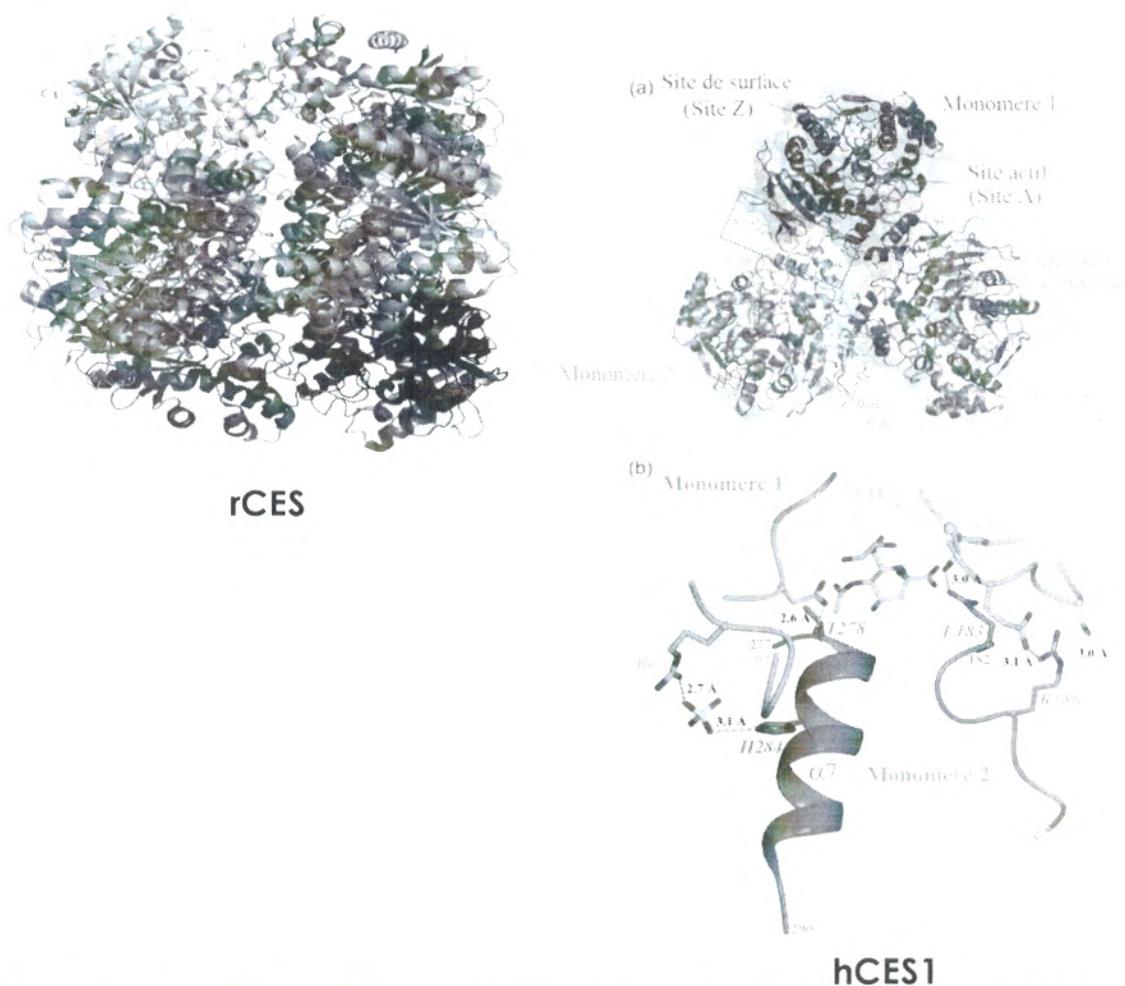


Figure 4 : La structure cristalline de la rCES et de la hCES1 (Liu, 2007; Fleming et al., 2005).

La carboxylestérase extraite du foie du porc comporte trois sous-unités d'un poids moléculaire de 58,2 kDa pour la sous-unité α , 59,7 kDa pour la sous-unité β et 61,4 kDa pour la sous-unité γ (**Bornscheuer et al., 2006**). Cependant, 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**).

1.3. Classification des carboxylestérases :

Selon la classification des estérases par Aldridge (1993), la super famille des sérines estérases comprend l'acétylcholine-estérase, la butyrylcholine-estérase et la carboxylestérase, qui appartiennent toutes à la famille B-estérase (**Satoh et Hosokawa, 2006**).

Les isoenzymes de la carboxylestérase ont été initialement classifiées par leur spécificité au substrat et le point isoélectrique, cependant, cette classification est moins précise à cause du chevauchement des spécificités du substrat (**Hosokawa, 2008**). Une seule réaction isoélectrique est souvent véhiculée par plusieurs types d'enzymes (**Hosokawa, 2010**).

Les carboxylestérases des mammifères comprennent une famille multigénique et peuvent être classées en cinq familles d'isoenzymes (CES1, CES2, CES3, CES4 et CES5) selon l'homologie de la séquence d'acides aminés (**Hosokawa, 2008**). 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 (**Takitani et al., 2007**).

La famille CES1 comprend les principales formes d'isoenzymes de la carboxylestérase et plus de 60% d'homologie avec la CES1A1 humaine. Ainsi, cette famille peut être divisée en huit sous familles (CES1A à CES1H). La plupart de la famille des CES1, à l'exception de CES1G, sont principalement exprimées dans le foie. 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 majeurs de la carboxylestérase du chien, du chat et du porc. La sous famille CES1H comprend RL1, ML1 et l'hydrolase B (CES1H3) et C (CES1H2) qui catalysent l'hydrolyse des longues chaînes acyl-CoA.

D'autre part, la famille des carboxylestérases inclut aussi la CES intestinale humaine hCES (CES2A1), la CES intestinale du lapin rCES2 (CES2A10), la CES intestinale du rat mCES2 (CES2A6), qui sont principalement exprimées dans l'intestin grêle. La famille des CES3 inclut la CES mâle (CES3A2) et la CES humaine (CES3A1). En effet, la CES3 humaine (CES3A1) a environ 40% d'identité d'acides aminés avec les deux CES1A1 et CES2A1, et est exprimée dans le tractus gastro-intestinal et du foie avec une expression faible par rapport au CES2A1 et CES2A1. La famille des CES4 inclut la (CES4A2), une protéine urinaire majeure excrétée dans les urines du chat. La famille des CES5 inclut des isoenzymes de 64,5 KDa, qui ont une structure différente de celle des autres isoenzymes de la carboxylestérase **(Hosokawa, 2008)**.

I.4. Sources :

Les carboxylestérases sont des enzymes ubiquitaires identifiées dans toutes les espèces allant des bactéries à l'homme **(Redinbo et Potter, 2005)**. Cependant, les carboxylestérases purifiées à partir des animaux ont été bien étudiées par rapport à celles des plantes et des micro-organismes **(Upadhya et al., 1985)**.

Parmi les carboxylestérases purifiées à partir du règne animal celles de la carboxylestérase hépatique humaine, la carboxylestérase hépatique du poulet, du cheval, du bœuf, du mouton et celle du porc qui est la plus étudiée **(Scott et Zerner, 1974)**. En ce qui concerne leur purification à partir des végétaux, 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)**. Cette enzyme est aussi synthétisée par les microorganismes tel que : *Sulfolobus sulfataricus*, *Acinetobacter lwoffii* et *Pseudomonas spp* **(Pesaresi et al., 2004)**.

Dans ces systèmes, les carboxylestérases existent surtout dans de multiples formes moléculaires, la présence très répandue de ces enzymes a incité de nombreux biochimistes pour les purifier et les étudier **(Upadhya et al., 1985)**.

1.5. 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.

La figure « 5 » illustre la formation du complexe enzyme-substrat par le modèle de simple complémentarité stérique 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**).

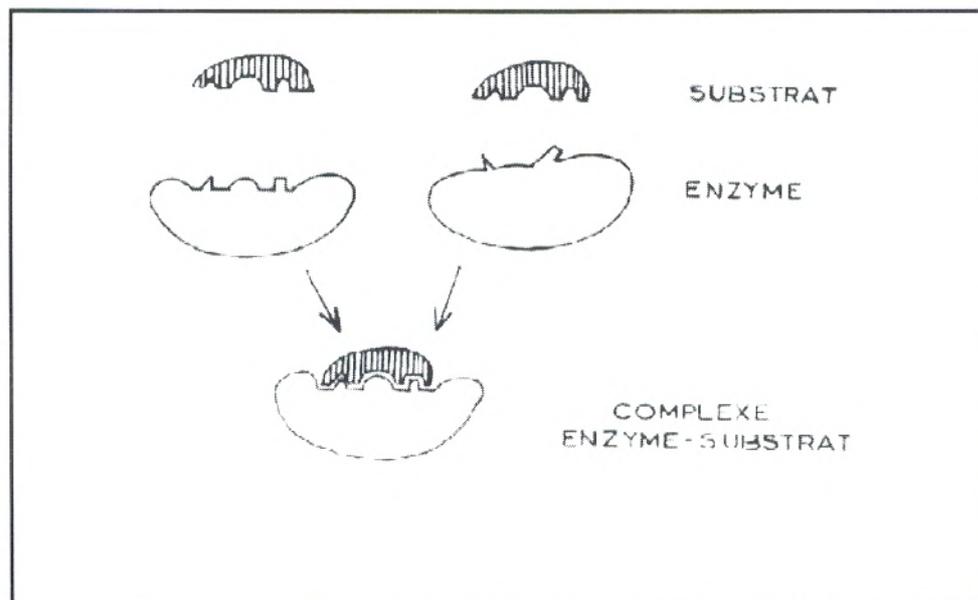


Figure 5 : Reconnaissance spécifique de l'enzyme et du substrat
- Modèle de la « clé dans la serrure ».
- Modèle de l'ajustement induit. (**Mouranche, 1985**).

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 reliée 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 par lequel les estérases hydrolysent leurs substrats a été examiné en utilisant des moyens à la fois biochimiques et structuraux par un certain nombre de groupes 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 acyl-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 la Ser203 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 Gly123 et la Gly124 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'His450. 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'His450 donne alors le proton à l'atome d'oxygène de la Ser203, qui libère alors le composant acide de substrat. Le composant acide diffuse plus loin accompagné par la régénération de l'enzyme **(Sato 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 (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., 2007)**.

La figure 6 représente les principales étapes du mécanisme d'action de la carboxylestérase :

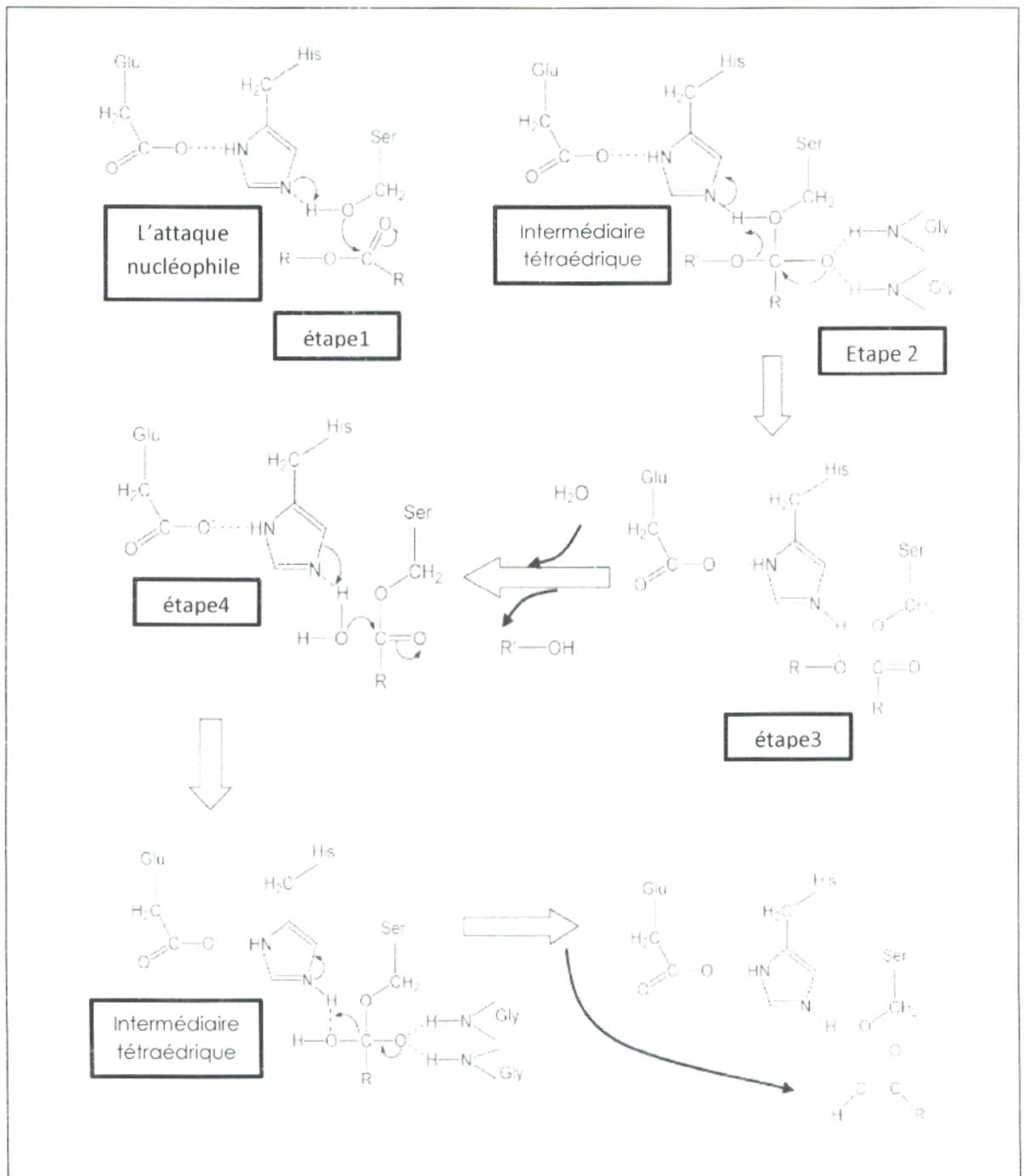


Figure 6 : Mécanisme d'action de la carboxylestérase (Sato et Hosokawa, 2010).

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 parfaits,

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

1.6.2. Le pH :

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**).

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**). 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 (il s'agit alors de groupements appartenant à des acides aminés 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 acides aminés 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 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 al., 1969**).

1.6.3. Le substrat :

Il est bien établi que les carboxylestérases hydrolysent des composés contenant des groupements fonctionnels tels que l'ester carboxylique comme l'esmolol, l'amide comme le procainamide et le thioester comme la spironolactone. Cependant, l'hydrolyse d'esters carboxyliques se déroule généralement plus rapide que les autres types d'hydrolyse, par exemple, la procaine est hydrolysée beaucoup plus rapide que son homologue amide le procainamide. Ainsi, la procaine est utilisée comme un anesthésique local et n'a pas d'application systémique. En revanche, le procainamide atteint la circulation systémique et est utilisé pour traiter l'arythmie cardiaque (**Anzenbacher et al., 2012**).

Les carboxylestérases peuvent hydrolyser un grand nombre de substrats agrochimiques et pharmaceutiques, les structures représentatives sont indiquées dans la figure 7. En particulier, les carboxylestérases hydrolysent les pyréthrinoïdes et les lient stoechiométriquement aux carbamates et aux organophosphates. Les carboxylestérases sont également importantes dans le métabolisme d'un grand nombre de traitements, y compris la lovastatine qui réduit le taux du cholestérol, l'antiviral l'oseltamivir, la mépéridine analgésique narcotique, la cocaïne et l'héroïne. L'activité de la carboxylestérase est aussi largement utilisée dans le métabolisme des pro-drogues (**Wheelock et al., 2008**). Chez des patients atteints du cancer, traités par le 7-éthyle-10-(4-1-pipéridino)-1-pépidino) carbonyloxycompotothécine (CPT-11), les carboxylestérases sont responsables de l'hydrolyse de cette pro-drogue (CPT-11) en sa forme active le 7-éthyle-10-hydroxycompotothécine (SN-38) ; le SN-38 est un puissant inhibiteur de la topo-isomérase I (**Yoon et al., 2004**).

