

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université Mouloud MAMMERY de Tizi Ouzou**

**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**



**THESE**

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat**  
**En Sciences Biologiques**  
**Option: Biochimie appliquée aux bio-industries**

Thème :

**Sélection de souches d'actinomycètes productrices d'enzymes  
d'intérêt biotechnologique**

Présenté par :  
**CHERGUI Achour**

**Devant le jury composé de :**

Présidente :	Mme SADOUNE-SMAIL Nouria	Professeur	UMMTO
Directeur :	Mr. HOUALI Karim	Professeur	UMMTO
Co-directeur :	Mr. KECHA Mouloud	Professeur	UAM Béjaia
Examineurs :	Mr. OUELHADJ Akli	MCA	UMMTO
	Mr. RIBA Amar	Professeur	UMB Boumerdès.
	Mr. MOUNI Lotfi	Professeur	UAMO Bouira.

*Année universitaire : 2018/2019*

## RESUME

La L-Asparaginase est l'enzyme qui hydrolyse la L-Asparagine en acide L-Aspartique et ammoniacque. Elle est utilisée en chimiothérapie anticancéreuse pour l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales. Parmi les micro-organismes producteurs, les actinomycètes sont de puissantes machines biologiques à synthétiser la L-Asparaginase. Dans le but de chercher de nouvelles molécules de L-Asparaginase, nous avons isolé 17 souches d'actinomycètes à partir de différentes sources : le son de blé ; les eaux du lac Agoulmim situé au Mont Tikjda (Djurdjura) et le sol rocheux de la commune de Mekla (W. Tizi-Ouzou). Parmi celles-ci, 12 étaient productrices de l'enzyme recherchée dont deux, CA01 et CA04 sélectionnées, ont été identifiées sur la base de leurs caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques et moléculaires ayant révélé un degré de similarité de 99% de la séquence du gène codant l'ARNr 16S au genre *Streptomyces* avec un taux d'identité à l'espèce de 99% à *Streptomyces hydrogenans* CA04 et de 99,73% lié à *Streptomyces paulus* CA01. Après standardisation de la production de la L-Asparaginase extracellulaire, suivant le plan OFAT et l'optimisation par la méthode des surfaces de réponse (RSM) du *Box Behnken Design* (BBD) réalisée avec le logiciel *Minitab17*, il s'est avéré que la souche *Streptomyces paulus* CA01 produit un maximum d'activité L-Asparaginase extracellulaire de 8,03UI/ml, dans les conditions optimales en (g/L) de : L-Asparagine 10,7 ; glucose 2,7 ; amidon 7 à une température de 27,83°C, et un maximum d'activité L-Asparaginase intracellulaire de 8,27UI/ml dans les conditions optimales en (g/L) de : L-Asparagine 11,9 ; glucose 2,6 ; amidon 7 à une température de 27,5°C. Tandis que la souche *Streptomyces hydrogenans* CA04 a produit uniquement la L-Asparaginase extracellulaire, avec un maximum de 5,98UI/ml dans les conditions optimales en (g/L) de : L-Asparagine 7,5 ; glucose 1,0 à une température de 25,76°C, sur un milieu de base ADS contenant en plus en (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.1 et une durée d'incubation de 6 jours. Les enzymes détectées sont extraites respectivement à 80% et 90% de saturation au sulfate d'ammonium, pour les souches CA01 et CA04, suivie d'une dialyse over-night, une séparation chromatographique sur *Séphacryl S-200* et une *PAGE-SDS* en conditions non dissociantes. Ce qui a révélé la présence de deux isoenzymes extracellulaires dans chaque extrait, à des PM respectifs de 114KDa et 91KDa pour la souche CA01 et 108KDa et 86KDa pour CA04 et une enzyme intracellulaire à 51KDa produite par CA01. Les fractions extracellulaires actives de rendement élevé, à savoir A<sub>1</sub> produite par CA01 et A<sub>4</sub> produite par CA04 sont caractérisées, respectivement par des activités spécifiques de 6,55UI/mg et de 2,33UI/mg ; des rendements de 68,92% et 64,06% ; des activités résiduelles de 3,36% et 2,74% vis-à-vis de la L-Glutamine et 0,18% et 0,36% vis-à-vis de l'acide L-aspartique ; des cinétiques enzymatiques caractérisées par des V<sub>max</sub> de 5,36UI/ml et 3,44UI/ml ; K<sub>M</sub> de 1,2.10<sup>-2</sup>M et 2.10<sup>-2</sup>M ; des V<sub>i</sub> de 1,02UI/ml et 0,36UI/ml. Les deux isoformes choisies présentent des activités importantes à pH entre 7 et 8,6 avec un optimum à pH8 et à des températures allant de 35 à 40°C avec des optimums à 37°C. Les activités des deux isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> sont réduites en présence de Fe<sup>2+</sup> et disparaissent en présence de Mn<sup>+</sup>. Cependant l'activité d'A<sub>1</sub> est améliorée en présence de Zn<sup>+</sup>.

**Mots clés :** L-Asparaginase, actinomycètes, *Streptomyces*, OFAT, RSM, Séphacryl S-200, PAGE-SDS.

## Abstract

L-Asparaginase is the enzyme that hydrolyzes L-Asparagine to L-Aspartic acid and ammonia. It is used in anticancer chemotherapy for the inhibition of tumor cell proliferation. Among the producing microorganisms, actinomycetes are powerful biological machines for synthesizing L-Asparaginase. In order to search for new L-Asparaginase molecules, we isolated 17 strains of actinomycetes from different sources: wheat bran; Lake Agulmim located at Mount Tikjda (Djurdjura) and the rocky soil of the municipality of Mekla (Dept. Tizi-Ouzou). Of these strains, 12 were producing the studied enzyme of which two CA01 and CA04 potentially candidates strains were identified on the basis of their morphological, biochemical, physiological and molecular characteristics, revealing a 99% degree of similarity in the sequence of gene encoding 16S rRNA to *Streptomyces* genus with a species-related recovery rate of 99% to *Streptomyces hydrogenans* CA04 and 99.73% bound to *Streptomyces paulus* CA01. After standardization of the production of extracellular and intracellular L-Asparaginase, according to the OFAT plan and response surface methodology (RSM) optimization of the Box Behnken Design (BBD) carried out by the software Minitab17, it turned out that the strain *Streptomyces paulus* CA01 produces a maximum of extracellular L-Asparaginase activity of 8.03 IU/ml, under optimal conditions (g/L) of: L-Asparagine 10.7; glucose 2.7; starch 7 at a temperature of 27.83°C, and a maximum of intracellular L-Asparaginase activity of 8.27IU/ml under optimal conditions in (g/L) of: L-Asparagine 11.9; glucose 2.6; starch 7 at a temperature of 27.5°C. While the strain *Streptomyces hydrogenans* CA04 produced only extracellular L-Asparaginase, with a maximum of 5.98IU/ml under optimal conditions (g/L) of: L-Asparagine 7.5; glucose 1.0 at a temperature of 25.76°C, in the ADS base medium (*Asparagin-Dextrose Salt medium*) additionally containing: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0.1 (g/L) and an incubation period of 6 days. Enzymes detected were extracted at 80% and 90% ammonium sulphate, for CA01 and CA04, respectively, followed by overnight dialysis, Sephacryl S-200 chromatographic separation and SDS-PAGE under non-denaturing conditions. This revealed the existence of two extracellular isoenzymes in each extract, at respective MW of 114KDa and 91KDa for CA01 and 108KDa and 86KDa for CA04 as well as an intracellular enzyme at 51KDa produced by CA01. The high MW and high yield extracellular fractions of each strain, namely A1 produced by CA01 and A4 produced by CA04 are characterized, respectively by specific activities of 6.55IU/mg and 2.33IU/mg; yields of 68.92% and 64.06% ; residual activities of 3.36% and 2.74% against L-Glutamine and 0.18% and 0.36% against L-Aspartic Acid; enzymatic kinetics characterized by V<sub>max</sub> of 5.36IU/ml and 3.44IU/ml; K<sub>m</sub> of 1.2.10<sup>-2</sup>M and 2.10<sup>-2</sup>M; V<sub>i</sub> of 1.02IU/ml and 0.36IU/ml. Both selected isoforms show significant activity at pH between 7 and 8.6 with an optimum at pH8 and at temperatures ranging from 35 to 40°C with an optimum at 37°C. The activities of both isoforms A1 and A4 are decreased in the presence of Fe<sup>2+</sup> ions and disappear completely in the presence of Mn<sup>+</sup>. However, the activity of A1 is increased in the presence of Zn<sup>+</sup>.

**Key Words :** L-Asparaginase, actinomycetes, OFAT, RSM, Sephacryl S-200, SDS-PAGE.

## ملخص

L-أسبراجيناز هو الإنزيم الذي يحلل L-أسبراجين إلى حمض الأسبارتيك والأمونيا. يستخدم في العلاج الكيميائي المضاد للسرطان لتثبيط تكاثر خلايا الورم. من بين الكائنات الحية الدقيقة المنتجة ، تعد الأكتينوميستات عبارة عن آلات بيولوجية قوية لتوليف L-أسبراجيناز. من أجل البحث عن جزيئات أسبراجيناز جديدة عزلنا 17 سلالة من الأكتينوميستات من مصادر مختلفة: نخالة القمح ؛ بحيرة أغولمير في جبل جرجرة والتربة الصخرية لبلدية مقلع. من بين هذه السلالات ، كان 12 منها ينتج الإنزيم المدّرس ، حيث تم تحديد سلالتين CA01 و CA04 يحتمل أن تكونا مرشحتين على أساس خصائصهما المورفولوجية ، البيوكيميائية ، الفسيولوجية والجزيئية ، وكشفت درجة التشابه بنسبة 99 ٪ ترميز الجينات ARNr S16 إلى جنس ستريبتوميستات مع معدل الاسترداد المرتبطة بالأنواع من 99 ٪ لستريبتوميستات هيدروجينيس CA04 و 99.73 ٪ منضمة ستريبتوميستات بولوس CA01 . بعد توحيد إنتاج L-أسبراجيناز خارج الخلية وداخل الخلايا وفقاً لخطة OFAT وتحسين سطح الاستجابة (RSM) لتصميم (Box Behnken (BBD) الذي تم تنفيذه بواسطة البرنامج Minitab17 ، اتضح أن ستريبتوميستات بولوس CA01 ينتج نشاط L-أسبراجيناز خارج الخلية بحد أقصى 8.03 UI/mL ، في ظل الظروف المثلى (g/L) من : أسبراجين 10.5 ؛ الجلوكوز 2.7. النشاء 7 عند درجة حرارة 27.83 درجة مئوية ، والحد الأقصى لنشاط أسبراجيناز داخل الخلايا من 8.27 UI/mL في ظل الظروف المثلى في ( g/L) من : أسبراجين 11.9 ؛ الجلوكوز 2.6. النشاء 7 عند درجة حرارة 27.5 درجة مئوية في حين أن سلالة CA04 أنتجت فقط أسبراجيناز خارج الخلية ، بحد أقصى 5.98 UI/mL في ظل الظروف المثلى (g/L) من : أسبراجين 7.5 ؛ الجلوكوز 1.0 عند درجة حرارة 25.76 درجة مئوية ، في وسط ADS يحتوي أيضاً على: 0.5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>؛ MgSO<sub>4</sub>- 0.1 7H<sub>2</sub>O (g/L). تم استخراج الأنزيمات المكتشفة عن 80٪ و 90٪ كبريتات الأمونيوم ، ل CA01 و CA04 ، على التوالي، تليها خلال الليل Dialyse ، والفصل الكروماتوغرافي على Sephacryl S-200 و SDS-PAGE والتي كشفت عن وجود اثنين من متشابهات الإنزيم خارج الخلية في كل استخراج تمتاز بوزن جزيئي (PM) 114KDa و 91KDa ل CA01 و 108KDa و 86KDa ل CA04 وإنزيم الخلايا التي تنتجها CA01 : 51KDa . تتميز الكسور النشطة ذات الوزن الجزيئي وكفاءة إنتاج كبيرين وهي A1 ، A4 التي تنتجها CA01 و CA04 على التوالي أنشطة محددة من 6،55 UI/mg و 2،33 UI/mg ، إنتاجية 68.92 ٪ و 64.06 ٪. النشاط المتبقية من 3.36 ٪ و 2.74 ٪ تجاه L-الجلوتامين و 0.18 ٪ و 0.36 ٪ تجاه حمض L-الأسبارتيك ؛ الحركية الأنزيمية التي تتميز ب Vmax من 5.36UI/ml و 3،44UI/ml K<sub>M</sub> ؛ 1،2.10<sup>-2</sup> و 2.10<sup>-2</sup> ؛ Vi 1،2UI/ml و 0،36UI/ml. الإنزيمات لها نشاط كبير في درجة الحموضة (pH) بين 7 و 8.6 مع الأمثل في درجة الحموضة 8 و في درجات حرارة تتراوح بين 35 إلى 40 درجة مئوية مع الأمثل عند 37 درجة . يتم تخفيض أنشطة كل من الأشكال الإنزيمية A1 و A4 في وجود الأيونات Fe<sup>2+</sup> وتختفي تماماً في وجود Mn<sup>+</sup>. ومع ذلك ، يتم زيادة نشاط A1 في وجود Zn<sup>+</sup>.

## الكلمات المفتاحية:

L-أسبراجيناز، الأكتينوميستات ، ستريبتوميستات ، OFAT ، منهجية استجابة السطح ، Sephacryl S-200 ، PAGE- SDS

## Remerciements

Louange à Allah qui m'a guidé dans ce chemin et m'a donné le courage de réaliser ce travail. Mon DIEU nous ne savons rien sauf ce que tu nous as fait savoir, c'est toi le Savant, c'est toi le Sage.

Je tiens à remercier mon Directeur de thèse, le Professeur HOUALI Karim, pour son encadrement le plus parfait, son soutien et sa patience tout au long de la réalisation de ce travail. Je lui exprime à travers ces mots, mon profond respect et ma gratitude quant à sa disponibilité tout le temps et dans n'importe quelle condition, que ce soit dans le cadre scientifique et personnel. Je le remercie également pour tous les efforts qu'il a fournis en mettant en ma disposition tous les moyens nécessaires dans son laboratoire.

Je remercie mon Co-directeur de thèse, le Professeur KECHA Mouloud qui m'a guidé vers ce domaine innovant et fascinant, du monde des actinomycètes. Qu'il trouve ici les sentiments de mon profond respect et ma gratitude.

Mes grands remerciements pour le Professeur SMAIL Nouria d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance. Qu'elle trouve ici les sentiments de mon profond respect et ma grande considération.

Mes remerciements les plus sincères au Professeur MOUNI Lotfi, recteur de l'université de Bouira, d'avoir accepté l'examen de mon travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon profond respect que ce soit pour sa qualité de scientifique, pour sa personne et pour son rôle de Doyen de la faculté SNVST dans laquelle j'exerce en qualité d'enseignant, à l'université de Bouira. Ça fait un énorme plaisir de travailler dans cet environnement très convivial à Bouira où le Pr. MOUNI est plus proche de tout un chacun comme une même famille. Pour cela je suis honoré qu'il accepte l'examen de mon modeste travail scientifique.

Je tiens à remercier également le Docteur OUELHADJ Akli et le Professeur RIBA Amar d'avoir accepté d'examiner mon travail. Ça fait un grand plaisir pour moi de bénéficier encore une fois de leurs expériences dans le domaine de la Biotechnologie Microbienne, après avoir examiné mon travail de Magister auparavant. Qu'ils trouvent ici les sentiments de mon profond respect.

Je remercie également Mr. IMESSAOUDENE Ali, mon ami et mon collègue à l'université de Bouira et Mr. TIGHRINE Hamid, pour leur aide colossale sur la réalisation de l'étude statistique.

Je remercie aussi Mr. LIMANE Abdelkrim, enseignant à l'UMMTO, pour son aide dans la confection de ma publication en langue anglaise.

Je remercie Mme SENOUSSI Chahra, enseignante à l'UMMTO de m'avoir aidé sur le plan matériel et sur le plan scientifique, pour la réalisation de l'étape de chromatographie.

Je remercie vivement mes amis intimes et d'enfance, BELKESSAM Ammar et BENNOUAR Djamel pour leur présence, leur soutien moral et leur sympathie, plus particulièrement Ammar qui était toujours là, disponible dans toutes les situations, que ce soit sur le plan moral ou matériel.

Mes remerciements pour ma femme BOUZIDA Samira, diplômée en Biologie à l'UMMTO, pour sa patience et son soutien moral ainsi que son aide, de part ces idées scientifiques et pertinentes, notamment lors de l'isolement des souches bactériennes.

Un remerciement particulier pour mes parents, CHERGUI Mohand Ouramdane et ABDICHE Djamilia pour leur soutien moral et leur éducation. Je leur souhaite à cette occasion, un prompt rétablissement et une longue vie.

Je remercie mes frères Sofiane et Nourdine et ma sœur Lydia pour leur patience et leur soutien.

Enfin, je souhaite et je prie le Bon Dieu, pour qu'il protège mon fils Ishak et qu'il le fasse épanouir dans tout le bonheur du monde. Je promets, à cette occasion, de veiller sur mon petit Ishak et de lui transmettre tout mon savoir.

## Table des matières

Résumé.

Liste des tableaux et des figures.

Liste des abréviations.

Introduction générale..... 1

Synthèse bibliographique

**I-Les Actinomycètes**

I-1-Historique.....	3
I-2-Définition.....	3
I-3-Biologie et cycle de vie.....	4
I-4-Distribution dans la nature.....	5
I-5-Identification et taxonomie.....	6
I-5-1-Critères morphologique.....	8
I-5-1-1-Micromorphologie.....	8
I-5-1-2-Macromorphologie.....	11
I-5-2- Critères chimio taxonomique.....	13
I-5-2-1-Composition en sucres cellulaires.....	13
I-5-2-2- Composition en acides aminés pariétaux.....	13
I-5-2-3- Composition en lipides membranaires et pariétaux.....	15
A-Les phospholipides.....	15
B-Les acides gras.....	16
C-Les ménaquinones.....	16
D-Les acides mycoliques.....	17
I-5-3- Critères physiologiques et taxonomie numérique.....	18
I-5-4- Critères moléculaires.....	18
I-6-Intérêt biotechnologique.....	19

**II-La L-asparaginase.**

II-1-Historique et définition.....	21
II-2-Structure et propriétés.....	22
II-2-1-La forme native.....	22
II-2-2-L'enzyme modifiée et/ou conjuguée.....	23
II-3-Classification.....	24
II-4-Mode d'action antinéoplasique et pharmacologie de la L-Asparaginase.....	26

II-5-Toxicité.....	29
II-6-Sources et production.....	31

## **Partie Expérimentale**

### **1-Matériel et Méthodes**

<b>1-1-Matériel Biologique et origine des échantillons.....</b>	<b>33</b>
<b>1-2-Méthodes.....</b>	<b>34</b>
1-2-1-Isolement des souches bactériennes.....	34
1-2-1-1-Préparation des échantillons.....	34
1-2-1-2-Technique de l'isolement.....	34
1-2-2-Identification morphologique des souches d'Actinomycètes isolées.....	34
1-2-3-Mise en évidence et screening de l'activité L-Asparaginase .....	35
1-2-3-1-Sur milieu solide.....	35
1-2-3-2-Sur milieu liquide.....	35
1-2-4-Dosage de l'activité enzymatique L-asparaginase totale .....	36
1-2-5-Standardisation et maximisation de la production de L-asparaginase.....	36
1-2-6-Etude des caractères biochimiques et physiologiques des deux souches potentiellement productrices de l'enzyme.....	37
1-2-7-Identification moléculaire des deux souches potentiellement productrices de l'enzyme.....	37
1-2-8-Optimisation de la production de la L-asparaginase par les deux souches sélectionnées.....	37
1-2-9-Extraction et purification partielle des enzymes.....	39
1-2-9-1-Récupération des extraits enzymatiques bruts.....	39
1-2-9-2-Concentration.....	39
1-2-9-3-Dosage des protéines.....	39
1-2-9-4-Extraction par précipitation au sulfate d'ammonium.....	39
1-2-9-5-Dialyse.....	40
1-2-9-6-Séparation par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphacryl S-200.....	40
1-2-9-7-Contrôle par Electrophorèse PAGE-SDS.....	41
1-2-10-Propriétés de l'enzyme L-Asparaginase.....	41
1-2-10-1-Effet du pH et de la température.....	41
1-2-10-2-Effet du temps de la réaction enzymatique.....	42

1-2-10-3-Effet des cofacteurs sur la stabilité de l'enzyme.....	42
1-2-10-4-Affinité aux substrats.....	42
1-2-11-Etude de la cinétique enzymatique (détermination de la $K_M$ et la $V_{max}$ ).....	42
1-2-12-Etude de la L-asparaginase intracellulaire.....	43
1-2-12-1-Lyse cellulaire et récupération de la fraction protéique intracellulaire.....	43
1-2-12-2-Mise en évidence de l'activité L-asparaginase intracellulaire.....	44
1-2-12-3-Optimisation de la production de la L-asparaginase intracellulaire.....	44
1-2-12-4-Extraction et purification partielle de la L-asparaginase intracellulaire.....	44
<b>2-Résultats et discussion</b>	
2-1- Identification morphologique des souches bactériennes isolées.....	45
2-2-Screening de la production de L-asparaginase et sélection des souches productrices.....	49
2-2-1-Sur milieu liquide .....	49
2-2-2-Sur milieu solide.....	50
2-3-Dosage de l'activité L-Asparaginase.....	50
2-4-Identification biochimique et physiologique des deux souches potentiellement productrices de L-asparaginase.....	52
2-5-Identification moléculaire des deux souches potentiellement productrices de l'enzyme .....	57
2-6-Standardisation et maximisation de la production de l'enzyme.....	60
2-6-1-Les sources de C et N .....	60
2-6-1-1-Standardisation de la source de carbone dans le milieu ADS.....	60
2-6-1-2- Standardisation de la source d'azote dans le milieu ADS.....	62
2-6-2- Durée d'incubation et cinétique de production de la L-asparaginase.....	63
2-7-Optimisation de la production de L-asparaginase par les deux souches candidates.....	65

2-7-1- Les matrices des expériences.....	65
2-7-2-Analyse statistique des données expérimentales.....	68
2-7-3-Détermination des valeurs optimales.....	72
2-7-4-Détermination et interprétation des surfaces de réponse (RSM).....	75
2-7-5-Evaluation graphique de l'analyse statistique.....	79
2-7-6-Validation expérimentale des modèles de production de la L-Asparaginase.	81
2-8-Extraction et identification partielle des protéines enzymatiques.....	82
2-8-1-Séparation chromatographique et détermination des PM.....	82
2-8-2-Contrôle par électrophorèse PAGE-SDS.....	89
2-8-3-Evaluation du degré de purification des molécules enzymatiques.....	90
2-9-Caractérisation de la L-asparaginase.....	92
2-9-1-Effet du pH et de la température.....	92
2-9-2-Effet du temps de la réaction .....	94
2-9-3-Effet des cofacteurs.....	96
2-9-4-Affinité aux différents substrats.....	97
2-10-Etude de la cinétique enzymatique (détermination de $K_M$ et $V_{max}$ ).....	98
2-11-Etude de la L-asparaginase intracellulaire.....	101
2-11-1-Mise en évidence de l'activité L-asparaginase intracellulaire sur milieu solide .....	101
2-11-2-Optimisation de la production de la L-asparaginase intracellulaire par la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01.....	102
2-11-3-Extraction et purification partielle de la L-asparaginase intracellulaire de <i>Streptomyces paulus</i> CA01.....	109
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>110</b>
<b>Références bibliographiques.</b>	
<b>Annexes.</b>	
<b>Publication.</b>	

## Liste des abréviations

ADS : Asparagine – Dextrose – Agar.  
AS : Activité enzymatique Spécifique.  
Asp : Acide aspartique.  
AT : Activité enzymatique Totale.  
BBD : Box Behnken Design : Plan d'expérience de Box Behnken.  
BSA : *Bovine Serum Albumine*. Sérum Albumine Bovine.  
DAB : Diaminobutyrique.  
DAP : Diaminopimélique.  
DOE : *Design of Experiments*. Plan d'expériences.  
EDTA : Ethylène diamine tétra acétique.  
GlcNAc : N-Acétylglucosamine.  
Glu : Acide glutamique.  
His : Histidine.  
Hz : Hertz.  
ISP : *International Streptomyces Project*. Milieu international *Streptomyces* Project.  
 $K_M$  : Constante de Michaelis – Menten.  
L-Asn : L-Asparagine.  
L-ASP : L-Asparaginase.  
MA : Mycélium aérien.  
MM : Masse Molaire.  
MS : Mycélium du substrat.  
*mTOR* : *mechanistic Target Of Rapamycin*, auparavant : *mammalian target of rapamycin*.  
Cible de la rapamycine chez les mammifères.  
MurNAc : acide N-Acétylmuramique.  
NCBI : *National Center for Biotechnology Information*. Centre national d'information en biotechnologie.  
OFAT : One Factor At Time : Plan d'expérience basé sur la variation d'un seul facteur à la fois.  
PAGE-SDS : Polyacrylamide gel Electrophoresis-Sulfate Dodecyl Sodium : Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence du Sulfate Dodécyl de Sodium.  
PBIL : Population-Based Incremental Learning. Logarithme d'apprentissage incrémental basé sur la population.  
*PCD* : *Programmed Cell Death* : Mécanisme de mort cellulaire programmée.  
PCR : *Polymerization Chain Reaction*. Réaction de polymérisation en chaîne.  
PEG : Polyéthylène glycol.  
PM : Poids Moléculaire.  
RSM : *Response Surface Methodology*. Méthodologie des surfaces de réponse.  
T (min) : Temps en minutes.  
T (°C) : Température en unité degré Celsius.  
TCA : *Tétrachlorures acetic acid*. Acide tétrachlorures acétique.  
 $t_M$  : temps mort.  
 $t'_M$  : temps mort réduit.

$t_R$  : temps de rétention.

$t'_R$  : temps de rétention réduit.

TEMED : Tetraméthyl éthylène diamine.

$V_i$  : Vitesse initiale de la réaction enzymatique.

$V_M$  : Volume mort.

$V_{max}$  : Vitesse maximale de la réaction enzymatique.

$V_R$  : Volume de rétention.

$V'_R$  : Volume de rétention réduit.