Les carboxylestérases, en particulier la hCES-1, peuvent aussi effectuer des réactions de transestérification. Quand l'alcool est présent en abondance, il peut attaquer l'intermédiaire acyl-enzyme

pour générer le produit d'ester. L'exemple le plus connu est la transestérification de la cocaïne avec de l'éthanol pour produire le cocaéthylène qui est plus toxique (Imai, 2006).

Etant donné l'importance de cette classe d'enzymes en métabolisant cette suite de composés, l'intérêt pour l'étude de leur fonction, la distribution et la sélectivité augmente considérablement.

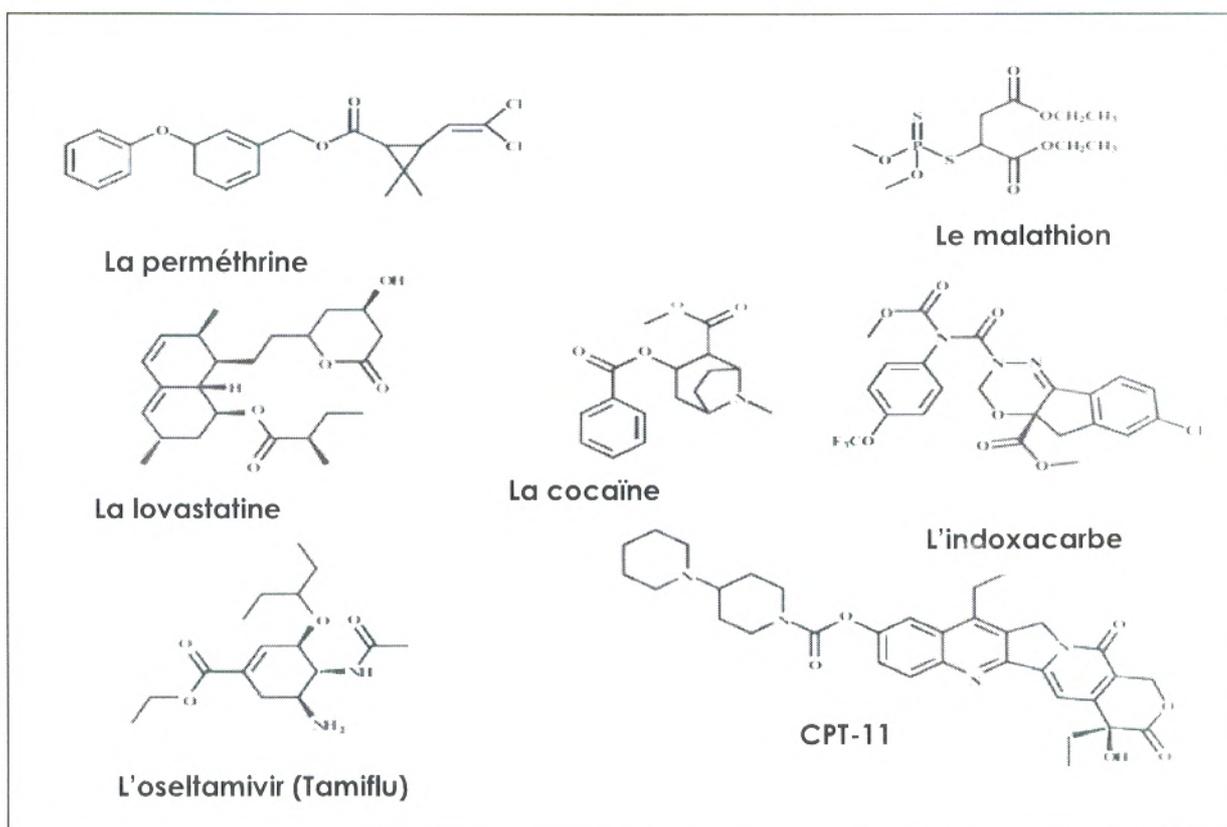


Figure 7 : Les Différents substrats agrochimiques et pharmaceutiques de la carboxylestérase (La perméthrine est un pyréthrianoïde ;le malathion est un organophosphoré; L'indoxacarbe est un oxadiazine; la lovastatine est un hypocholestérolémiant utilisé dans le traitement des maladies cardiovasculaires; la cocaïne est un alcaloïde tropane; l'oseltamivir ou Tamiflu est un médicament antiviral utilisé dans le traitement de la grippe et le CPT-11 ou irinotécan est un agent chimio-thérapeutique qui est un inhibiteur de topo-isomérase I, utilisé principalement dans le traitement du cancer du côlon (Wheelock et al., 2008).

1.6.4. Les inhibiteurs de la carboxylestérase :

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 par rapport à l'activation qui n'est pas bien compris jusqu'à présent.

Plusieurs produits chimiques tels que le 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)**.

En ce qui concerne l'inhibition, il existe un certain nombre de composés différents (figure 8) qui peuvent être à l'origine de l'inhibition de l'activité de la carboxylestérase y compris : les dérivés organophosphorés, les carbamates, le trifluorométhyl cétone, les sulfonamides, l'éthane-1,2-diones, les benziles ainsi que certain nombre de dérivés y compris : l'indole-2,3-diones 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, 2005)**.

Parmi ces inhibiteurs, les cétones trifluorométhylées sont des inhibiteurs les plus efficaces des carboxylestérases trouvés jusqu'à présent, qui se lient de manière covalente à l'enzyme, la liaison covalente est réversible et l'enzyme est réactive au bout de quelques jours à quelques semaines **(Wheelock, 2002)**.

Les formes d'oxons d'insecticides organophosphorés, comme le paraoxon (O, O-diéthyl p.nitophénylphosphate) peuvent être des inhibiteurs très puissants de la carboxylestérase et 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

vieillessement 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, 2005**).

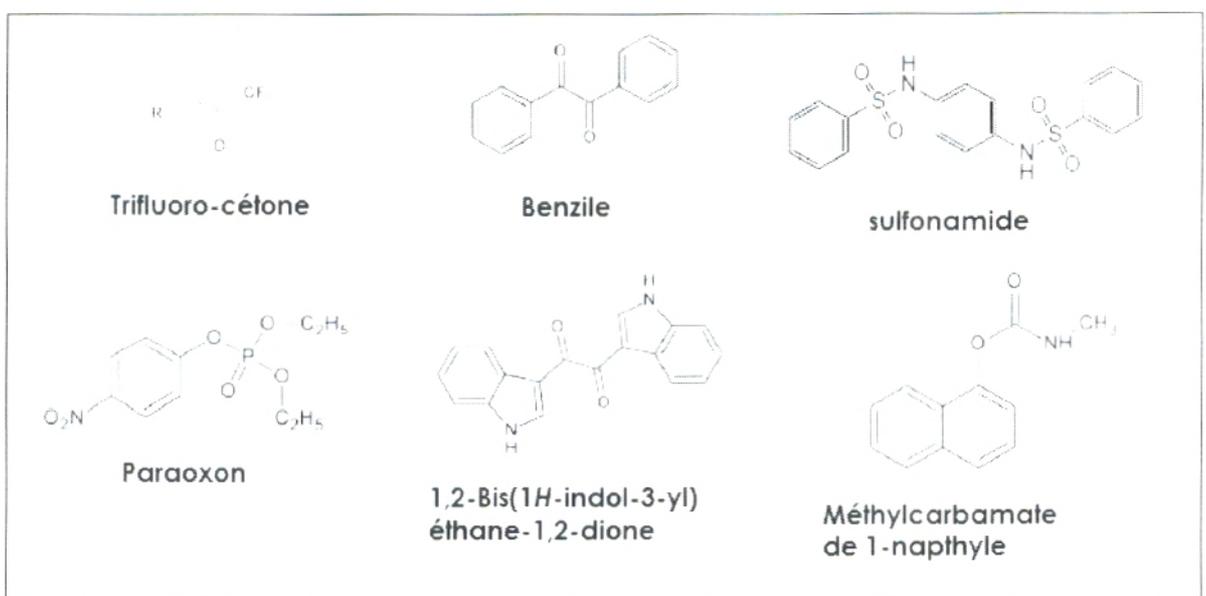


Figure 8 : Structures chimiques des inhibiteurs de la carboxylestérase (**Potter et Hatfield, 2011; Redinbo et Potter, 2005**).

I.7. Le rôle biologique de la carboxylestérase :

I.7.1. Le métabolisme des xénobiotiques :

I.7.1.1. Le métabolisme des médicaments :

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 capécitabine), l'héroïne, la cocaïne, et une variété d'autres agents y compris : le flumazénil, la procaine, oxybutynine, aspirine, chlorhydrate, dipivéfrine, salicylates, palmitoyl-coenzyme A, l'halopéridol, imidapril, les alcaloïdes de pyrrolizidine et les stéroïdes. Dans la majorité des cas, l'hydrolyse par ces enzymes aboutie à l'inactivation des médicaments **(Liu, 2008; Redinbo et Potter, 2005)**.

I.7.1.2. L'activation des promédicaments :

Les promédicaments CPT-11 et la capécitabine nécessitent une hydrolyse enzymatique pour produire des métabolites actifs. L'agent anti-cancéreux CPT-11 est activé par la carboxylestérase comme il est indiqué dans la figure 9. Le fragment dipipéridino présent dans la molécule est éliminé pour donner le SN-38 qui est un inhibiteur efficace de la topoisomérase I (inhibition de la transcription), ce qui conduit finalement à la mort des cellules **(Humerickhouse et al., 2000)**.

I.7.2. Le métabolisme des endobiotiques :

En plus du rôle de la carboxylestérase dans le métabolisme des xénobiotiques, ces enzymes permettent aussi l'hydrolyse de plusieurs substrats endogènes tels que : les esters de cholestérol, les acides gras, les triacylglycérols et l'acyl-carnitine **(Streit, 2008)**.

1.7.2.1. L'homéostasie du cholestérol :

Le cholestérol est essentiel pour l'intégrité structurale des membranes plasmiques, il peut être toxique s'il est présent en excès. La carboxylestérase a une activité similaire à celle de l'acyl-CoA cholestérol-O-acyl transférase (ACAT), elle catalyse la réaction de transestérification (figure 9), les acides gras sont ajoutés en position 3 du cholestérol pour donner les esters de cholestérol. 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**).

1.7.2.2. 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 vont être accumulés dans les mitochondries des cellules où ils vont entraîner le découplage de la phosphorylation oxydative ce qui entraîne une inefficacité de la production d'énergie ainsi que des dommages aux cellules (**Beckemeier et Bora, 1998**).

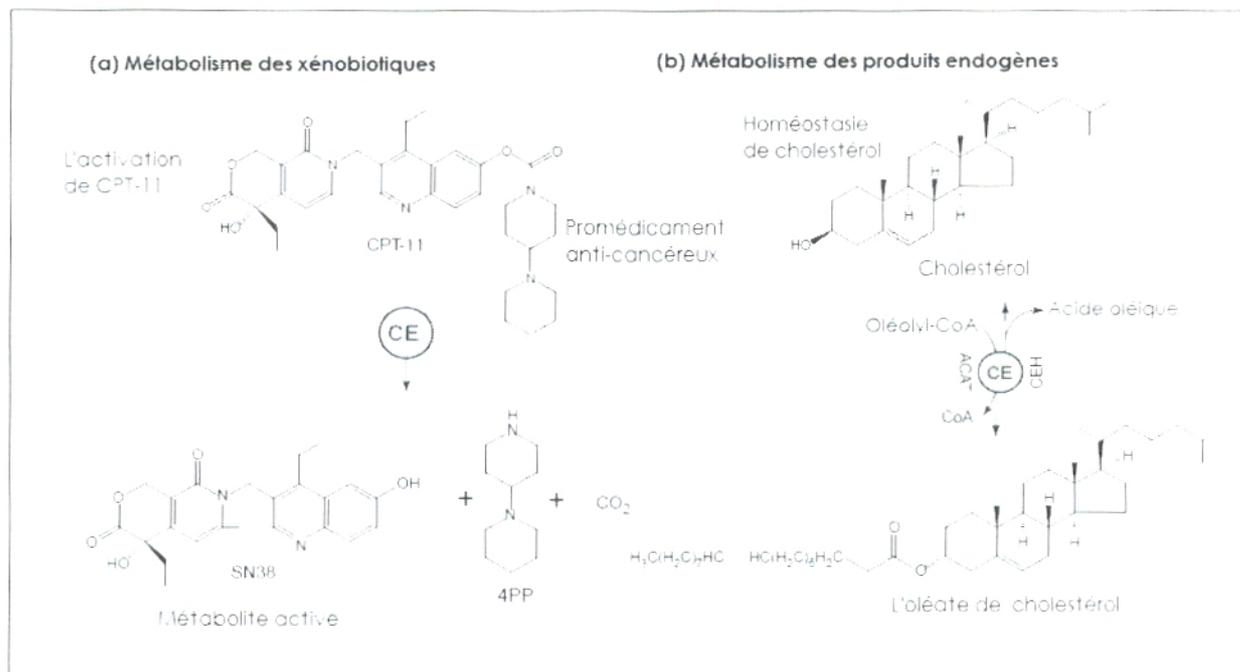


Figure 9 : Les fonctions biologiques de la carboxylestérase (Redinbo et Potter, 2005).

II. Les colorants alimentaires :

Les additifs alimentaires sont toutes substances habituellement non consommées comme aliment en soi et qui ont ou non une valeur nutritionnelle, ajoutées intentionnellement aux denrées alimentaires pour assurer certaines fonctions technologiques telles que la coloration, la préservation, la texturisation, la saveur ou le goût (**Bourrier, 2006**). Parmi les additifs alimentaires, les colorants qui sont ajoutés pour donner une couleur à une denrée alimentaire ou à lui redonner sa couleur naturelle. En effet, le premier sens de 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**).

Jusqu'en 1850, les colorants alimentaires étaient d'origine naturelle (carotte, betterave, peau de raisin noir, safran, etc.). Dès 1856, apparaissent les colorants de synthèse et les colorants artificiels, plus stables et moins chers, de plus en plus utilisés par l'industrie alimentaire mondiale (**Gallen et Pla, 2013**). Parmi ces colorants alimentaires, la tartrazine (**E102**) remplace le plus souvent le safran dans la cuisine de nombreux pays, ce substitut revient moins cher, et le colorant vert utilisé dans beaucoup de produits (alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques, etc...).

II.1. La tartrazine :

La tartrazine (**E102**) est un colorant alimentaire synthétique, utilisé dans la cuisine de nombreux pays comme un substitut au safran. Il est très utilisé dans les produits alimentaires comme les chips, les soupes instantanées, moutardes, sucreries (bonbons, pastillages, décors de pâtisserie), boissons, glaces et crèmes glacées. Utilisé avec le bleu patenté V synthétique (**E131**) pour donner la couleur verte aux sirops de menthe. Elle est employée dans l'alcool modifié médical pour le rendre impropre à la consommation.

On la trouve aussi dans beaucoup de médicaments et certains cosmétiques (**Gallen et Pla, 2013**). La dose journalière admissible (DJA) pour l'être humain est de 0 à 7,5 mg/Kg du poids corporel (**Tanaka et al., 2008**).



Figure 10 : La tartrazine

II.1.1. Structure et nomenclature :

La tartrazine autrement connu comme E102 ou FD&C Yellow ou C.I 19140 est un colorant jaune citron synthétique azoïque, utilisé comme colorant alimentaire, de formule brute $(C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2)$ et d'un poids moléculaire de 534,36 g/mol. Il est dérivé du goudron de houille (coal tar). Son nom chimique est le tri-sodium 5-hydroxy-1-(4-sulfonatophényl)-4-(4-sulfonatophénylazo)-H-pyrazol-3-carboxylate.

La tartrazine comporte un groupement azoïque (-N=N-), qui est propre à tous les colorants azoïques, et qui est très nocif pour les êtres vivants (**Amin et al., 2010**). Sa formule développée est indiquée dans la figure ci-dessous :

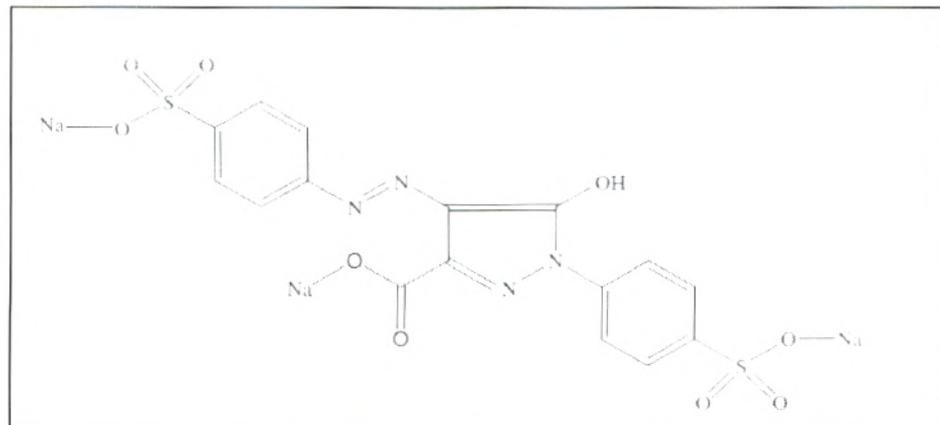


Figure 11 : Structure chimique de la tartrazine.

II.1.2. Propriétés physico-chimiques :

C'est une poudre de couleur orange, soluble dans l'eau, employée dans le monde entier comme additif pour colorer plusieurs nourritures, des médicaments et des cosmétiques. La pureté est spécifiée en tant que, 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 %.

II.1.3. Effet de la tartrazine sur la santé :

La tartrazine est parmi les colorants les plus toxiques, elle est interdite en Amérique et leur usage est très réglementé en France. En ce qui concerne les études toxicologiques de ce colorant chez les mammifères, **Davis et al. (1964)** 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%) n'a pas causée de tumeur. **Maekewa et al. (1987)** ont constaté que la tartrazine administrée dans l'eau potable (1% à 2%) n'a pas montré d'effets cancérigènes durant 2 ans d'études de toxicité chez les rats. Cependant, **Amin et al. (2010)** ont constaté que la tartrazine a un effet défavorable et permet de changé certaines variables biochimiques (par exemple : la peroxydase de glutathion (GSH-Px),

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 été aussi 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 immunologiques 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, des vagues de chaleur, 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 de l'hyperactivité chez les enfants ainsi que des crises d'asthme, de rhinites, d'urticaires, d'eczéma atopique et des chocs anaphylactiques (**Gallen et Pla, 2013**).

II.2. Le colorant vert :

L'étiquetage du colorant vert utilisé lors de l'expérimentation indiquée dans la figure ci-dessous, montre que ce colorant est obtenu à partir de deux colorants : Le rouge ponceau (E124) et le dioxyde de titane (E171), ainsi que du dextrose (D-glucose).



Figure 12 : Le colorant vert

II.2.1.2. Toxicité du rouge ponceau :

Dans les études toxicologiques du rouge ponceau, **Gaunt et al. (1967)** ont rapporté que la DL₅₀ 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 DL₅₀ orale a dépassé 8 g/kg chez les deux espèces. **Brantom et al. (1987)** ont indiqué que le niveau sans effet observé était de 500 mg/kg par jour dans une étude de toxicité à long terme (60 jours dans la génération F₀, 114 semaines et 118 semaines chez les mâles et les femelles, dans la génération F₁). Lors d'une étude de reproduction sur trois générations, un niveau non nocif est observé de ce colorant chez les rats était de 1250 mg/kg par jour.

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 embryo-toxique 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.

II.2.2. Le dioxyde de titane :

Le dioxyde de titane (TiO₂) est employé comme additif alimentaire sous la référence E171, c'est un colorant 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**). Il est hautement stable à la chaleur, à la lumière, à l'oxygène et au pH. De même, il est insoluble dans l'eau, dans presque tous les acides et dans tous les solvants organiques (**Lomer et al., 2000**).

Le dioxyde de titane est en général mal absorbé chez les mammifères avec aucun 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. En effet, le dioxyde de titane peut être bien absorbé par le tractus gastro-intestinal, 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**).

II.2.3. 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.

II.2.4. L'indigotine :

II.2.4.1. Structure et nomenclature :

Le carmin d'indigo appelé aussi l'indigotine connu sous les références suivantes : FD&C bleu n°2, C.I. (1972), N°. 73015 ou le E132 est le sel disodique de l'acide 1-indigotine-5,5'-disulfonique ($C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$) (figure 14). Il est utilisé comme un colorant dans les produits alimentaires, les comprimés et les capsules pharmaceutiques et aussi utilisé à des fins de diagnostic médical (**Hooson et al., 1974**).

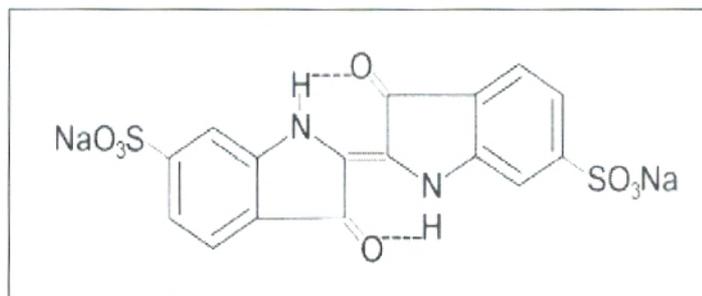


Figure 14 : Structure moléculaire d'indigotine (Mittal et al., 2006).

II.2.4.2. 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 fatal, car il est cancérigène et peut mener à une toxicité reproductrice et développementale. Il a été aussi établie 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 la diarrhée (Mittal et al., 2006).

*Matériel
et
Méthodes*

I. Réactifs utilisés :

- L'éthyle butyrate $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ (99%, $d = 0,875$).
- La carboxylestérase du foie du porc : Sigma prod. No E3019-20KU.
- La tartrazine commerciale : Colorant alimentaire. La chaine 14,888 (Mm = 534,36 g/mol).
- Le colorant alimentaire vert (E124-E171) (Mm= 684,339 g/mol).
- Tétraborate de sodium $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Mm = 381,37 g/mol).
- Chlorure d'hydrogène HCl (37%, $d = 1,19$).
- L'hydroxyde de sodium NaOH (Mm = 40 g/mol).
- Tartrate double de sodium et de potassium $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Mm = 282,22 g/mol).
- Iodure de potassium KI (Mm = 166 g/mol).
- Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Mm = 249,68g/mol).
- L'acide citrique $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Mm = 192,12 g/mol).
- Potassium phosphate monobasique KH_2PO_4 (Mm = 136,09 g/mol).
- Sodium phosphate dibasique Na_2HPO_4 (Mm = 358,13 g/mol).
- Le chlorure de potassium KCl (Mm = 74,54 g/mol).
- L'albumine sérique bovine (BSA), Sigma prod. No A3912-100G. 19K1526. Poudre lyophilisée.

II.1. Préparation de la gamme d'étalonnage :

- ✓ On prépare une solution mère de l'albumine de sérum bovin (BSA) qui présente la protéine étalon à 10 g/l.
- ✓ Dans une série de 15 grands tubes à essais (5 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes :

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

- ✓ Lorsqu'on termine avec les dilutions mentionnées dans le tableau ci-dessus, on ajoute à chaque tube à essais 4 ml du réactif du biuret, ensuite, on les incube pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- ✓ A l'aide d'un spectrophotomètre, on mesure la densité optique à 540 nm contre un blanc réactif.

A partir des absorbances obtenues, on trace la droite d'étalonnage représentée dans la figure 15 :

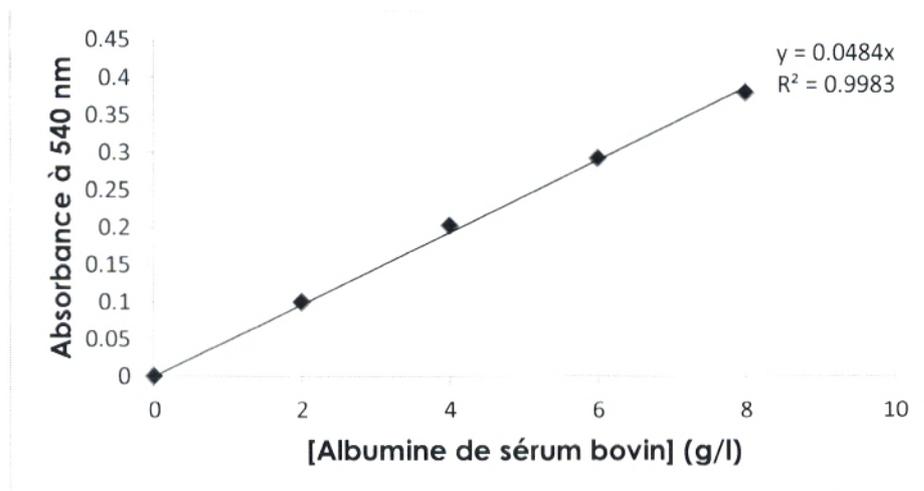


Figure 15 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret.

(Absorbance = 0,0484 x [protéines] ; $r^2 = 0,9983$).

II.2. Calcul de la concentration en protéine de la préparation enzymatique de la carboxylestérase :

- ✓ Dissoudre 0,05 g d'estérase du foie du porc lyophilisée dans 10 ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).
- ✓ Dans une série de 15 grands tubes à essais (5 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes à partir de la solution mère enzymatique.

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

- ✓ Après avoir préparé les dilutions mentionnées dans le tableau ci-dessus, on ajoute à chaque tube 4 ml 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 de ces tubes à 540 nm par un spectrophotomètre contre un blanc réactif.

La concentration en protéines de la préparation enzymatique est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue. 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 quatre concentrations déterminées expérimentalement.

III. Détermination de l'activité enzymatique :

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

- ✓ Préparer dans un bécher 25 ml de la solution d'éthyle butyrate (0,2 ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Mettre le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C puis ajouter 0,05 ml d'éthyle butyrate concentré.
- ✓ Ajuster le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M) puis ajouter 0,1 ml de la solution enzymatique (0,0029 g d'estérase du foie du porc dans 1 ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Déclencher le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00. Laisser la réaction pendant 1 min puis placer le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ Maintenir le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 par l'addition de faibles volumes d'environ 0,05 ml de NaOH (10mM).
- ✓ Noter le volume de NaOH utilisé pour atteindre le pH 8,00 et le temps nécessaire de la consommation du réactif NaOH (10mM).

Refaire 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 :

Par définition, la vitesse initiale d'hydrolyse du substrat (l'éthyle butyrate) 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_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse de l'éthyle butyrate (μmol de substrat transformé. $\text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

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

t : Temps de réaction (min).

V_r : 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 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 :

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

II.1. Préparation de la gamme d'étalonnage :

- ✓ On prépare une solution mère de l'albumine de sérum bovin (BSA) qui présente la protéine étalon à 10 g/l.
- ✓ Dans une série de 15 grands tubes à essais (5 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes :

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

- ✓ Lorsqu'on termine avec les dilutions mentionnées dans le tableau ci-dessus, on ajoute à chaque tube à essais 4 ml du réactif du biuret, ensuite, on les incube pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- ✓ A l'aide d'un spectrophotomètre, on mesure la densité optique à 540 nm contre un blanc réactif.

A partir des absorbances obtenues, on trace la droite d'étalonnage représentée dans la figure 15 :

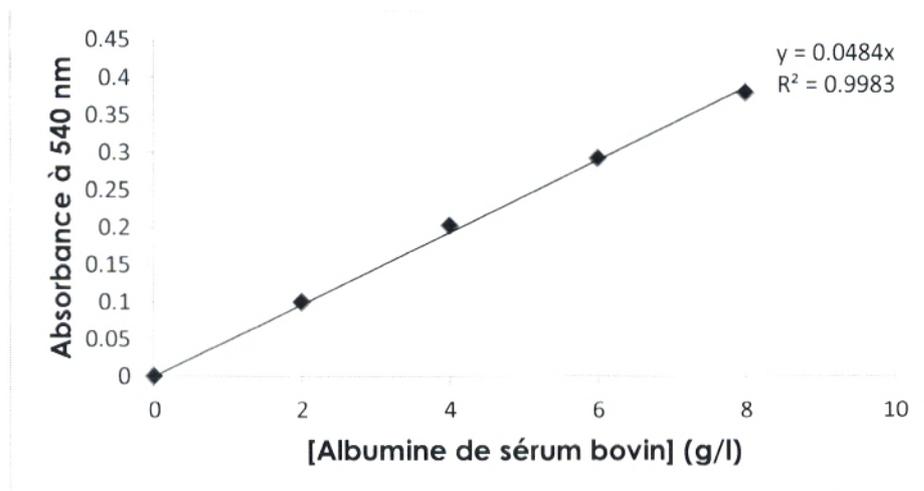


Figure 15 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret.

(Absorbance = 0,0484 x [protéines] ; $r^2 = 0,9983$).

II.2. Calcul de la concentration en protéine de la préparation enzymatique de la carboxylestérase :

- ✓ Dissoudre 0,05 g d'estérase du foie du porc lyophilisée dans 10 ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).
- ✓ Dans une série de 15 grands tubes à essais (5 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes à partir de la solution mère enzymatique.

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

- ✓ Après avoir préparé les dilutions mentionnées dans le tableau ci-dessus, on ajoute à chaque tube 4 ml 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 de ces tubes à 540 nm par un spectrophotomètre contre un blanc réactif.

La concentration en protéines de la préparation enzymatique est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue. La formule qui permet le calcul de la concentration en protéines est la suivante :

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

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

III. Détermination de l'activité enzymatique :

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

- ✓ Préparer dans un bécher 25 ml de la solution d'éthyle butyrate (0,2 ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Mettre le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C puis ajouter 0,05 ml d'éthyle butyrate concentré.
- ✓ Ajuster le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M) puis ajouter 0,1 ml de la solution enzymatique (0,0029 g d'estérase du foie du porc dans 1 ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Déclencher le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00. Laisser la réaction pendant 1 min puis placer le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ Maintenir le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 par l'addition de faibles volumes d'environ 0,05 ml de NaOH (10mM).
- ✓ Noter le volume de NaOH utilisé pour atteindre le pH 8,00 et le temps nécessaire de la consommation du réactif NaOH (10mM).

Refaire 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 :

Par définition, la vitesse initiale d'hydrolyse du substrat (l'éthyle butyrate) 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_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse de l'éthyle butyrate (μmol de substrat transformé. $\text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

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

t : Temps de réaction (min).

V_r : 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 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 :

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

Avec :

AV : Activité enzymatique volumique (UI/ml).

NaOH : le 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 8,0.

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 :

$$AS = \frac{AV}{[Protéine]}$$

Avec :

AS : Activité spécifique (UI/mg).

AV : Activité volumique (UI/ml).

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

IV. Etude de l'influence du pH et de la température sur l'activité de la carboxylestérase :

IV.1. Influence du pH :

Pour déterminer le pH optimum de la carboxylestérase dans lequel l'activité est maximale, on procède de la manière suivante :

- ✓ Préparer dans un bécher 25 ml de la solution d'éthyle butyrate (0,2ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Mettre le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C puis ajouter 0,05 ml d'éthyle butyrate concentré.
- ✓ Ajuster le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M) puis ajouter 0,1 ml de la solution enzymatique (0,0029 g de carboxylestérase du foie du porc dans 1 ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Déclencher le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00. Laisser la réaction pendant 5 min puis placer le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ Maintenir le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 par l'addition de faibles volumes d'environ 0,05 ml de NaOH (10mM), puis noter le volume de NaOH utilisé pour atteindre le pH 8,00 et le temps nécessaire de la consommation du réactif NaOH (10mM).
- ✓ Refaire la même manipulation avec les mêmes conditions, mais 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 ; 10 ; 10,6.