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b>	Tableau récapitulatif de l'ensemble des critères d'identification des actinomycètes	7
<b>Tableau II</b>	Classification des actinomycètes selon les types de phospholipides pariétaux	16
<b>Tableau III</b>	Classification des actinomycètes selon les types d'acides gras pariétaux	16
<b>Tableau IV</b>	Classification des actinomycètes en fonction de leur contenu en ménaquinones pariétaux	17
<b>Tableau V</b>	Recueil de la totalité des souches d'actinomycètes isolées et identification morphologique (identification préliminaire)	47
<b>Tableau VI</b>	Tableau montrant la quantification de l'activité L-Asparaginase chez les souches productrices présélectionnées	51
<b>Tableau VII</b>	Tableau récapitulatif des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des deux souches <i>CA01</i> et <i>CA04</i>	55
<b>Tableau VIII</b>	Matrice des expériences pour l'optimisation de la production de L-Asparaginase par <i>Streptomyces paulus</i> CA01, obtenue par le plan Box Behnken	66
<b>Tableau IX</b>	Matrice des expériences pour l'optimisation de la production de L-Asparaginase par <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04, obtenue par le plan Box Behnken	67
<b>Tableau X</b>	Tableau global de l'estimation des paramètres statistiques pour la production de la L-Asparaginase par <i>Streptomyces paulus</i> CA01	68
<b>Tableau XI</b>	Analyse de la variance (ANOVA) de tous les effets du modèle quadratique, pour l'étude statistique concernant la production de l'enzyme par la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01	68
<b>Tableau XII</b>	Tableau de l'estimation des paramètres statistiques du modèle réduit en éliminant les facteurs non significatifs, pour <i>Streptomyces paulus</i> CA01	69
<b>Tableau XIII</b>	Analyse de la variance du modèle simplifié, pour la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01	70
<b>Tableau XIV</b>	Estimation des paramètres statistiques pour la production de la L-Asparaginase par <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	71
<b>Tableau XV</b>	Analyse de la variance (ANOVA) pour l'étude statistique concernant la production de l'enzyme par <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04.	71
<b>Tableau XVI</b>	Tableau récapitulatif des paramètres d'optimisation et de validation des modèles	81
<b>Tableau XVII</b>	Tableau récapitulatif de l'analyse des spectres des molécules enzymatiques détectées	86
<b>Tableau XVIII</b>	Corrélation entre le PM et le temps de rétention	87
<b>Tableau XIX</b>	Représentation des valeurs des PM des différents isoformes de L-Asparaginase extracellulaires identifiés	87

<b>Tableau XX</b>	Diagramme d'identification des isoformes de L-Asparaginase extracellulaires produits par la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01	90
<b>Tableau XXI</b>	Diagramme d'identification des isoformes de L-Asparaginase extracellulaires produits par la souche <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	90
<b>Tableau XXII</b>	Tableau résumant les activités enzymatiques des molécules L-Asparaginase A <sub>1</sub> et A <sub>4</sub> produites par les deux souches <i>Streptomyces paulus</i> CA01 et <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04 vis-à-vis des trois substrats	97
<b>Tableau XXIII</b>	Matrice des expériences pour l'optimisation de la production de la Asparaginase intracellulaire par la souche CA01	L- 103
<b>Tableau XXIV</b>	Coefficients codés des réponses transformées	103
<b>Tableau XXV</b>	Analyse de la variance des réponses obtenues pour l'optimisation de la production de la L-Asparaginase intracellulaire, par la souche CA01	104
<b>Tableau XXVI</b>	Tableau des coefficients codés pour les réponses transformées du modèle réduit.	104
<b>Tableau XXVII</b>	Analyse de la variance des réponses de l'activité L-Asparaginase intracellulaire du modèle réduit.	105

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	Cycle de développement des actinomycètes (exemple du genre <i>Streptomyces</i> ) sur milieu solide	5
<b>Figure 02</b>	Photos illustrant la micromorphologie de quelques espèces d'actinomycètes observées au microscope électronique à balayage	8
<b>Figure 03</b>	Images de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes	9
<b>Figure 04</b>	Images de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre <i>Streptomyces</i>	10
<b>Figure 05</b>	Représentation schématique et image de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes	10
<b>Figure 06</b>	Schéma montrant les différentes formes des chaînes de spores chez les actinomycètes	11
<b>Figure 07</b>	Les différents types de macromorphologies des Actinomycètes en culture submergée, avec leurs principales caractéristiques	12
<b>Figure 08</b>	Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.	15
<b>Figure 09</b>	Structure générale des Ménaquinones	17
<b>Figure 10</b>	Structure générale des acides mycoliques	18
<b>Figure 11</b>	Caractéristiques structurales de la L-asparaginase	25
<b>Figure 12</b>	Mode d'action schématisé de la L-asparaginase	26
<b>Figure 13</b>	schéma montrant la réaction d'hydrolyse de la l-asparagine par la l-asparaginase	27
<b>Figure 14</b>	Photo montrant le résultat du screening de l'activité L-asparaginase sur bouillon ADS, de l'ensemble des 17 souches isolées	49
<b>Figure 15</b>	Photos montrant le résultat de la production de la L-asparaginase sur gélose ADS par la souche <i>CA01</i>	50
<b>Figure 16</b>	Photo illustrant le résultat du dosage de l'activité L-Asparaginase produite par les deux souches sélectionnées.	51
<b>Figure 17</b>	Aspect macroscopique en culture sur milieu gélosé, des deux souches candidates	56
<b>Figure 18</b>	Photo de microscopie photonique au grossissement 40 × 10, montrant l'aspect des hyphes filamenteux des deux souches candidates à la production de la L-Asparaginase	56
<b>Figure 19</b>	L'arbre phylogénétique de la souche <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	58
<b>Figure 20</b>	L'arbre phylogénétique de la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01	59
<b>Figure 21</b>	Histogramme de la variation de l'activité L-Asparaginase en fonction de la variation de la source de carbone, pour les deux souches <i>Streptomyces paulus</i> CA01 et <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	61
<b>Figure 22</b>	Histogramme de la variation de l'activité L-Asparaginase en fonction de la variation de la source d'azote, pour les deux souches <i>Streptomyces paulus</i> CA01 et <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	62
<b>Figure 23</b>	Cinétique de production de la L-Asparaginase par la souche <i>CA01</i>	64
<b>Figure 24</b>	Graphe d'optimisation de l'activité L-Asparaginase de la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01	73
<b>Figure 25</b>	Graphe d'optimisation de l'activité L-Asparaginase de la souche <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	73
<b>Figure 26</b>	Représentation graphique par surfaces de réponse illustrant l'effet des combinaisons de deux facteurs sur la production de L-Asparaginase, par la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01	76
<b>Figure 27</b>	Représentation graphique par surfaces de réponse illustrant l'effet des combinaisons de deux facteurs sur la production de L-Asparaginase par la souche <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	78

<b>Figure 28</b>	Graphique de l'ANOVA pour l'analyse des résultats de l'optimisation de la production de la L-Asparaginase par la souche <i>Streptomyces paulus</i> CA01	79
<b>Figure 29</b>	Graphique de l'ANOVA pour l'analyse des résultats de l'optimisation de la production de la L-Asparaginase par la souche <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	80
<b>Figure 30</b>	Graphique illustrant le chromatogramme d'éluion de l'extrait enzymatique brut de la souche CA01, sur Séphacryl S-200	83
<b>Figure 31</b>	Graphique illustrant le chromatogramme d'éluion de l'extrait enzymatique brut de la souche CA04, sur Séphacryl S-200	83
<b>Figure 32</b>	Profils électrophorétiques sur PAGE-SDS des enzymes extracellulaires	89
<b>Figure 33</b>	Effet de la variation du pH sur la réaction enzymatique catalysée par la asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04	L-L- 92
<b>Figure 34</b>	Effet de la variation de la température sur la réaction enzymatique catalysée par la asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04	L- 93
<b>Figure 35</b>	Effet de la variation du temps sur la réaction enzymatique catalysée par la asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04	L- 95
<b>Figure 36</b>	Effet des cofacteurs sur la réaction enzymatique catalysée par la L-asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04.	96
<b>Figure 37</b>	Cinétique de l'activité L-Asparaginase des deux isoformes A <sub>1</sub> et A <sub>4</sub>	98
<b>Figure 38</b>	Graphiques représentant les vitesses initiales ( $V_i$ ) des isoformes A <sub>1</sub> et A <sub>4</sub> de asparaginase, produits par les deux souches <i>Streptomyces paulus</i> CA01 et <i>Streptomyces hydrogenans</i> CA04	L- 99
<b>Figure 39</b>	Représentation graphique de l'activité (ou vitesse) enzymatique L-Asparaginase des isoformes A1 et A4 ( $V$ ) en fonction de la concentration en substrat ( $S$ )	100
<b>Figure 40</b>	Photo montrant le résultat de l'activité L-asparaginase de la fraction protéique intracellulaire de <i>Streptomyces paulus</i> CA01	102
<b>Figure 41</b>	Les valeurs optimales de la production de la L-Asparaginase intracellulaire par <i>Streptomyces paulus</i> CA01	106
<b>Figure 42</b>	Les surfaces de réponse de la production de la L-Asparaginase intracellulaire par la souche CA01	107
<b>Figure 43</b>	Evaluation de l'analyse statistique du modèle de production de la L-asparaginase intracellulaire par la souche CA01	108
<b>Figure 44</b>	Représentation graphique des pics d'absorbances de la fraction L-asparaginase intracellulaire de <i>Streptomyces paulus</i> CA01	109
<b>Figure 45</b>	Profile protéique séparé sur PAGE-SDS de la fraction intracellulaire de L-asparaginase produite par <i>Streptomyces paulus</i> CA1.	110

## **Liste des annexes**

**Annexe 1 :** Courbes d'étalonnage et tableau de précipitation saline.

**Annexe 2 :** Equipements scientifiques utilisés.

**Annexe 03 :** Réactifs et milieux de culture.

**Annexe 04 :** Séquences complètes des gènes codant l'ARNr 16S des deux souches candidates sous forme de contig de nucléotides.

**Annexe 05 :** Image illustrant l'élution du Bleu de Dextran sur le gel de Séphacryl S-200.

# Introduction générale

Le phylum des Actinobacteria est l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les principales lignées reconnues dans le Domaine des bactéries (Ludwig et al., 2012). Les génomes actinobactériens séquencés à ce jour appartiennent à des organismes relevant de la médecine humaine et vétérinaire, de la biotechnologie et de l'écologie. Cette hétérogénéité est supposée refléter leur biodiversité (Ventura et al., 2007). Dans ce phylum, le groupe des actinomycètes renferme des organismes largement répandus dans les écosystèmes à la fois terrestre et aquatique (y compris marins) (Macagnon et al., 2006). Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif ayant une teneur élevée en guanine plus cytosine (G+C) dans leurs génomes. Ils se développent par une combinaison d'extension de la pointe et ramification des hyphes. C'est ce qui leur a donné leur nom, qui dérive des mots grecs pour ray (aktis ou aktin) et champignons (mukes) : ce qui veut dire champignons rayonnants. Traditionnellement, les actinomycètes étaient considérés comme des formes de transition entre les champignons et les bactéries. En effet, comme les champignons filamenteux, de nombreux actinomycètes produisent un mycélium et beaucoup de ces actinomycètes mycéliens se reproduisent par sporulation.

Les actinomycètes sont considérés comme les plus grands producteurs de molécules d'intérêt, notamment les antibiotiques et les enzymes, grâce à leur grande aptitude de dégradation des composés biologiques (Okami, 1986). Parmi les enzymes produites par ces bactéries, les enzymes thérapeutiques notamment les enzymes anticancéreuses sont largement recherchées. Ces dernières comprennent la L-asparaginase, l'arginine désiminase (ADI), l'arginase (ARG), la glutaminase (GA), la méthioninase (METase) et l'amine oxydase sérique bovine (BSAO) (Asselin et Rizzari, 2015). En plus des six enzymes anticancéreuses mentionnées ci-dessus, d'autres telles que la leucine déshydrogénase (Zhu et al., 2016) et la phénylalanine ammoniac-lyase (Turgut et al., 2018), auraient également des effets anticancéreux.

La L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase EC.3.5.1.1) est une enzyme d'intérêt thérapeutique utilisée dans la lutte contre la leucémie lymphoïde aigue. Son mode d'action est basé sur la déplétion de la L-asparagine du milieu, ce qui inhibe la prolifération des lymphocytes cancéreux (Hill et al., 1967 ; Amena et al., 2010). La L-asparaginase a été découverte il y a une quarantaine d'année et reconnue comme une enzyme anticancéreuse, notamment à l'égard des lymphomes ; lors de son identification pour la première fois dans le sérum du porc (Albert et al., 1997). Contrairement aux cellules normales de l'organisme, les lymphocytes transformés présentent une sensibilité remarquable vis-à-vis de la L-asparaginase, à cause de leur incapacité à produire la L-asparagine synthétase, enzyme catalysant la synthèse de novo, de la L-asparagine (Aly et al., 2013). La L-asparaginase d'origine microbienne est la plus rencontrée, d'ailleurs, c'est celles produites par *E. Coli* et *Erwinia* qui sont utilisées dans les protocoles de chimiothérapie anticancéreuse, comme inhibiteurs de la biosynthèse des protéines (Mezentsev et al., 2006). Cependant à cause des effets secondaires de grande ampleur, rencontrés chez les patients traités (Narta et al., 2007), plusieurs travaux scientifiques se focalisent sur la recherche de nouvelles molécules moins toxiques et efficaces à faibles doses. Plusieurs catégories de L-asparaginase existent, selon leurs sources de production ainsi que leur localisation cellulaire (Keating et al., 1993).

La problématique principale qui se pose dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules de L-asparaginase réside, principalement dans le souci que les molécules utilisées actuellement, et qui sont représentées par la L-asparaginase d'*E. Coli* et celle d'*Erwinia*, sont responsables de l'apparition de toxicité dont les effets sont non négligeables sur les patients traités. D'autre part, dans certaines situations, l'enzyme s'avère inefficace quant à son pouvoir d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, à cause de son inhibition par des anticorps anti-asparaginase. Pour cela, la communauté scientifique explorant cet axe, ne cesse de s'intéresser à l'isolement de nouvelles souches microbiennes productrices. A rajouter que le potentiel des actinomycètes à produire la L-asparaginase a été prouvé dans plusieurs travaux scientifiques, où des molécules dotées de propriétés intéressantes ont été caractérisées.

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail. En effet nous avons ciblé certaines sources non exploitées sur le territoire national d'Algérie, pour isoler de nouvelles souches d'actinomycètes et sélectionner celles produisant la L-asparaginase, à des rendements importants. Nous avons choisi certains milieux, que nous avons jugés propices pour le développement des actinomycètes, dans les deux wilayas : Tizi-Ouzou et Bouira. Notre investigation scientifique a été réalisée dans l'unité de recherche : Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, suivant plusieurs étapes expérimentales :

Nous avons commencé par l'isolement des souches d'actinomycètes à partir de trois échantillons de nature différente, à savoir le son de blé tendre, l'eau du lac Agulmim de Tikjda et le sol de montagne rocheuse de la région de Mekla dans la wilaya de Tizi-Ouzou.

Nous avons ensuite identifié toutes les souches isolées, sur la base d'une observation des caractères morphologiques.

Nous avons réalisé le screening de l'activité enzymatique L-asparaginase sur milieux solide et liquide, ce qui nous a permis de sélectionner des souches candidates potentiellement productrices que nous avons identifié par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

Nous avons réalisé une standardisation du milieu de production suivie d'une optimisation de la production en enzyme, en mettant en place un plan d'expériences, ceci en utilisant le logiciel Minitab17.

Nous avons par la suite procédé à l'extraction et la purification des substances enzymatiques, sur la base de laquelle nous avons sélectionnés pour chacune des deux souches, un seul isoforme considéré majoritaire, pour une étude de caractérisation physicochimique.

Enfin nous avons mis en évidence l'existence d'une L-asparaginase intracellulaire, chez l'une des deux souches, que nous avons partiellement purifiée, après avoir optimisé sa production.

*Synthèse  
bibliographique*

## I- Les actinomycètes

### I-1-Historique

La connaissance des actinomycètes a évolué à travers 05 périodes dans l'histoire : La première a été la période médicale allant de 1877 à 1890, pendant laquelle les actinomycètes ont été connues en tant que micro-organismes pathogènes (Pirouz et al., 1999), vu les différentes pathologies causées par ses micro-organismes, notamment les nocardioses. La deuxième période allant de 1900 à 1940, selon (Mariat et Sebald, 1990) est caractérisée par des études sur les actinomycètes du sol particulièrement les conditions de développement de ces bactéries dans les différents milieux naturels. La période qui a suivi 1940, est celle de la découverte des antibiotiques, par la mise en évidence la production de la Streptomycine par *Streptomyces griseus*. Elle fût nommée la période de Waksman (Sanglier et Trujillo, 1997). Durant la quatrième période (1940 – 1970), le rythme de l'évolution des critères d'identification des actinomycètes s'est accéléré passant de l'identification des critères morphologiques, biochimiques et culturels à la compréhension de la physiologie bactérienne et à l'apparition de la taxonomie numérique. Enfin, depuis 1960, c'est l'ère de la biologie moléculaire, qui a révolutionné l'identification et la classification des actinomycètes, avec les travaux de Hapwood 1973 (Ventura, 2007). Depuis, les travaux sur l'utilisation des actinomycètes, comme sources potentielles d'antibiotiques, d'enzymes, d'antiviraux, d'anti-inflammatoires et d'agents cytotoxiques, ont marqué l'histoire dans ce domaine (Donadio, 2002).

### I-2-Définition

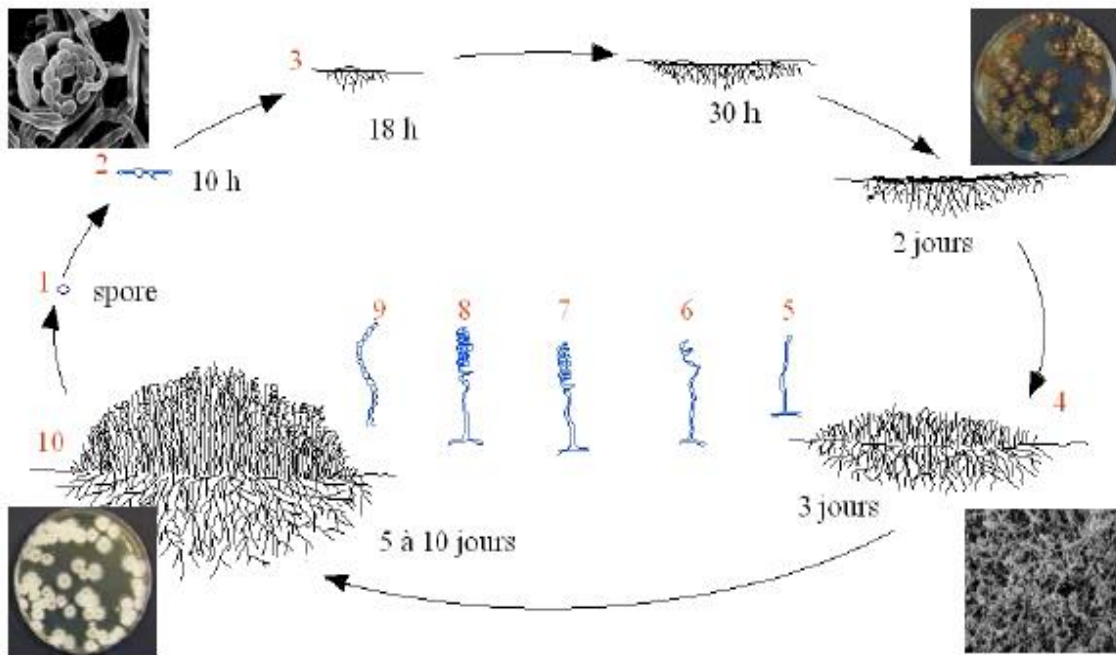
Les actinomycètes, mot provenant de deux substantifs grecs « Aktinos et mycetes » qui veut dire « Champignon rayonnant ou à rayons » reflétant la forme de leurs colonies caractérisées par des filaments appelés hyphes, qui irradiant suivant une croissance centrifuge autour des spores centrales qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973; Lechevalier et Lechevalier, 1981), sont des bactéries Gram positives appartenant au groupe des *Actinomycetales* (Mariat et Sebald, 1990). Au départ, les actinomycètes étaient considérés comme étant des champignons vu la forme de leurs mycéliums fongicoïde (filaments ramifiés et formation de spores) (Ikeda et al., 2003). Néanmoins, certaines caractéristiques ont permis de les classer parmi les bactéries : leurs cellules procaryotes, la présence du peptidoglycane au niveau de leur paroi ainsi que leur sensibilité aux antibactériens (Ludwig et al., 2012). D'autre part, le phylum des actinomycètes se caractérise par leur grand pourcentage en G+C dans leur ADN (Kavitha et al, 2010 ; Whitman et al., 2012) entre 63 et 78% chez le genre *Streptomyces* (Madigan et Martinko, 2005). Dans le manuel de Bergey de 2012, l'ordre des *Actinomycetales* a été scindé en plusieurs ordres. Les actinomycètes sont classés dans le règne des procaryotes, le domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria* et la Sous-Classe des *Actinobacteridae* (Euzéby, 2015). Le phylum des *Actinobacteria* comprend cinq classes, 21 ordres et de nombreuses familles. Les genres sont établis sur la base d'une extrême diversité morphologique. Les actinomycètes sont des bactéries aérobies, mais certaines souches peuvent être facultatives ou anaérobies strictes,

chimio-hétérotrophes et capables d'assimiler une grande variété de nutriments et de substrats complexes, notamment les polysaccharides (Barka et al, 2016).

Les actinomycètes, du Grec « Aktinos et mycetes » qui veut dire « Champignon rayonnant » reflétant la forme de leurs colonies caractérisées par des filaments appelés hyphes, qui irradient suivant une croissance centrifuge autour du germe central qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981), sont des bactéries à Gram positif appartenant au groupe des *Actinomycetales* (Mariat et Sebald, 1990). Au départ, les actinomycètes ont été considérés comme des champignons vu la forme de leurs mycéliums fongicoïdes (filaments ramifiés et formation de spores) (Ikeda et al., 2003). Néanmoins, certaines caractéristiques ont permis de les classer parmi les bactéries : leurs cellules procaryotes, la présence du peptidoglycane au niveau de leur paroi ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques (Ludwig et al., 2012). D'autre part, le phylum des actinomycètes se caractérise par leur grand pourcentage en G+C (Kavitha et al., 2010 ; Whitman et al., 2012) jusqu'à 63 à 78% chez le genre *Streptomyces* (Madigan et Martinko, 2005). Dans le manuel de Bergey de 2012, l'ordre des *Actinomycetales* a été scindé en plusieurs ordres. Les actinomycètes sont classés dans le règne des procaryotes, le domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria* et la Sous-Classe des *Actinobacteridae* (Euzéby, 2015). Le phylum des *Actinobacteria* comprend cinq classes, 21 ordres et de nombreuses familles. Les genres sont établis sur la base d'une extrême diversité morphologique. Les actinomycètes sont des bactéries aérobies, mais certaines souches peuvent être facultatives ou anaérobies strictes, chimio-hétérotrophes et capables d'assimiler une grande variété de nutriments et de substrats complexes, notamment les polysaccharides (Barka et al., 2016).

### I-3-Biologie et cycle de vie

Les actinomycètes présentent un cycle de différenciation morphologique et métabolique unique chez les Procaryotes (Seghezzi, 2009). Le cycle biologique de ces bactéries est similaire à celui des moisissures, car sur milieu de culture solide, le développement est initié par la germination d'une unité de la reproduction, qui est la spore (Perry et al., 2004), donnant naissance à un mycélium végétatif (appelé également le mycélium de substrat). Ce dernier est souvent incrusté dans le milieu solide, sous forme d'hyphes ramifiés et multinucléoïdes (Flardh et Buttner, 2009). Ensuite, sur le mycélium végétatif, se développe un mycélium aérien. Les hyphes adoptent une croissance apicale et leur fragmentation aboutit à la formation de septa qui sont des formes uni-génomiques, c'est-à-dire qu'il y a une multitude de copie du génome cellulaire dans chaque septa (Elliot, 2008 ; Claessen et al, 2014). A ce moment, on observe une spiralisation des hyphes aériens (Flårdh, 2003). Les cellules subissent un épaississement de leurs parois, donnant naissance à de nouvelles spores résistantes à la dessiccation. En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium du substrat (Hadj-Husein, 2013) (Figure 1).



**Figure 01 :** Cycle de développement des actinomycètes (exemple du genre *Streptomyces*) sur milieu solide (Jakimowicz et al., 2007).

Le mécanisme de la sporulation est hautement régulé, il est contrôlé par des facteurs endogènes, propres au micro-organisme, et des facteurs externes (environnementaux). Parmi ces derniers, la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, la présence du carbonate de calcium et de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin, favorisent la sporulation (McCormick et Flärdh, 2012).

Chez le genre *Streptomyces* par exemple, qui forme, le genre le plus développé en terme de ramification et longueur du mycélium, la croissance est assurée par l'extension des extrémités des hyphes, contrairement aux bactéries unicellulaires, comme *E. coli* et *Bacillus* où l'élongation cellulaire (augmentation du nombre de cellules) est réalisée par la division cellulaire. Dans des conditions de stress nutritionnel, le mycélium végétatif s'autolyse par un signal intracellulaire appelé Programme de mort cellulaire (*PCD : Programmed Cell Death*). Le PCD est un mécanisme qui active la lyse du mycélium végétatif, donnant une source d'acides aminés et de sucres permettant le développement d'un mycélium aérien (Colombié, 2005). Les sources nutritionnelles qui s'accumulent autour du mycélium végétatif dégradé attirent des micro-organismes compétiteurs. Il est donc évident que la production des antibiotiques, par la bactérie *Streptomyces* est réalisée à ce moment là afin de protéger ce pool de nutriments, des agresseurs (Rigali et al., 2006 ; Rigali et al., 2008).

#### I-4-Distribution dans la nature

Les actinomycètes sont retrouvées dans plusieurs milieux naturels, les sols et les milieux aquatiques dont les eaux marines (ex. *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*

et *Salinispora*) (Macagnan et al., 2006), en symbiose avec les végétaux supérieurs (ex. *Frankia*), pathogènes des plantes ou des animaux (ex. *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia*) et germes commensaux de l'appareil digestif (ex. *Bifidobacterium*) (Barka et al., 2016). Néanmoins, les Actinomycètes prédominent dans les sols (entre 0 et 2 mètres de profondeur), par rapport aux autres écosystèmes, notamment dans les sols alcalins et riches en matières organiques, où ils peuvent vivre à plus de 2 mètres de profondeur (Goodfellow et al., 1983) et représentent entre 10% et 50% des micro-organismes telluriques avec la prédominance du genre *Streptomyces*. Les actinomycètes sont reconnus dans les sols, grâce à leur odeur caractéristique due à la production de Géosmine et de MIB (2-Méthyl-isobornéol) (Zaitlin et Watson, 2006). Les actinomycètes du genre *Frankia* prédominent dans la rhizosphère où ils participent dans la fixation de l'azote au niveau des nodules de nombreuses plantes, il s'agit de l'association actinorhizienne (Prescott et al., 2007). La densité microbienne dépend du type de l'habitat colonisé ainsi que des conditions climatiques. Elle varie généralement de  $10^6$  à  $10^9$  cellules par gramme de sol (Goodfellow et al., 1983). Les actinomycètes sont généralement plus nombreux, dans le sol, que les champignons mais moins nombreux que les autres bactéries.

D'autres facteurs comme la température, le pH et l'humidité du sol, influencent également la distribution des actinomycètes dans la nature. A l'inverse des autres bactéries, la plupart des actinomycètes sont mésophiles, avec des températures de croissance optimales allant de 25 à 30°C. A l'exception de quelques souches thermophiles qui peuvent se développer à des températures élevées de 50 à 60°C. Le développement des formes végétatives d'actinomycètes du sol est favorisé par une forte teneur en humidité, surtout lorsque les spores sont submergées d'eau. Dans les sols arides où la pression d'humidité est basse, la croissance est limitée (Barka et al., 2016). Dans le sol, la croissance maximale a été observée à des pH allant de 6 à 9 avec des optima situés à la neutralité (Macagnan et al., 2006). Les actinomycètes sont également retrouvés dans les milieux aquatiques : Les eaux de mers et les sédiments marins (Ghanem et al., 2000) ; l'eau douce (Kitouni et al., 2005) et les marécages salés (Boughachiche et al., 2005). Les actinomycètes se rencontrent aussi sur les débris des végétaux (Wang et al., 2006).

Les actinomycètes sont également responsables de certaines pathologies de l'homme et de l'animal. C'est le cas des genres : *Nocardia* ; *Corynebacterium*, *Rhodococcus* et *Mycobactérium* (Van De Sande, 2013) ainsi que certains phytopathogènes comme *Streptomyces Scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (Lindholm, 1997).

### I-5-Identification et taxonomie

Les critères d'identification des actinomycètes sont répertoriés dans le manuel de Bergey (ou Bergey's manual of systematic bacteriology, 2012).

L'identification des espèces et des genres appartenant aux actinomycètes passe par l'étude de leur morphologie, leurs caractéristiques biochimiques et physiologiques, leur chimiotaxonomie et leurs caractères moléculaires (Girard et al., 2013). La taxonomie récente des Actinomycètes est basée sur la construction d'un arbre phylogénétique après séquençage

du gène codant pour l'ARNr 16S (Ludwig et al., 2012). La classe des Actinobactéries est divisée en 16 ordres dont l'ordre des Actinomycétales qui est restreint à la famille des Actinomycetaceae (Gao et Gupta, 2012). Le tableau I ci-après résume les critères communément utilisés pour l'identification des actinomycètes.

**Tableau I :** Tableau récapitulatif de l'ensemble des critères d'identification des actinomycètes.

	<b>Critères taxonomiques</b>	<b>Références</b>
<b>Critères morphologiques</b>	<p><b>Macromorphologie :</b>                      Forme, abondance et disposition des hyphes.                      Présence ou absence des mycéliums, végétatif et du substrat.                      Forme et pigmentation des colonies.</p> <p><b>Micromorphologie :</b>                      Forme, nombre, mobilité et localisation des spores.                      Présence de sporanges, de sclérotés et de synnémata.</p>	Schofield et Schaal, 1981
<b>Critères biochimiques et physiologiques (et taxonomie numérique)</b>	<p>Hydrolyses des substrats carbonés et azotés : glucides (glucose, lactose, fructose, mannose,...), acides aminés, voies fermentaires, hydrolyse de l'urée et du nitrate, production d'oxydase, catalase,...etc.</p> <p><b>Taxonomie numérique :</b>                      Attribution d'un chiffre codé (1 ou 0) pour chaque caractère étudié de chaque souche et constitution d'un dendrogramme.</p>	Saker, (2015)
<b>Critères chimiotauxonomiques</b>	<p>Composition du peptidoglycane, des sucres cellulaires, des acides aminés et des phospholipides membranaires.                      Composition en acides mycoliques et en ménaquinones.</p>	Lechevalier et Lechevalier, (1985) ; Larpent et Sanglier, (1989)
<b>Critères moléculaires</b>	<p>Pourcentage en GC.                      Hybridation ADN/ADN.                      Séquençage du gène de l'ARNr 16S.</p>	Ventura (2007) ; Zhi (2009).

## I-5-1-Critères morphologique

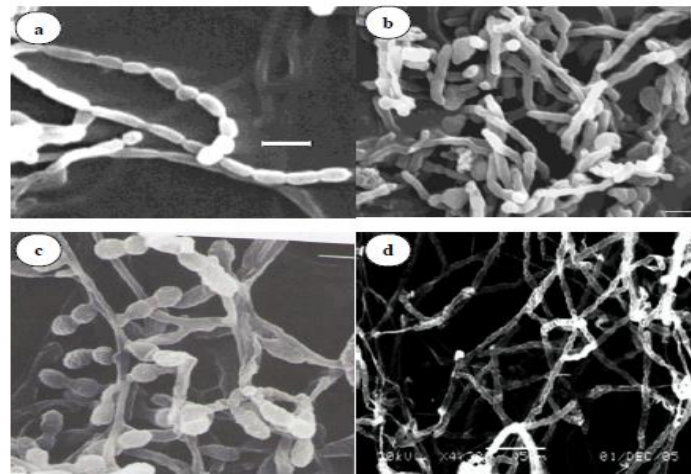
### I-5-1-1-Micromorphologie

Selon Saker (2015) et Barka et al. (2016), la micromorphologie des actinomycètes est étudiée par observation au microscope optique (et parfois électronique) des colonies poussant sur milieux gélosés. Il s'agit de noter :

- la fragmentation ou non du mycélium du substrat (MS) ;
- la présence ou non, sur le mycélium aérien (MA) et/ou le MS, de spores, leur agencement (isolées, par deux ou en chaînes), la forme des chaînes de spores et l'ornementation de la surface des spores ;
- la présence de structures particulières comme les sporanges et les synnématas sur le MA.

La surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) est quant à elle observée au microscope électronique à balayage

La figure 2 montre, à titre d'exemple, la micromorphologie de quelques genres principaux d'actinomycètes.

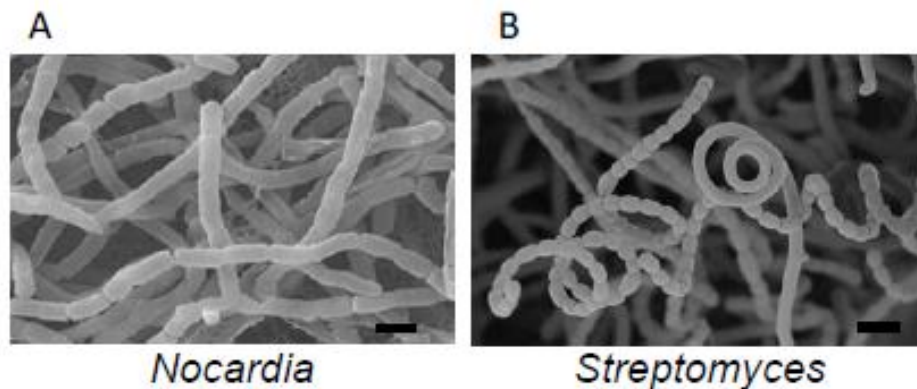


**Figure 02 :** Photos illustrant la micromorphologie de quelques espèces d'actinomycètes observées au microscope électronique à balayage).

a : *Nocardioopsis sinuspersici* HM6T (Hamedi *et al.*, 2010) ; b : *Saccharopolyspora indica* VRC122T (Vaddavalli *et al.*, 2014) ; c : *Saccharomonospora halophila* 8T (Al Zarban *et al.*, 2002) ; d : *Actinopolyspora alba* YIM 90480T (Tang *et al.*, 2011).