Remarque: La gamme allant de pH 6 à 7,8 et 9,6 à 11 est assurée par le tampon phosphate (pH 5 à 11) et la gamme allant de pH 8 à 9 est assurée par la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00.

IV.2. Influence de la température :

La température a une influence sur la vitesse des réactions enzymatiques comme pour n'importe quelle réaction chimique. Pour déterminer la température optimale de la carboxylestérase, on procède de la manière suivante :

- ✓ Préparer dans un bécher 25 ml de la solution d'éthyle butyrate (0,2 ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Mettre le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C puis ajouter 0,05 ml d'éthyle butyrate concentré.
- ✓ Ajuster le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M) puis ajouter 0,1 ml de la solution enzymatique (0,0029 g de carboxylestérase du foie du porc dans 1 ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Déclencher le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00. Laisser la réaction pendant 5 min puis placer le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ Maintenir le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 par l'addition de faibles volumes d'environ 0,05 ml de NaOH (10mM).
- ✓ Noter le volume de NaOH utilisé pour atteindre le pH 8,00 et le temps nécessaire de la consommation du réactif NaOH (10mM).

- ✓ Refaire les mêmes manipulations dans les mêmes conditions, mais en variant la température du milieu : 25°C ; 30°C ; 37°C ; 40°C ; 45°C ; 50°C ; 55°C ; 60°C ; 65°C ; 70°C.

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

L'influence de la concentration d'éthyle butyrate sur l'activité de la carboxylestérase permet de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme, et donc, on procède de la manière suivante:

- ✓ Préparer dans un bécher 25 ml de la solution d'éthyle butyrate (0,2 ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Mettre le bécher dans un bain-marie équilibré à 25°C puis ajouter 0,05 ml d'éthyle butyrate concentré pour avoir une concentration de $2,983 \times 10^{-2}$ M.
- ✓ Ajuster le pH de cette solution à 8,1 à l'aide d'un pH-mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M) puis ajouter 0,1 ml de la solution enzymatique (0,0029 g de carboxylestérase du foie du porc dans 1 ml de solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Déclencher le chronomètre lorsque le pH atteint la valeur 8,00. Laisser la réaction pendant 5 min puis placer le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes, puis maintenir le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 par l'addition de faibles volumes d'environ 0,05 ml de NaOH (10mM).

- ✓ Noter le volume de NaOH utilisé pour atteindre le pH 8,00 et le temps nécessaire de la consommation de réactif NaOH (10mM).
- ✓ Refaire la même manipulation avec les mêmes conditions opératoires, mais en changeant la concentration du substrat l'éthyle butyrate selon la gamme suivante de concentration : $1,044 \times 10^{-2}$; $1,193 \times 10^{-2}$; $1,342 \times 10^{-2}$; $1,49 \times 10^{-2}$; $2,983 \times 10^{-2}$; $4,474 \times 10^{-2}$; $5,9659 \times 10^{-2}$; $7,457 \times 10^{-2}$; $8,948 \times 10^{-2}$; $10,44 \times 10^{-2}$ M.

VI. Etude de l'influence de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase :

VI.1. Spectre d'absorption de la tartrazine :

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

VI.2. L'effet de la concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine :

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

- ✓ Prendre une série de 5 tubes à essais contenant chacun 5 ml de solution tampon (Borax 0,025M/HCl 0,1M; pH 8,00), 5 ml de solution d'éthyle butyrate préparée dans le tampon Borax 0,025 M/HCl 0,1M; pH 8,00 (dont les concentrations étaient de : $1,49 \times 10^{-2}$; $2,983 \times 10^{-2}$; $4,474 \times 10^{-2}$; $5,9659 \times 10^{-2}$; $7,457 \times 10^{-2}$ mol.l⁻¹ respectivement), et 2 ml de la solution de tartrazine (0,1mmol/l).

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

VI.3. 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 :

- ✓ Préparer 200 ml de solution de tartrazine à 0,027 g/l dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00.
- ✓ Dans un erlenmeyer contenant 100 ml de la solution préparée, ajouter 1 ml de la solution enzymatique (0,0029 g de la carboxylestérase du foie de porc dans 1 ml de tampon Borax 0,025M/HCl 0,1 M ; pH 8,00), puis suivre 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 restantes). En effet, l'erlenmeyer était dans un bain-marie réglé à 25°C pendant tout le suivi.
- ✓ Mettre dans un autre erlenmeyer 100 ml de la solution de tartrazine restante, puis suivre 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 heures) pour voir s'il y aura un changement significatif dans les absorbances ce qui pourrait fausser nos résultats. Les prélèvements ont été faits simultanément avec ceux de l'autre solution.

VI.4. Effet du pH sur la tartrazine :

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

- ✓ Préparer une solution de tartrazine à 0,02 g/ml dans de l'eau distillée.
- ✓ Diluer ensuite cette solution à 1/1500 dans différentes solutions tampons : Solution tampon KCl/HCl 0,2M (pH 1,2 et 2,0) ; solution tampon d'acide citrique 0,1M/phosphate disodique 0,2M (pH 3,00 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).
- ✓ Passer ensuite à la mesure de la longueur d'onde dans laquelle l'absorbance est maximale à l'aide d'un spectrophotomètre pour chaque dilution.

VI.5. Effet de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase :

Pour étudier l'effet de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase, on procède de la manière suivante :

- ✓ Préparer dans un bécher 25 ml de solution d'éthyle butyrate (0,2 ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml de la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8).
- ✓ Mettre le bécher dans un bain-marie et équilibré à 25°C puis ajouter 0,05 ml d'éthyle butyrate concentrée pour arriver à une concentration de $2,983 \times 10^{-2}$ M et 0,9 ml de la solution de tartrazine préparée (0,001 g de tartrazine dans 20 ml de tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00 qui correspond à 0,0935mM).

- ✓ Ajuster le pH à 8,1 à l'aide d'un pH mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M), puis ajouter 0,1 ml de la solution d'enzyme (0,0029 g de carboxylestérase dans 1 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Déclencher le chronomètre lorsque le pH atteint 8,00 et laisser la réaction pendant 5 min, ensuite placer le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ Maintenir le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 en ajoutant goutte à goutte la solution de NaOH (10mM). Noter le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8,00 et le temps nécessaire de la consommation de réactif NaOH.
- ✓ Refaire la même manipulation et avec les mêmes conditions mais avec des concentrations différentes d'éthyle butyrate selon la gamme suivante : $1,193 \times 10^{-2}$; $1,342 \times 10^{-2}$; $1,49 \times 10^{-2}$; $2,983 \times 10^{-2}$; $4,474 \times 10^{-2}$; $5,9659 \times 10^{-2}$ M.

Remarque : Refaire la même étude (effet de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase) mais en variant pour chaque étude la concentration de la tartrazine selon la gamme suivante : 0.187mM (0,002 g de tartrazine dans 20 ml de tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00) et 0,561mM (0,006 g de tartrazine dans 20 ml de tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).

VII. Etude de l'influence du colorant vert (E124-E171) sur l'activité de la carboxylestérase :

VII.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 d'eau distillée, cette solution est diluée ensuite à 1/10 dans le tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00, puis à l'aide d'un spectrophotomètre, on établira le spectre d'absorbance qui indiquera la longueur d'onde où l'absorbance est maximale.

VII.2. Effet de la concentration en éthyle butyrate sur le colorant vert :

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

- ✓ Prendre une série de 5 tubes à essais contenant chacun 5ml de la solution tampon (Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00), 5 ml de la solution d'éthyle butyrate préparé dans le tampon Borax/HCl pH 8,00 (dont les concentrations étaient de : $1,49 \times 10^{-2}$; $2,983 \times 10^{-2}$; $4,474 \times 10^{-2}$; $5,9659 \times 10^{-2}$; $7,457 \times 10^{-2}$ mol.l⁻¹ respectivement), et 2 ml de la solution du colorant vert (0,01 g/ml).
- ✓ Après 45 et 90 min d'incubation, on passe à la mesure des absorbances de chaque tube à essais dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 611 nm.

VII.3. 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 manière suivante:

- ✓ Préparer 200 ml de la solution du colorant vert à 0,005 g/ml de tampon Borax/HCl.

- ✓ Mettre 100 ml de cette solution préparée dans un erlenmeyer, puis ajouter à cette solution 1 ml de la solution enzymatique (0,0029 g de carboxylestérase du foie du porc dans 1 ml du tampon Borax/HCl), ensuite suivre l'évolution de l'absorbance durant 3 heures à l'aide d'un spectrophotomètre à 611 nm (en faisant des prélèvements toutes les 10 min dans la première heure et toutes les 15 min dans les deux heures restantes). En effet, l'erlenmeyer était dans un bain-marie réglé à 25°C pendant tout le suivi.

- ✓ Mettre la solution du colorant vert restante (100 ml) dans un autre erlenmeyer, puis suivre 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. Les prélèvements ont été faits simultanément avec ceux de l'autre solution.

VII.4. Effet du pH sur le colorant vert :

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

- ✓ Préparer une solution du colorant vert à 0,01 g/ml d'eau distillée.

- ✓ Diluer ensuite cette solution à 1/10 dans les différentes solutions tampons : Solution tampon KCl/HCl 0,2M (pH 1,2 et 2,0); solution tampon d'acide citrique 0,1M/phosphate disodique 0,2M (pH 3,00 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).

- ✓ Passer ensuite à la mesure de la longueur d'onde dans laquelle l'absorbance est maximale à l'aide d'un spectrophotomètre pour chaque dilution.

VII.5. Effet du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase :

Pour étudier l'effet du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase, on effectue de la manière suivante :

- ✓ Préparer dans un bécher 25 ml de la solution d'éthyle butyrate (0,2 ml d'éthyle butyrate concentré dans 100 ml de la solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8).
- ✓ Mettre le bécher dans un bain-marie et équilibré à 25°C puis ajouter 0,05 ml d'éthyle butyrate concentré pour arriver à une concentration de $2,983 \times 10^{-2}$ M et 0,9 ml de la solution du colorant vert préparé (0,01 g de colorant vert dans 20 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00 qui correspond à 0,7306mM).
- ✓ Ajuster le pH à 8,1 à l'aide d'un pH mètre en ajoutant quelques gouttes de NaOH (0,1M), puis ajouter 0,1 ml de la solution d'enzyme (0,0029 g de carboxylestérase dans 1 ml du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).
- ✓ Déclencher le chronomètre lorsque le pH atteint 8,00 et laisser la réaction pendant 5 min, ensuite placer le bécher dans un récipient d'eau glacée pendant 10 secondes.
- ✓ Maintenir le pH de ce mélange réactionnel à 8,00 en ajoutant goutte à goutte la solution de NaOH (10mM). Noter le volume de NaOH utilisé pour maintenir le pH 8,00 et le temps nécessaire de la consommation du réactif NaOH.
- ✓ Refaire la même manipulation et avec les mêmes conditions mais avec des concentrations différentes d'éthyle butyrate selon la gamme suivante : $1,193 \times 10^{-2}$; $1,342 \times 10^{-2}$; $1,49 \times 10^{-2}$; $2,983 \times 10^{-2}$; $4,474 \times 10^{-2}$; $5,9659 \times 10^{-2}$ M.

Remarque : Refaire la même étude (effet du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase) mais en variant pour chaque étude la concentration du colorant vert selon la gamme suivante : 0,3653mM (0,005 g de colorant vert dans 20 ml de tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00) et 0,5479mM (0,0075 g de colorant vert dans 20 ml de tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M ; pH 8,00).

VIII. Détermination de la concentration inhibitrice médiane IC₅₀ :

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50% (IC₅₀), l'activité de la carboxylestérase du foie du porc a été mesurée à 25°C et à pH 8,00 (tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M) et à concentration constante d'éthyle butyrate ($2,983 \times 10^{-2}M$), en absence et en présence des différentes concentrations des deux inhibiteurs : la tartrazine et le colorant vert. Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

Résultats
et
Discussion

I. Mesure des activités volumique et spécifique de l'enzyme :

Le tableau (1) ci-dessous représente les valeurs des activités volumique et spécifique de la carboxylestérase ainsi que la concentration en protéines de la préparation enzymatique et la vitesse initiale de cette enzyme dans les conditions opératoires standards ([éthyle butyrate] = $2,983 \times 10^{-2}$ M, solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00), température 25°C, durée de la réaction 5 minutes).

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

Concentration en protéines (g/l)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$)	Activité volumique (UI/ml)	Activité Spécifique (UI/mg)
4,948 $\pm 0,3652$	319,444 $\pm 11,2239$	401509,922 $\pm 14886,45$	81331,36 $\pm 9227,75$

II. Recherche de l'activité de la carboxylestérase de la préparation enzymatique :

La figure ci-dessous, montre que la préparation enzymatique de la carboxylestérase a permis l'hydrolyse de l'éthyle butyrate en éthanol et en acide butyrique, où l'activité volumique atteint un maximum de $400,829 \times 10^3$ UI/ml au-delà de 6 minutes d'incubation, cela confirme que la préparation enzymatique commerciale est active. Cependant, l'hydrolyse de l'éthyle butyrate ne semble pas être spontanée, puisqu'en absence de cette enzyme, l'éthyle butyrate n'est pas hydrolysé.

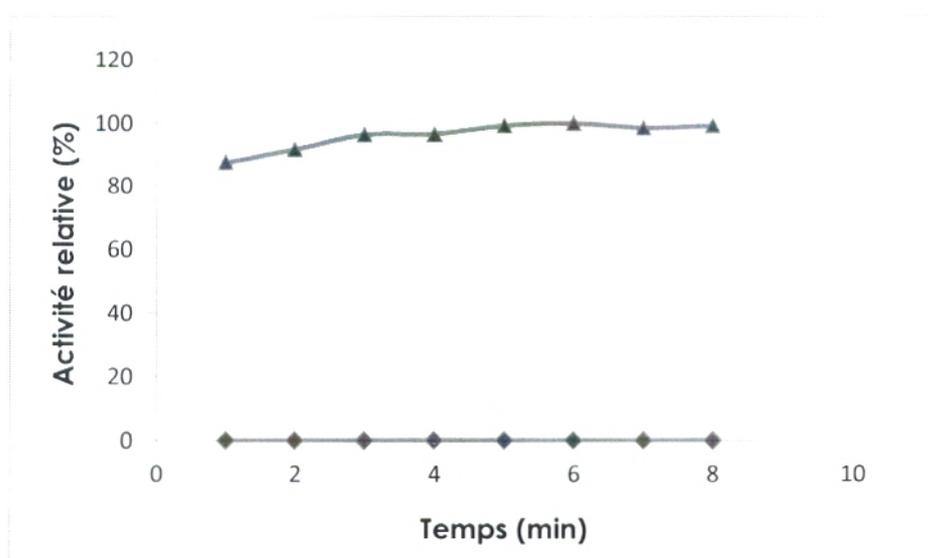


Figure 16 : Cinétique d'hydrolyse d'éthyle butyrate en présence (▲) et en absence (◆) de la préparation d'enzyme de la carboxylestérase ([éthyle butyrate]= $2,983 \times 10^{-2}$ M ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) ; 25°C).

III. 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, ensuite elle diminue à fort pH (**Jawetz et al, 1973**).

La figure ci-dessous représente l'effet du pH sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase :

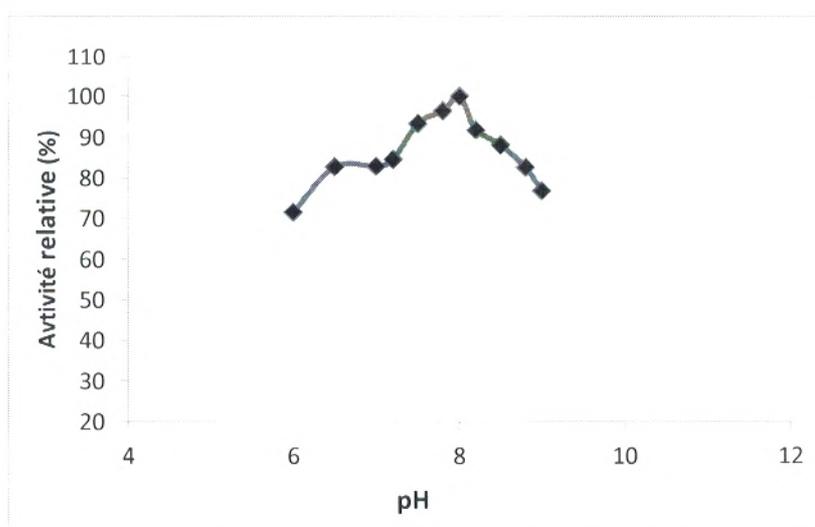


Figure 17 : effet du pH sur l'activité de la carboxylestérase. ([Éthyle butyrate]= $2,983 \times 10^{-2}$ M ; durée de la réaction : 5 min ; 25°C).

Le résultat obtenu fait ressortir un pic caractérisé par une activité maximale de la carboxylestérase (390×10^3 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 est réduite par la suite d'une inactivation.

Selon **Bertrame 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.

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.

Cet effet de pH est lié à l'état d'ionisation d'un certain nombre de groupements dissociables participant à la formation et à l'activité du complexe enzyme-substrat. Les phénomènes de dissociation peuvent intervenir aussi bien pour le substrat que pour les chaînes latérales de l'enzyme et il peut en résulter des modifications de conformation de l'enzyme, d'association avec le substrat et parfois une influence sur le phénomène catalytique (**Audigié et Zonszain, 1995**).

IV. Influence de la température sur l'activité de la carboxylestérase :

Comme pour la plupart des réactions chimiques, la vitesse des réactions catalysées par des enzymes augmente en général avec la température. Cependant, quand la température s'élève au-dessus de 50 à 60°C, l'activité catalytique des enzymes diminue le plus souvent (**Garrett et Grisham, 2000**). Ce phénomène est représenté dans la figure ci-dessous :

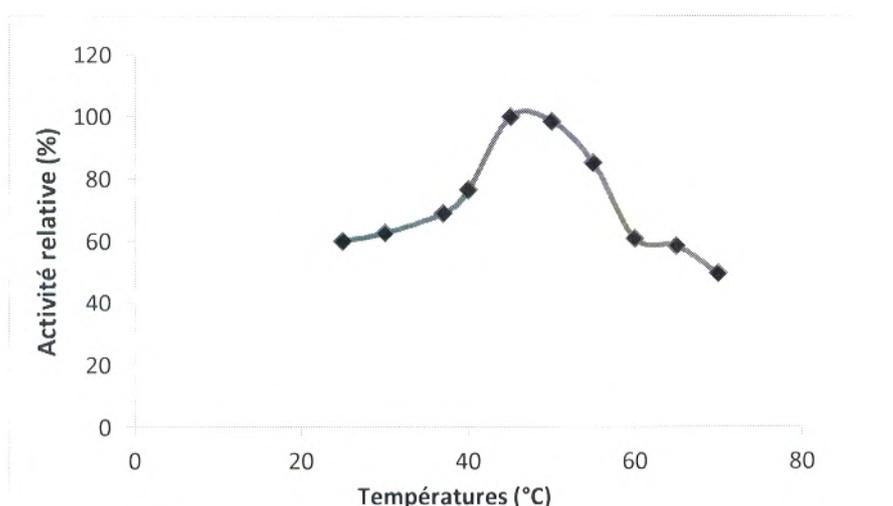


Figure 18 : Effet de la température sur l'activité de la carboxylestérase. ([Éthyle butyrate] = $2,983 \times 10^{-2}$ M ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) ; durée de la réaction : 5 min).

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, où l'activité de la carboxylestérase augmente avec la température, cette augmentation d'activité 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 $389,473 \times 10^3$ UI/ml à 25°C et 648×10^3 UI/ml à 45°C. Cette partie de la courbe correspond à la courbe d'activation (**Weil, 1997**).

• **La phase descendante** : De 45 à 70°C, caractérisée par une diminution de l'activité de la carboxylestérase, cette diminution d'activité correspond à une dénaturation de l'enzyme qui perd sa configuration spatiale par destruction des liaisons faibles (liaisons hydrogènes, ioniques et forces de Van der Waals) (**Augère, 2001**).

Dans les conditions de mesures choisies, la température de 45°C à laquelle correspond l'activité enzymatique maximale (648×10^3 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, sont détruites (**Robert et Vian, 2004**).

Selon **Wynne et al. (1973)** la carboxylestérase a une température optimum de 40°C, dans laquelle l'activité est maximale.

La partie ascendante de la courbe d'activité relative en fonction de la température du milieu réactionnel (figure 18) 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 19). 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 « synthèse bibliographique »).

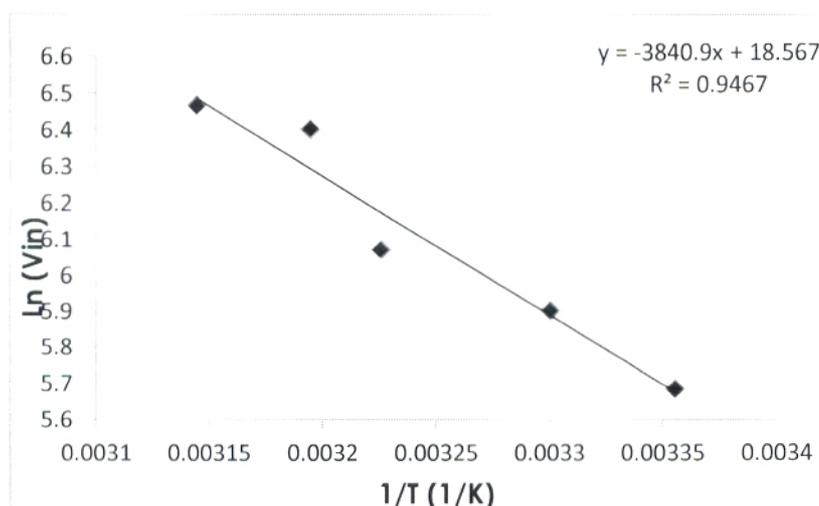


Figure 19 : Représentation graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de la carboxylestérase.

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 courbe d'Arrhenius ci-dessus est égale à $31,917 \text{ KJ.mol}^{-1}$, cette valeur d'énergie est proche à celle obtenue par **Zhou et al. (2001)**, $E_a = 34 \text{ KJ.mol}^{-1}$ pour la carboxylestérase du foie du porc.

V. La tartrazine (E102) :

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

La figure 20 mentionnée ci-dessous 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 à la couleur bleu-violet absorbée par ce colorant.

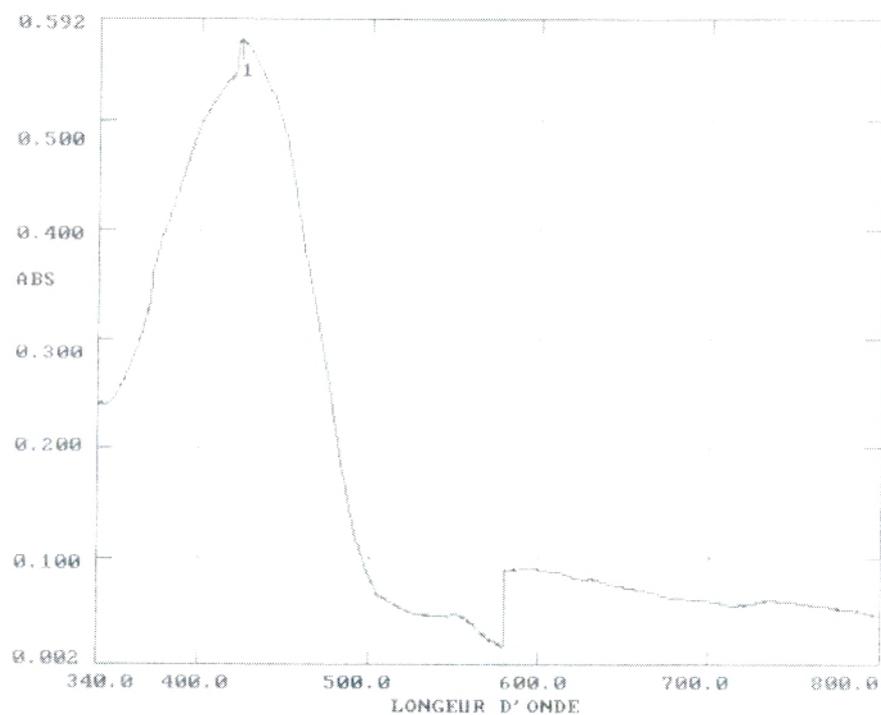


Figure 20 : Spectre d'absorption de la tartrazine diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).

V.2. Effet de concentration en éthyle butyrate sur la tartrazine :

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

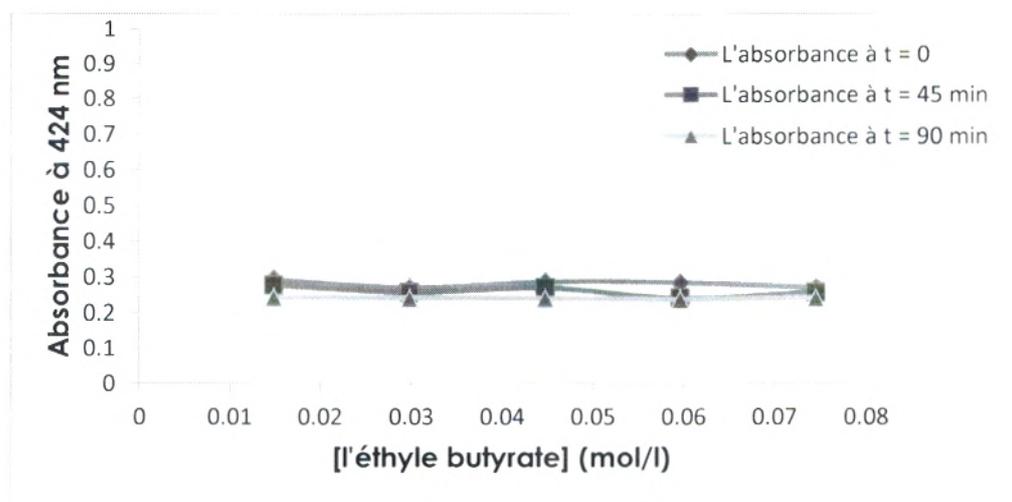


Figure 21 : L'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence de différentes concentrations d'éthyle butyrate.

Les résultats représentés dans cette figure montrent qu'il n'y a pas de changement significatif dans l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence de différentes concentrations d'éthyle butyrate pour les valeurs de temps suivantes (0 ; 45 et 90 minutes), cela montre que l'éthyle butyrate ne présente aucun effet sur ce colorant.

V.3. Effet de la carboxylestérase sur la tartrazine :

La figure 22 est une représentation de l'évolution de l'absorbance des deux solutions en fonction du temps : une solution de la tartrazine diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) et l'autre solution contenant la carboxylestérase et la tartrazine diluées dans la même solution tampon.

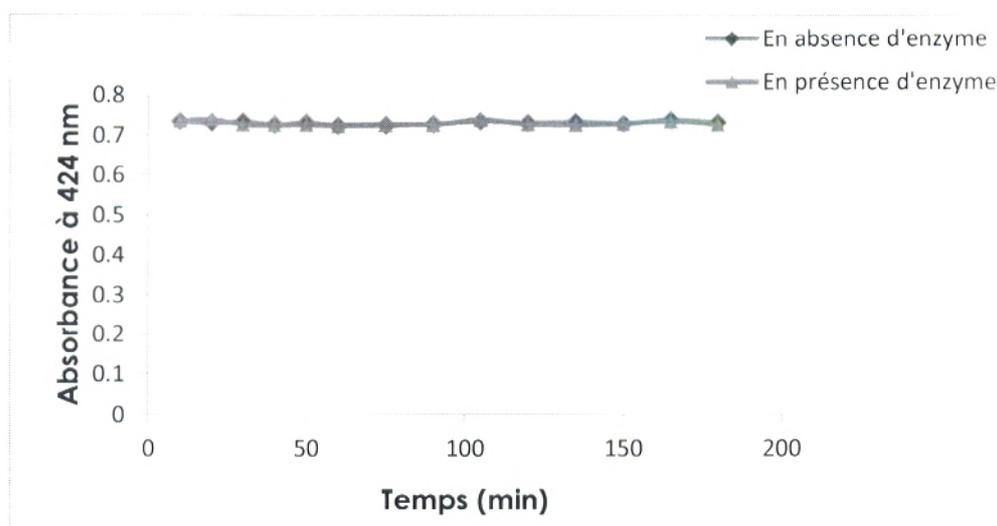


Figure 22 : Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance de la tartrazine en présence et en absence de la carboxylestérase en fonction du temps.

D'après cette figure, on observe que les valeurs d'absorbance de la solution contenant l'enzyme et la tartrazine diluées dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) restent stables pendant tout le temps de suivi (trois heures), ces valeurs ne présentent aucun changement significatif par rapport à celles de la solution témoin (solution de tartrazine diluée dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00)), cela nous montre que 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 l'interaction de la tartrazine au cours de la cinétique enzymatique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase.

V.4. Effet du pH sur la tartrazine :

La figure 23 représente l'effet du pH sur l'absorbance de la tartrazine.

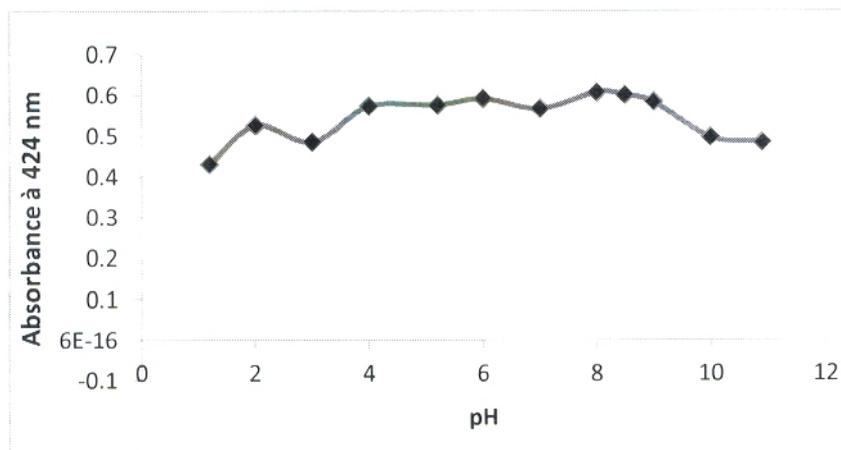


Figure 23 : Effet du pH sur l'absorbance de la tartrazine.

Selon cette figure, le pH a un effet visible en diminuant l'absorbance de la tartrazine à un pH compris entre (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'absorption 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 24 ci-dessous.

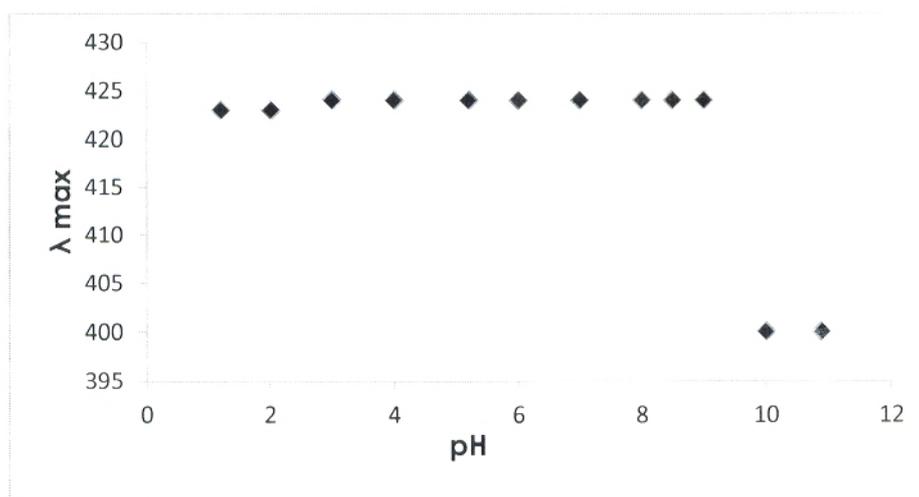


Figure 24 : Effet du pH sur le maximum d'absorption de la tartrazine.