Chez les actinomycètes, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  (Eunice, 1983), est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5  $\mu\text{m}$ ) (Gottlieb, 1973). Leur mycélium présente une grande diversité de morphologie. On rencontre des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres au mycélium fugace, qui se fragmente (certaines *Nocardia*) et enfin des espèces au

mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*. Les mycélia fragmentaires et permanents sont illustrés sur la figure 3.



**Figure 03 :** Images de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes (Shaker, 2015).

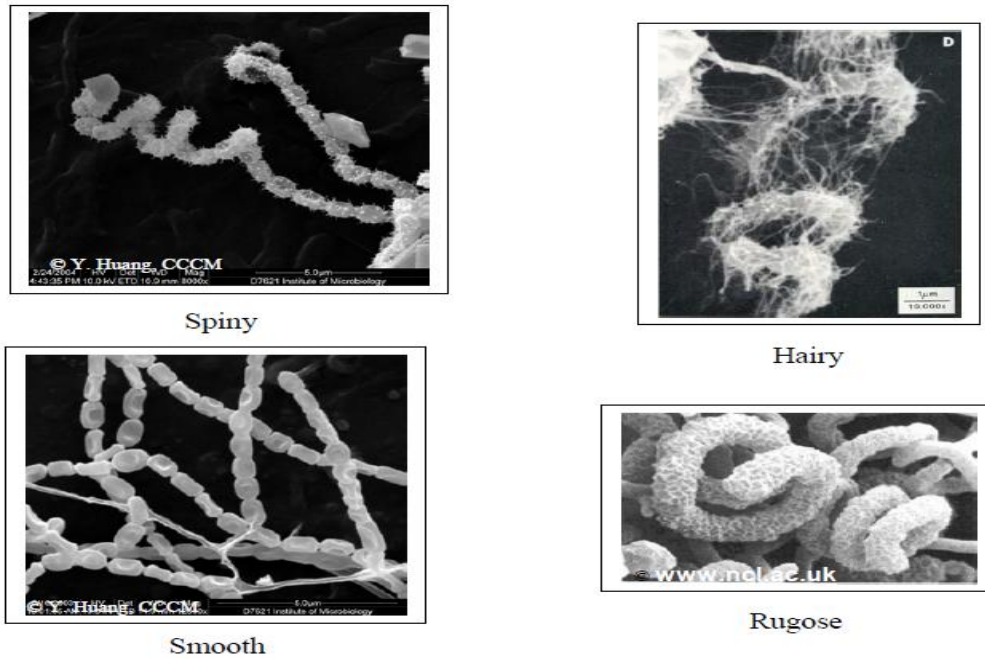
(A) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmente, (B) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation.

Barre d'échelle : 1 µm.

Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif (appelé aussi mycélium de substrat) et/ou en mycélium aérien. On distingue trois cas différents :

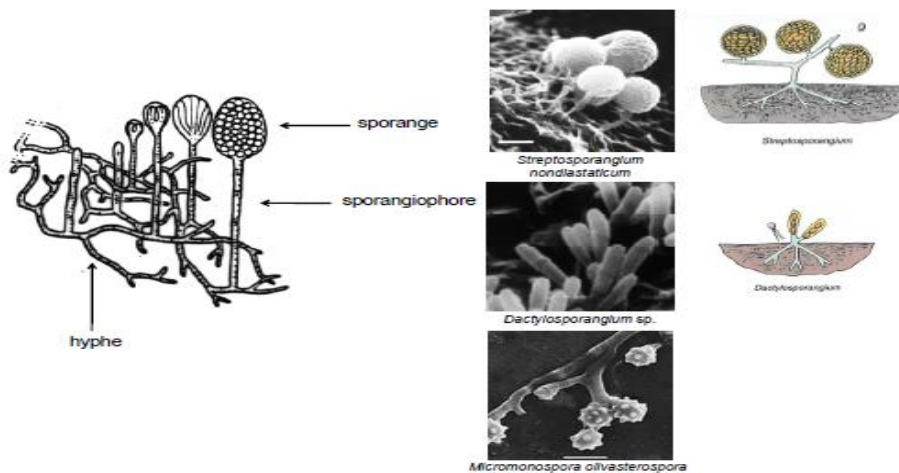
- soit seul le mycélium végétatif est formé (exemple de genre : *Frankia*, *Dactylosporangium*). La croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu. Le mycélium est coénocytique : il renferme un cytoplasme commun multi-nucléoïde, et est donc dépourvu de septum ;
- soit il y a formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien mûri en conidies (exemple : *Streptomyces*). Le mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat ;
- soit, seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que chez le genre *Sporichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachées au milieu solide par des «crampons» (Flärdh et Buttner, 2009 ; Van Dissel, 2014).

Même si la plupart des actinomycètes sont immobiles, certaines formes peuvent produire des spores ayant une mobilité grâce à la présence de flagelles, assurant leur dispersion dans les milieux aquatiques (Flärdh et Buttner, 2009). Les spores d'actinomycètes présentent une grande variété d'arrangements. Elles peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînettes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores de leur part, peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. Elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. On rencontre également une importante diversité au niveau de la surface des spores : lisse (smooth), rugueuse (rugose), épineuse (spiny) ou d'aspect velu (hairy) (Figure 4).

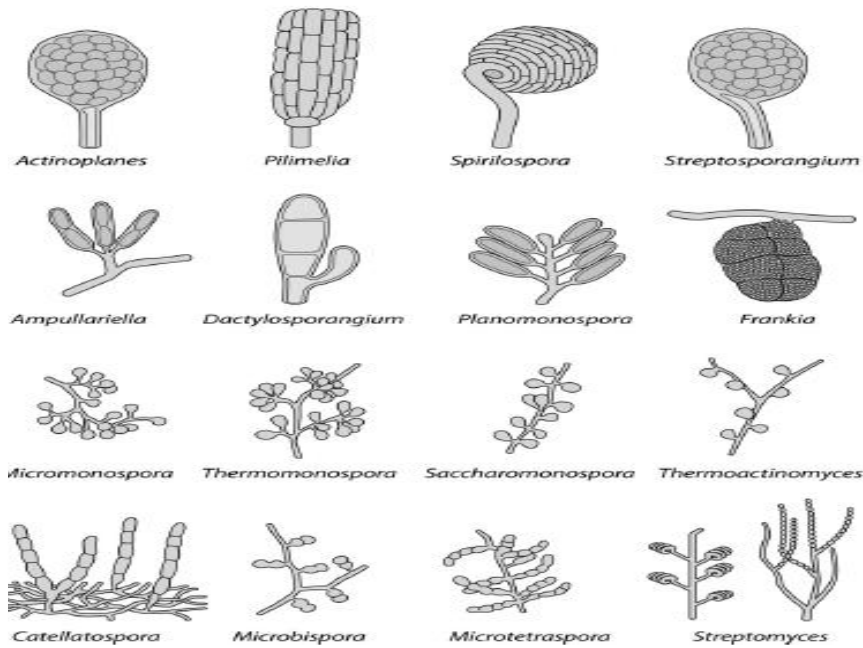


**Figure 04 :** Images de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre *Streptomyces* (Madigan et al., 2003).

D'autre part, les spores peuvent être portées par le mycélium aérien et/ou par le mycélium du substrat. Elles sont portées sur le mycélium du substrat chez *Micromonospora*, *Microbispora* et *Thermoactinomyces*, sur le mycélium aérien chez *Streptomyces* (Barka et al, 2016). Chez certains genres, les spores sont contenues dans un sporangie : compartiment qui se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore (Figure 5). Les sporanges peuvent contenir quelques unes à plusieurs milliers de spores, formant des chaînes enroulées ou parallèles (figure 6).



**Figure 05 :** Représentation schématique et image de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes (Perry et al., 2004).

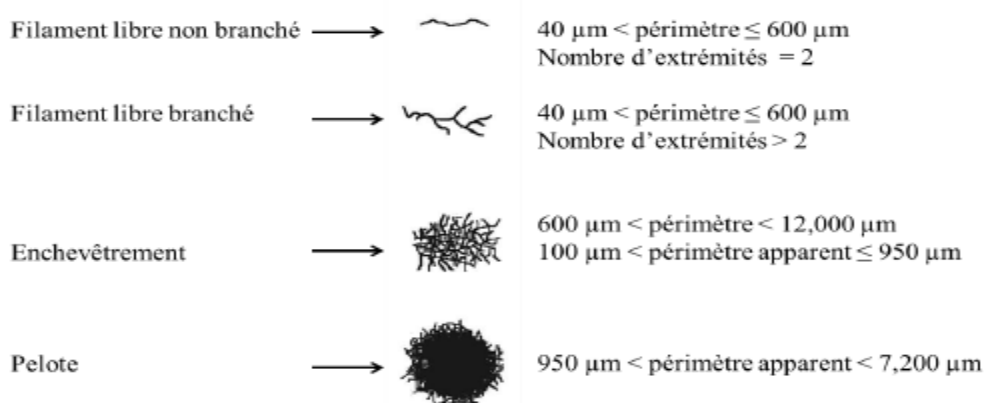


**Figure 06 :** Schéma montrant les différentes formes des chaînes de spores chez les actinomycètes (Goodfellow et al, 2012).

### I-5-1-2-Macromorphologie

Les actinomycètes présentent plusieurs types de morphologie. Les colonies d'actinomycètes formées sur milieu solide résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés, contrairement aux bactéries non filamenteuses dont les colonies sont des amas de cellules. Chez les actinomycètes, le diamètre des colonies est variable de 1 à 10 mm et leur aspect peut être compact, sec, lisse, rugueux à contours lisse ou échancrés. D'autre part, les colonies sont souvent pigmentées : blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc... (Perry et al., 2004).

Dans les cultures de fermentation sur milieu liquide, trois formes se distinguent : des hyphes branchés ou non, du mycélium dispersé et ramifié appelé clump ou des agrégations d'hyphes appelés pelotes (figure 7). En culture liquide, selon l'agitation mécanique, on distingue deux situations : en absence d'agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (Keulen et al., 2003), par contre en présence d'agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores.



**Figure 07 :** Les différents types de macromorphologies des Actinomycètes en culture submergée, avec leurs principales caractéristiques (Pamboukian et al, 2002).

Chez le genre *Streptomyces* à titre d'exemple, il y a d'abord formation des filaments libres, qui se ramifient et s'entremêlent pour former des agrégats. Ces derniers, généralement sphériques, sont composés d'une masse dense d'hyphes enroulés appelées pelotes (Claessen et al, 2003 ; Hadj-Husein, 2013). Puisque les cellules du centre sont privées de nutriment, les agrégats grossissent seulement par la formation de cellules à la surface de la sphère (Wösten et al., 2000 ; Claessen et al., 2006). Les pelotes peuvent se présenter sous forme d'agglomérats sphériques ou ellipsoïdaux. Il existe différentes formes de pelotes : à petit noyau plus ou moins échevelé, ou à gros noyau peu ou pas échevelé (Hadj-Husein, 2013). La structure de la pelote peut varier en fonction de la compacité des hyphes entrelacés. Une forte compacité conduira à la formation de pelotes compactes, souvent caractérisées par une surface lisse alors qu'une compacité légère mènera à des pelotes lâches avec une surface chevelue (Papagianni, 2004). La pelote a tendance à être plus compacte avec l'augmentation de la vitesse d'agitation en fermenteur industriel (Xu et al., 2006).

Enfin, il existe d'autres structures morphologiques plus atypiques qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie. Ainsi les sclérotés trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés. Les Synnémata, appelés également corémies, structure caractéristique du genre *Actinosynnema*, sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Les conidies qui sont des spores asexuées pouvant avoir plusieurs organisations (Belyagoubi, 2014) :

- une seule conidie chez le genre *Micromonospora* ;
- une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
- chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
- longues chaînes de conidies formées d'un nombre de plus de 20 spores par chaîne ;

- conidies rassemblées dans des synnématas (spores mobiles et qui peuvent être libérées).

### I-5-2- Critères chimiotauxonomiques

La chimiotauxonomie est la répartition en groupes de chimiotypes, des organismes vivants, en fonction du degré de similarité de leur contenu cellulaire en composés chimiques (Goodfellow et Minnikin, 1985 ; O'Donnell, 1988).

Les composés chimiques les plus communément utilisés sont les acides aminés et les lipides pariétaux, les sucres cellulaires, les ménaquinones et le type de peptidoglycane (Williams et al., 1989).

#### I-5-2-1-Composition en sucres cellulaires

La diversité de la composition cellulaire en sucres est de sa part une approche ayant permis la classification des actinomycètes en chimiotypes différents. Les chimiotypes existant actuellement, en se basant sur la présence de certains sucres, sous forme de couples de deux sucres sont les suivants :

- Chimiotype A : "arabinose-galactose" (*Nocardia*, *Actinopolyspora*, *Prauserella*, etc.)
- Chimiotype D : "arabinose-xylose" (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, etc.)
- Chimiotype E : "rhamnose-galactose" (*Saccharothrix*, *Lentzea*, etc.)
- Chimiotype B : "madurose ou 3-0-méthyl-galactose" (*Actinomadura*, *Streptosporangium*, etc...)

D'autres types de sucres considérés comme non caractéristiques, peuvent être retrouvés (= type C) (Labeda, 1987). Ce sont en général le ribose, le mannose et le galactose quand il n'est pas couplé à l'arabinose ou au rhamnose).

#### I-5-2-2- Composition en acides aminés pariétaux

L'importance de l'analyse du contenu en aminoacides de la paroi des actinomycètes est due au fait que ces bactéries contiennent du peptidoglycane, comme le reste des bactéries Gram- positif (Vollmer, 2008). Le peptidoglycane est un polymère de chaînes osidiques linéaires constituées de N-Acétyleglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-Acétylemuramique (MurNAc), reliées par des ponts peptidiques composés de 4 acides aminés reliés deux à deux par des liaisons covalentes. La variabilité des types de ces acides aminés ainsi que des liaisons peptidiques engagées, fait de la composition chimique du peptidoglycane, un caractère taxonomique de classification chez les bactéries (Schleifer et Kandler, 1972).

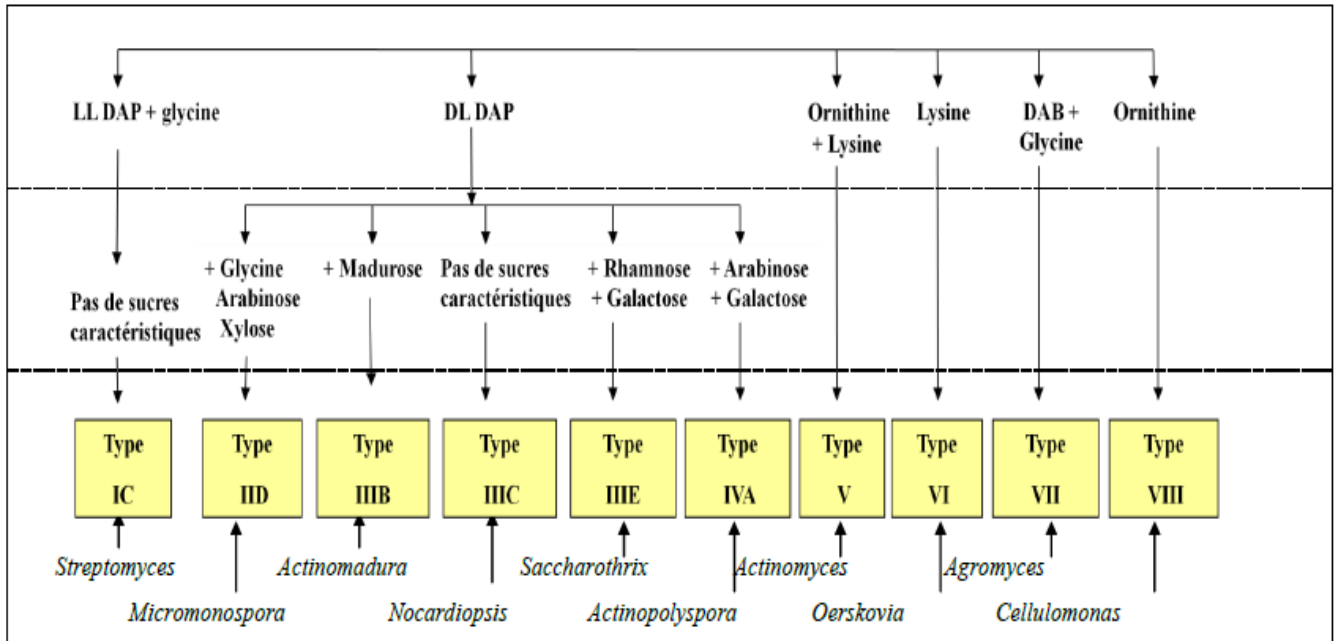
Chez les actinomycètes, on retrouve de la Lysine en troisième position de la chaîne peptidique chez les genres à métabolisme fermentaire (ex. *Actinomyces*), et de l'acide diamino pimélique à la même position chez les genres à métabolisme oxydatif (ex. *Streptomyces*) (Royet et Dziarski, 2007 ; Willey et al., 2010).

Du point de vue taxonomique, on distingue deux types d'acides aminés qui déterminent les chimiotypes des actinomycètes mycéliennes (Lechevalier et Lechevalier, 1970) :

- l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous deux formes, LL ou DL (mésos) selon les genres ;
- la glycine qui peut être présente ou absente. Il s'agit d'un acide aminé qui relie, par des liaisons peptidiques, les différentes sous-unités du peptidoglycane.

Néanmoins, chez les actinomycètes non mycéliens, le DAP est remplacé par la lysine ou bien par l'ornithine ou encore par l'acide diaminobutyrique (DAB).

En se basant sur la composition des cellules des actinomycètes en acides aminés (Becker et al., 1965 ; Yamagushi, 1965) et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970, Labeda et al., 1989 et Stackebrandt et al., 1994), dix chimiotypes ont ainsi été définis (Tableau II).



Note: +: présent, -: absent, Gly: glycine, DAP: acide diaminopimélique, DAB: acide diaminobutyrique.

- I, II, III et IV sont définis par Becker *et al.*, (1965), Yamaguchi (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970), en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique et la présence ou non de glycine.

- A, B, C, D et E sont définis par Lechevalier et Lechevalier (1970), Labeda *et al.* (1989) et Stackebrandt *et al.* (1994), en se basant sur la présence ou non des sucres suscités.

**Figure 08 :** Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

### I-5-2-3- Composition en lipides membranaires et pariétaux

Chez certains actinomycètes, la composition en sucres et en aminoacides cellulaires s'avère insuffisante pour les classer. Pour cela, l'analyse des lipides complète souvent l'identification chimiotaxonomique des actinomycètes (Labeda, 1987).

Quatre types de lipides sont recherchés :

#### I-5-2-3-1-Les phospholipides

Différents types de phospholipides sont rencontrés au niveau de la membrane plasmique des actinomycètes et leur distribution hétérogène permet d'avoir des informations sur les différents groupes chimiques (Yokota *et al.*, 1994 ; Rainey *et al.*, 1995). Le tableau III ci-après illustre les différents chimiotypes d'actinomycètes, selon leur composition membranaire en phospholipides.

**Tableau II :** Classification des actinomycètes selon les types de phospholipides membranaires (Lechevalier et al., 1997).

Types de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemples
PI	-	-	-	V	<i>Actinomadura, Spirillospora.</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces, Pseudonocardia.</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Actinopolyspora, Amycolatopsis, Nocardioopsis.</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Nonomuraea, Prauserella, Saccharopolyspora.</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia.</i>

**PE :** Phosphatidyléthanolamine ; **PC :** phosphatidylcholine ; **PG :** phospholipides contenant de la glucosamine ; **PGI :** phosphatidylglycérol. + : présent ; - : absent ; **V :** variable suivant les espèces et les souches.

### I-5-2-3-2-Les acides gras

La composition cellulaire en acides gras est aussi un bon indicateur taxonomique pour l'identification des actinomycètes (Kroppenstedt, 1985). Les acides gras des cellules bactériennes présentent des chaînes carbonées situées entre 2 et 90 atomes de C, mais seulement ceux situés entre C<sub>10</sub> et C<sub>24</sub> qui présentent un intérêt taxonomique (Suzuki et al., 1993).

**Tableau III:** Classification des actinomycètes selon les types d'acides gras cellulaires (Kroppenstedt, 1985).

Type de profil	Acides gras à chaînes ramifiées							Cyclopropane
	Saturé	Insaturé	Iso 14/16/18	Iso 15/17	Antéiso 15/17	10-Méthyl		
						17	18	
1a	+++	+++	-	-	-	-	-	-
1b	+++	+++	-	-	-	-	+	-
1c	+++	+++	-	-	-	-	-	++
2a	++	+	+++	+	(+)	-	-	-
2b	(+)	+	++	+++	+	-	-	-
2c	+	(V)	+++	+	+++	-	-	-
2d	+	+	+++	+++	+++	-	-	-
3a	+++	++	+++	(+)	(+)	(+)	+++	-
3b	+	+	+++	+++	++	++	(+)	-
3c	+	+	++	+	+	+++	(+)	-
3d	+	+	+++	++	+++	(+)	+++	-

+++ : Très présent ; ++ : moyennement présent ; + : faiblement présent ; (+) : présent avec un taux inférieur à 5% ; - : absent ; (V) : variable.

### I-5-2-3-3-Les ménaquinones (MK)

Connus également sous le nom de vitamine K2, les ménaquinones sont des lipides membranaires participant dans le mécanisme de transfert d'électrons au niveau des chaînes respiratoires bactériennes. Ils sont constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne aliphatiques renfermant des unités isoprènes. Ils sont classés en fonction du nombre de ces

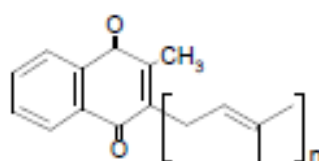
unités et le degré de leur hydrogénation (Collins et al., 1984). Les études génétiques et biochimiques ont démontré l'implication de 6 gènes dans la biosynthèse de ces molécules : *menA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E* et *-F*. Les ménaquinones ont un potentiel taxonomique important chez les bactéries, notamment les actinomycètes.

Le tableau ci-après présente les principaux dérivés ménaquinones retrouvés chez les actinomycètes.

**Tableau IV :** Classification des actinomycètes en fonction de leur contenu en ménaquinones pariétaux (Kroppensdedt, 1985).

Type	Description	Principaux ménaquinones	Genres représentatifs
1a	Absence d'unités isoprènes hydrogénées.	MK-7	<i>Brachybacterium</i>
1b		MK-9	<i>Gordona</i>
2a	Présence d'un seul type de ménaquinones, souvent dihydrogénées ou tétrahydrogénées avec 8 ou 9 unités d'isoprènes.	MK-8(H2)	<i>Rhodococcus</i>
2b		MK-8(H4)	<i>Nocardia</i>
2c		MK-9(H2)	<i>Mycobacterium</i>
2d		MK-9(H4)	<i>Geodermatophilus</i>
3a	Présence de ménaquinones tétrahydrogénées.	MK-8(H4), MK-9(H4)	<i>Saccharomonospora</i>
3b		MK-9(H4), MK-10(H4)	<i>Actinoplanes</i>
4a	Présence de ménaquinones ayant la même longueur mais avec des degrés de saturation différents.	MK-9(H2), MK-9(H4), MK-9(H6)	<i>Microtetraspora</i>
4b		MK-9(H4), MK-9(H6), MK-9(H8)	<i>Streptomyces</i>
4c		MK-10(H4), MK-10(H6)	<i>Nocardiopsis</i>

La figure 8 ci-après représente la structure générale des ménaquinones.



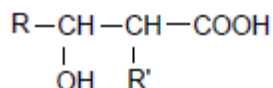
**Figure 09 :** Structure générale des Ménaquinones.

La chaîne isoprène est représentée entre crochets.

### I-5-2-3-4-Les acides mycoliques

Se sont des lipides complexes, insaturés et ramifiés, à longue chaîne de carbone (de 20 à 90 atomes de carbone), retrouvés dans la paroi des actinomycètes et permettant leur classification, vu leur diversité structurale (Goodfellow et al., 2012). Les acides mycoliques sont retrouvés uniquement chez les actinomycètes du chimiotype IVA d'où leur intérêt dans

l'identification des genres qui lui appartiennent. A titre d'exemple : le genre *Nocardia* possède des acides mycoliques tandis qu'*Amycolatopsis* et *Pseudonocardia* n'en possèdent pas. De plus, une diversité de la longueur des chaînes carbonées de l'acide mycolique a été retrouvée chez les différents genres : *Nocardia* (46-64 atomes de carbone) et *Williamsia* (50-56 atomes de carbone). La figure 9 illustre la structure générale des acides mycoliques.



**Figure 10 :** Structure générale des acides mycoliques.

R et R' sont des chaînes de CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>.

### I-5-3- Critères physiologiques et taxonomie numérique

Les principaux caractères physiologiques utilisés en taxonomie des actinomycètes sont : les optima du pH et de température de croissance, la sensibilité au chlorure de sodium (pouvoir de résistance au sel) et aux antibiotiques ainsi qu'à certains agents chimiques (Omura, 1992) et au stress oxydatif (Van Keulen et al., 2007). D'autre part, l'utilisation des différentes sources carbonées et azotées ainsi que la dégradation de certains polymères tels que l'amidon, la caséine et la gélatine; la production de mélanine et des pigments diffusibles sont d'autres caractères à considérer dans l'étude physiologique et biochimique des actinomycètes (Haj-Husein, 2013).

La taxonomie numérique a débuté dans les années 70, elle combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques, biochimiques et morphologiques, permettant de différencier les espèces de chaque genre entre elles (Smaoui, 2010). Il s'agit de regrouper des unités taxonomiques en taxons à l'aide de méthodes numériques en se basant sur leurs caractères, et ce par la détermination de la présence ou l'absence des caractères choisis pour identifier le (ou les) micro-organismes étudié (s) (Prescott et al., 2003). Plus le nombre des caractères physiologiques et biochimiques sélectionnés pour l'étude est important et plus l'identification est fiable. La présence d'un caractère est codée par 1 et son absence par 0. Ainsi, en comparaison à des souches de référence, les degrés de similitude sont à la fin, représentés sous la forme de dendrogramme et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables (Kitouni, 2007).

### I-5-4- Critères moléculaires

L'identification morphologique et chimiotaxonomique des actinomycètes sont remplacées par l'identification moléculaire, rapide et pointue grâce au séquençage du génome bactérien. De ce fait, plusieurs groupes d'actinomycètes improprement classés, sont aujourd'hui reclassés, grâce à l'étude moléculaire (Zhi et Stackebrandt, 2009). De nouvelles espèces ont été découvertes par l'utilisation de l'identification moléculaire, notamment par les techniques du séquençage de l'ADNr 16S et de l'hybridation ADN/ADN (Anderson et Wellington, 2001).

Les rangs supérieurs de la classe des Actinobactéries ont été proposés et décrits en 1997. À chaque rang, les taxons ont été délimités les uns des autres uniquement sur la base de la séquence du gène de l'ARNr 16S.

Ainsi les séquences présentant des homologies supérieures à 97% sont considérées de la même espèce. D'autre part, la construction de dendrogrammes est réalisée par les algorithmes des programmes DNAPARS et PHYLIP DNAML (Felsenstein, 2005) ainsi que de MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013).

L'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S a été corrélée aux pourcentages de réassociations ADN/ADN. Car des chercheurs ont démontré que des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S présentant des similarités inférieures à 97% ne correspondaient jamais à des pourcentages de réassociation ADN/ADN supérieurs à 70% (Kim *et al.* (2014). De plus des séquences du même gène, partageant moins de 97% de similarité correspondent à des espèces différentes.

Cependant, plusieurs travaux récents ont émis des propositions pour augmenter le seuil de similarité des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S : Meier-Kolthoff *et al.* (2013) proposent 98,2% puis Kim et al., (2014) indiquent, à travers leurs travaux publiés dans la revue *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* et basés sur une analyse statistique pointue, qu'il est admis que des séquences du gène ADNr 16S sont considérées identiques, si elles présentent un taux de similarité dépassant 98,65%. Ce qui veut dire que les séquences qui partagent moins de 98,65% de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S correspondent à des espèces différentes.

### **I-6-Intérêt biotechnologique**

Les actinomycètes sont des micro-organismes à grand intérêt biotechnologique, par leur aptitude à produire une variété de métabolites primaires et secondaires, utilisés actuellement dans divers domaines : médecine, pharmacie, industrie agroalimentaire, environnement et agriculture (Barka et al., 2016). Les actinomycètes produisent, approximativement, les deux tiers des antibiotiques connus dont la majorité est produite par le genre *Streptomyces* (Ilic et al., 2007). De ce fait, ces bactéries présentent un intérêt dans la lutte contre les germes pathogènes multi-résistants (Bennett, 1998 ; Ilic et al., 2007).

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés à différentes souches productrices d'antibiotiques, ces dernières décennies, ainsi, les premiers antibiotiques découverts chez les actinomycètes furent : l'actinomycine, produit par *Streptomyces antibioticus* en 1940 (Waksman et Woodruff, 1940) et Streptomycine produite par *Streptomyces griseus* en 1944 (Schatz et Waksman, 1944). D'autres types d'antibiotiques utilisés actuellement en clinique, sont produits par les actinomycètes, il s'agit des aminoglycosides (neomycine, kanamycine, streptomycine (Vakulenko et Mobashery, 2003 ; Busscher et al., 2005), ainsi que des agents antitumoraux comme la landomycine et la moromycin (Kharel et al., 2012), ansamycine (rifamycine, geldanamycine) (Kang et al., 2012), des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase (acide clavulanique (Saudagar et al., 2008), chloramphénicol (Vining et Stuttard, 1994),

glycopeptides (vancomycine, teichoplanine) (Van Bambeke, 2006 ; Butler et al., 2014), lipopeptides (daptomycine) (Baltz, 2010), lantibiotiques (mersacidine, actagardine) (Willey et al., 2007).

Il est à signaler, qu'après la publication du séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor* (Bentley et al., 2002), il s'est avéré qu'il s'agit bien d'une bactérie à production potentielle en terme de substances bioactives, où plus de 20 clusters génétiques responsables de la production de métabolites secondaires ont été identifiés (Challis et Hopwood, 2003). D'autre part, selon les résultats des études d'antagonisme microbien et de séquençage génétique, il apparaît que les bactéries du genre *Streptomyces* sont de parfaits candidats pour la production de nouvelles molécules d'antibiotiques (Baltz, 2008 ; Gross, 2009 ; Zerikly et Challis, 2009 ; Zhu et al., 2014).

En plus des antibiotiques, les actinomycètes sont des germes producteurs d'autres métabolites secondaires, comme des herbicides (Tindall et al., 2006), antifongiques, anthelminthiques et antitumoraux (Behal, 2000). Parmi ces substances, on distingue : les Macrotétrolidés, actifs à l'égard des insectes (Jizba et al., 1991) et des helminthes (Nippon et al., 1981) et ayant une action immunosuppressive (Shichi et al., 1989). Il s'agit d'une classe de métabolites secondaires produits par le genre *Streptomyces*. Entre autres, la tétranactine, une molécule cyclique, est la plus active des macrotétrolidés et est largement utilisée en agriculture pour la protection des fruits, des insectes ravageurs. Des agents antiviraux, comme 9-D-Arabinofuranosyladénine produite par *Streptomyces antibioticus* (Farmer et Suhadolnik, 1972), des agents antitumoraux, comme les Anthraquinones produits par *Micromonospora* spp (Igarashi, 2007) ; des agents immunostimulants, comme la Rubratine produite par *Nocardia rubra* (De Reijke et al., 1997) ; des agents immunosuppresseurs, comme la Brasilicardine produite par *Nocardia brasiliensis*.

En plus de cette large gamme de métabolites secondaires, qui sont des substances non essentielles pour le développement et la croissance des actinomycètes, ces derniers sont une source potentielle de métabolites primaires, très demandés et actuellement appliqués en biotechnologie, il s'agit notamment des enzymes. Parmi les enzymes produites par les actinomycètes, celles appliquées dans le domaine industriel, en l'occurrence, des cellulases et  $\alpha$ -amylases (Liu et al., 2010) produites par *Saccharomonospora. halophila* (Al-Zarban et al., 2002), *Saccharomonospora. saliphila* (Syed et al., 2008), *Saccharomonospora. paurometabolica* (Li et al., 2003) et *Saccharomonospora xinjiangensis* (Jin et al., 1998), la lignine peroxydase, les laccases et la tyrosinase, employées dans le domaine des textiles (Heumann et al., 2006), l'estérase et l'amidase produites par *Nocardia sp* et présentant un intérêt dans l'augmentation du caractère hydrophile de certains polymères comme le polyéthylène téréphtalates (PETE) et les fibres de polyamides (Prakash et al., 2013). Enfin les enzymes d'intérêt thérapeutique comme la L-Asparaginase produite par *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29 (Meena et al., 2015) et la L-Glutaminase produite par *Streptomyces olivochromogenes* (Balagurunatha et al., 2010) utilisées comme agents antitumoraux, la thrombinase produite par *Streptomyces sp* utilisée dans le traitement et la prévention de l'infarctus du myocarde (Jayaprakashvel, 2012).

## II-La L-asparaginase

### II-1-Historique et définition

La L-asparaginase est la L-asparagine aminohydrolase EC 3.5.1.1, enzyme appartenant au groupe des amidases (Kumar et Verma, 2012), capable d'hydrolyser la L-asparagine en acide aspartique et ammoniacque (Borek et Jaskólski, 2001). Il s'agit d'une enzyme ayant des propriétés antinéoplasiques, utilisée en chimiothérapie pour le traitement des désordres lymphoprolifératifs, notamment la leucémie lymphoïde aigue et ce depuis 1977 (Narta et al., 2007). En effet, elle a été identifiée pour la première fois en 1922, par Clementi qui avait remarqué une forte activité L-asparaginase dans le sérum de porc. C'est en 1953 que Kidd a décrit la régression de la prolifération des cellules tumorales lymphocytaires transplantées, chez la souris et le rat, suite à l'administration du sérum de porc, alors que la même activité était absente chez les témoins auxquels on a administré du sérum de lapin. Ensuite en 1956, Neuman et McKoy avaient élargi cette théorie en mettant en évidence l'arrêt de la prolifération des cellules du carcinome *Walker*, dans un milieu pauvre en L-Asparagine. C'est grâce à Broome (1961), qu'il a été enfin prouvé, que l'activité antiproliférative du sérum de porc est due à l'action de la L-asparaginase. En 1966, Yellin et Wriston sont arrivés à purifier les deux isoformes de L-asparaginase retrouvés dans le sérum du porc, où un seul isoforme était responsable de l'action antinéoplasique.

En effet, vue la difficulté expérimentale de purifier la L-asparaginase du sérum de porc, d'autres sources ont été exploitées, notamment l'étude de la L-asparaginase d'origine microbienne. C'est dans ce contexte que Campbell et Mashburn (1969) ont purifié pour la première fois, la L-asparaginase produite par *E. Coli* et ont mis en évidence son activité antiproliférative. D'autre part, Oettgen et al. (1967) ont été les premiers à démontrer l'activité anti-leucémie humaine de la L-asparaginase. Actuellement, beaucoup d'importance est attribuée à l'enzyme microbienne où plusieurs micro-organismes se sont avérés producteurs de la L-asparaginase, à savoir des bactéries (Avramis et al., 2006 ; Pieters et al., 2008) dont des bactéries filamenteuses comme les actinomycètes et les champignons (Narta et al., 2007). Cela est dû notamment, à la facilité d'obtention (purification) de l'enzyme microbienne et son rendement élevé dans les milieux de culture. La L-asparaginase est considérée comme un puissant agent inducteur de la mort des cellules transformées, dans plusieurs types de cancers. Cependant la principale limite de son utilisation est sa dose thérapeutique qui provoque une hypersensibilité chez 3 à 78% des patients. C'est d'ailleurs, le problème posé dans l'utilisation des protéines en thérapie, notamment celles administrées par voie parentérale, comme c'est le cas pour la L-asparaginase (Yang et al., 2018). Pour cela, c'est les molécules de L-asparaginase produites par *E. Coli*, *Erwinia Carotovora* et *Erwinia Chrysanthemi* qui sont utilisées actuellement en chimiothérapie anticancéreuse, vu leur toxicité moins importante sur l'organisme humain (Duval et al., 2002).

Auparavant, 3 formes commerciales de L-asparaginase existaient : Deux sous formes natives produites par *E. Coli* et fabriquées par le laboratoire pharmaceutique *Merck* (*E. coli* asparaginase: *Kidrolase*, EUSA Pharma, Oxford, UK; *Elspar*, Ovation Pharmaceuticals,

Deerfield, Illinois; *Crasnitin*, Bayer AG, Leverkusen, Germany; *Leunase*, Sanofi-Aventis, Paris, France; *Asparaginase Medac*, Kyowa Hakko, Tokyo, Japan) (Pieters et al., 2010) et par *E. Carotovora* disponible sous le nom *Erwinia l-asparaginase* fabriquée aux USA par *Odgen Bioservices Pharmaceutical Repository* et vendu au Canada et en Europe sous le nom *Erwiniase* (Avramis et al., 2006). Les différentes formes natives de L-asparaginase produites par *E. Coli* existent en Europe, notamment la *L-Asparaginase Medac* et la *Crastinine* ayant différentes propriétés pharmacocinétiques (Boos et al., 1996). Cela permet de remplacer une forme par une autre vue la différence de réaction d'hypersensibilité des patients vis-à-vis des deux molécules. La troisième forme de L-asparaginase est la PEG-L-asparaginase, modifiée chimiquement, et commercialisée sous le nom de *Pegasparaginase* (ou *Pegasparagase*). Cette forme est le résultat du greffage d'un groupement Polyéthylène glycol (PEG) sur la forme native de L-asparaginase produite par *E. Coli*. La PEG-L-asparaginase est également fabriquée par Rhone Poulenc Rorer sous le nom *Oncaspar* et approuvée par la *Food and drug Administration* (FDA), comme médicament utilisé dans les protocoles de chimiothérapie chez les patients atteints de leucémie lymphoblastique aigue (Acute Lymphoblastique Leukemia : ALL) et présentant une hypersensibilité aux formes natives de L-asparaginase (Oncospar, 2006). Aujourd'hui, une quatrième forme de L-asparaginase est disponible. Il s'agit de la L-asparaginase recombinante d'*E. Coli* ayant une séquence en acides aminés identique à celle de la L-asparaginase *Medac* qui a été choisie sur la base de son efficacité et sa toxicité moins importante (Pieters et al., 2008).

## II-2-Structure et propriétés

### II-2-1-La forme native

Selon (Asselin et Rizzari, 2015) la forme native de la L-asparaginase possède une taille de 149 à 173 Kda. Différents isoformes de L-asparaginase ont été retrouvés chez différentes souches d'*E. coli* (Aghaiypour et al., 2001). La L-asparaginase est souvent une protéine tétramérique composée de 4 sous unités contenant chacune un site actif (Hellman et al., 1983), sauf que sous l'effet de la lyophilisation et de la variation du pH, la molécule peut passer à une forme monomérique (Kamble et al., 2012). D'autre part, dans leurs travaux, K'orholz et al. (1989) avaient suggéré que les PM des sous unités sont de 32KDa pour la L-asparaginase d'*E. coli* et de 40KDa pour celle produite par *Erwinia*. D'autre part, des structures hexamériques, dimériques et trimériques de L-asparaginase ont été mises en évidence à partir de différentes sources, notamment celles d'origine bactérienne (Ramya et al., 2011). Les molécules de L-asparaginase produites par *E. coli* et *Erwinia carotovora* possèdent des structures tridimensionnelles proches (Lubkowski et al., 2002). L'enzyme d'*Erwinia* est représentée par deux tétramères *ABCD* et *EFGH* composés de monomères identiques.

Chaque monomère contient 327 acides aminés liés sous formes de 14 hélices  $\alpha$  et 08 feuilletts  $\beta$  (Kozak et al., 2000). De plus le domaine N-terminal des monomères est plus grand que le C-terminal (Aghaiypour et al., 2001). Le site actif de l'enzyme est quant à lui, positionné entre les monomères *A* et *C*; *B* et *D* (Sanchez et al., 2003). Le site actif est composé des acides aminés : *Thr15*, *Tyr29*, *Ser62*, *Glu63*, *Thr95*, *Asp 96*, *Ala120* et *Lys168*,

et se sont les acides aminés *Thr15* et *Thr95* qui sont responsables de l'activité catalytique de l'enzyme (Asselin et al., 1999). L'activité spécifique de la L-asparaginase purifiée produite par *E. Coli* est comprise entre 300 et 400  $\mu\text{mole}$  de substrat transformé par minute par milligramme de protéines. Les pH isoélectriques sont de 4,6 à 5,5 pour l'enzyme d'*E. Coli* et au voisinage de 8,7 pour celle d'*Erwinia* (Swain et al., 1993). Il est à noter qu'il existe deux isoformes de L-asparaginase *I* et *II* présentant des activités enzymatiques à l'égard de la L-asparagine et la L-glutamine (Batoool et al., 2016). Néanmoins, c'est l'isoforme *II* qui est caractérisé par une forte spécificité vis-à-vis de la L-asparagine et est la molécule utilisée en chimiothérapie pour lutter contre les leucémies lymphoïdes aigues (Kotzia et al., 2007).

### II-2-2-L'enzyme modifiée et/ou conjuguée

L'action anaphylactique observée chez 25% des patients suite à leur hypersensibilité exprimée vis-à-vis de la forme native de la L-asparaginase et la demi-vie réduite de cette dernière dans l'organisme, ont motivé le recours à la synthèse chimique pour la fabrication de la PEG-l-asparaginase (Shrivastava et al., 2016). Cette modification chimique a donné naissance à une nouvelle molécule avec un pouvoir immunogène moins élevé et une demi-vie assez importante (Fu et al., 2007), ce qui augmente l'intensité d'action de l'enzyme dans l'organisme (Kwon et al., 2009). Cette dernière propriété, a permis selon Narta et al. (2007) de réduire la fréquence d'injection du médicament. Selon le même auteur, plusieurs types de modifications chimiques ont été réalisés sur la L-asparaginase, comme le couplage avec le Dextran ; avec le DL-Alanyl-peptide ; avec l'albumine sérique humaine et un procédé d'acylation. Ces études avaient l'objectif de réduire l'exposition de l'épitope à l'origine des réactions immunologiques et d'augmenter en même temps le pouvoir antinéoplasique de l'enzyme. Ceci était possible uniquement par conjugaison à un groupement PEG. Le procédé est basé sur la formation de liaisons chimiques de type amine ou amide entre le groupement PEG et la protéine enzymatique (Han et al., 2016). D'ailleurs plusieurs molécules de L-asparaginase conjuguées au PEG ont été rapportées, comme PEG<sub>1000</sub> BSAO conjuguée (Agostinelli et al., 2015), la L-asparaginase d'*E. Coli* conjuguée au PEG<sub>2000</sub> (Shrivastava et al., 2016), la L-asparaginase ARG humaine conjuguée au PEG<sub>5000</sub> (Cheng et al., 2007). Cependant c'est l'enzyme conjuguée au PEG<sub>2000</sub> qui est la plus utilisée pour traiter le cancer (Ott et al., 2013). La PEG-l-asparaginase possède des propriétés différentes par rapport à l'enzyme native, car elle a un haut PM mais une faible affinité aux anticorps de l'organisme. L'affinité aux anticorps diminue si l'enzyme est soumise à des cycles de congélation – décongélation répétés (Körholz et al., 1989). Les études cliniques ont confirmé l'importante activité anticancéreuse de la L-asparaginase Pégylée ainsi que son intérêt dans la diminution de l'hypersensibilité observée avec la molécule native (Ulu et al., 2018). Parmi les procédés de modification de la L-asparaginase, un dérivé de l'enzyme, encapsulé dans des liposomes, la palmitoyl-l-asparaginase a été étudié chez l'animale. Cette forme a une demi-vie dix fois supérieure à la forme native (Ashrafi et al., 2013).

D'autres formes conjuguées de L-asparaginase ont été fabriquées, il s'agit de l'enzyme encapsulée dans des globules rouges (Kwon et al., 2009) ou dans des nanoparticules, à savoir des nanoparticules poreuses ou nanoparticules magnétiques de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Ortac et al., 2014) ; des

nanoparticules de carbone (Muthukumar et al., 2014) ; des nanoparticules à base de tri-polyphosphate de chitosane (Bahreini et al., 2014) ; des nanoparticules à base d'oxyde de Zinc (Baskar et al., 2015) et l'enzyme conjuguée à l'inuline oxydé (Tabandeh et al., 2009). Les formes conjuguées et encapsulées de la L-asparaginase, en comparaison avec la forme native, possèdent les avantages suivants :

- Prolongement de la durée de vie *in vitro* et la demi-vie *in vivo* en augmentant le poids moléculaire avec la polymérisation (Angiolillo et al., 2014) ;
- augmentation de la stabilité vis-à-vis du pH, de la thermostabilité ainsi que la résistance à l'action des enzymes protéolytiques (Tabandeh et al., 2009 ; Ashrafi et al., 2013) ;
- amélioration du ciblage moléculaire pour une libération efficace des enzymes (Han et al., 2016) ;
- réduction de la cytotoxicité et de l'immunogénicité (Yeh et al., 2016).

Néanmoins, les procédés de préparation des formes Pégylées et encapsulées de la L-asparaginase sont souvent à l'origine de la diminution de l'activité enzymatique totale (Gil et al., 2017), où il a été observé la diminution de l'activité L-asparaginase de 60% lors de l'encapsulation dans des globules rouges (Kwon et al., 2009). D'autre part, des anticorps spécifiques du *PEG* sont produits suite à l'administration de la L-asparaginase Pégylée, et leur liaison au *PEG* a induit des changements histologiques caractérisés par une vacuolisation cellulaire dans certains tissus (Ivens et al., 2015).

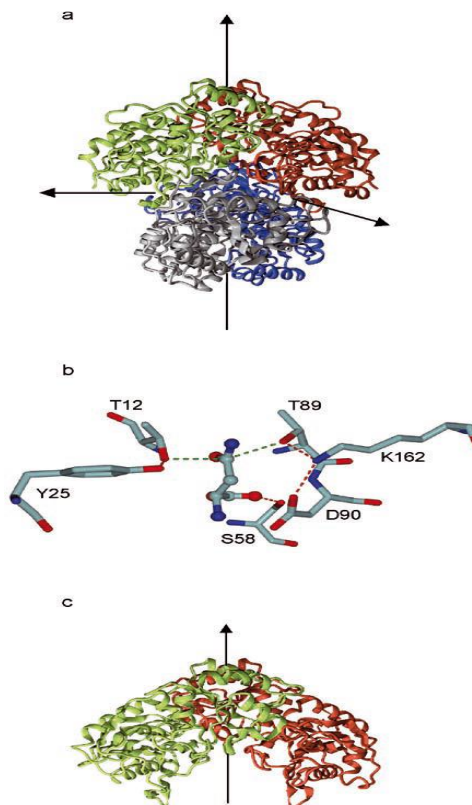
### II-3-Classification

Les enzymes L-asparaginase sont classées selon Michalska et Jaskolski, (2006) en L-asparaginase de type bactérien et L-asparaginase de type végétal. Les L-asparaginases de type bactérien sont également divisées en sous-types *I* et *II*, définis par leur localisation intra / extra-cellulaire, leur affinité pour le substrat et leur forme oligomérique.

Les L-asparaginases de type végétal se distinguent des enzymes bactériennes par leur évolution et leur structure. Elles fonctionnent comme des Nt-hydrolases dépendantes ou indépendantes du potassium et ayant une structure formée par des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$  organisés en 2 oligomères. Elles sont similaires aux aspartyl glucosaminidases, enzymes qui hydrolysent la L-asparagine glycosylé issue de la protéolyse des glycoprotéines ou du recyclage des protéines défectueuses (Michalska et Jaskolski, 2006).

L'enzyme de type bactérien possède un site actif désordonné qui s'organise correctement sur la liaison du substrat. La structure de la L-asparaginase bactérienne *EcAII* a révélé une protéine tétramère, composée de quatre sous-unités identiques de 326 résidus d'acides aminés, réparties en deux dimères intimes chacune (Figure 10).

Dans chacun des quatre sites actifs, une molécule d'acide aspartique liée est apparue, définissant l'interaction Enzyme – Substrat. Bien que l'intime dimère soit nécessaire pour la formation du site actif, les acides aminés intervenant dans les interactions avec le substrat sont principalement formés dans une sous-unité et impliquent deux résidus Thréonine (*Thr12* et *Thr89*) posés des deux côtés de la chaîne de la molécule de ligand (Figure 10). Des débats scientifiques ont été émis depuis longtemps sur lequel des deux résidus *Thr* est nécessaire pour fournir le groupement nucléophile –OH pour attaquer l'atome du C de la fonction amide du substrat. Au final, il a été admis que c'est la *Thr12* vue l'observation d'un produit *Thr12-acyl* formé lors de l'incubation de la l-asparagine avec un mutant de *EcAII* T89V (Palm et al., 1996).

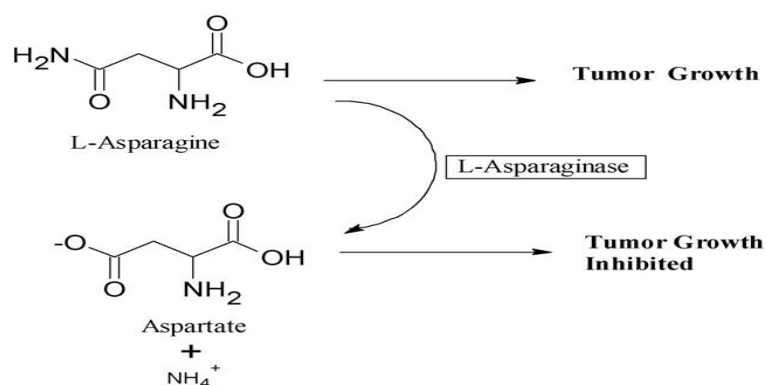


**Figure 11 :** Caractéristiques structurales de la L-Asparaginase.

(a) La structure quaternaire de l'enzyme périplasmique d'*E. Coli EcAII*. Le vert et le rouge (ou gris et bleu) forment les dimères intimes. Les flèches correspondent aux axes doubles qui définissent la symétrie 222 de cet homotétramère. (b) Le site actif de *EcAII* avec une molécule de substrat en l-Asn (bille et bâtonnet) modélisée selon le complexe *EcAII* / l-Asparaginase (Swain et al., 1993). Les lignes pointillées rouges représentent les liaisons hydrogène tandis que les lignes vertes symbolisent une ligne d'attaque potentielle du résidu *Thr* du site actif, sur l'atome de C de l'amide du substrat. (c) La structure quaternaire de la l-asparaginase bactérienne de type I de *Pyrococcus horikoshii*, similaire à l'enzyme cytosolique d'*E. coli EcAI*. La protéine est un homodimère, identique à l'homodimère intime de *EcAII* représenté en (a).

## II-4-Mode d'action antinéoplasique et pharmacologie de la L-asparaginase

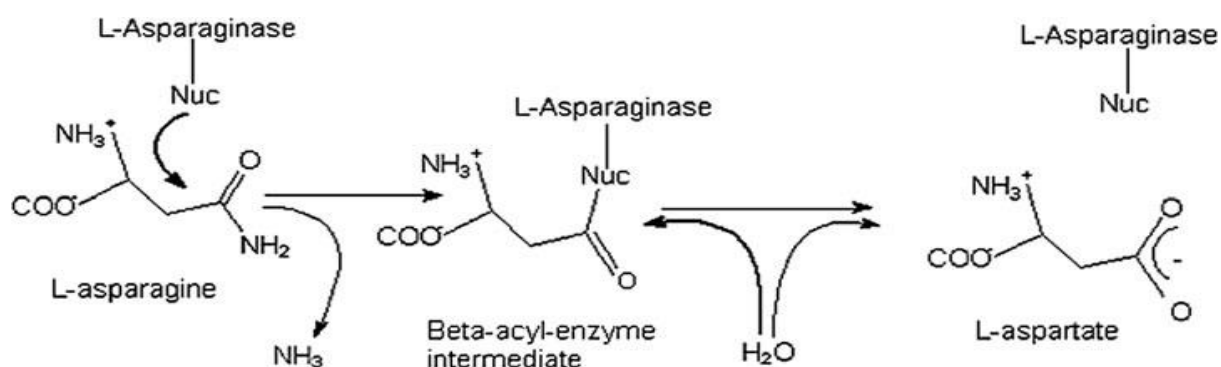
Les cellules tumorales, notamment les cellules lymphatiques transformées requièrent des taux élevés de L-Asparagine, et parfois même elles absorbent des quantités importantes de cet acide aminé à partir du plasma sanguin, pour assurer leur grande croissance et prolifération (Savitri et al., 2003). La L-asparaginase exploite justement cette propriété pour stopper la prolifération des cellules tumorales, en les privant de L-Asparagine du milieu plasmatique, nécessaire à la biosynthèse de leurs protéines (Pokrovsky et al., 2017) (Figure 11). La L-asparaginase engage une attaque nucléophile sur la fonction amide de la L-asparagine formant un intermédiaire  $\beta$ -Acyl-enzyme suite à la libération de la fonction amine, pour libérer ensuite le produit de la réaction qui est l'acide aspartique (Figure 12).



**Figure 12 :** Mode d'action schématisé de la L-asparaginase (Kotzia et al., 2007).

Le mécanisme des L-asparaginases a été comparé à celui des sérines protéases classiques, dont l'activité dépend d'un ensemble de résidus d'acides aminés : *Ser-His-Asp*, connus sous le nom de «*triade catalytique*» (Goodsell, 2005). Cet ensemble comprend un résidu nucléophile (*Ser*), une base (*His*) et un résidu acide additionnel (*Asp*), tous reliés par une chaîne de liaisons hydrogène. La réaction se déroule en deux étapes : Dans un premier temps, l'enzyme nucléophile activée via une liaison hydrogène *O-H... B* avec un résidu de base adjacent, attaque l'atome de carbone du substrat amide (L-asparagine ou L-glutamine), menant à travers un état de transition tétraédrique à un intermédiaire *acyl-enzyme* (Figure 12). La charge négative qui se développe sur l'atome d'oxygène du groupe amide dans l'état de transition est stabilisé par des interactions avec l'hydrogène adjacent qui représente un donateur obligatoire d'électrons. La constellation de ces donneurs (qui sont généralement des groupes *N-H* de la chaîne principale) est connue comme le "*trou oxyanion*".

La deuxième étape de la réaction est identique à la première, mais maintenant l'attaque nucléophile sur l'*Ester C* est lancée par une molécule d'eau. Différentes régions (séquences) d'acides aminés conservées de l'enzyme s'engagent par des liaisons hydrogènes avec le substrat (L-asparagine) : La *Thr12* de la L-asparaginase-glutaminase produite par *Acinetobacter glutaminasificans* AGA (Holcenberg et al., 1978) et la *Ser120* de l'enzyme de type *II* d'*E. Coli* (Peterson et al., 1977). Des études structurales menées par la *RMN du H<sup>1</sup>* ont montré l'importance des résidus *His* et *Tyr* dans l'activité catalytique de la L-asparaginase (Bagert et al., 1989).



**Figure 13** : schéma montrant la réaction d'hydrolyse de la l-asparagine par la l-asparaginase (Batool et al., 2016).

Cependant l'importance capitale de la *Thr12* est démontrée par la perte totale de l'activité enzymatique suite à une mutation de cet acide aminé (Derst et al., 1992). Les cellules tumorales sont spécifiquement ciblées par l'action inhibitrice de la L-Asparaginase vu leur incapacité à produire la L-asparagine *De Novo* à cause de l'absence de la L-asparagine synthétase et dépendent, de ce fait, du pool plasmatique en L-asparagine (Batool et al., 2016). Au contraire, les cellules normales sont capables de produire cet acide aminé en deux étapes métaboliques : La première fait intervenir des transaminases qui transforment l'*Oxaloacétate* en *Aspartate* et la deuxième est catalysée par la L-asparagine synthétase qui transforme enfin l'*Aspartate* en *L-Asparagine* (Dhanam et al., 2013 ; Yadav et al., 2014). La mort des cellules tumorales exposées *in vitro* et *in vivo* à l'action de la L-asparaginase a été rapportée par Asselin et al. (1989). Il a été également constaté que le cycle cellulaire est arrêté à la phase *G<sub>1</sub>*, en présence de L-asparaginase dans le milieu de culture des cellules murines *L5178Y* (Illarionova et al., 1980). D'autre part, il a été rapporté que la L-asparaginase induit l'apoptose des lymphoblastes humain *MOLT-4* et de la lignée myélocytaire leucémique *HL60*, via l'activation de la protéine *p53* (Fu et al., 1998 ; Nandy et al., 1998).

Selon Ando et al. (2005), la L-asparaginase induit l'apoptose des cellules tueuses naturelles (Natural Killer : NK) de type *NK-YS* et *NK-92* transformées dans le cas de leucémie lymphoïde, sachant que ces cellules sont généralement résistantes aux substances utilisées en chimiothérapie anticancéreuse. Il est ainsi important de signaler que la forme conjuguée de l'enzyme, notamment la L-asparaginase encapsulée dans des nanoparticules de Carbone présente un effet apoptotique élevé, atteignant 90%, en comparaison avec la forme native (Muthukumar et al., 2014). Cependant la principale cause qui a été rapportée quant à l'inhibition des cellules tumorales leucémiques, est la réduction voir même la disparition de la L-asparagine du milieu, nécessaire à la prolifération des cellules cibles (Stams et al., 2003). Cependant il est recommandé d'atteindre une activité résiduelle de L-Asparaginase de 0,1UI/ml afin de réaliser un appauvrissement adéquat en L-asparagine permettant l'inhibition des cellules tumorales. La déplétion de la L-asparagine et de la L-Glutamine par la L-asparaginase, induit l'inhibition de la voie de signalisation *mTOR* dans la cellule (Shrivastava et al., 2016), entraînant l'inhibition de la phosphorylation de la sérine thréonine

kinase *p70s6k* et du facteur d'initiation *E-binding protein 1 (4EBP1)* conduisant à l'arrêt de la synthèse des protéines ribosomiques et à la mort cellulaire (Iiboshi et al., 1999).

D'autre part, Jacque et al. (2014) ont démontré que la L-asparaginase induit un mécanisme autophagique au niveau des cellules de leucémie aigue myéloïde via le blocage de *mTORC1*, qui est un complexe de la voie *mTOR*. La voie *mTOR* est essentielle à la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Il s'agit d'une voie complexe dont l'activation peut se faire soit au niveau extracellulaire via des récepteurs à activité tyrosine kinase, soit au niveau intracellulaire par mutation ou surexpression de protéines impliquées dans cette voie (Brotelle et al., 2016). De plus la L-asparaginase a des effets anticancéreux actifs sur les tumeurs malignes du tissu hématologique, le lymphome *NK/T* extranodal, le myélosarcome, le cancer de l'ovaire, le carcinome gastrique et l'adénocarcinome pancréatique (Covini et al., 2012 ; Bachet et al., 2015). Néanmoins, dans certains cas, les cellules cancéreuses peuvent présenter une résistance face à l'action de la L-asparaginase, et ce, par la biosynthèse de la L-asparagine synthétase, dont le mécanisme de régulation dépend de la méthylation d'un résidu cytosine du gène codant la L-asparagine synthétase localisé sur le chromosome 7 (7q21.3) chez l'homme (Savitri et al., 2003).