D'après cette figure, nous remarquons que les valeurs de la longueur d'onde maximale sont stables dans une gamme de pH compris entre 1,2 et 9, ce qui explique qu'il y a pas un effet du pH dans cette gamme, 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 (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 8,83. Cette diminution est due au changement d'ionisation du groupement auxochrome de la tartrazine.

VI. Le colorant vert (E124-E171):

VI.1. Spectre d'absorption du colorant vert (E124-E171) dilué dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) :

La figure ci-dessous représente le spectre d'absorption du colorant vert.

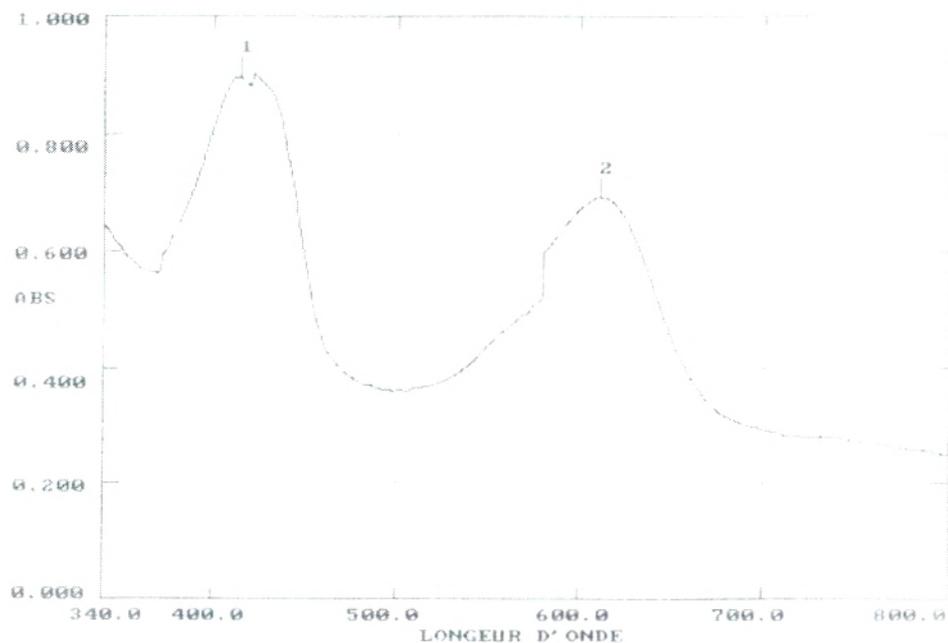


Figure 25 : Spectre d'absorption du colorant vert dilué dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00).

D'après cette figure, le spectre d'absorption du colorant vert représente deux pics d'absorption, ce qui confirme que ce colorant est constitué de deux colorants différents : le colorant jaune représentant une absorbance maximale à une longueur d'onde égale à 414 nm (cette longueur d'onde est proche à celle de la tartrazine) et un autre colorant bleu où son absorbance maximale se situe à 611 nm (cette valeur est proche de celle de l'indigotine (610 nm) **(Altinoz et Toptan, 2003)**). Donc, ce colorant vert peut être constitué de la combinaison tartrazine (E102) et indigotine (E132).

VI.2. Effet de concentration en éthyle butyrate sur le colorant vert :

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

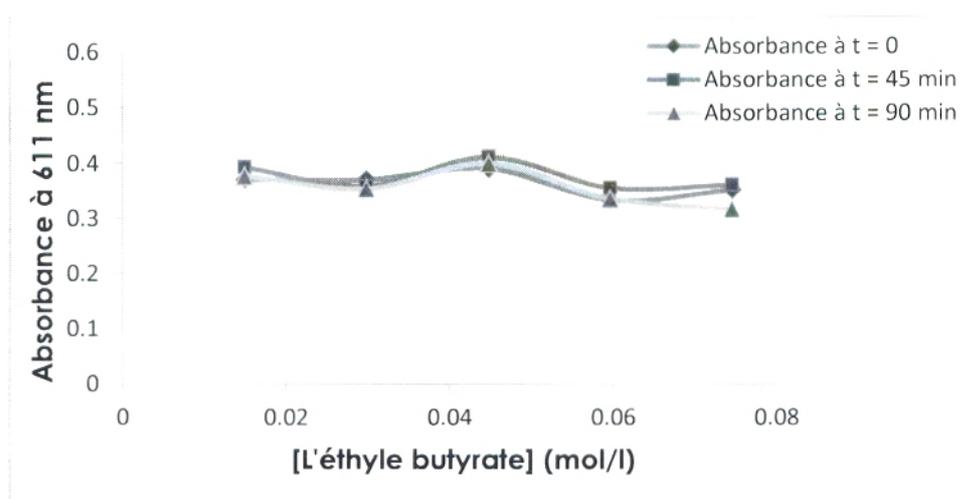


Figure 26 : Evolution de l'absorbance du colorant vert en présence de différentes concentrations d'éthyle butyrate.

Pendant tout le temps du suivi (0, 45 et 90 min), les valeurs d'absorbance du colorant vert en présence de différentes concentrations d'éthyle butyrate sont plus ou moins stables et ne présentent aucun changement significatif, cela explique que le colorant vert n'est pas influencé par l'éthyle butyrate.

VI.3. Effet de la carboxylestérase sur le colorant vert :

La figure 27 indique l'évolution de l'absorbance de deux solutions préparées en fonction du temps, une première solution du colorant vert dilué dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M, pH 8,00 et une deuxième solution contenant la carboxylestérase et le colorant vert dilués dans la même solution tampon.

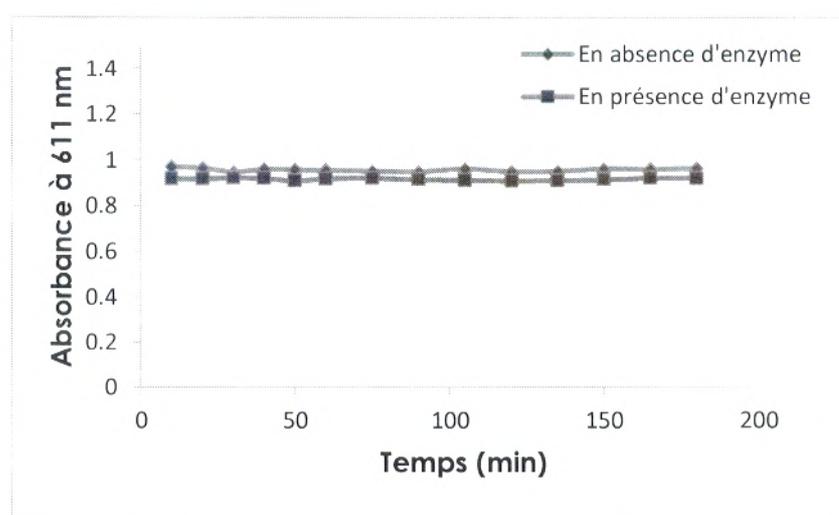


Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance du colorant vert en présence et en absence de la carboxylestérase en fonction du temps.

Durant trois heures du suivi, les valeurs d'absorbance de la solution contenant la carboxylestérase et le colorant vert dilués dans du tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00) restent stables et ne présentent aucun changement significatif avec celles de la solution du colorant vert dilué dans la même solution tampon, cela explique que le colorant vert n'a pas été influencé par cette enzyme. Ce constat nous aidera à poursuivre l'étude de l'effet de ce colorant sur la cinétique d'hydrolyse d'éthyle butyrate par la carboxylestérase.

VI.4. Effet du pH sur le colorant vert :

La figure 28 est une représentation de l'effet du pH sur l'absorbance du colorant vert.

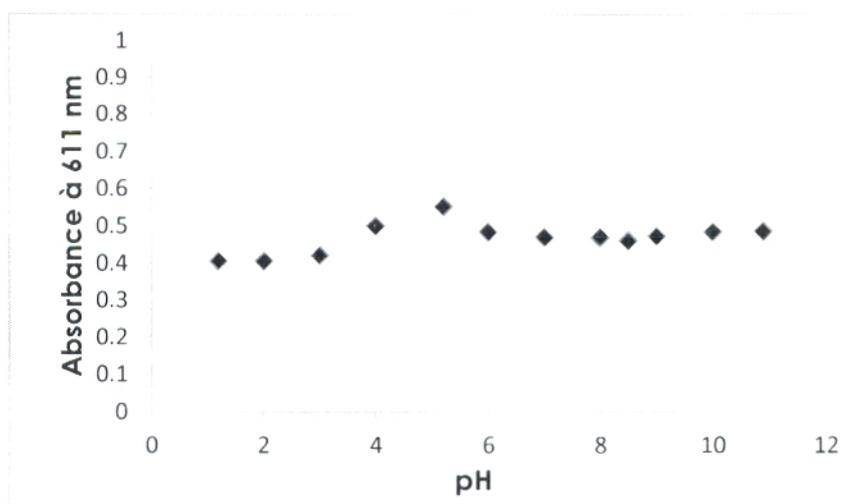


Figure 28 : Effet du pH sur l'absorbance du colorant vert.

Selon cette représentation, l'absorbance du colorant vert se stabilise à des valeurs de pH allant de 1 à 3 et de 6 à 10,9, mais avec une légère augmentation pour les valeurs de pH de 4 et 5,2.

Chaque valeur d'absorbance représente un maximum d'absorption pour une longueur d'onde bien définie comme le montre la figure 29.

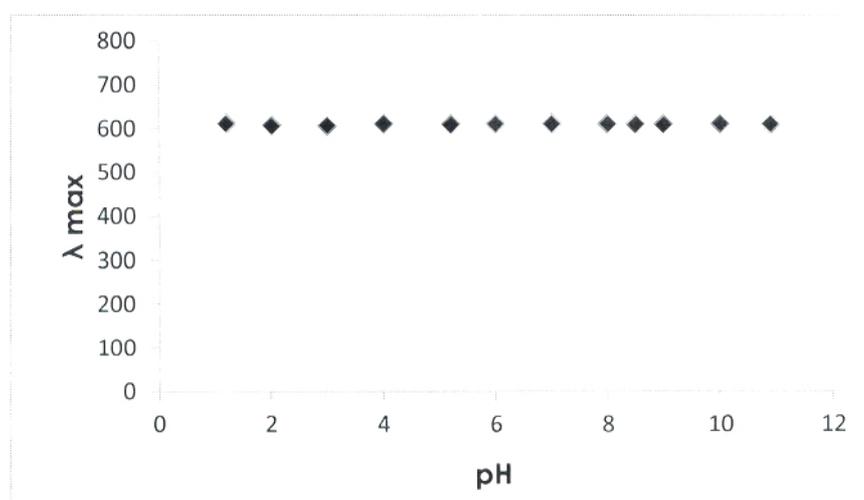


Figure 29: Effet du pH sur le maximum d'absorption du colorant vert.

D'après cette figure, 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.

VII. Détermination des paramètres cinétiques :

VII.1. Cinétique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase :

Afin de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la carboxylestérase, nous avons utilisé en premier lieu, l'équation de Michaelis-Menten où k_m et V_{max} apparaissent comme deux constantes caractéristiques du système enzymatique. Leurs valeurs sont déterminées par mesure des vitesses initiales pour une série de concentrations d'éthyle butyrate allant de $0,567 \times 10^{-2}$ M à $2,983 \times 10^{-2}$ M et à une concentration fixe d'enzyme. L'équation de Michaelis-Menten est la suivante:

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

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) (mol.l^{-1}) ;

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

La courbe $V_{in} = f([S])$ de l'équation de Michaelis-Menten est représentée dans la figure (30).

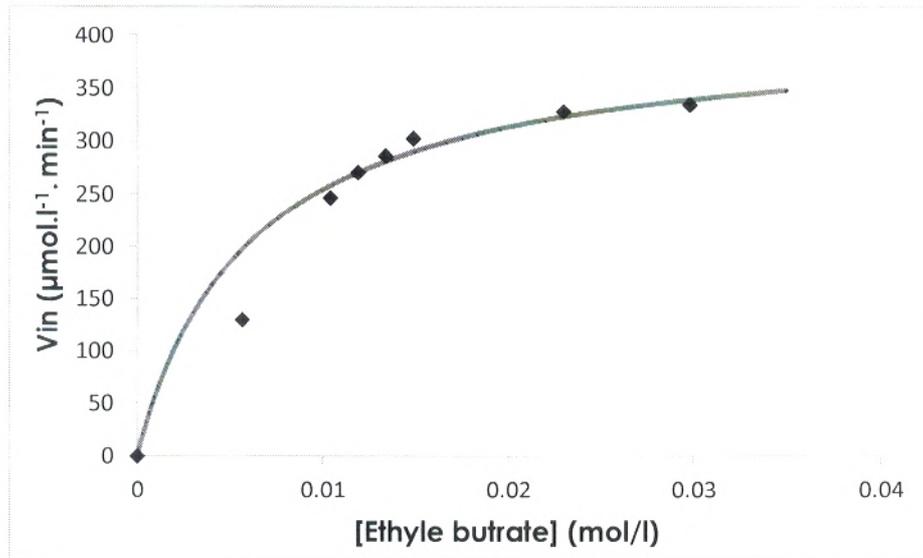


Figure 30 : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en éthyle butyrate selon l'équation de Michaelis-Menten. (25°C ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00)).

A partir de cette courbe, nous avons obtenu :

$$V_{\max} = 407,77 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 6,033 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.$$

$$r^2 = 0,9954.$$

Afin d'obtenir des valeurs plus précises des paramètres cinétiques K_m et V_{\max} , il est préférable de les déterminer par des représentations graphiques à partir de transformations de l'équation de Michaelis-Menten qui conduisent à des relations linéaires, parmi ces représentations, la plus couramment utilisée est celle de Lineweaver-Burk (représentation en coordonnées inverses) pour des concentrations en substrat non saturantes (**Weinman et Méhul, 2004 ; Burnstein, 2000**).

La représentation de Lineweaver et Burk consiste à porter les variations de $1/V_{\text{in}}$ en fonction de $1/[S]$. A partir de l'équation de Michaelis-Menten on obtient l'expression suivante:

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

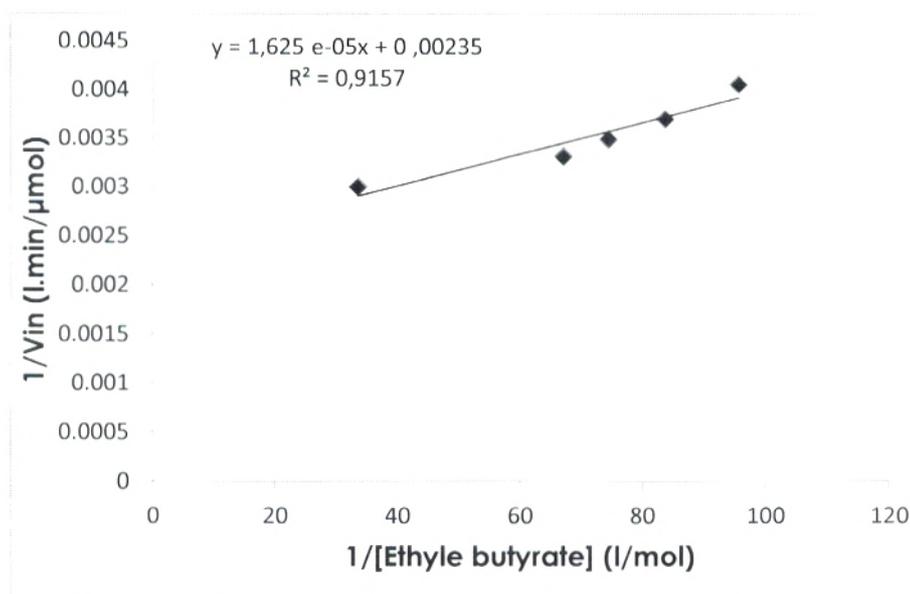


Figure 31: Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase. (cf. figure 30 pour les conditions opératoires).