La pharmacocinétique de la L-asparaginase, comme toute autre substance médicamenteuse, est fortement dépendante de la voie de son administration et du type de préparation (Schwartz et al., 1970). Les études réalisées *in vivo* ont démontré que la L-asparaginase d'*E. Coli* et celle d'*Erwinia* ont la même demi-vie, qui est de l'ordre de 10h (Capizzi et al., 1992). La L-asparaginase est cependant connue pour sa forte diffusion dans le milieu sanguin, à l'intérieur des vaisseaux, et elle est rapidement détectée dans le fluide pleural et d'ascite (Appel et al., 2008), mais rarement dans le liquide cébrospinal (ou liquide céphalorachidien : LCR) (Vieira et al., 2006). Même quand elle est injectée dans le LCR, la L-asparaginase gagne rapidement le plasma sanguin (Dinndorf et al., 2007). Cependant cette enzyme n'existe pas naturellement dans le plasma humain (Holmquist et al., 1963).

L'administration intraveineuse (IV) de L-asparaginase entraîne un pic plus élevé en concentrations plasmatiques, alors que les résultats de l'administration intramusculaire (IM) montrent une augmentation concomitante plus lente en terme d'activité de la L-asparaginase en raison de l'effet de dépôt (Pieters et al., 2011). Il est à signaler que la L-asparaginase est administrée durant les deux premières phases de chimiothérapie dirigée contre la leucémie lymphoïde, à savoir les phases d'induction et de consolidation et n'est pas administrée durant les phases de réinduction et de maintenance (Egler et al., 2016).

Par rapport aux médicaments de chimiothérapie à petites molécules, les enzymes anticancéreuses, qui sont des grandes molécules, présentent des avantages tels qu'une efficacité et une spécificité élevées, ce qui diminue la posologie. Cependant, elles présentent certains inconvénients tels qu'une biodisponibilité réduite, une dose à court intervalle et une immunogénicité (Verma et al., 2016). Les activités des enzymes anticancéreuses sont facilement influencées par la température, le pH et les enzymes digestives protéolytiques (Yang et al., 2018). Un système de libération d'enzymes anticancéreuses approprié peut

augmenter efficacement la stabilité *in vitro* et *in vivo*, améliorer le comportement pharmacocinétique, réduire l'immunogénicité et améliorer l'effet thérapeutique (Asselin et Rizzari, 2015).

Le poids moléculaire peut fournir des informations utiles pour analyser les caractéristiques pharmacocinétiques de l'enzyme anticancéreuse (Swami et al., 2013). Selon Yan et al. (2018), les enzymes anticancéreuses sont éliminées par protéolyse alors qu'un anticancéreux de poids moléculaire relativement faible, est principalement éliminée par le rein. En plus du *PM*, d'autres propriétés physico-chimiques, comme la structure et la charge ont une influence sur la pharmacocinétique des protéines thérapeutiques (Han et al., 2016). Les enzymes anticancéreuses sélectionnées ont d'excellentes propriétés, à savoir une bonne stabilité thermique et un puissant effet antitumoral (Charma et al., 2014 ; Reda, 2015). Asselin et al. (1993) ont démontré qu'il existe une différence de pharmacocinétique entre les différentes préparations de L-asparaginase, ainsi la demi-vie de l'activité sérique en L-asparaginase après administration a été de 1,28 ; 5,73 et 0,65 jours pour la L-asparaginase native d'*E. Coli*, la L-asparaginase pégylée d'*E. Coli* et la L-asparaginase d'*Erwinia*, respectivement.

Les enzymes supérieures de L-asparaginase ont généralement des paramètres cinétiques appropriés, c'est-à-dire des valeurs de *km* et de *Kcat* plus basses, qui reflètent des grandes affinités au substrat (Covini et al., 2012). D'autre part, par rapport à l'enzyme native, les plus grosses molécules PEGylées sont filtrées beaucoup plus lentement par les reins en raison de la faible perméabilité de la membrane basale rénale (Gil et al., 2017). Pour cela, les formes conjuguées au *PEG* de la L-asparaginase permettent d'augmenter le temps de circulation plasmatique ainsi que la protection de l'enzyme vis-à-vis des protéases digestives (El-Sayed et al., 2012 ; Agostinelli et al., 2015 ).

Concernant la durée du traitement par la L-asparaginase, il a été rapporté qu'un meilleur taux de guérison est observé chez les patients recevant la L-asparaginase d'*Erwinia chrysanthemi* pendant 26 semaines avec un taux de 90% de guérison, en comparant avec 73% chez ceux ayant reçu le traitement pendant 25 semaines (Silverman et al., 2001). Néanmoins, lorsque la L-asparaginase d'*Erwinia* est administrée en seconde ligne, en remplaçant la L-asparaginase d'*E. Coli*, dans le cas où le patient exprime une résistance au traitement par cette dernière, à cause de la production d'anticorps anti-asparaginase, la durée du traitement dépend du taux de déplétion initiale en L-asparagine. En général, la durée de traitement est fortement dépendante du protocole de chimiothérapie suivi (Pieters et al., 2011).

### II-5-Toxicité

La L-asparaginase peut toucher les cellules normales de l'organisme. Pour cela, son administration chez les patients atteints de leucémie lymphoïde aigue (LLA) est responsable de l'apparition de certains effets secondaires comme les œdèmes, les irritations cutanées, la fièvre, un dysfonctionnement hépatique, le diabète, la leucopénie, la pancréatite (Barry et al., 2007 ; Kearney et al., 2009), une atteinte neurologique et des hémorragies ; mais elle ne

touche pas les cellules gastro-intestinales, la muqueuse orale et les follicules pileux (Ohnuma et al., 1970). Ces effets résultent de l'inhibition de la synthèse protéique au niveau des tissus à forte fréquence de biosynthèse des protéines comme le foie, le pancréas et le système de coagulation du sang (Oettgen et al., 1967). Concernant l'hépatotoxicité, l'augmentation du taux des transaminases hépatiques et de la bilirubine est le symptôme commun chez tous les patients traités par la L-asparaginase (Goekbuget et al., 2008). Des quantités anormales de phosphatases alcalines, une diminution du taux d'albumine sérique, de fibrinogène et de lipoprotéines sériques sont encore rapportées (Parsons et al., 1997). L'inhibition de la biosynthèse des protéines dans les hépatocytes peut affecter également les fonctions endocrines, où des taux très bas de *Thyroxin Binding Globulin (TBG)*, la protéine de transport majoritaire des hormones thyroïdiennes, ainsi que de la *Sex Hormon Binding Globulin (SHBG)*, ont été enregistrés durant le traitement par la L-asparaginase (Ferster et al., 1992).

Enfin, des infiltrations pathologiques en acides gras ont été détectées dans le foie, en présence de la L-asparaginase (Cortijo-Cascajares et al., 2012). Cependant les effets d'hépatotoxicité due à la L-asparaginase disparaissent juste après l'élimination de cette enzyme de l'organisme. Concernant l'hématotoxicité, la L-asparaginase induit la diminution du taux des facteurs de coagulation et de fibrinolyse sanguine, comme l'antithrombine *III (ATIII)* (Mitchell et al., 2018) ; le plasminogène ; la protéine C et la protéine S, ce qui explique l'apparition de thromboses (Pradeep et al., 2010). Parmi les autres manifestations secondaires dues au traitement par la L-asparaginase, l'apparition des pancréatites dans 10 à 16% des cas, avec un taux de mortalité estimé entre 1,8 et 4,6% (Alvarez et al., 2000 ; Barry et al., 2007). La pancréatite se manifeste par des douleurs abdominales, des nausées et vomissements (Chiewchengchol et al. 2009) et elle est responsable de l'augmentation des taux sériques en lipase et amylase (Sadoff et al., 1997).

La L-asparaginase détruit souvent les îlots de Langerhans, ce qui diminue la biosynthèse de l'insuline provoquant le diabète (Alves et al., 2007). Des effets neurotoxiques ont été également rapportés, et sont dues probablement à l'accumulation de l'ammoniaque dans le sang. Néanmoins aucune étude n'a démontré la corrélation entre l'augmentation du taux d'ammoniaque dans le sang, suite à l'administration de la L-asparaginase, et l'apparition des effets neurotoxiques (Narta et al., 2007).

D'autre part, une hypersensibilité accompagnée d'un syndrome anaphylactique est observée chez les patients auxquels l'enzyme a été administrée (Savitri et al., 2003 ; Patro et al., 2011). Ce syndrome se manifeste souvent par l'apparition de fièvre, douleur, œdème, œdème de Quincke, urticaire, érythème, éruption cutanée et prurit (Woo et al., 2000). Ces effets secondaires sont diminués voir atténués par l'administration de corticostéroïdes (Avramis et al., 2006). Ce type de toxicité est en effet inexistant avec la pegaspargase (Hawkins et al., 2004). D'autre part, des études scientifiques ont démontré que le facteur d'âge n'influence pas l'hypersensibilité due à la L-asparaginase (Barry et al., 2007). Cependant d'autres ont rapporté que les patients de jeune âge et les nourrissons développent moins les anticorps anti-asparaginase comparativement aux adolescents et les adultes (Avramis et al., 2006).

La production des anticorps anti-asparaginase est surtout responsable de l'inactivation de l'enzyme et l'obtention d'une déplétion sub-optimale en L-asparagine, ce qui est dénommé par l'hypersensibilité silencieuse (Panosyan et al., 2004 ; Wenner et al., 2005).

En général, l'effet toxique de la L-asparaginase peut varier en fonction de l'âge et selon Duval et al. (2003), les adolescents sont les plus exposés à sa neurotoxicité. On pense que la toxicité de la L-asparaginase est causée par son activité L-Glutaminase (Boos et al., 1996). Ces manifestations de toxicité dues à la L-asparaginase ont une fréquence de 13 à 30% avec la l-asparaginase d'*E. coli*, qui est souvent influencée par certains facteurs de risque, à savoir : une chimiothérapie concomitante (Amylon et al., 1999), l'hypersensibilité à la l-asparaginase à des doses supérieures à 6000 UI/m<sup>2</sup> par jour, la voie d'administration intraveineuse (I.V) plutôt qu'intramusculaire (I.M), la répétition du traitement et le recours à un agent unique plutôt qu'à une chimiothérapie d'association. L'approche de Chimiothérapie d'association, contrairement à la monothérapie, est considérée comme utile pour éviter les réactions allergiques, car le premier produit immunosuppresseur efface une réponse immunitaire à la l-asparaginase (Package, 1994).

### II-6- Sources et production

La L-asparaginase est largement distribuée dans la nature, où elle est produite par les animaux, les plantes et les micro-organismes (Yadav et al., 2014). *Withnaria somnifera* (Verma et al., 2011), *Sphagnum fallax* (Borkotaky et al., 2002), *Lupine araboreuse* et *Lupin angustifolius* (Bell et al., 2004 ; Borek et al., 2004) sont les plantes utilisées pour la production de la L-Asparaginase. En plus de certaines racines végétales comme les racines de *Pinus pinaster* et *Pinus radiata* (Roberts et al., 1972). Néanmoins les micro-organismes représentent la meilleure source vue la facilité de leur culture et développement ainsi que leur rendement élevé de production en enzyme (Jha et al., 2012). La production de cette enzyme par plusieurs germes a été rapportée : *Pseudomonas fluoresces*, *Mycobacterium phlai* (Ramakrishnan et al., 1996), *Rhodosprium toruloides*, *Rhodotorula* sp (Sarquis et al., 2004). *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus terreus* (Sarquis et al., 2004). Parmi les germes producteurs, *Erwinia caratovira*, *Erwinia Chrysanthemi*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas stutzeri* et *E. coli* sont les plus utilisées (Appel et al., 2007). Il est ainsi à rappeler que la L-Asparaginase produite par *Erwinia chrysanthemi* et par *E. Coli* possèdent les meilleures propriétés pharmacologiques.

Deux isozymes de L-asparaginase sont produites par *E. Coli* ; l'enzyme de type *I* est localisée dans le cytoplasme tandis que celle de type *II* se trouve dans la région périplasmique et possède une affinité supérieure à son substrat, contrairement à la première (Amy et al., 1993). Selon Cedar et al. (1967), la production de l'enzyme de type *II* est augmentée dans les conditions d'anaérobiose. D'autre part, une molécule de L-asparaginase a été purifiée à partir d'une micro algue marine, *Chlamydomonas* sp. (Mostafa et al., 1979). Les actinomycètes, notamment le genre *Streptomyces* s'avèrent une source très importante de L-asparaginase, avec des quantités plus élevées (Savitri et al., 2003 ; Kavitha et Vijayalakshmi 2010).

Enfin, une glycosyl-asparaginase *GLIAP* a été purifiée à partir de la fraction cytosolique des astrocytes, et est considérée comme une L-asparaginase de type *II* de mammifères (Dietrich et al., 2003).

# *Partie Expérimentale*

# *Matériels et Méthodes*

## 1-Matériel et Méthodes

### 1-1-Matériel Biologique et origine des échantillons

A travers notre étude, nous avons ciblé 03 sites pour l'isolement de souches d'actinomycètes :

Nous avons ciblé le lac de Thamda Ougulmim (ou Agulmim) localisé dans la montagne de Tikjda de la commune d'El Asnam et la daïra de Bechloul à 36° 15' 53" au Nord et à 4° 04' 26" à l'Est de la wilaya de Bouira, comme source environnementale pour l'isolement des actinomycètes, vu qu'il s'agit d'un site non exploité pour la recherche et l'isolement de micro-organismes d'intérêt biotechnologique. La température relativement basse en été et très basse en hivers a été un paramètre motivant pour le choix de ce site pour l'isolement de nouvelles souches d'actinomycètes. Nous avons réalisé un prélèvement d'un volume de 250mL d'eau au bord du lac en choisissant un coin riche en matières organiques formées de débris de végétaux. Le volume d'eau a été recueilli dans un flacon stérile hermétiquement fermé. Juste après le prélèvement, le flacon a été mis dans une glacière.

Nous avons également choisi le son de blé tendre, un sous-produit de l'industrie, récolté du moulin Hakim situé au niveau du pont de Bougie localisée à l'entrée Sud de la ville de Tizi-Ouzou, pour l'isolement de souches d'actinomycètes, en vue d'une éventuelle valorisation industrielle de ce sous produit non exploité. Même s'il a été rapporté que le grain de blé entier abrite une diversité de micro-organismes producteurs d'enzymes (Leyral et Vierling, 2007) dont les bactéries du genre *Streptomyces* (Prescott et al., 2010). Le son du blé a été récupéré dans un flacon de verre stérile et hermétiquement fermé, mis dans une glacière et transporté au laboratoire.

Nous avons également choisi le sol de montagne rocheux afin de trouver de nouvelles souches intéressantes d'actinomycètes. Pour cela environ 200 g du sol rocheux a été récolté de la carrière de la région de Mekla, situé à 25Km au Sud-Est de la wilaya de Tizi-Ouzou. L'échantillon de sol a été recueilli dans un flacon stérile hermétiquement fermé puis transporté au laboratoire. De plus la présence des actinomycètes dans le sol est très connue.

Nous signalons que nous n'avons pas eu recours au choix de milieux extrêmes, à forte présence de salinité, de hautes températures voir de résidus de polluants chimiques de nature organique ou minérale, pour isoler nos souches, vue que dans ce type de sites, la flore microbienne se trouve souvent dans des conditions de pression osmotique ou thermique provoquant l'orientation du métabolisme vers la biosynthèse d'équipements enzymatiques participant dans l'élimination des résidus chimiques ou l'adaptation à la chaleur. Ce genre d'enzyme a néanmoins, un intérêt industriel, c'est le cas des laccases. Quand à la production de L-asparaginase, nous avons opté pour des sites d'isolement riches en matières organiques dans lesquelles nous avons la chance d'isoler des souches intéressantes produisant l'enzyme étudiée.

## 1-2-Méthodes

### 1-2-1-Isolement des souches bactériennes

#### 1-2-1-1-Préparation des échantillons

Les différents échantillons prélevés ont été traités comme suit :

-Le son de blé a été séché à l'air libre pendant 21 jours, afin de détruire les formes végétatives microbiennes (Meena et al., 2015), puis broyé avec un broyeur ménager (Blinder *Moulinex*) sous forme d'une poudre fine. Cette dernière a été filtrée sur un tamis traditionnel afin d'éliminer les résidus des enveloppes dures. Ensuite, 1g de la poudre obtenue est mélangée avec 9ml d'eau physiologique stérile pour obtenir la dilution  $10^{-1}$ . Une série de dilutions jusqu'à  $10^{-3}$  est réalisée (Taechowisan et al., 2003).

-1ml de l'eau du lac Agulmim est mélangé à 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir la dilution  $10^{-1}$  (Aly et al., 2013). Des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution  $10^{-3}$ .

-Le sol de montagne rocheuse de Mekla a été séché de sa part, à l'air libre pendant 21 jours. Ensuite, le même principe de dilution est suivi.

#### 1-2-1-2-Technique de l'isolement

1 ml de chacune des dilutions  $10^{-3}$  correspondant aux différents échantillons est ensemencé sur chacune des géloses sélectives : ISP<sub>1</sub> (*International Streptomyces Project 1*), ISP<sub>2</sub>, Amidon-Caséines et Bennett (Aly et al., 2013) additionnée d'acide Nalidixique (50µg/ml) pour inhiber la croissance des bactéries Gram- et de Nystatine (10µg/ml) permettant l'inhibition des champignons (Abdallah et al., 2012). Les cultures sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours (Sivasankar et al., 2013).

Le meilleur développement des colonies typiques d'actinomycètes a été observé sur le milieu gélosé ISP<sub>2</sub>. Pour cela, ce dernier est retenu pour la suite de l'étude, comme milieu idéale de croissance et d'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des souches isolées.

Les souches d'actinomycètes isolées sont conservées, après leur identification, dans le bouillon ISP<sub>2</sub> en présence de glycérol à 30% et à une température de -80°C pour stopper toutes les réactions biochimiques internes et préserver l'intégralité cellulaire. D'autre part, les spores sont récoltées après maturation et conservées dans les mêmes conditions.

### 1-2-2-Identification morphologique des souches d'Actinomycètes isolées

Après l'isolement des colonies typiques d'actinomycètes en adoptant la méthode des stries par épuisement sur gélose sélective ISP<sub>2</sub>, ces dernières sont repérées suivant leurs caractères morphologiques. L'étude macromorphologique est réalisée en se basant sur l'aspect des mycéliums aérien et du substrat et la taille des colonies. L'étude micromorphologique est basée par contre, sur une observation microscopique de frottis par la coloration de Gram où

l'aspect des hyphes (forme, taille et ramification) et la présence des spores sont observés (Hasani et al., 2014) (voir tableau VII).

### **1-2-3-Mise en évidence et screening de l'activité L-asparaginase**

#### **1-2-3-1-Sur milieu solide**

Afin de mettre en évidence la production de la L-asparaginase, les souches bactériennes sont ensemencées sur une gélose Asparagin Dextrose Salt agar (ADS) (Basha et al., 2009) qui renferme comme seule source d'Azote, de l'Asparagine et dont la composition chimique en g/L est : L-Asparagine 10 ; D-Glucose 2 ;  $K_2HPO_4$  0,5 ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 ; Rouge Phénol (de couleur jaune clair à pH acide, jaune foncé (mat) entre pH6,5 et 8,4 et rouge à pH8,5) 0,09 (Meena, 2015). Les cultures sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

Des zones de virage de la couleur de la gélose du jaune au rose sont repérées autour des colonies bactériennes (Shukla et Mandal, 2013), indiquant l'alcalinisation du milieu, en présence d'ammoniaque produit par hydrolyse de la L-asparagine par une L-asparaginase. Une boîte de Petri contenant de la gélose ADS non ensemencée a servi de témoin négatif.

#### **1-2-3-2-Sur milieu liquide**

Suivant le même principe que sur milieu solide, les souches bactériennes sont ensemencées dans du bouillon ADS (Aly et al., 2013). L'activité L-asparaginase est mise en évidence, par l'apparition d'un virage de la coloration vers le rose.

D'autre part, nous avons remarqué que la production de biomasse cellulaire ainsi que de l'activité L-asparaginase sont meilleures en absence d'agitation. Pour cela, toutes les cultures liquide au cours de cette étude, ont été lancées en absence d'agitation.

### 1-2-4-Dosage de l'activité enzymatique L-asparaginase totale

La démarche appliquée est le protocole de Nesslerisation modifié et standardisé. A partir des cultures jeunes sur bouillon ISP<sub>2</sub>, de chacune des souches bactériennes isolées, 1ml est inoculé dans 100 ml de bouillon ADS puis incubés à 28°C pendant 7 à 10 jours, en absence d'agitation. Après avoir effectué une centrifugation de la culture bactérienne à 10000g pendant 20min à +4°C, le surnageant récupéré a servi d'extrait brut pour le dosage de l'activité enzymatique. Celui-ci est basé sur la détection de l'ammoniaque produit par hydrolyse de la L-asparagine, en utilisant le réactif de Nessler. Pour se faire : 0,2 ml de l'extrait brut sont mélangés avec 0,9 ml du substrat (L-Asn 0,04M solubilisé dans du Tris/HCl 0,5 M, pH 7,2) et laissé incubé à 37°C pendant 30 min. La réaction est stoppée par ajout de 0,5ml d'acide trichloracétique 1,5M. Ensuite, 0,2 ml du mélange sont additionnés de 1ml d'eau distillée et dosés avec 0,5 ml du réactif de Nessler. Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante pendant 10 à 15 min. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm par spectrophotométrie. Le blanc est traité de la même façon, il correspond à la même combinaison sauf que l'extrait brut est remplacé par du bouillon ADS (Asparagin Dextrose Agar). (Imada et al, 1973 ; Konečná, 2004 ; Khamna et al, 2009 ; Meena et al, 2015). Une courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant des solutions de sulfate d'ammonium à concentrations connues, comme source d'ammoniaque (Deshpande et al, 2014).

### 1-2-5-Standardisation et maximisation de la production de L-asparaginase

Deux étapes essentielles ont été suivies dans cette partie :

#### *Etape I*

Il s'agit d'évaluer le potentiel de production en L-asparaginase de l'ensemble des souches sélectionnées, en fonction du temps (El-Naggar et al, 2015). Pour cela, des cultures sur bouillon ADS correspondantes à chacune des douze souches candidates ont été lancées, dans un volume final de 20ml chacune. Après incubation à 28°C pendant 7 jours, l'activité L-asparaginase a été dosée dans les surnageant de culture. Enfin, les meilleures souches productrices de l'enzyme seront sélectionnées pour la suite du travail. Par ailleurs, l'activité enzymatique a été dosée toutes les 24h pour tracer la courbe de la cinétique de production par les deux souches candidates.

#### *Etape II*

Dans cette étape, les sources de carbone (C) et d'azote (N) ont été standardisées, en référence aux travaux d'El Naggar et al. (2015) et en se basant sur un plan *One factor At a Time (OFAT)* dont le principe est de faire varier, un seul facteur à la fois, lié à la composition du milieu de production de l'enzyme. Pour cela, les combinaisons suivantes, en terme de sources de carbone et d'azote ont été utilisées dans le milieu de base ADS (voir annexe 3) :

Variation de la source de C : 0.2% glucose; 2% amidon et 0.1% glucose + 0.7% amidon.

Variation de la source de N: En absence de source d'Azote ; En présence de source d'Azote organique (L-Asparagine 1%) et en présence de source d'Azote minérale (NaNO<sub>3</sub> 1%).

### **1-2-6-Etude des caractères biochimiques et physiologiques des deux souches potentiellement productrices de l'enzyme**

Les deux souches CA01 et CA04 sont soumises à l'étude physiologique et biochimique, focalisée sur l'ensemble des caractères de dégradation de certains composés chimiques simples : sucres et dérivés, voies fermentaires et types respiratoire, acides aminés et quelques polymères : Amidons et Caséines ; ainsi que la croissance à différentes conditions de pH, température et salinité (Perez et al., 1990 ; Meena et al, 2015).

### **1-2-7-Identification moléculaire des deux souches potentiellement productrices de l'enzyme**

Pour effectuer l'identification moléculaire des deux souches sélectionnées pour la production de la L-asparaginase, nous avons réalisé le séquençage complet de leurs gènes codant l'ARNr 16S. Le protocole est réalisé au laboratoire BIOFIDAL (Lyon - France) selon le principe de Sanger et al. (1977). L'extraction de l'ADN est réalisée par le kit *pathogène universel Omega Biotech Mag-Bind*. Après cela, nous avons réalisé l'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S avec les séquences universelles: *16S-27f* et *16S-1492r*. Les conditions de la PCR sont : Réalisation des Mix : Extraits d'ADN génomique (160 ng pour CA01 et 720ng pour CA04) : 2µl ; Mix *HOTBIOAmp 5X* à 12.5mM MgCl<sub>2</sub> : 6µl ; *Enhancer 10X* : 2µL ; *Primer* (amorce)*16S-27F* : 1µl ; *Primer 16S-1492R* : 1µl ; H<sub>2</sub>O qsp 30µl : 18 µl ; *Cycles de PCR* : 96°C 12 min (activation du Mix *HotStart HOTBIOAmp*) puis 35 cycles de 96°C 20sec- 56°C 20sec- 72°C 1min30 ; extension finale à 72°C – 5 min. Ensuite nous avons utilisé les amorces: *16S-27f*; *16S-515f*; *16S-805R* et *16S-1492R* pour le séquençage des produits de PCR et nous avons réalisé l'analyse et l'alignement de séquences pour la création du Contig de 1460 PB correspondant à la séquence 16S complète. Nous avons étudié le Blast avec la base de données de *PBIL (BiBi)* de l'Université Claude Bernard – Lyon 1 (*UCBL1*) pour l'identification des souches. Nous spécifions que les produits d'amplification sont purifiés avec *ExoSap-It* (Mélange d'Exonucléase I et de phosphatase alcaline de crevette) puis mis en séquençage avec le kit *BigDyeV3.1 Dye Terminator Kit (Thermo Fisher Scientific)*. Les produits du séquençage sont purifiés avec le kit *terminateur BigDye X (Thermo Fisher Scientific)* avant analyse dans un séquenceur de 96 capillaires *ABI3730XL*. Les séquences ont été alignées avec le logiciel *CHROMAS Pro* pour créer le gène Contig Complet 16S.

### **1-2-8-Optimisation de la production de la L-asparaginase par les deux souches sélectionnées**

Après avoir standardisé le temps de production ainsi que les sources de carbone et d'azote dans le milieu de production de l'enzyme, dans cette étape nous avons suivi un plan d'expérience Box Behnken basé sur les surfaces de réponse (RSM) afin d'optimiser cette production.

Ce plan d'expérience permet d'évaluer l'effet des 03 facteurs les plus influençant sur la production de la L-asparaginase par les deux souches sélectionnées. Les facteurs sont : la Température de la fermentation bactérienne (°C), la concentration en substrat de l'enzyme (L-

Asparagine) dans le milieu de production ADS (%) et la concentration en glucose dans le même milieu (%). Avec 1% + 1g/100mL.

Le plan Box Behnken est basé sur la réalisation d'une matrice d'expérience des variables sélectionnées, puis de corrélérer la réponse obtenue avec les facteurs choisis, à travers une équation de régression (I) représentée comme suit :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ii} x_i^2 + \sum a_{ij} x_i x_j \quad \text{(I)}$$

Où  $x_i$  représente le niveau attribué au facteur  $i$  ;  $Y$  est la réponse prédite par les valeurs actuelles ;  $a_0$  est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude;  $a_i$  représente les effets linéaires de chaque facteur ;  $a_{ii}$  représente les carrés des effets (carré du même effet) et  $a_{ij}$  représente l'interaction des effets. L'équation représente donc un modèle quadratique.

La réponse est représentée dans notre travail, par l'activité enzymatique L-asparaginase exprimée en activité totale AT (UI/ml). Nous avons choisi dans cette étude un modèle quadratique, vue la significativité des facteurs de corrélation obtenus ( $R^2$ ).

Contrairement au plan OFAT (*One factor At Time*), ce plan d'expérience représente, non seulement les effets de chaque facteur sur la réponse, mais également les effets des interactions entre les facteurs, d'où son intérêt dans l'explication mathématique de différents phénomènes biologique (Amstrong et Amilton, 2004).

Une analyse statistique réalisée par le logiciel *Minitab17* a servi pour évaluer la significativité des modèles obtenus, en utilisant l'analyse de la variance ANOVA pour démontrer la significativité de chaque variable (linéaires, carrés et interactions quadratiques) en étudiant les constantes : Fisher *F-value*, Student *T-value* et la probabilité *P-value*. Enfin, la significativité du modèle est exprimée par le facteur de corrélation  $R^2$  représentant les valeurs réelles (obtenues lors de l'expérimentation) et  $R^2$  ajusté (*adj-R square*) représentant les valeurs prédites par le modèle. Plus le  $R^2$  est proche du  $R^2$  ajusté, plus le modèle est significatif et la réponse est dépendante des variables choisies pour l'étude (Kaushik et al, 2006).

Pour réaliser l'optimisation des facteurs choisis, des intervalles de variation de ces derniers ont été choisis. Les intervalles sont formés d'une valeur minimale : -1, une valeur maximale : +1 et une valeur moyenne (appelée point au centre) : 0.

Pour cela, les données utilisées pour cette étude sont :

Température (°C) : 25 (-1) ; 27.5 (0) ; 30 (+1).

Concentration en substrat (L-Asparagine) (%) : 0.75 (-1) ; 1 (0) ; 1.25 (+1).

Concentration en glucose (%) : 0.1 (-1) ; 0.2 (0) ; 0.3 (+1).

Les expériences composées des points au centre, comme variable, sont répétées 3 fois en utilisant le logiciel *Minitab17* pour permettre la reproductibilité de l'expérience et faciliter l'évaluation de l'erreur pure (El-Naggar et al., 2015).

Les valeurs optimales sont données par le logiciel sous formes de valeurs codées. De ce fait, les valeurs optimales réelles sont déterminées par l'équation des valeurs centrées et réduites (V-C-R) :

$$\frac{X_{act} - X_{moy}}{pas} \quad \text{D'où :} \quad X_{act} = (X_{cod} \times pas) + X_{moy}$$

Avec :  $X_{act}$  : valeur actuelle ;  $X_{moy}$  : valeur moyenne de l'intervalle des variables ;  $X_{cod}$  : valeurs codées.