D'après la figure 31 représentée ci-dessus, l'intersection de la droite représentative avec l'abscisse détermine « $-1/K_m$ » et son intersection avec l'ordonnée présente « $1/V_{max}$ » :

$$V_{max} = 424,504 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 6,901 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.$$

$$r^2 = 0,9157.$$

Nous avons mesuré ensuite les vitesses initiales d'hydrolyse d'éthyle butyrate à des concentrations de substrat supérieures à $2,983 \cdot 10^{-2}$ M qui entraînent une inhibition partielle de l'enzyme, à 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 est alors :

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

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 (mol.l^{-1}) ;

K_m : Constante de Michaelis (mol.l^{-1}) ;

K_s: Constante d'inhibition par le substrat (mol.l^{-1}).

La courbe (figure 32) $V_{in} = f([\text{éthyle butyrate}])$ 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.

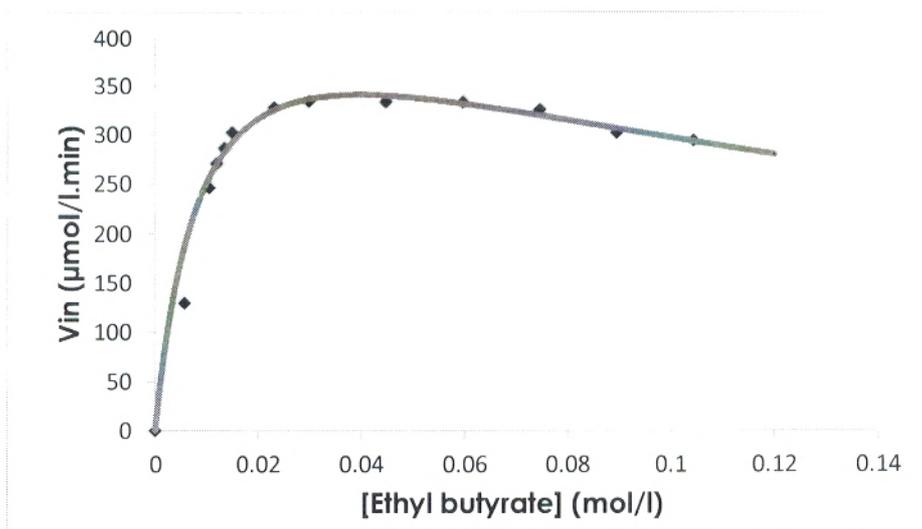


Figure 32 : Effet de la concentration de l'éthyle butyrate sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la carboxylestérase. (cf. figure 30 pour les conditions opératoires).

A partir de cette représentation, nous avons obtenu :

V_{max} = $501,861 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

K_m = $9,347 \times 10^{-3} \text{mol.l}^{-1}$.

K_s = $1,675 \times 10^{-1} \text{mol.l}^{-1}$.

r² = 0,9965.

D'après la figure 32, la vitesse initiale d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase augmente dans un premier temps avec la concentration initiale de substrat (S_0) jusqu'à atteindre un maximum à $[S_0] = 2,983 \times 10^{-2}$ M. au-delà de cette concentration la vitesse initiale d'hydrolyse diminue, cette diminution peut être due à une inhibition de la carboxylestérase par excès de substrat (éthyle butyrate). 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 du mouton et du lapin ainsi que celle du bœuf a été observée aux fortes concentrations d'éthyle butyrate.

Dans certains systèmes, le substrat lorsqu'il est relativement concentré, entre en compétition avec lui-même, en formant avec le récepteur enzymatique des liaisons incomplètes, ce qui entraîne une inhibition par excès de substrat. L'effet se manifeste par une déviation par rapport à la loi de Michaelis-Menten ; la vitesse de réaction ne tend plus vers une asymptote lorsque la concentration de substrat augmente, mais passe par un maximum, puis diminue (**Weinman et Méhul, 2004**).

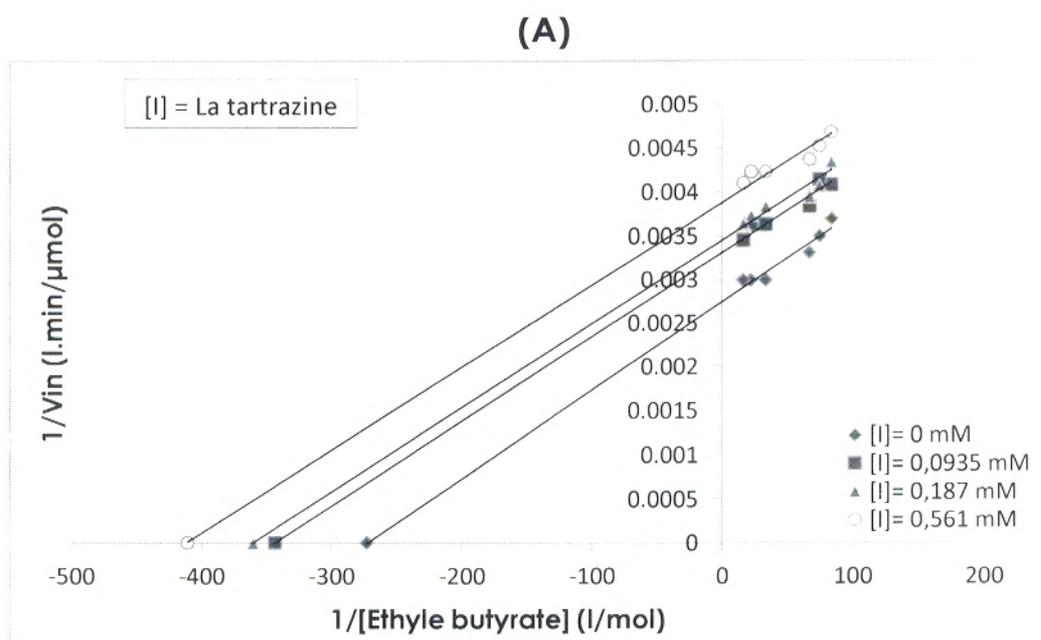
Le tableau 2 ci-dessous, récapitule les paramètres cinétiques de la carboxylestérase.

Tableau 2: Les paramètres cinétiques de la carboxylestérase.

Equations cinétiques	Paramètres cinétiques de la carboxylestérase			
	Vmax ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Km (mol.l^{-1})	Ks (mol.l^{-1})	r ²
$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$	407,773	0,006033	–	0,9954
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$	424,504	0,006901	–	0,9175
$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S] + [S]^2/K_s}$	501,861	0,009347	0,1675	0,9965

VII.2. Cinétique de la carboxylestérase en présence de la tartrazine et du colorant vert:

Puisque les deux colorants alimentaires, 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 exercent un effet inhibiteur ou activateur sur l'activité de cette enzyme. 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 (0,0935mM, 0,187mM et 0,561mM) et (0,3653mM, 0,5479mM et 0,7306mM), respectivement, selon la représentation de Lineweaver-Burk (figure 33).



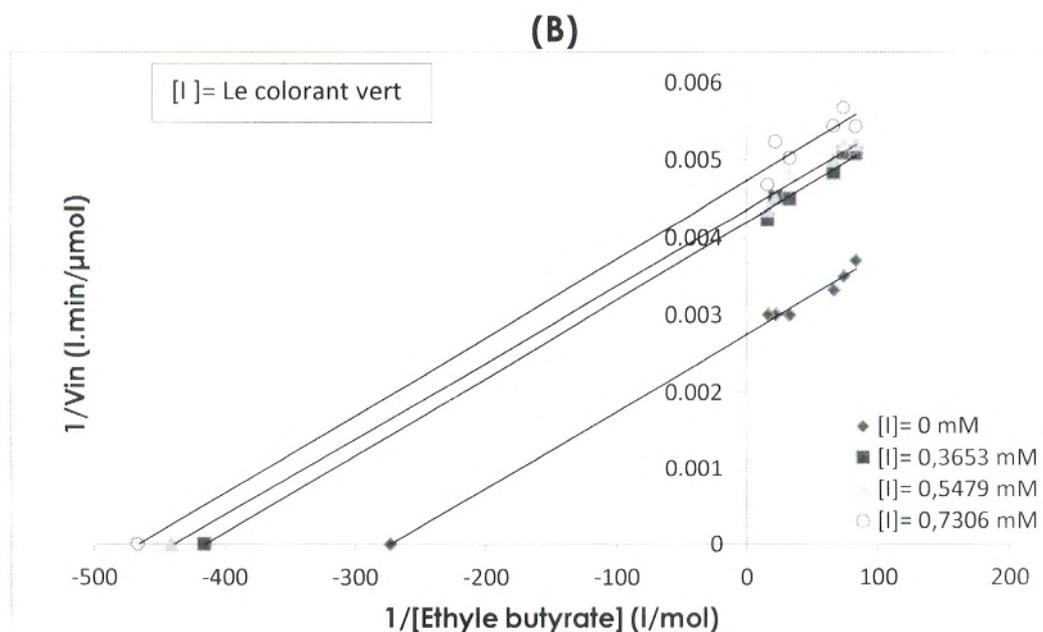
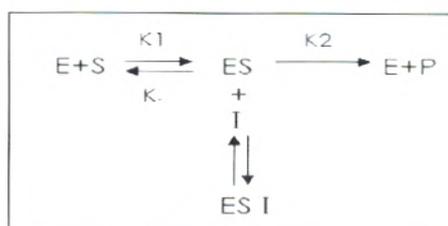


Figure 33 : Représentation de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase en absence et présence de la tartrazine (A) et du colorant vert (B). (25°C ; solution tampon Borax 0,025M/HCl 0,1M (pH 8,00)).

Selon les représentations graphiques (figure 33) de Lineweaver-Burk de la cinétique de la carboxylestérase en absence et en présence des deux colorants (la tartrazine et le colorant vert), les droites traduisant la cinétique de la carboxylestérase en présence de ces deux colorants sont parallèles aux droites obtenues en absence de ces derniers, ce qui explique que ces deux colorants exercent une inhibition de type incompétitive sur l'activité de la carboxylestérase.

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 ;

K₁, K₋₁, K₂ : 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 » et donc renforce en apparence la fixation du substrat sur l'enzyme. L'action de cet inhibiteur se traduit par une diminution de la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m). En augmentant la concentration de la tartrazine ainsi que du colorant vert, les paramètres cinétiques K_m et V_{max} apparentés, notés K_m' et v_{max}' respectivement, diminuent, traduisant ainsi l'effet d'inhibition incompétitive. On a donc:

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

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-Burkde (figure 33) sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Les paramètres cinétiques de la carboxylestérase déterminés en absence et en présence de la tartrazine et du colorant vert.

Les colorants	Concentration des colorants (mM)	Paramètres cinétiques de la carboxylestérase				
		Vmax ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Vmax' ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Km (mol.l ⁻¹)	Km' (mol.l ⁻¹)	Ki (mol.l ⁻¹)
La tartrazine (E102)	0	424,504	—	$6,9 \times 10^{-3}$	—	—
	0,0935	—	298,562	—	$2,63 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-4}$
	0,187	—	283,905	—	$2,31 \times 10^{-3}$	$3,78 \times 10^{-4}$
	0,561	—	249,967	—	$1,76 \times 10^{-3}$	$8,03 \times 10^{-4}$
Le colorant vert (E124-E171)	0	424,504	—	$6,9 \times 10^{-3}$	—	—
	0,3653	—	242,453	—	$2,82 \times 10^{-3}$	$4,84 \times 10^{-4}$
	0,5479	—	234,299	—	$2,77 \times 10^{-3}$	$6,75 \times 10^{-4}$
	0,7306	—	211,138	—	$2,14 \times 10^{-3}$	$7,23 \times 10^{-4}$

VII.3. Détermination de la concentration d'inhibition médiane

IC₅₀ :

L'effet de différentes concentrations des deux colorants de synthèse (la tartrazine et le colorant vert) sur l'activité d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase du foie du porc est représenté dans les figures 34 et 35 ci-dessous.

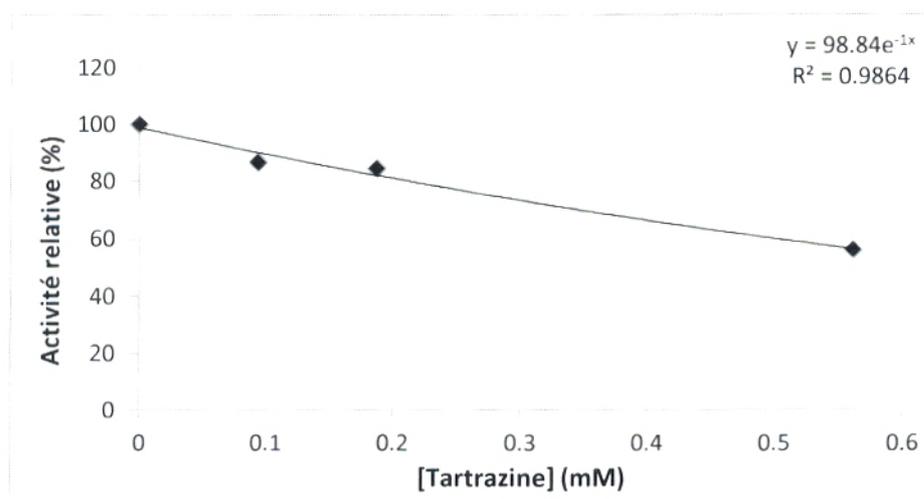


Figure 34 : Effet de la concentration de la tartrazine sur l'activité de la carboxylestérase.

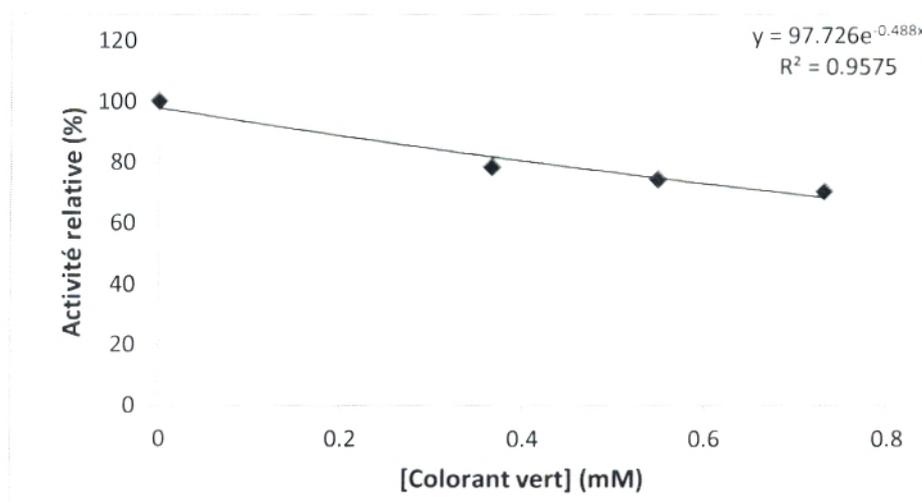


Figure 35 : Effet de la concentration du colorant vert sur l'activité de la carboxylestérase.

Selon les deux figures représentées ci-dessus, l'activité d'hydrolyse de l'éthyle butyrate par la carboxylestérase diminue avec l'augmentation de la concentration des deux colorants (la tartrazine et le colorant vert).