### 1-2-9-Extraction et purification partielle des protéines enzymatiques

#### 1-2-9-1-Récupération des extraits enzymatiques bruts

Dans le but d'avoir un rendement important en L-asparaginase par les deux souches sélectionnées, des grandes cultures ont été lancées à raison de 500ml de bouillon ADS standardisé et optimisé, dans des Erlen Meyer de 1L, en utilisant des inocula issus de cultures jeunes développées sur bouillon ISP<sub>2</sub>. Après 6 jours d'incubation (correspondant à la durée optimale de production), les surnageant ont été récupérés, après une centrifugation réfrigérée à 10000g pendant 20min (Dharmaraj, 2011). Les surnageant représentent ainsi les extraits enzymatiques pour le reste du travail.

#### 1-2-9-2-Concentration

Après avoir récupéré les surnageant de culture, ces derniers sont concentrés en utilisant des tubes de concentration *VIVASCIENCE MWCO 10.000 Da*, qui sont soumis à une centrifugation réfrigérée pendant 1h à 10000g (Dharmaraj et al, 2011).

#### 1-2-9-3-Dosage des protéines

Le dosage des protéines dans les extraits de L-asparaginase récupérés, est réalisé suivant la méthode de Bradford (1976). Pour cela 1ml de chaque extrait est mélangé avec 4ml du réactif de Bradford (voir annexe 2). Après incubation à l'obscurité pendant 15min, l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 595nm au spectrophotomètre Visible *medline MD-1105 U.K.* Un blanc est réalisé, composé d'eau distillée à la place de l'extrait enzymatique. D'autre part, une droite d'étalonnage est tracée en utilisant une série de concentrations connues en sérum albumine bovine (BSA) allant de 0 jusqu'à 1 mg/ml.

L'objectif de la détermination du taux de protéines des extraits enzymatiques, à chaque étape d'extraction, est de calculer les activités enzymatiques spécifiques AS (UI/mg de protéines : Tableaux 21 et 22).

#### 1-2-9-4-Extraction par précipitation au sulfate d'ammonium

Les extraits enzymatiques des deux souches sont soumis à une extraction basée sur la précipitation saline (*Salting-Out*), en utilisant du sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Une

gamme de concentration en ce sel, allant de 20% à 90% a été additionnée à chacun des deux extraits correspondant aux deux souches CA01 et CA04 (Toma et al., 2011), puis incubés à +4°C sous agitation douce jusqu'à solubilisation totale du sel (Amena et al., 2010). Enfin, une étape de centrifugation réfrigérée à 10000g pendant 20min est réalisée pour récupérer les culots protéiques après précipitation (Dharmaraj, 2011 ; Mohana et al., 2011). Ces derniers ont été resolubilisés dans un tampon Tris/HCl 0.05M pH8.4 (Dhamaraj, 2011). La quantité de sulfate d'ammonium rajoutée dans le milieu est déduite, à chaque fois du tableau de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium (Green and Hughes, 1955) représenté en annexe 1.

### 1-2-9-5-Dialyse

Après précipitation saline, les extraits actifs de chacune des deux souches bactériennes, sont dialysés, dans le but d'éliminer l'excès en sulfate d'ammonium. Pour cela, les extraits sont versés dans des boudins de dialyse (membranes semi-perméables) ayant un domaine de fractionnement de 8KDa, et les boudins sont plongés dans 2L de tampon Tris-HCl 0.05M pH8.4 et laissés pendant une nuit sous agitation douce à +4°C dans un réfrigérateur (El-Bessoumy et al, 2003). Les dialysats ont été récupérés pour purification partielle.

### 1-2-9-6-Séparation par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphacryl S-200

La phase stationnaire de cette colonne est préparée à base de Séphacryl S-200, sous forme d'un gel prêt à l'emploi. Le gel est stabilisé en ajoutant du tampon Tris/HCl 0,02M, pH8,4 (Dhamaraj, 2011), puis coulé dans une colonne Kontes™ Chromaflex™ (30 × 2,5 cm) en une seule fois, d'une façon régulière. Après stabilisation de la phase stationnaire et réglage du débit d'élution à 1ml/min, le volume mort  $V_0$  a été estimé par l'élution du Bleu de Dextran à 1mg/ml qui possède un PM =  $2 \cdot 10^6$  Da, à travers la colonne préparée (Image de l'annexe 05). La phase stationnaire est ensuite étalonnée en faisant éluer des protéines standards (de PM connu) :  $\beta$ -Galactosidase (Coli-prev<sup>R</sup>) (PM 116KDa) ; BSA (PM 66.5KDa) ; Pepsine (PM 34.7KDa) ; Trypsine (PM 26.6KDa) ; Lysozyme du blanc d'œuf (PM 16.7KDa).

Par la suite, les dialysats protéiques de chaque extrait enzymatique, sont préalablement filtrés sur filtre de 0,22 $\mu$  puis déposés en haut de la colonne et élués, à température ambiante, sous pression gravimétrique (basse pression) et à un débit constant de 1ml/min. Des fractions de 1ml sont recueillies et soumises au dosage des protéines par la méthode de Bradford ( $\lambda=590$ nm) et au dosage de l'activité enzymatique L-asparaginase, par Nesslerisation ( $\lambda=450$ nm). Une droite de corrélation Log PM = f (Temps de rétention) est tracée, afin d'estimer les PM des fractions actives.

Les profils protéiques d'élution des extraits enzymatiques bruts sont illustrés sous forme de pics d'absorption, représentant le taux de protéines ainsi que l'activité enzymatique (exprimées en DO), en fonction du temps de rétention (min).

Les paramètres de l'élution sont :

Colonne : Type *Kontes™ Chromaflex™* (30 × 2,5cm).

Phase stationnaire : Séphacryl S-200 stabilisé dans un tampon Tris-HCl 0,05M, pH8,4.

Phase Mobile : Tampon Tris-HCl 0,05M, pH8,4.

Débit d'éluion : 1ml/min. Elution : Isocratique.

Volume d'échantillon : 1 ml.

Température : température ambiante (25°C).

Pression : pression atmosphérique (basse pression).

Détection :

-Spectrophotométrie Visible :  $\lambda_{\max} = 450\text{nm}$  (activité enzymatique) ;  $\lambda = 595\text{nm}$  (dosage des protéines par la méthode de Bradford).

-Spectrophotométrie UV :  $\lambda_{\max} = 280\text{nm}$  (dosage du Bleu Dextran pour la mesure du  $V_0$ ).

Les fractions actives de chaque extrait sont jumelées puis soumises à des études de caractérisations.

### 1-2-9-6-Contrôle par électrophorèse PAGE-SDS

Les fractions actives éluées, correspondantes à chaque extrait enzymatique sont mélangées et soumises à un contrôle électrophorétique par PAGE-SDS en conditions non dissociantes selon le protocole de Leammli (1970) modifié (voir annexe 3). Un marqueur de poids moléculaire est utilisé, le Prestained Molecular Weight Marker (MW. 26600 – 180000 Da).

### 1-2-10-Propriétés de l'enzyme L-asparaginase

Après avoir réalisé une identification partielle de l'enzyme, nous avons étudié, à travers l'étape de caractérisation, l'effet de certains facteurs physico-chimique sur la stabilité de l'activité L-asparaginase. D'autre part, nous avons déterminé les paramètres cinétiques de l'enzyme par l'analyse *Lineweaver-Burk* afin d'avoir une idée, quant à sa vitesse d'action, caractère très demandé en thérapie anticancéreuse où l'enzyme est largement appliquée (Narta et al., 2007).

#### 1-2-10-1-Effet du pH et de la température

Afin d'estimer l'effet de la variation du pH sur la réaction enzymatique catalysée par notre enzyme, nous avons fait varier le pH de la solution contenant le substrat, de pH4 à 10, avec un pas de 1 en évitant le pH5,4 qui est le pHi du substrat (L-asparagine) de crainte de précipiter ce dernier. Pour cela, différentes solutions tampons sont préparées selon la gamme du pH : Tampon phosphate 0.05M (pH4 à 7) ; tampon Tris-HCl 0.05M (pH8 à 9) ; tampon Glycine-NaOH (pH10). D'autre part, la température de réalisation de la réaction enzymatique a été variée dans le but d'étudier l'effet de la température. Pour cela, des valeurs variables allant de

30°C à 80°C (30°C ; 35°C ; 37°C ; 40°C ; 44°C ; 50°C ; 60°C ; 70°C ; 80°C) ont été étudiées dans les conditions standards du dosage de l'activité L-asparaginase (Susmita et al, 2012).

### 1-2-10-2-Effet du temps de la réaction enzymatique

Pour étudier l'effet du temps d'incubation sur l'activité L-asparaginase, un intervalle allant de 5min à 45min a été observé.

### 1-2-10-3-Effet des cofacteurs sur la stabilité de l'enzyme

L'effet des cofacteurs a été également étudié, et ce dans le but d'avoir une idée concernant la stabilité des enzymes étudiées, en présence des certains éléments chimiques et d'autre part, pour avoir une information sur la structure globale de l'enzyme. L'effet cofacteurs :  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , EDTA,  $Fe^{2+}$  et  $Mn^{+}$  a été étudié. Pour se faire, nous avons additionné les différents éléments chimiques, à la solution enzymatique partiellement purifiée, sous forme des sels suivants :  $MgSO_4$  (1mM),  $CuSO_4$  (3mM),  $ZnSO_4$  (10mM), EDTA (10mM),  $FeSO_4$  (10mM) et  $MnCl_2$  (10mM) (Siddalingeshwara et Lingappa, 2011). Un blanc et un témoin positif ont été réalisés. Ce dernier est représenté par l'enzyme et le substrat, dans les conditions standards et en absence de cofacteurs.

### 1-2-10-4-Affinité au substrat

Dans cette partie, nous avons remplacé la L-asparagine (Substrat habituel de la réaction enzymatique), par chacun des deux acides aminés : L-Glutamine (0.04M) et acide l-aspartique (0.04M). Nous avons choisi ces deux acides aminés dans le but d'évaluer le degré d'affinité de notre enzyme à l'attaque des fonctions amine localisées sur les radicaux *R* de L-Asparagine et de L-Glutamine, et sur le *carbone  $\alpha$*  (*C- $\alpha$* ) de l'acide L-Aspartique, selon le principe de Huang et al. (2013). De plus l'évaluation de l'activité L-Glutaminase de notre enzyme est importante puisqu'elle est souvent corrélée à une forte toxicité qui a été mise en évidence *in vivo*, suite à l'administration de L-asparaginase, chez les patients atteints de leucémies (Narta et al., 2007). L'activité enzymatique relative à celle enregistrée avec le substrat habituel, a été notée et l'affinité aux différents substrats est ainsi estimée (Siddalingeshwara et Lingappa, 2011).

### 1-2-11-Etude de la cinétique enzymatique (détermination de la $K_M$ et la $V_{max}$ )

Nous avons réalisé dans cette étape une étude cinétique de l'activité enzymatique en fonction du temps de la réaction. Après avoir repéré la zone où l'activité L-asparaginase augmente en fonction du temps (partie 1-2-10-2 de notre présente étude), nous avons procédé à l'étude de la cinétique de l'activité L-asparaginase, en nous proposant de suivre la vitesse de formation graduelle du produit dès la première minute de contact avec le substrat jusqu'à 10 min. Pour cela, nous avons versé dans des tubes numérotés de 1 à 10, la solution contenant le substrat L-Asparagine 0,04M, puis graduellement, nous avons versé, chacun des extraits enzymatiques

dans chaque tube et nous avons chronométré le temps de 1 à 10 min en utilisant un pas de 1 min.

Dans chaque tube numéroté, la réaction est stoppée, par ajout d'acide trichloracétique (TCA) à 1,5M, au temps en minutes, correspondant la numérotation. Enfin, l'activité L-asparaginase est dosée dans chaque tube, et, est corrélée au temps de la réaction, graphiquement.

D'autre part, afin d'estimer les paramètres de la cinétique enzymatique des molécules L-asparaginase produites par nos souches, nous avons utilisé l'analyse *Lineweaver-Burk*. De ce fait, pour calculer la  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten) qui reflète l'affinité au substrat, nous avons fait varier le taux de substrat L-Asparagine, dans la réaction enzymatique de 0,002 à 0,04 M. La  $K_M$  est considérée comme la concentration en substrat où l'activité enzymatique diminue de moitié (50%), par rapport à son activité à concentration saturante en substrat (0,04M) (Imada et al., 1979). La vitesse maximale  $V_{max}$  et la  $K_M$  sont déterminées graphiquement, selon l'équation de Michaelis – Menten :

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

**Avec :** v : vitesse de la réaction enzymatique (UI/ml).

$V_{max}$  : vitesse maximale de la réaction enzymatique (UI/ml).

S : concentration en substrat (mM).

$K_m$  : constante de *Michaelis-Menten* (mM).

Pour se faire, la courbe :  $V = f([S])$  et la droite  $1/V = f(1/[S])$  ont été tracées.

## 1-2-12-Etude de la L-asparaginase intracellulaire

### 1-2-12-1-Lyse cellulaire et récupération de la fraction protéique intracellulaire

Après culture des deux souches sélectionnées sur bouillon ADS modifié, pendant 10 jours à 28°C (ALY et al, 2013), la lyse cellulaire est réalisée selon le protocole modifié d'Anderson et McKay. (1983), afin de récupérer la fraction enzymatique intracellulaire active. Pour ce faire, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 10000g pendant 30min à +4°C et les culots cellulaires ont été préalablement lavés 3 fois avec de l'eau physiologique puis resuspendus dans 4ml de la *solution 1* contenant : Saccharose à 6,7% dans Tris 50mM et EDTA 1mM avec un pH8. Le tout est chauffé à 37°C pendant 1h. Par la suite, 100µl de la *solution 2* renfermant : Lysozyme 25mg/ml dans Tris 25mM et ayant un pH8 est rajoutée, et le tout est incubé à 37°C pendant 20min. Pour continuer, la *solution 3* : 40 µl d'EDTA 0,25mM dans Tris 50mM, pH8 et la *solution 4* : 20µl de SDS 20% (m/v) dans Tris 50mM et EDTA 20mM, pH8, sont additionnées.

Le mélange est vortexé immédiatement puis incubé pendant 20min à 37°C pour compléter la lyse. Cependant, la lyse cellulaire a été optimisée, suivant le principe d'Aly et al, (2013) par

un procédé de sonication à 50Hz pendant 1h. La fraction protéique intracellulaire brute récupérée dans le surnageant après centrifugation réfrigérée à 15000g pendant 30min (Anderson et McKay, 1983), est filtrée sur un filtre de 10KDa puis aliquotée et congelée à -80°C. Cette fraction servira d'extrait enzymatique brut pour le reste du travail.

### **1-2-12-2-Mise en évidence de l'activité L-asparaginase intracellulaire**

Dans cette partie, la mise en évidence de l'activité L-asparaginase intracellulaire est réalisée par la méthode de diffusion des puits, suivant le protocole d'El Naggar et al, (2014). En nous inspirant du même protocole de Nissen-Meyer et al, (1992), l'extrait enzymatique brut est neutralisé à pH7 puis versé, à raison de 70 µl, dans le puits d'une gélose ADS contenant du rouge de phénol comme indicateur de pH. Un deuxième puits servant de témoin négatif est rempli avec 70 µl de bouillon ADS non ensemencé. Un résultat est considéré comme positif s'il y a virage, du jaune au rose autour du puits rempli par l'extrait enzymatique, à l'inverse du témoin négatif.

### **1-2-12-3-Optimisation de la production de la L-asparaginase intracellulaire**

Après la mise en évidence de l'existence de la L-asparaginase intracellulaire, une étape d'optimisation basée sur le même principe que l'enzyme extracellulaire, est réalisée, en choisissant les mêmes paramètres de culture.

### **1-2-12-4-Extraction et purification partielle de la L-asparaginase intracellulaire**

Le même principe que celui de l'enzyme extracellulaire est suivi dans cette partie, à savoir une extraction par le sulfate d'ammonium suivie d'une séparation chromatographique sur Séphacryl S-200, suivant les mêmes paramètres, de la fraction enzymatique active. Un contrôle sur PAGE-SDS est réalisé.

# *Résultats et discussions*

## 2-Résultats et discussion

### 2-1- Identification morphologique des souches bactériennes isolées

Grace à l'emploi du milieu sélectif ISP<sub>2</sub> additionné d'acide Nalidixique et de Nystatine, il a été possible d'avoir des colonies bien isolées et spécifiques des actinomycètes. La présence de l'extrait de malt dans ce milieu permet un bon développement. C'est d'ailleurs le milieu le plus utilisé dans beaucoup de travaux d'isolement d'actinomycètes. C'est dans le même contexte que Mohana et al, (2011) se sont basés dans leurs travaux sur la stimulation et l'augmentation de la croissance de *Streptomyces sp. TA22*, où l'extrait de malt s'est avéré comme meilleure source de carbone ayant donné le taux de biomasse le plus important avec 16,5 mg/ml. D'autre part, les caractéristiques culturales de la même souche TA22 ont été étudiées sur le milieu ISP<sub>2</sub> qui a donné la meilleure croissance permettant l'isolement des colonies et l'étude des caractères morphologiques : consistance poudreuse, mycélium aérien blanc, mycélium de substrat brun et production de pigments solubles (Mohana et al., 2011). Ceci correspond aux mêmes résultats obtenus dans notre travail (Tableau VI).

L'étude des colonies a été focalisée sur l'identification de l'aspect mycélien, à savoir l'observation du mycélium aérien et le mycélium du substrat incrusté dans la gélose. L'aspect poudreux caractéristique a été également un caractère décisif d'identification (figure 17). De plus, l'observation microscopique après coloration Gram (figure 18) nous a fourni les renseignements permettant de différencier les souches d'actinomycètes isolées ayant des filaments fins et ramifiés à Gram+, des moisissures possédant des hyphes épais et ne prenant pas le Gram (Dharmaraj, 2011).

Remya et al., en 2008, avaient réalisé l'isolement de 173 souches bactériennes de différents sites naturels, parmi lesquelles, 64 souches ont été identifiées comme des actinobactéries en se basant sur l'étude morphologique dont l'aspect filamenteux et surtout la présence à la fois de mycélium aérien et de mycélium de substrat.

Dharmaraj et Dhevendaran, (2010) ont mentionné que les mêmes caractères nutritionnels, biochimiques et morphologiques, que nous avons étudiés et les ont qualifiés de suffisants pour détecter le genre *Streptomyces*, que nous suspectons. Cependant, l'identification moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr 16s nous permettra de certifier notre identification.

Par la présente étude, nous avons pu mettre en évidence la richesse des sites choisis, en actinomycètes, à savoir le son de blé où nous avons démontré pour la première fois qu'il peut s'agir d'un transporteur d'actinomycètes. Néanmoins, le son de blé a été utilisé auparavant, comme substrat de fermentation, car, Bartolomé et al. (2003) ont conclu qu'un maximum d'activité enzymatique de type feruloyl estérase produite par *Streptomyces avermitilis* CECT 3339, est enregistré à 1 jour d'incubation, sur des oligosaccharides feruloylés provenant du son de blé. De leur part, Nascimento et al. (2009) avaient utilisé le son de blé, comme source de carbone, pour la production de cellulase par *Streptomyces malaysiensis*. Le sol de montagne rocheuse de la région de Mekla est aussi un milieu favorable pour le développement des actinomycètes. D'ailleurs à travers des travaux antérieurs, Duraipandiyar et al. (2010) avaient isolé 12 souches d'actinomycètes à partir du sol des montagnes de

l'Himalaya, ayant des propriétés antimicrobiennes et produisant une activité  $\alpha$ -amylase. Valan-Arasu et al. (2009) ont également isolé une souche de *Streptomyces spp.* ERI03 dotée de propriétés antimicrobiennes, à partir d'un sol rocheux de montagne, en Inde. De son côté, Abdulla (2009) a pu isoler 66 souches d'actinomycètes dont la prédominance a été formée des deux genres *Nocardia* et *Streptomyces*, à partir d'un sol extrêmement rocheux, à St. Katherine, en Egypte. Enfin notre étude prouve également, que l'eau du lac Agulmim situé dans la montagne de Tikjda, abrite des souches bactériennes appartenant aux actinomycètes. Malgré que le lac Agulmim n'a pas été exploité dans ce contexte auparavant, le sol de forêt de la montagne de Tikjda, entourant le lac est reconnu comme une source potentielle d'actinomycètes, notamment dans les travaux de Messis et al. (2013) où une nouvelle souche du genre *Streptomyces* à activité antifongique, a été isolée.

**Tableau V** : Recueil de la totalité des souches d'actinomycètes isolées et identification morphologique (identification préliminaire).

Souches	Source d'isolement	Conditions d'isolement	Caractères Macroscopiques	Caractères Microscopiques
<b>CA01</b>	Son de blé séché à l'air libre pendant 21 jours.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Forme avec cratères des colonies, surface lisse, blanche et compartimentée. Diamètre 3 à 4 mm.	Forme mycélienne ramifiée avec des hyphes non fragmentés.
<b>CA02</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies blanches, grandes, forme volcan. Diamètre 3 à 5 mm	Filaments fins et ramifiés.
<b>CA03</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies blanches, petites, bombées, surface lisse à sommet poudreux. Diamètre 2mm.	Filamenteux avec ramifications et quelques bacilles regroupés.
<b>CA04</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies poudreuses blanches Diamètre 4mm.	Filaments fins et ramifiés
<b>CA05</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies blanches ouvertes et plates. Diamètre 5mm.	Filaments ramifiés (forme branches d'arbre nette), et fins.
<b>CA06</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies jaunes, plates rosaces, sèches et brunâtres sur gélose ADA (Asparagin Dextrose Agar) et sur gélose à 1% CMC. Diamètre 4 à 9 mm.	Filaments fin et très ramifiés avec un haut degré de chevauchement.
<b>CA07</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies jaunes et blanches sous forme de rosace ouverte Diamètre 2 à 4 mm.	Filaments fin et très ramifiés avec un haut degré de chevauchement.
<b>CA08</b>	Sol de montagne rocheux (MEKLA)	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies beiges à grises, plates, surface sèche et rugueuses comme une rose de sable. Diamètre de 5 à 10mm.	Filaments et amas de filaments ramifiés et fins.
<b>CA09</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies beiges, compartimentées, très collées au fond de la gélose, surface sèche et légèrement élevée. Diamètre 3à 5 mm.	Filaments ramifiés en forme d'Arc, très fins que ceux des autres souches.

<b>CA10</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies blanches poudreuses. Diamètre 1,5 mm.	Filaments fins et ramifiés.
<b>CA11</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies volumineuses blanchâtres, bombées et poudreuses. Diamètre 7 à 10 mm.	Filaments fins et ramifiés.
<b>CA12</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies rondes et transparentes.	Filaments fins et ramifiés.
<b>CA13</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. Incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies blanches, grisâtres à maturité (portent des spores sur le MA), poudreuse et similaires à des volovans. De 5 à 7 mm de diamètre.	Filaments fins et ramifiés.
<b>CAB1, CAB2, CAB3</b>	Eau du lac Agulmim de Tikjda.	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies blanches, grisâtres à maturité (portent des spores sur le MA), poudreuse et similaires à des volovans. Diamètre : CATik1 : 5mm ; CATik2 : 7mm et CATik3 : 11mm.	Filaments ramifiés, septés et non fragmentaires. Ramifications binaire (structure communes pour l'ensemble des 03 souches.
<b>CA.M</b>	Sol de montagne rocheux (Mekla)	Géloses ISP1, ISP2, Bennett et Amidon Caséine. incubation : 28 à 30°C/7jours	Colonies blanches poudreuses. Diamètre 3 à 7 mm.	Filaments fins et ramifiés

Une étude micromorphologique approfondie a été réalisée sur les deux souches candidates à la production de la L-asparaginase (Tableau VI, figures 17 et 18)

## 2-2-Screening de la production de L-asparaginase et sélection des souches productrices

### 2.2.1. Sur milieu liquide



**Figure 14:** Photo montrant le résultat du screening de l'activité L-asparaginase sur bouillon ADS, de l'ensemble des 17 souches isolées.

De gauche à droite: Témoin négatif; CA01; CA02; CA03, CA04; CA05; CA06; CA07; CA08; CA09; CA10; CA11; CA12; CA13; CA14, CA15; CA16 et CAM.

La figure 14 illustre le résultat de la recherche de l'activité enzymatique L-asparaginase chez les 17 souches d'actinomycètes isolées. Il est à signaler que le virage du milieu au rose est l'indicateur de la production de l'enzyme, se traduisant par la production de l'ammoniac alcalinisant le milieu de culture. L'ammoniaque provient de l'hydrolyse de la L-Asparagine, unique source d'azote dans le milieu ADS.

En comparant la couleur des différents tubes, au témoin négatif, nous remarquons le virage au rose dans la majorité des tubes. Le tube Témoin contient du bouillon ADS nonensemencé.

En nous basant sur ce résultat, nous avons sélectionné les souches suivantes, comme productrices de la L-asparaginase:

*CA01; CA02; CA03; CA04; CA05; CA06; CA07; CA08; CA13; CA14; CA16; CAM.*

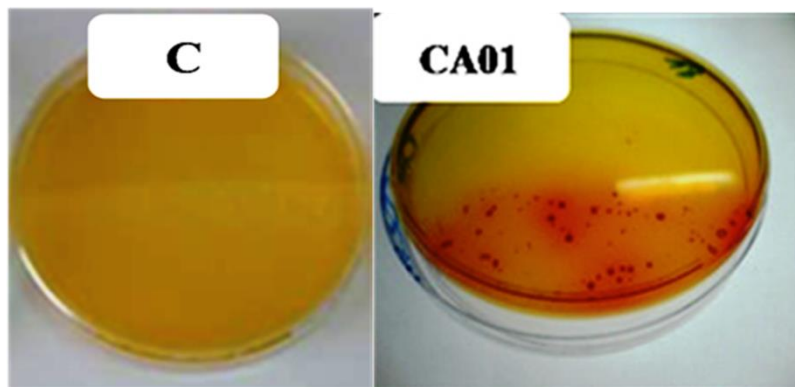
Comme on le voit, 12 souches parmi les 17 isolées et identifiées comme des actinomycètes, sont des productrices de L-asparaginase. La production de cette enzyme par les actinomycètes est fréquente, ce qui a été révélé dans les travaux d'El Naggar et al, (2015).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence la production de la L-asparaginase de souches isolées, sur milieux solide et liquide, afin de comparer l'aptitude des différentes souches bactériennes, à s'adapter à la composition et la structure du milieu.

### 2.2.2. Sur milieu solide

Le virage de la couleur du milieu gélosé ADS, autour des colonies développées, indique l'alcalinisation par production d'ammoniac (Figure 15). Comme la seule source d'azote du milieu est la L-Asparagine, son hydrolyse est à l'origine de la production d'ammoniac. L'hydrolyse de cet acide aminé dans les milieux de culture ensemencés, contrairement au témoin négatif, peut s'expliquer par la production de l'enzyme L-asparaginase (Imada et al., 1973 ; Meena et al., 2015). Le même résultat a été obtenu par Konečná et al. (2004) qui avaient isolé, sur gélose ADS, une souche d'actinomycète appartenant au genre *Arthrobacter* et produisant la L-asparaginase sur gélose ADS modifiée. Les mêmes auteurs ont réalisé l'optimisation de la production de l'enzyme, en tenant compte de la température et de la composition chimique du milieu de culture.

La photo de la figure ci-après montre le résultat de production de L-asparaginase, par *CA01* sur gélose ADS qui se manifeste par le virage au rose, autour des colonies bactériennes.



**Figure 15 :** Photos montrant le résultat de la production de la L-asparaginase sur gélose ADS par la souche *CA01*.

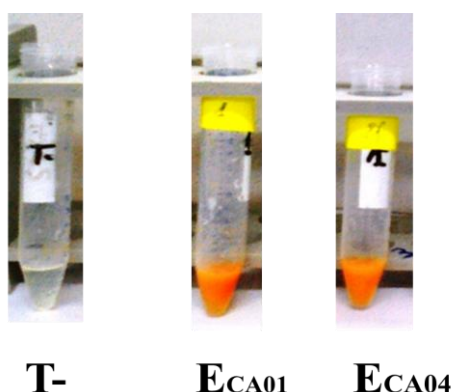
### 2.3. Dosage de l'activité L-asparaginase

La quantification de l'activité L-asparaginase par le dosage de l'ammoniaque du milieu réactionnel en utilisant le réactif de Nessler, nous a permis de sélectionner deux souches *CA01* et *CA04*, comme meilleures productrices de l'enzyme, en fonction du temps d'incubation. Au bout de 6 jours d'incubation des 12 souches productrices de l'enzyme, sur bouillon ADS, l'activité L-asparaginase a été dosée dans les surnageant. Le tableau VI, ci-après montre les résultats de ce dosage.

**Tableau VI :** Tableau montrant la quantification de l'activité L-asparaginase chez les souches productrices présélectionnées.

Extrait brute de chaque souche bactérienne	Activité L-asparaginase enregistrée (UI/ml)
CA01	0.66
CA02	0.25
CA03	0.11
CA04	0.73
CA05	0.21
CA06	0.09
CA07	0.14
CA08	0.25
CA13	0.15
CA14	0.012
CA16	0.10
CAM	0.22

Il apparaît bien, dans ce tableau, que les deux souches CA01 et CA04 possèdent une meilleure activité L-asparaginase, exprimée en terme d'activité enzymatique totale (UI/ml). La production rapide en enzyme et à des quantités élevées est un caractère important, sur la base duquel nous avons sélectionné ces deux souches pour le reste de notre travail.

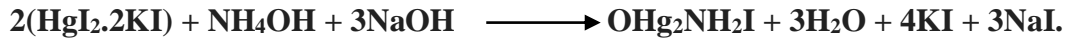


**Figure 16:** Photo illustrant le résultat du dosage de l'activité L-asparaginase produite par les deux souches sélectionnée.

**T- :** Témoin négatif ; **E<sub>CA01</sub> :** Extrait de la souche CA01 ; **E<sub>CA04</sub> :** Extrait de la souche CA04.

L'apparition du précipité jaune orangé montré sur la figure 16, dans le tube contenant l'extrait enzymatique (E) des cultures bactériennes, à l'opposé du tube témoin (T-), est due à la formation d'un complexe chimique iodure mercurique ammonobasique, suite à l'interaction du réactif de Nessler formé d'iodure de potassium KI et de l'iodure mercurique HgI<sub>2</sub> dans un milieu basique contenant du NaOH saturé, avec l'ammoniac, libéré suite à l'hydrolyse de la

L-Asparagine en acide aspartique et ammoniacque, par l'action de la L-asparaginase. La réaction catalysée est illustrée par (Leonard, 1963) comme suit :



Il est à préciser que l'ammoniac est dosé dans le milieu réactionnel sous forme de sel d'ammonium :  $\text{NH}_4^+$ .

L'activité L-asparaginase est calculée de la façon suivante (Imada, 1973):

Le taux d'ammonium  $\text{NH}_4^+$  est déduit en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage (Annexe 2) :

$$[\text{NH}_4^+](\mu\text{M}) = \left[ \frac{(\text{Abs} - 0,079)}{0,159} \right]$$

$$\text{Activité enzymatique totale } \mathbf{AT} = \mathbf{AE} \text{ (UI/ml)} = \frac{[\text{NH}_4^+] \cdot V_{TR}}{V_{Prél} \times V_{Ext\ enz} \times t}$$

$$\text{Activité spécifique : } \mathbf{AS} \text{ (UI/mg)} = \frac{\mathbf{AT}}{\mathbf{Taux\ de\ protéines\ (mg)}}$$

Avec :

$V_{TR}$  : volume totale de la réaction : 1,6ml.

$V_{prél}$  : volume du prélèvement de la réaction enzyme – substrat, pour le dosage : 0,2ml.

$V_{Ext\ enz}$  : volume de l'extrait enzymatique utilisé pour la réaction : 0,2ml.

$t$  : Temps de la réaction enzymatique à 37°C : 30min.

$\text{NH}_4^+$  : Produit de la réaction à doser.

1 UI d'enzyme représente la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1  $\mu\text{mole}$  d'ammoniacque par ml et par minute.

A travers cette étape, deux souches candidates à la production de la L-asparaginase *CA01* et *CA04*, ont été sélectionnées, pour la suite du travail. D'ailleurs, l'étape qui suit est consacrée à leurs caractéristiques physiologiques, biochimiques et morphologiques.

## 2-4-Identification biochimique et physiologique des deux souches potentiellement productrices de L-asparaginase

L'étude de quelques caractères biochimiques nous a aidés à compléter l'identification de nos souches (Tableau VII). En référence à d'autres travaux sur les actinomycètes producteurs de L-asparaginase, notamment les travaux de Meena et al. (2015), la majorité des caractères étudiés sont proches de nos résultats, notamment les voies de dégradation des composés chimiques organiques et minéraux : la dégradation du glucose, lactose et mannitol ; un

métabolisme oxydatif dans la voie d'attaque des glucides (observé sur le milieu MEVAG) ; la production de la catalase, de tryptophane désaminase (TDA) et de la nitrate réductase (NR) et l'hydrolyse des caséines. Ce sont d'ailleurs les caractères communs pour les deux souches *CA01* et *CA04*.

En plus, l'absence de production de gaz, de H<sub>2</sub>S et d'indole et l'absence de mobilité, sont fréquemment rencontrés chez les actinomycètes (Meena et al., 2015), qui sont des bactéries chimio-organotrophes, immobiles, aérobies le plus souvent et ayant un métabolisme oxydatif (Goodfellow et Williams, 1983).

Néanmoins, quelques différences phénotypiques ont été observées chez les deux souches, car la souche *CA01* isolée du son de blé tendre d'Algérie, présente, contrairement à la souche *CA04* isolée du la Agulmim, la capacité de dégrader l'amidon. Ce résultat est corrélé avec la composition du substrat de son isolement, car le son de blé représente la fraction externe du grain de blé (les enveloppes) qui sont riches en polymères polysaccharidiques et en minéraux, notamment en amidon. L'adaptation de la souche à un tel environnement est assurée, de ce fait, par la capacité à dégrader ces nutriments.

De plus, certains critères de résistance à certaines conditions de croissance ont été étudiés :

Il apparaît que les deux souches ne se comportent pas de la même façon à travers leur développement. Nous notons que la souche *CA01* se développe à une gamme de température allant de 25 à 37°C et à un intervalle de pH de 6 à 9, et peut supporter des concentrations de NaCl pouvant aller jusqu'à 20%. Nous pensons que la croissance optimale de cette souche à cet intervalle de température est due principalement à son habitat naturel en symbiose, avec le blé tendre. Quant à la souche *CA04*, elle se développe dans une gamme de température de 4 à 44°C, à des pH allant de 7 à 10 et tolère des concentrations en NaCl pouvant atteindre 25% (tableau VII). Nous pensons, que la souche *CA04*, isolée du lac Agulmim, caractérisé par son eaux glaciale en hiver et relativement froide même en été possède une grande aptitude d'adaptation au froid, puisque nous avons enregistrée une croissance de cette dernière, à 4°C. D'autre part, l'éventuelle présence d'une salinité dans le lac, pouvant provenir du ruissellement des eaux, à travers la roche du Djurdjura, serait un facteur ayant favorisé l'adaptation de la souche *CA04* à la forte salinité. Par contre, la plupart des souches d'actinomycètes identifiées et rapportées en littérature se développent à des gammes de pH et de température restreint, soit acidophiles ou alcalophiles, soit psychrophiles ou thermophiles, même si la majorité sont neutrophiles et mésophiles. En accord avec nos résultats, Ait Barka et al. (2015) ont rapporté que la majorité des actinomycètes se développent à des pH allant de 6 à 9.

Des résultats similaires avaient été rapportés auparavant par Williams et al., (1989), ou la majorité des actinomycètes décrits, sont neutrophiles, ayant des capacité à supporter des pH allant de 5,0 à 9,0 avec des optimums de 6,5 à 8,0. Cependant il existe des souches alcalophiles, comme des souches de *Streptomyces caeruleus*, rapportées par Taber (1960) et Mikami (1982) et qui poussent à des pH allant de 8,0 à 11,5 avec des optima de 9,0 à 9,5. D'autre part, certaines souches d'actinomycètes peuvent tolérer des pH acides, c'est le cas des phyto-pathogènes, parasites de la pomme de terre : *S. acidiscabis* (Lambert et Loria, 1989).

D'autre part une nouvelle souche d'actinomycètes, *Streptomyces yeochonensis*, acidophile, supportant des pH de 3,5 avec un optimum entre 5,0 et 5,5, a été isolée d'un sol en Corée du Sud, par l'équipe de Kim et al., (2004).

Concernant la croissance à différentes températures, la majorité des bactéries appartenant aux actinomycètes sont mésophiles et possèdent un optimum de croissance à 28°C. Cependant, certaines souches, comme *Streptomyces beijangensis*, isolée en Chine, par (Li et al., 2002), supportent des températures inférieures allant de 8 à 20°C. D'autre part, une minorité d'actinomycètes thermophiles existe, supportant des températures allant de 28 à 55°C. Il s'agit dans ce cas, de micro-organismes dits extrêmophiles vivant dans des sols arides, comme *S. thermogriseus* décrites par Xu et al., en 1998.

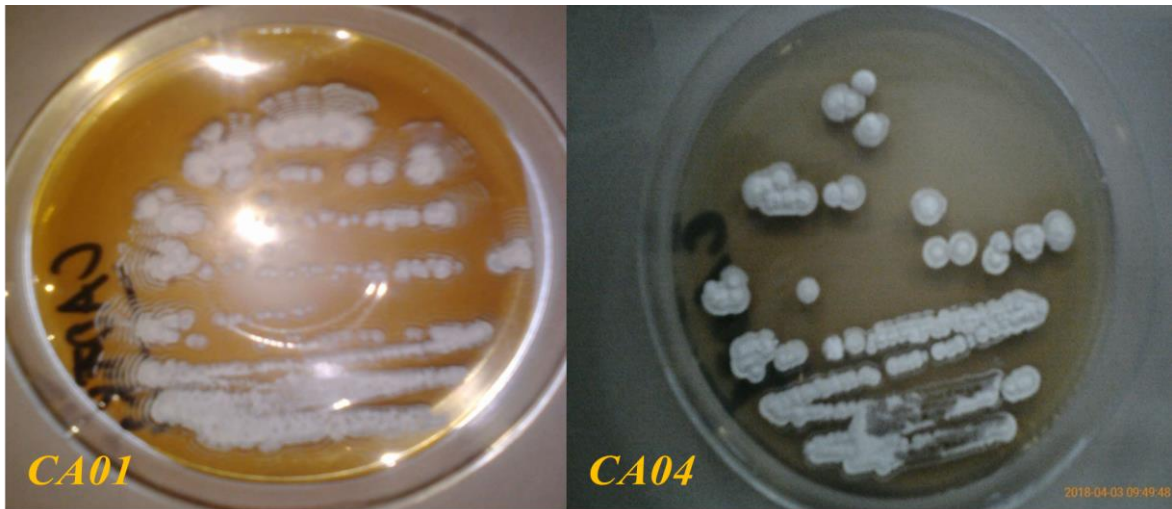
Concernant la croissance en présence du sel, plusieurs travaux ont rapporté l'aptitude des actinomycètes à se développer en présence de différentes teneurs en sels, notamment les souches isolées de milieux hyper salés (Tang et al., 2002 ; Lakshmipathy et al., 2010 ; Ballav et al., 2015).

**Tableau VII :** Tableau récapitulatif des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des deux souches *CA01* et *CA04*.

+ Présence du caractère étudié ; - Absence du caractère étudié.

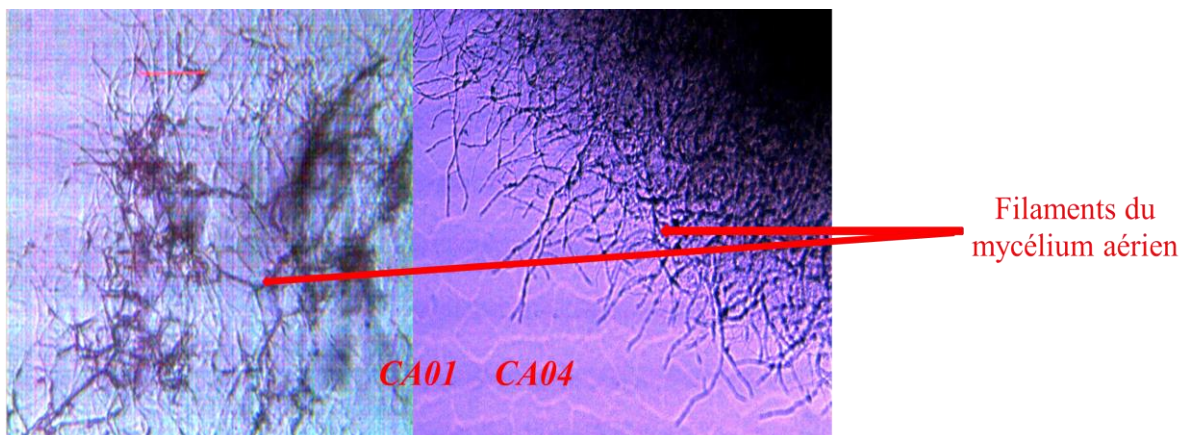
Caractéristiques étudiées	Souche CA01	Souche CA04
<b>Dégradation des sucres et dérivés</b>		
Glucose	+	+
Fructose	-	+
Lactose	+	+
Amidon	+	-
Citrate	+	-
Mannitol	+	+
<b>Production de gaz.</b>		
Production de H <sub>2</sub> S	-	-
Production d'indole	-	-
<b>Voies d'attaque des glucides (MEVAG)</b>		
Aérobiose	+	+
Anaérobiose	-	-
Uréase	-	+
Catalase	+	+
Oxydase	-	-
Tryptophane Désaminase (TDA)	+	+
Nitrate Réductase	+	+
VP	+	+
RM	-	-
Hydrolyse des Caséines	+	+
Teste de Mobilité	-	-
<b>Croissance à différentes températures</b>		
4°C	-	+
25°C	+	+
28°C	+	+
37°C	+	+
44°C	-	+
50°C	-	-
<b>Croissance à différents pH</b>		
5	-	-
6	+	-
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	-	+
11	-	-
<b>Tolérance de différentes concentrations en NaCl</b>		
5%	+	+
10%	+	+
15%	+	+
20%	+	+
25%	-	+
30%	-	-
Morphologie et couleur des spores.	Colonies rondes, spores localisées sur le MA	Colonies rondes et localisées sur le MA.
Couleur du mycélium du substrat (MS) / Couleur mycelium aérien (MA)	Gris / Blanc	Marron / Blanc
Apparence de l'aspect des spores	Grises et poudreuses	Grises et poudreuses
Gram	Gram +	Gram +

Les photos de la figure ci-après montrent l'aspect macroscopique des colonies des deux souches *CA01* et *CA04* sur milieu ISP<sub>2</sub>.



**Figure 17 :** Aspect macroscopique en culture sur milieu gélosé, des deux souches candidates.

Le diamètre des colonies sont respectivement de 3 à 4mm pour la souche *CA01* et de 4mm pour la souche *CA04*.



**Figure 18 :** Photo de microscopie photonique au grossissement  $40 \times 10$ , montrant l'aspect des hyphes filamenteux des deux souches candidates à la production de la L-asparaginase.  
**CA01:** Souche *CA01*; **CA04:** Souche *CA04*.

## **2-5-Identification moléculaire des deux souches potentiellement productrices de l'enzyme**

L'analyse des séquences complètes des gènes codant pour l'ARNr 16S ainsi que leur alignement aux séquences génétiques des bases de données (*GenBank*) *PBIL* et *NCBI*, par le logiciel *CHROMAS PRO*, ont prouvé des degrés de similarité de 99% au genre *Streptomyces* et 99% d'homologie à *Streptomyces hydrogenans* pour la souche *CA04*. Pour la souche *CA01*, la même démarche a montré un taux de similarité de 99,73% au genre *Streptomyces* avec un degré d'homologie de 99% lié à l'espèce *Streptomyces paulus*.

Les figures suivantes illustrent les résultats des arbres phylogénétiques obtenus pour les deux souches identifiées :

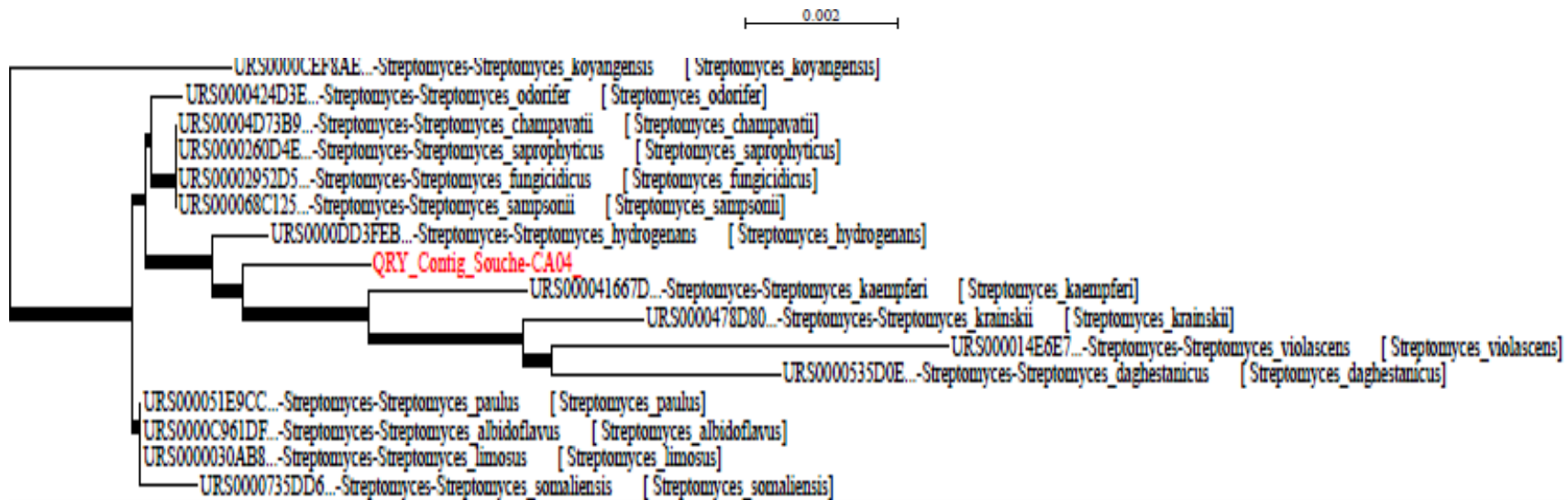
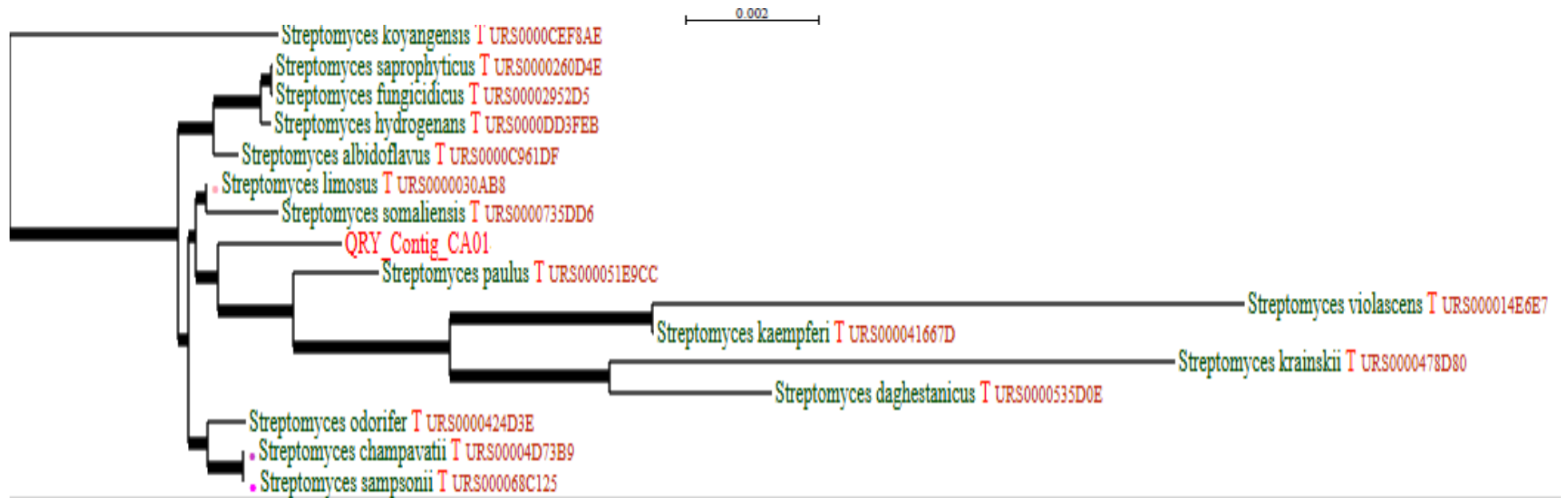


Figure 19 : L'arbre phylogénétique de la souche *Streptomyces hydrogenans* (CA04).



**Figure 20 :** L'arbre phylogénétique de la souche *Streptomyces paulus* (CA01).

Les séquences complètes du gène codant l'ARNr 16S des deux souches sont données dans l'annexe 04.

D'autre part les deux séquences nucléotidiques sont déposées dans la banque génomique *NCBI* sous les deux numéros d'accès :

*SUB5200153 Contig\_Souche-CA04\_16S-Comple* *MK530175* : pour *Streptomyces hydrogenans* CA04.

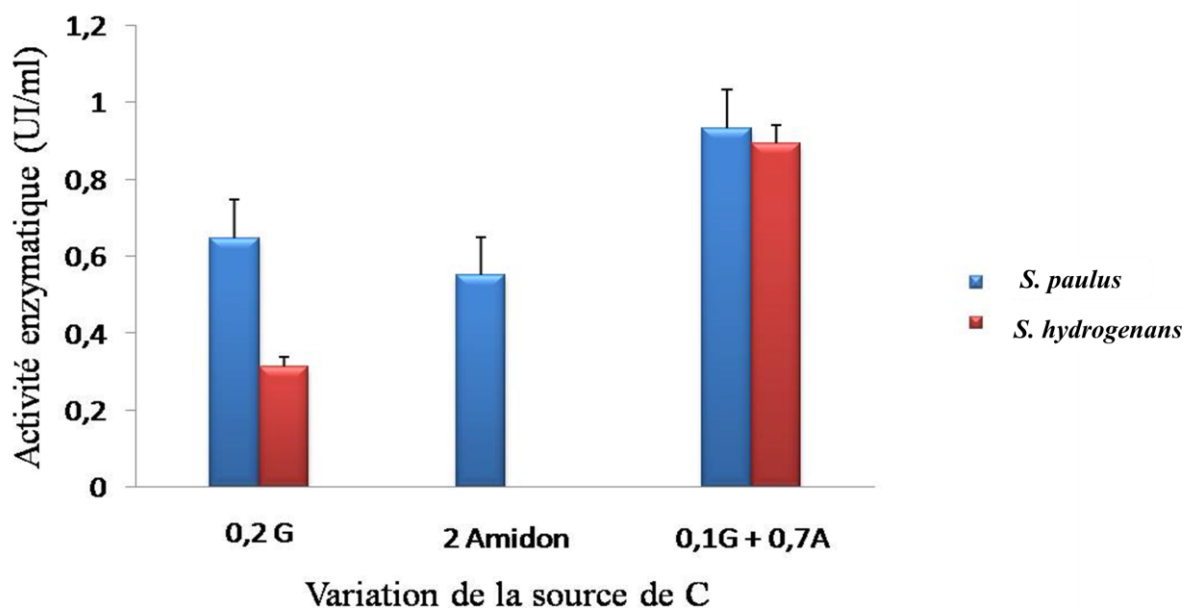
*SUB5247581 Contig MK574832* : pour *Streptomyces paulus* CA01.

### **2-6-Standardisation et maximisation de la production de l'enzyme**

#### **2-6-1-Les sources de C et N**

##### **2-6-1-1-Standardisation de la source de carbone dans le milieu ADS**

L'histogramme ci-après représente la variation de la production de la L-asparaginase par les deux souches *S. paulus* (CA01) et *S. hydrogenans* (CA04) en fonction des différentes sources de carbone introduites simultanément dans le milieu ADS de production de l'enzyme.



**Figure 21** : Histogramme de la variation de l'activité L-asparaginase en fonction de la variation de la source de carbone, pour les deux souches *Streptomyces paulus* (*S. paulus*) et *Streptomyces hydrogenans* (*S. hydrogenans*).

0,2G : Glucose à 0.2% ; 2 Amidon : amidon à 2% ; 0,1G + 0,7A : glucose 0,1% et amidon 0,7%

Nous précisons que le taux de production en L-asparaginase est représenté par l'activité enzymatique L-asparaginase dosée. L'histogramme de la figure 21 montre que la variation de la source de carbone affecte l'activité L-asparaginase des deux souches, exprimée en termes d'activité totale (UI/ml) et révélée par Nesslerisation. Chez la souche *Streptomyces paulus* (CA01), l'activité enzymatique est plus importante en présence de la combinaison 0,1% de glucose avec 0,7% d'amidon, avec une activité de 0,93 UI/ml, contrairement à 0,64 UI/ml obtenue dans les conditions usuelles où le bouillon de culture ADS renferme 0,2% de glucose, d'une part, et à 0,55 UI/ml obtenue en présence d'amidon seul à 2%.

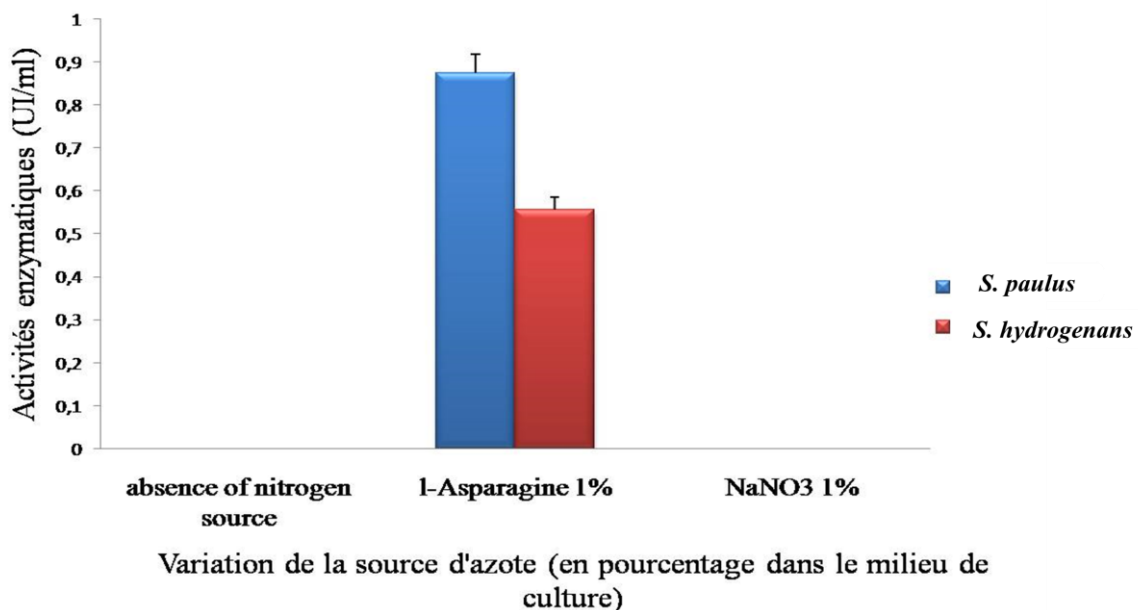
Pour la souche *Streptomyces hydrogenans* (CA04), nous remarquons que l'activité enzymatique est meilleure en présence de la même combinaison: 0,1% de glucose avec 0,7% d'amidon, avec une activité L-asparaginase de 0,89 UI/ml, par rapport à 0,36 UI/ml obtenue, en présence de glucose à 2%, dans le milieu usuelle ADS. Par contre, pour la souche CA04, nous notons l'absence de l'activité enzymatique, en utilisant l'amidon seul à 2%, comme source de carbone.

Nous remarquons que la capacité à produire la L-asparaginase par les deux souches, est augmentée en présence de glucose et amidon avec un rapport (glucose / amidon : 2/14). D'autre part, notre démarche a été inspirée de la procédure adaptée par (El-Naggar et al., 2015) où la meilleure activité L-asparaginase produite par une souche de *Streptomyces*, a été obtenue en utilisant, comme source de carbone, le glucose / amidon avec un rapport de 2/20. Il est important de signaler que ce résultat possède un intérêt économique dans le procédé industriel de la production de l'enzyme, à grande échelle, et ce, en diminuant le taux de glucose, qui est un substrat coûteux, de 50% par rapport au milieu usuel ADS, et en ajoutant

de l'amidon, qui est un polymère glucidique, considéré relativement moins cher vu que son procédé d'obtention n'est pas coûteux. D'autre part, l'amidon est largement disponible dans la nature, notamment à travers la valorisation de sous produits agricoles comme le son de blé et les racines des végétaux supérieurs.

Nous pouvons noter également que contrairement à la souche *Streptomyces hydrogenans*, la souche *Streptomyces paulus* est capable de dégrader et assimiler l'amidon, comme unique source de carbone, dans le milieu. Cela est peut être dû à son origine d'isolement, le son de blé tendre, un substrat riche en amidon.

### 2-6-1-2-Standardisation de la source d'azote dans le milieu ADS



**Figure 22** : Histogramme de la variation de l'activité L-asparaginase en fonction de la variation de la source d'azote, pour les deux souches *Streptomyces paulus* (*S. paulus*) et *Streptomyces hydrogenans* (*S. hydrogenans*).

Absence of nitrogen source : En absence de source d'azote ; l-Asparagine 1% : l-asparagine à 1% ; NaNO<sub>3</sub> 1% : NaNO<sub>3</sub> à 1%.

Nous avons réalisé une variation de la source d'azote en utilisant différents substrats azotés. Nous notons, selon l'histogramme de la figure 22, que l'activité L-asparaginase a été exprimée par les deux souches CA01 et CA04, uniquement en présence de la L-Asparagine à 1%.

Les deux souches *S. paulus* et *S. hydrogenans* ont produit la L-asparaginase avec des valeurs respectives de 0,87 UI/ml et 0,55 UI/ml. Il y a donc absence de la production de l'enzyme, en présence de NaNO<sub>3</sub> à 1% ou encore en absence de toute source d'azote.

Ce résultat obtenu peut s'expliquer par l'induction de la biosynthèse de la L-asparaginase, chez les deux souches, par le substrat L-Asparagine.

Nous notons également, que la souche *Streptomyces paulus* présente l'activité enzymatique la plus importante, dans ces conditions.