Afin de comparer le pouvoir inhibiteur de ces deux colorants, nous avons déterminé à partir des deux représentations ci-dessus leurs valeurs d'IC₅₀. L'IC₅₀ 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'IC₅₀ ainsi obtenues correspondent à 0,681mM pour la tartrazine et 1,373mM pour le colorant vert

Conclusion

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.

Dans notre travail, la première phase était d'étudier l'activité enzymatique d'hydrolyse d'éthyle butyrate par la carboxylestérase du foie du porc (EC 3.1.1.1) en fonction du temps, ensuite, nous avons étudié l'effet de la température et du pH sur l'activité de cette enzyme, cela nous a permis d'estimer une température optimale de 45°C et un pH optimum de 8,00 ainsi qu'une énergie d'activation de 31,917 KJ.mol⁻¹.

Puis, nous avons entamé l'étude de la cinétique d'hydrolyse de l'éthyle butyrate où nous avons constaté que la carboxylestérase est inhibée par un excès de ce substrat avec les paramètres cinétiques suivant: $V_{max} = 501,861 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $K_m = 9,347 \times 10^{-3} \text{mol.l}^{-1}$; $K_s = 1,675 \times 10^{-1} \text{mol.l}^{-1}$.

En dernier lieu, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de deux colorants de synthèse : la tartrazine (**E102**) et le colorant vert (**E124-E171**) sur l'activité enzymatique de la carboxylestérase pour savoir quel type d'inhibition est exercé par ces deux colorants. D'après les résultats obtenus, nous avons pu constater que ces deux colorants inhibent l'activité de la carboxylestérase de façon incompétitive. De nombreux pays (l'Autriche, la Finlande, La Norvège et la Tunisie) ont interdit l'utilisation de la tartrazine à cause de ses effets nocifs pour la santé, ce qui devrait interpeller les autres pays notamment les pays de Maghreb qui utilisent beaucoup ce colorant synthétique dans la cuisine. De plus, nous noterons ainsi que l'étiquetage du colorant vert utilisé au cours de l'expérimentation ne correspond pas à la composition de ce dernier, et pour cela la réglementation, en ce qui concerne les colorants, doit être rigoureuse et suivi d'un contrôle strict.

*Références
Bibliographiques*

1. 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.
2. AMIN, A., ABDEL HAMEID, H., ABD ELSTAR, 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.
3. ANZENBACHER, P., ZANGER, M. Metabolism of drugs and other xenobiotics. *Library of congress card*, 2012, pp. 169 – 170.
4. AUDIGIE, C., ZONZAIN, F. *Biochimie métabolique*. 3ème édition, Doin éditeurs, 1995, pp. 58.
5. AUGERE, B. *Les enzymes, biocatalyseurs protéiques*. Ellipses édition, 2001, pp. 19.
6. 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.
7. BERTRAME, J., KRISCH, K. Hydrolysis of Vitamin A Acetate by Unspecific Carboxylesterases from Liver and Kidney. *Eur. J. Biochem*, 1969, Vol. 11, pp. 122-126.
8. 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.

9. BORNSCHEUER, T., KAZLAUSKAS, J. Hydrolases in organic synthesis. Reio- and Stereoselective Biotransformations. 2006, pp. 166-167.
10. BOURRIER, T. Intolérances et allergies aux colorants et additifs. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2006, Vol. 46, pp. 68-79.
11. 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.
12. BURNSTEIN, C. Biotechnologie enzymatique : Mode d'emploi : Industrie alimentaire – Environnement - Médical. Paris: Economica, 2000, pp. 63 -103.
13. 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.
14. COUTOULY, G. Génie enzymatique une introduction. Paris : Masson et Doin, 1991, pp. 21-38.
15. DAVIS, K., FITZHUGH, O., NELSON, A. Chronic rat and dog toxicity studies on tartrazine. Toxicol Appl Pharmacol, 1964, Vol. 6, pp. 621–626.
16. EINARSSON, J., SIGMUNDSSON, K., FILIPPUSON, H. Purification and some properties of a carboxylesterase from ovine liver. Comp. Biochem. Physiol, 1996, Vol. 114, pp. 41-48.
17. 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.

18. 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.
19. GALLEN, C., PLA, J. Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue française d'allergologie*, 2013, Vol. 53, pp. 9-18.
20. 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.
21. GARRETT, R.H., GRISHAM, C. M. *Biochimie*. 2^{ème} édition, De Boeck Université, 2000, pp. 442.
22. 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.
23. GAVRILOVIE, M., MAGINOT, J., SCHWARTZ, C., WALLACH, J. *Manipulations d'analyse biochimique* 3^{ème} édition. Doin éditeurs, 1996, pp. 158 – 160.
24. HARADA, T., NAKAGAWA, Y., WADKINGS, M., POTTER, M., WHEELLOCK, 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.
25. HATFIELD, M., POTTER, M. Carboxylesterase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, Vol. 21, pp. 1159-1171.

26. HOOSON, J., GAUNT, I. F., KISS, S., GRASSO, P., BUTTERWORTH, K.R. *FdCosmet. Toxicol*, 1975, Vol. 13, pp. 167-176.
27. HOSAKAWA, M., SATOH, T. *Carboxylesterases: overview, structure, function and polymorphism*, 2010, pp. 43-56.
28. HOSOKAWA, M. *Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs*, *Molecules*, 2008, Vol. 13, pp. 412-431.
29. 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.
30. 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.
31. IMAI, T. *Human carboxylesterase isoenzymes: Catalitic properties and rational drug design*. *Drug Metab. Pharmacokinet*, 2006, Vol. 21, pp. 173 -185.
32. JAWETZ, E., MELNICK, L., ADELBERG, A. *Microbiologie médicale*. Paris : Librairie Maloine, 1973, pp. 68.
33. KYEONG, K., HYUN, K., DONG, H., KWANG, Y., SENYON, C., OOK, J., SE, W. *Crystal structure of carboxylesterase from Pseudomonas fluorescens, an α/β hydrolase with broad substrate specificity*. *Current Biology*, 1997, Vol. 5, pp. 1571-1572.
34. LEHNINGER, A.L. *Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires*. 2ème édition. Flammarion, 1977, pp. 191-192.

35. LEVINE, N., LAVIS, D., RAINES, T. Trimethyl Lock: A Stable Chromogenic Substrate for Esterases. *Molecules*, 2008, Vol. 13, pp. 204-211.
36. 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.
37. 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.
38. LIU, P. Structural, Kinetic and Mutational Analysis of Two Bacterial Carboxylesterases. *Biology Dissertations*, 2007, pp. 5, 6, 7, 8.
39. 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.
40. LONCLE, D. Génie enzymatique. Paris : Doin, 1992, pp. 3 -21.
41. 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.
42. 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.
43. MICHEL, V. Toxicologie. 3^{ème} édition, éditions Wolters Kluwer SA, 2007, pp. 535.

44. 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.
45. 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.
46. MOURANCHE, A. Mode d'action des hydrolases. Hydrolases et dépolymérase. Enzyme d'intérêt industriel. Coordonateurs : MOURANCHE, A et COSTES, C. Paris : Bordas, Gauthier - Villars, 1985, pp. 38 - 43.
47. NARDINI, M., DIJKSTRA, W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, Vol. 9, pp. 732-737.
48. NEVADO, B., FLORES, R., LLERENA, 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.
49. PALMER, T. *Understanding enzymes*. 2ème édition. Ellis Horwood Limited. 1985, pp.162 -163.
50. PARKINSON, A. *Biotransformation of xenobiotics*. Copyright, 2001, pp. 133-224.
51. PELMONT, J. *Enzymes*. Alger : Office des publications universitaires, 1993, pp. 167.
52. PERRIER, R., AUFFREL, T., ZONZAIN, F. *Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques*. Doin éditeurs, 1997, pp. 70.

53. 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.
54. REDINBO, R., POTTER, M. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, 2005, Vol. 10, pp. 313-325.
55. ROBERT, D., VIAN, B. éléments de biologie cellulaire. 3ème édition, Doin, 2004, pp. 74 -75.
56. 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.
57. SATOH, T., HOSOKAWA, M. Carboxylesterases: structure, function and polymorphism in mammals, *Journal of Pesticide Science*, 2010, Vol. 35, pp. 218-228.
58. SATOH, T., HOSOKAWA, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, Vol. 162, pp. 195-211.
59. SCOTT, K., ZERNER, B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). Amino acid composition of liver Carboxylesterases. *Can. J. Biochem*, 1975, Vol. 53, pp. 561-564.
60. 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.
61. 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.

62. 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.
63. 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.
64. UPADHYA, G., GOVARDHAN, L., VEERABHADRAPPA, S. Purification and properties of a carboxylesterase from germinated finger millet (*Eleusinecoracana* Gaertn.). *J. Biosci.* 1985, Vol. 7, pp. 289-301.
65. VIAU, C., TARDIF, R. *Toxicologie. Environnement et santé publique-Fondements et pratiques*, 2003, pp.119-143.
66. VOET, D., VEOT, J.G. *Biochimie ; 2ème édition. De Boeck et Larcier. Bruxelles*, 2005, pp. 127 – 129.
67. 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.
68. WEIL, H.J. *Biochimie générale. 10^{ème} édition. Paris : Masson*, 2005, pp. 86 - 88.
69. WEIL, H.J. *Biochimie générale. 8ème édition. Paris : Masson*, 1997, pp.19 - 87.
70. WEINMAN, S., MEHUL, P. *Toute la biochimie. Dunod, Paris*, 2004, pp. 97.

71. WHEELLOCK, 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.
72. WHEELLOCK, 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.
73. WHEELLOCK, 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.
74. WYNNE, D., GINSBURG, S., SHALITIN, Y. Beef Liver Esterase. Kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1973, Vol. 154, pp. 204-211.
75. 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.
76. 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

I. Préparation des solutions tampons :

Dans de nombreuses branches de la chimie et en particulier en analyse chimique et biochimique, il est nécessaire de garder le pH d'une solution constante notamment au cours d'une réaction qui produit ou consomme des protons, 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 (**Michel, 2007**).

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

Pour préparer une solution tampon d'acide borique à pH 8,00, on mélange des volumes donnés de deux solutions **A** et **B**, appelées solutions 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 9,534 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ La solution **B** est une solution de HCl à 0,1M, elle est obtenue après avoir ajouté 8 ml d'HCl dans de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1000 ml.

Après avoir préparé les deux solutions **A** et **B**, on mélange 100 ml de la solution **A** et 41 ml de la solution **B**, puis on ajoute 59 ml d'eau distillée pour obtenir un volume final de 200 ml de solution tampon d'acide borique à pH 8,00. Si le pH de cette solution n'est pas à 8,00 on ajoute quelques gouttes d'HCl 1N ou de NaOH 1N pour ajuster cette valeur.

I.2. Solution tampon KCl/HCl 0,2M- pH 1,2 et 2,01:

La solution tampon (KCl/HCl) est obtenue après la préparation d'un mélange de deux solutions **A** et **B**, la solution **A** est une solution de KCl 0,2M et la solution **B** est une solution de HCl 0,2M.

- ✓ Pour obtenir un pH de 1,2, on mélange 25 ml de la solution **A** avec 36 ml de la solution **B** et on complète à 100ml par de l'eau distillée pour obtenir une solution tampon (KCl/HCl) à pH 1,2.
- ✓ Pour obtenir un pH de 2,01, on mélange 5,9 ml de la solution **A** avec 50,7 ml de la solution **B** puis on complète à 100 ml par l'eau distillée pour obtenir une solution tampon (KCl/HCl) à pH 2,01.

I.3. Solution tampon acide citrique 0,1M/phosphate disodique 0,2M pH 3,00 et 4,00 :

On peut préparer une solution tampon d'acide citrique/phosphate disodique, on mélangeant deux solutions **A** et **B**.

- ✓ La solution **A** est une solution d'acide citrique 0,1M, elle est obtenue après dissolution de 19,2 g d'acide citrique dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ La solution **B** est une solution de phosphate disodique 0,2M, elle est obtenue après dissolution de 28,39 g de phosphate disodique dans 1000 ml d'eau distillée.

Pour obtenir une solution d'un pH de 3, on mélange 80,3 ml de la solution **A** avec 19,7 ml de la solution **B**.

Pour obtenir une solution d'un pH de 4, on mélange 62 ml de la solution **A** avec 48 ml de la solution **B**.

I.4. Tampon phosphate (pH 5 à 11) :

On prépare deux solutions **A** et **B**. La solution **A** est une solution de sodium hydrogénophosphate, elle est obtenue après dissolution de 9,64 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée. La solution **B** est une solution de potassium phosphate, elle est obtenue par dissolution de 9,06 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée. La solution **B** est stockée dans un grand bécher de 1000 ml, puis à l'aide d'un pH-mètre, le pH de cette solution doit être proche de 4,5, on ajoute goutte à goutte la solution **A** jusqu'à obtention de pH désiré (de 5,3 à 11).

II. Réactif du biuret :

Le réactif du biuret est obtenu à partir de :

- 6 g sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 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 du biuret doit être conservé à l'abri de la lumière dans un flacon soigneusement bouché.

Résumés

Résumé :

Ce travail est une contribution à l'étude de l'inhibition de l'activité de l'estérase du foie du porc par deux colorants alimentaires : la tartrazine (**E102**) et le colorant vert (**E124-E171**).

L'activité de la carboxylestérase a été étudiée en fonction du pH, de la température, de la concentration en substrat (éthyle butyrate) et en présence de deux colorants (la tartrazine et le 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. Cette enzyme est inhibée par excès de substrat (L'éthyle butyrate) avec des valeurs de : $V_{max} = 501,861 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $K_m = 9,347 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$; $K_s = 1,675 \times 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$.

La tartrazine et le colorant vert exercent une inhibition de type incompétitive sur la carboxylestérase en diminuant les paramètres cinétiques V_{max} et K_m .

Mots clés : Carboxylestérase, estérase du foie du porc, éthyle butyrate, colorant vert, tartrazine.

Abstract:

This work is a contribution to the study of the inhibition of the activity of pig liver esterase by two food dyes: tartrazine (**E102**) and green colorant (**E124-E171**).

Carboxylesterase activity has been studied as function of pH, temperature, concentration of substrate (ethyl butyrate) and in the presence of two food dyes (tartrazine and green colorant). The measurement of the initial rate of hydrolysis gave to the following results:

Carboxylesterase has a maximum activity at pH 8 and at temperature of 45 ° C. This enzyme is inhibited by excess of substrate (ethyl butyrate) with values: $V_{max} = 501,861 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m = 9,347 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, $K_s = 1,675 \times 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$.

Tartrazine and the green dye exert an uncompetitive inhibition on the carboxylestérase by decreasing kinetic parameters V_{max} and k_m .

Keywords: Carboxylesterase, pig liver esterase, ethyl butyrate, green colorant, tartrazine.

ملخص:

هذا العمل مشاركة في دراسة آلية تثبيط عمل الـ Estérase المستخلص من كبد الخنزير بواسطة ملونين غذائيين: الـ Tartrazine (E102) و الملون الأخضر (E124-E171).

تمت دراسة عمل الـ Carboxylestérase بدلالة درجة الحموضة، درجة الحرارة، تركيز مادة التفاعل (Ethyle butyrate) و بوجود الملونين (الـ Tartrazine و الملون الأخضر). قياس السرعة الابتدائية للتحلل أعطت النتائج التالية:

الـ Carboxylestérase لديه نشاط أعظمي عند درجة الحموضة 8,00 و عند درجة الحرارة 45° مئوية. هذا الإنزيم تم تثبيطه من خلال إفراط في تركيز مادة التفاعل (Ethyle butyrate) حسب القيم التالية:
 $K_m = 9,347 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ، $V_{max} = 501,861 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$
 $K_s = 1,675 \times 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$

الـ Tartrazine و الملون الأخضر يثبطان الـ Carboxylestérase بتثبيط من نوع Incompétitif مع انخفاض كل من K_m و V_{max} .

الكلمات المفتاحية: Carboxylestérase، Estérase المستخلص من كبد الخنزير، Ethyle butyrate، الملون الأخضر، Tartrazine.