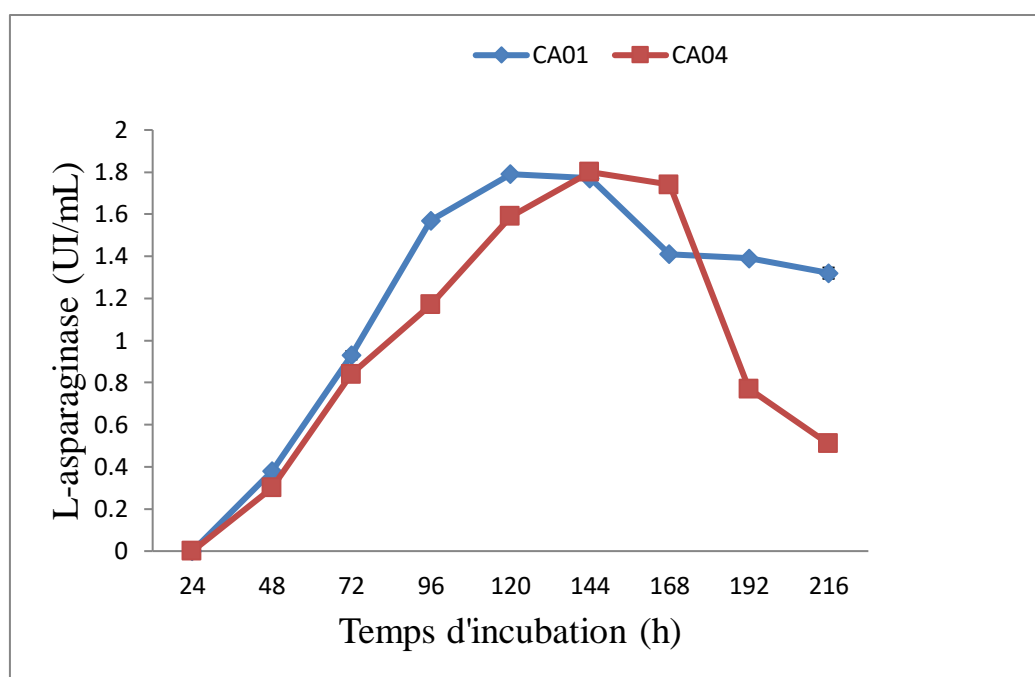
La faible production de L-asparaginase enregistrée chez les deux souches, lors de l'utilisation du glucose seul comme source de carbone à 0,2% par rapport à 0,1%, est expliquée par (Kiranmayi et al., 2013) en accord avec (Mohana et al., 2013), par l'acidité générée lors de la dégradation du glucose en quantité élevée, au cours de la fermentation bactérienne, ce qui peut empêcher la production de L-asparaginase. Ainsi, l'ajout de l'amidon dans le milieu de culture avait un effet positif, en augmentant la productivité de l'enzyme, car, selon (Meena, 2015), l'amidon génère les conditions alcalines dans le milieu. Dans le même contexte, il a été signalé que l'amidon était la meilleure source de carbone pour la production de L-asparaginase par la souche *Streptomyces longporusflavus* (Abdel-Fattah et al., 1996). (Mukherjee et al., 2000) a conclu que le glucose additionné d'amidon, constituent les meilleures sources de carbone pour une production maximale de L-asparaginase.

D'autre part, Geckil et al, (2006) ont insisté sur le fait que le glucose est utilisé préférentiellement par les bactéries productrices pendant la première période de fermentation et que l'acidité générée par sa dégradation est souvent neutralisée par la production d'ammoniac à partir de l'hydrolyse de la L-Asparagine.

Concernant la standardisation de la source d'azote, La présence de l'acide aminé L-Asparagine a été nécessaire pour la production de l'enzyme car, dans les travaux d'Agarwal et al. (2010), il a été conclu que la L-Asparagine est un inducteur de la production de L-asparaginase. Selon Geckil et Gencer (2006), c'est la L-asparagine qui est hydrolysée par la L-asparaginase, menant à la production de  $\text{NH}_3$ , qui alcalinise le milieu de culture. Selon les mêmes auteurs, le pH alcalin optimise la production de l'enzyme. Pour ces raisons, le pH du milieu n'a pas été pris en compte dans notre démarche expérimentale, mais nous utilisons un pH initial de 7 pour le milieu ADS, qui augmentera après la production d'ammoniac.

### **2-6-2-Durée d'incubation et cinétique de production de la L-asparaginase**

Les graphes ci-après illustrent la cinétique de production de la L-asparaginase, par les deux souches, en fonction de la durée d'incubation, dans le bouillon ADS, dont les sources de carbone et d'azote sont standardisées selon les meilleures conditions obtenues dans l'étape précédente. Le but de cette étape est donc, l'étude de l'influence du temps de la culture sur le rendement en enzyme. Nous avons tracé ces courbes, en réalisant le dosage de l'activité enzymatique, dans les surnageant de culture, par Nesslerisation. L'activité enzymatique totale (UI/ml) a été enregistrée quotidiennement.



**Figure 23 :** Cinétique de production de la L-asparaginase par les deux souches *Streptomyces paulus* (CA01) et *Streptomyces hydrogenans* (CA04).

La production de l'enzyme a commencé à partir de 24h d'incubation, dans le bouillon ADS standardisé, à une température de 28°C. La phase d'attente est due, probablement, à l'assimilation de la source de carbone, du milieu ADS, en l'occurrence le glucose et l'amidon (chez la souche CA01). Après 48h, l'activité enzymatique commence à augmenter, probablement par épuisement de la source de carbone et le début de dégradation de la source d'azote qui est la L-Asparagine. Cela a donc induit la biosynthèse de la L-asparaginase, dont l'activité a augmenté pour atteindre un maximum de 1,73 UI/ml pour la souche *Streptomyces paulus* et 1,89UI/ml pour la souche *Streptomyces hydrogenans*, au bout de 6 jours d'incubation (144h). Enfin, la diminution graduelle de l'activité enzymatique peut s'expliquer là encore, soit pas l'épuisement du substrat azoté (le substrat de l'enzyme), ou par la saturation de l'enzyme produite.

La production maximale de L-asparaginase par les deux souches isolées dans le présent travail, est enrichie après 144h (6 jours), puis commence à diminuer. Ce résultat est attendu car il est fréquent chez les actinomycètes, où pratiquement l'activité maximale de la L-asparaginase est enregistrée après 6 jours d'incubation sur du milieu ADS. Nous supposons que la production enzymatique maximale est atteinte lors de la phase stationnaire de croissance des souches, au delà de laquelle la diminution du taux de substrat inducteur provoquerait l'arrêt de la biosynthèse de l'enzyme. Ce qui a été proposé par Heinemann et al., (1969) qui ont obtenu un maximum de L-asparaginase à 51h d'incubation de *Serratia marcescens* SB08, ce qui correspond, selon eux, à la phase stationnaire de la bactérie. Selon les mêmes auteurs, la diminution du rendement en enzyme à partir de cette phase est due à son interaction avec les molécules issues de la lyse des cellules. De plus, il a été conclu que la production maximale de L-asparaginase sur le bouillon ADS, par la souche *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29, était atteinte après 144 h (06 jours) d'incubation (Meena, 2015). En

effet, dans les travaux de (Mostafa et al., 1979) et ceux de (Deshpande et al., 2014), il a été rapporté que la production maximale de L-asparaginase dans *Streptomyces collinus* et *Streptomyces gulbargensis*, respectivement, avait été obtenue au jour 06. Cependant, dans les travaux de (Amena et al., 2010), un maximum d'activité de la L-asparaginase a été observé après 72h d'incubation.

Jusque là les conditions idéales déduites, pour la production de la L-asparaginase par les deux souches candidates, en adoptant un plan *OFAT*, basé sur la variation d'un seul facteur à la fois, sont: glucose 0,1%, amidon 0,7%, L-Asparagine 1%, dans un bouillon ADS modifié ayant une composition de base de  $N_2HPO_4$  0,05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01%, à une température d'incubation de 28°C pendant 6 jours.

Dans l'étape suivante, nous avons entrepris de réaliser une étude mathématique basée sur l'optimisation des facteurs les plus influençant sur la production de la L-asparaginase, afin d'augmenter le rendement de production. En nous basant sur l'étape préliminaire de standardisation, nous avons choisi 3 facteurs pour cette étude: la température d'incubation, la concentration en substrat (L-Asparagine) et la concentration en glucose. Nous signalons que la concentration en amidon est, néanmoins, fixée à 7 g/L (0,7%), d'après le résultat obtenu dans l'étape de standardisation, qui stipule, qu'un maximum d'activité enzymatique, a été obtenu en présence de cette concentration. De ce fait, nous n'avons pas tenu compte de la variation du taux de l'amidon, au cours de l'étape d'optimisation.

### **2-7- Optimisation de la production de L-asparaginase par les deux souches candidates**

Dans cette étape, nous avons réalisé un plan d'expérience (*DOE: Design Of Experiments*) dans le but d'étudier l'effet de 3 facteurs sélectionnés, ainsi que l'interaction entre ces facteurs, sur le taux de production en L-asparaginase produite par chacune des deux souches.

#### **2-7-1- Les matrices des expériences**

Le tableau ci-après représente les 15 expériences réalisées du plan d'expérience conçu pour l'optimisation de production en L-asparaginase extracellulaire par la souche *Streptomyces paulus* CA01. La colonne *StdOrder* (Standard Order : ordre standard) représente l'ordre non randomisé des expériences. *RunOrder* (Ordre d'exécution ou ordre d'essai) est l'ordre dans lequel doivent s'effectuer les expériences afin de réduire le risque de biais dans un ordre aléatoire. La colonne *Blocks* représente les blocs, car un bloc est une variable catégorique qui identifie des groupes d'essais expérimentaux menés dans des conditions relativement homogènes. L'utilisation de cette notion dans la conception et l'analyse expérimentales permet de minimiser les biais et la variance d'erreur dus à des facteurs non contrôlés. Les blocs peuvent expliquer la variation de la variable de réponse qui n'est pas causée par les facteurs expérimentaux. La colonne *FITS* (Erreur type des ajustements : ou erreur standard des ajustements) représente la variation de la réponse moyenne estimée pour un ensemble spécifié de valeurs de prédicteurs, de niveaux de facteurs ou de composants et est utilisée pour générer l'intervalle de confiance de la prédiction. Plus l'erreur type est petite, plus la réponse

moyenne estimée est précise. La colonne *RESI* représente l'erreur résiduelle ou les résidus, calculés par la différence entre la réponse obtenue lors de l'expérimentation (*L-ASP activ* : activité L-asparaginase) et *FITS1* données par le modèle obtenu.

**Tableau VIII** : Matrice des expériences pour l'optimisation de la production de L-

StdOrder	RunOrder	Blocks	T °C	SC %	GC %	L-ASP activ (IU/mL)	FITS1	RESI1
3	1	1	-1	1	0	3,11	3,26	-0,15
8	2	1	1	0	1	2,08	2,65	-0,57
11	3	1	0	-1	1	4,11	4,73	-0,62
7	4	1	-1	0	1	3,61	4,02	-0,41
4	5	1	1	1	0	1,33	1,89	-0,56
10	6	1	0	1	-1	3,01	3,9	-0,89
1	7	1	-1	-1	0	2,02	1,58	0,44
2	8	1	1	-1	0	0,48	0,21	0,27
9	9	1	0	-1	-1	2,14	2,23	-0,09
5	10	1	-1	0	-1	1,64	1,52	0,12
15	11	1	0	0	0	7,5	7,12	0,38
6	12	1	1	0	-1	1	0,14	0,86
14	13	1	0	0	0	6,98	7,12	-0,14
12	14	1	0	1	1	8,01	6,41	1,6
13	15	1	0	0	0	6,88	7,12	-0,24

asparaginase par *Streptomyces paulus* CA01, obtenue par le plan Box Behnken

**Tableau IX :** Matrice des expériences pour l’optimisation de la production de L-asparaginase par *Streptomyces hydrogenans* (CA04), obtenue par le plan Box Behnken.

StdOrder	RunOrder	Blocks	T	SC	GC	L-ASP (IU/ml)	FITS1	RESI1
3	1	1	-1	1	0	2,16	2,10	0,06
1	2	1	-1	-1	0	1,01	0,93	0,08
15	3	1	0	0	0	3,12	3,16	-0,04
2	4	1	1	-1	0	4,29	4,35	-0,06
9	5	1	0	-1	-1	4,99	5,18	-0,19
4	6	1	1	1	0	0,82	0,90	-0,08
7	7	1	-1	0	1	2,09	2,34	-0,25
14	8	1	0	0	0	3,2	3,16	0,04
13	9	1	0	0	0	3,15	3,16	-0,01
10	10	1	0	1	-1	2,6	2,77	-0,17
12	11	1	0	1	1	4,8	4,61	0,19
5	12	1	-1	0	-1	0,66	0,55	0,11
8	13	1	1	0	1	2,11	2,22	-0,11
11	14	1	0	-1	1	4,65	4,48	0,17
6	15	1	1	0	-1	3,12	2,87	0,25

Ces matrices randomisées représentent l’ensemble des réponses obtenues durant les 15 expériences réalisées.

Selon les matrices obtenues, nous pouvons remarquer que l’activité L-asparaginase expérimentale L-ASP varie de 0,46 à 8,01 UI/ml et l’activité résiduelle FITS (calculée par le modèle) de 0,21 à 7,12 UI/ml, pour la souche *S. paulus*, ce qui a engendré une erreur résiduelle RESI maximale de +1,60 UI/ml. Pour la souche *S. hydrogenans*, l’activité L-asparaginase expérimentale L-ASP varie de 0,82 à 4,99 UI/ml alors que l’activité résiduelle RESI est de 0,90 à 5,18 UI/ml, engendrant une erreur résiduelle maximale de 0,25 UI/ml. Sachant que l’erreur résiduelle est déduite de la soustraction de l’activité enzymatique expérimentale et l’activité résiduelle, il apparaît clairement, que les valeurs sont proches, vue la RESI faible. Cela est en faveur d’un modèle avec une variabilité étroite et une forte précision.

D’autre part, les réponses obtenues quant aux points au centre sont également très proches, avec les valeurs (7,5 ; 6,98 ; 6,88) UI/ml chez *Streptomyces paulus* et les valeurs (3,12 ; 3,20 ; 3,15) UI/ml chez *Streptomyces hydrogenans*. Ce résultat est en faveur d’une expérimentation de parfaite répétabilité.

### 2-7-2-Analyse statistique des données expérimentales

**Tableau X :** Tableau global de l'estimation des paramètres statistiques pour la production de la L-asparaginase par *Streptomyces paulus* (CA01).

Term	Effect	Coefficient	SE Coefficient	T-value	P-value	VIF
Constant		2.6679	0.0842	31.63	0.000	
T	-0.5193	-0.2596	0.0517	-5.03	0.004	1.00
SC	0.4694	0.2347	0.0517	4.54	0.006	1.00
GC	0.6803	0.3402	0.0517	6.59	0.001	1.00
T <sup>2</sup>	-2.0183	-1.0091	0.0760	-13.27	0.000	1.01
SC <sup>2</sup>	-0.8020	-0.4010	0.0760	-5.27	0.003	1.01
GC <sup>2</sup>	-0.5060	-0.2530	0.0760	-3.33	0.021	1.01
T×SC	0.0591	0.0295	0.0730	0.40	0.703	1.00
T×GC	-0.0886	-0.0443	0.0730	-0.61	0.571	1.00
SC×GC	0.2654	0.1327	0.0730	1.82	0.129	1.00

Avec : *Term* : les différents termes du modèle ; *Effect* : les effets des différents termes du modèle, sur la réponse *Y* ; *SE Coefficient (Standard Error Coefficient)* : les coefficients de l'erreur standard. *VIF* : mesure l'ampleur de la variance d'un coefficient de régression.

**Tableau XI :** Analyse de la variance (ANOVA) de tous les effets du modèle quadratique, pour l'étude statistique concernant la production de l'enzyme par la souche *Streptomyces paulus* (CA01).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	P-value
Model	9	6.22248	0.69139	32.39	0.001
Linear	1				
T	1	0.53930	0.53930	25.27	0.004
SC	1	0.44069	0.44069	20.65	0.006
GC	1	0.92568	0.92568	43.37	0.001
Square	1				
T <sup>2</sup>	1	3.76002	3.76002	176.17	0.000
SC <sup>2</sup>	1	0.59375	0.59375	27.82	0.003
GC <sup>2</sup>	1	0.23637	0.23637	11.07	0.021
2-Way interaction	1				
T×SC	1	0.00349	0.00349	0.16	0.703
T×GC	1	0.00785	0.00785	0.37	0.571
SC×GC	1	0.10672	0.10672	3.30	0.129
Error	5	0.10672	0.02134		
Lack-of-fit	3	0.09903	0.03301	8.58	0.106
Pure Error	2	0.00769	0.00385		
Total	14	6.32920			

Avec : *DF (Degree of Free)* : les degrés de liberté des différents termes du modèle ; *Adj SS (Adjusted sum of squares)* : Les sommes des carrés ajustés des termes du modèle ; *Adj MS (Adjusted means squares)* : Les carrés des moyennes ajustés des termes du modèle.

### Résumé des paramètres de corrélation liés au modèle de l'étude de la réponse

$S = 0.146094$ ;  $R^2 = 98.31\%$  ;  $R^2$  adjusted = 95.28% ;  $R^2$  predicted = 74.69%

L'analyse de la variance est utilisée pour déterminer la significativité statistique des variables étudiées. Selon le tableau de l'ANOVA, nous remarquons que les effets linéaires et les carrés des effets correspondant aux facteurs étudiés sont significatifs avec des probabilités d'apparition  $P\text{-value} < 5\%$ . Cependant, les interactions entre les variables des mêmes facteurs sont non significatives. D'ailleurs, les tableaux suivants montrent les effets des facteurs significatifs, après avoir éliminé, les effets non significatifs du modèle :

**Tableau XII :** Tableau de l'estimation des paramètres statistiques du modèle réduit en éliminant les facteurs non significatifs, pour *Streptomyces paulus* (CA01).

Term	Effect	Coefficient	SE Coefficient	T-Value	P-Value	VIF
Constant		7,120	0,492	14,46	0,000	
T	-1,373	-0,686	0,301	-2,28	0,052	1,00
SC	1,678	0,839	0,301	2,78	0,024	1,00
GC	2,505	1,253	0,301	4,15	0,003	1,00
T <sup>2</sup>	-7,620	-3,810	0,444	-8,59	0,000	1,01
SC <sup>2</sup>	-3,150	-1,575	0,444	-3,55	0,008	1,01
GC <sup>2</sup>	-2,455	-1,228	0,444	-2,77	0,024	1,01

Après avoir éliminer les variables non significatives, l'analyse de la variance du modèle simplifié est représentée sur le tableau XIII. Il faut noter que les facteurs de corrélation ont diminué, mais l'équation de régression du modèle, est plus représentative.

**Tableau XIII :** Analyse de la variance du modèle simplifié, pour la souche *Streptomyces paulus* (CA01).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	84,2995	14,0499	19,32	0,000
Linear					
T	1	3,7675	3,7675	5,18	0,052
SC	1	5,6280	5,6280	7,74	0,024
GC	1	12,5501	12,5501	17,26	0,003
Square					
T <sup>2</sup>	1	53,5979	53,5979	73,72	0,000
SC <sup>2</sup>	1	9,1592	9,1592	12,60	0,008
GC <sup>2</sup>	1	5,5634	5,5634	7,65	0,024
Error	8	5,8165	0,7271		
Lack-of-Fit	6	5,5949	0,9325	8,42	0,110
Pure Error	2	0,2216	0,1108		
Total	14	90,1159			

**Résumé des paramètres de corrélation liés au modèle de l'étude de la réponse**

$S = 0.852678$  ;  $R^2 = 93,55\%$  ;  $R^2$  adjusted = 88,70% ;  $R^2$  predicted = 74,61%

En regardant le tableau des coefficients des effets (tableau XII), nous remarquons que la température affecte négativement la production en L-asparaginase par la souche *Streptomyces paulus*, avec un coefficient de -0,686. Ce qui veut dire que l'augmentation de la température dans l'intervalle de l'étude (25 à 30°C), engendre une diminution du taux d'enzyme. Il est important de signaler que l'intervalle de l'étude a été choisi selon les résultats de Meena et al. (2015) stipulant que la production de L-asparaginase chez les actinomycètes, ne requière pas de grandes températures et, est souvent proche de la température optimale de croissance des souches productrices. Les autres facteurs influencent positivement la production de L-asparaginase, par la souche *S. paulus*, avec des coefficients positifs. Dans ce contexte, l'effet de la L-asparagine est représenté par un coefficient de +0,839 et celui de la concentration en glucose avec +1,253. Il est important de signaler, néanmoins, que le glucose influence beaucoup la production de l'enzyme.

La significativité du modèle de l'étude est confirmée par un coefficient de corrélation  $R^2$  de 98,31%, proche du coefficient de corrélation ajusté ( $R^2$  adj) de 95,28%. Ce qui prouve une bonne corrélation entre les réponses expérimentales et les réponses prédites par le modèle. Enfin, nous avons supprimé les variables non significatives du modèle afin d'obtenir un modèle simplifié qui décrit parfaitement la réponse (activité L-asparaginase) en la faisant corréler avec les variables significatives des facteurs choisis dans cette étude.

L'équation de régression du modèle quadratique simplifié est représentée ci-après:

$$Y = 2.6679 - 0.2596T + 0.2347SC + 0.3402GC - 1.0091T^2 - 0.4010SC^2 - 0.2530GC^2 \quad (\text{II}).$$

Y représente l'activité L-asparaginase.

**Tableau XIV:** Estimation des paramètres statistiques pour la production de la L-asparaginase par *Streptomyces hydrogenans* (CA04).

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		3,157	0,141	22,33	0,000	
T	1,1050	0,5525	0,0866	6,38	0,001	1,00
SC	-1,1400	-0,5700	0,0866	-6,58	0,001	1,00
GC	0,5700	0,2850	0,0866	3,29	0,022	1,00
T <sup>2</sup>	-3,352	-1,676	0,127	-13,15	0,000	1,01
SC <sup>2</sup>	1,178	0,589	0,127	4,62	0,006	1,01
GC <sup>2</sup>	1,028	0,514	0,127	4,04	0,010	1,01
T×SC	-2,310	-1,155	0,122	-9,43	0,000	1,00
T×GC	-1,220	-0,610	0,122	-4,98	0,004	1,00
SC×GC	1,270	0,635	0,122	5,19	0,004	1,00

**Tableau XV :** Analyse de la variance (ANOVA) pour l'étude statistique concernant la production de l'enzyme par *Streptomyces hydrogenans* (CA04).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	27,7207	3,0801	51,38	0,000
Linear					
T	1	2,4420	2,4420	40,74	0,001
SC	1	2,5992	2,5992	43,36	0,001
GC	1	0,6498	0,6498	10,84	0,022
Square					
T <sup>2</sup>	1	10,3695	10,3695	172,99	0,000
SC <sup>2</sup>	1	1,2817	1,2817	21,38	0,006
GC <sup>2</sup>	1	0,9761	0,9761	16,28	0,010
2-Way Interaction					
T×SC	1	5,3361	5,3361	89,02	0,000
T×GC	1	1,4884	1,4884	24,83	0,004
SC×GC	1	1,6129	1,6129	26,91	0,004
Error	5	0,2997	0,0599		
Lack-of-Fit	3	0,2964	0,0988	60,50	0,016
Pure Error	2	0,0033	0,0016		
Total	14	28,0204			

**Résumé des paramètres de corrélation liés au modèle de l'étude de la réponse**

S = 0,244833 ; R-sq = 98,93% ; R-sq(adj)= 97,01% ; R-sq(pred) = 83,05%.

Selon le tableau de l'ANOVA de la production de la L-asparaginase par la souche *Streptomyces hydrogenans*, nous remarquons que l'ensemble des effets des 3 variables du modèle quadratiques, sont significatives, avec des probabilités d'apparition  $P\text{-value} < 5\%$ . Ce qui prouve, qu'en plus des effets linéaires et des carrés des effets, les interactions quadratiques des variables étudiées sont également significatives, d'où l'importance de l'interaction entre les facteurs sélectionnés, sur la production de l'enzyme par la souche *Streptomyces hydrogenans*.

D'autre part, selon le tableau des effets et des coefficients, la température et la concentration en glucose influencent positivement, la réponse, avec des coefficients respectifs de +0,55 et +0,28, tandis que la concentration en substrat influence négativement, la production en enzyme. Cela veut dire que dans les intervalles d'étude, l'augmentation de la température et de la concentration en glucose permettrait d'augmenter le rendement en enzyme, alors que la concentration en substrat est inversement proportionnelle à la production de l'enzyme L-asparaginase. Concernant donc l'effet du substrat (L-asparagine), il apparaît qu'il induit la production de L-asparaginase à des concentrations inférieures dans l'intervalle choisi.

La significativité du modèle représentant la production de la L-asparaginase par la souche *Streptomyces hydrogenans* est prouvée par le coefficient de corrélation  $R^2$  de 98,93%, proche du coefficient de corrélation ajusté ( $R^2 \text{ adj}$ ) qui est égal à 97,01%.

Le rapprochement des valeurs des  $R^2$  et  $R^2$  ajusté explique une meilleure corrélation entre les réponses expérimentales et les réponses prédites par le modèle. Le modèle est d'ailleurs représenté, mathématiquement par l'équation de régression du modèle quadratique suivante :

$$Y = 3,157 + 0,5525 T - 0,5700 SC + 0,2850 GC - 1,676 T^2 + 0,589 SC^2 + 0,514 GC^2 - 1,155 T \times SC - 0,610 T \times GC + 0,635 SC \times GC \quad \text{(III)}.$$

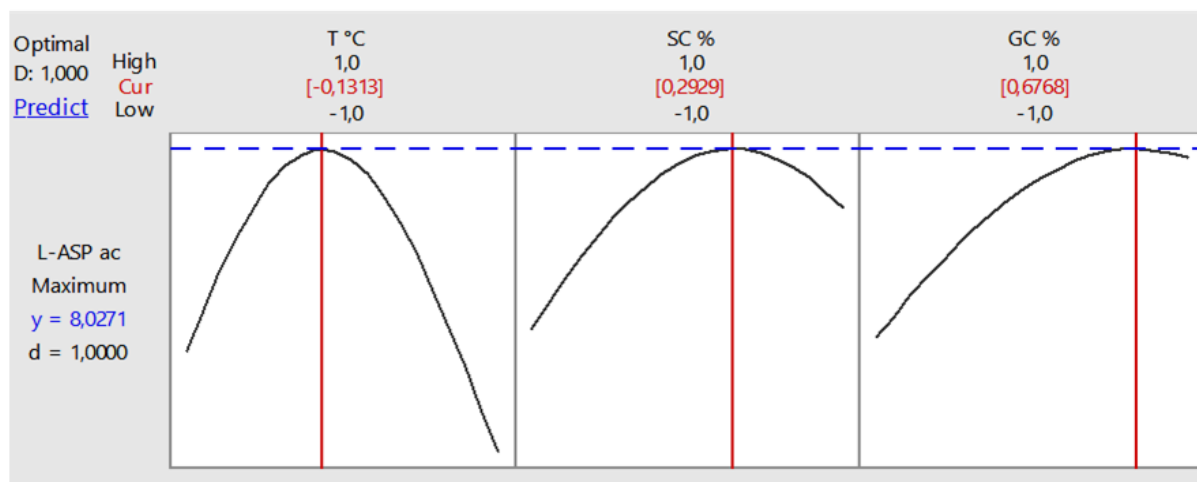
$Y$  représente l'activité L-asparaginase.

Il apparaît clairement que les 03 facteurs sélectionnés pour l'étude influencent de différentes manières sur l'aptitude des deux souches sélectionnées, *Streptomyces paulus* et *Streptomyces hydrogenans*, à produire la L-asparaginase. Contrairement à *Streptomyces paulus*, l'effet des interactions entre les variables est significatif chez *Streptomyces hydrogenans*. Ce qui influence sur le modèle représentant la réponse de la production en L-asparaginase, car le modèle de la souche *Streptomyces hydrogenans* est représenté par plusieurs variables incluant les interactions entre les facteurs (équation III), contrairement à celui de *Streptomyces paulus*, plus simple et dont la réponse est ciblée à un nombre réduit de variables (équation II).

### 2-7-3-Détermination des valeurs optimales

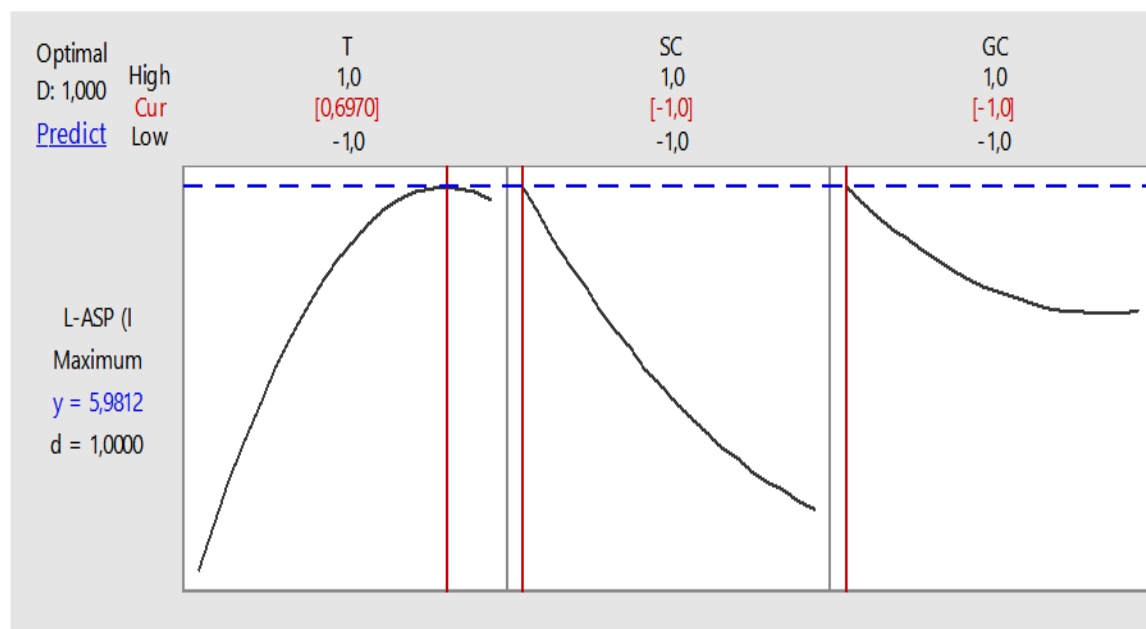
Les valeurs optimales des 3 facteurs choisis, permettant d'avoir une meilleure production en L-asparaginase par les souches *Streptomyces paulus* (CA01) et *Streptomyces hydrogenans* (CA04), sont représentées sur les figures 24 et 25 ci-après.

Les valeurs optimales réelles ont été déduites par la formule des variables centrées et réduites donnée dans la partie 1.2.7.



**Figure 24 :** Graphe d'optimisation de l'activité L-asparaginase de la souche *Streptomyces paulus*.

La figure 24, illustre la réponse maximale obtenue par le modèle pour la production de la L-asparaginase par *Streptomyces paulus*, en fonction des valeurs optimales des variables choisies. L'activité enzymatique optimale obtenue dans cette partie de l'étude est de 8,0271 UI/ml, avec les valeurs optimales codées: T = -0.1313, SC = 0.2929, GC = 0.6768. Les valeurs optimales réelles déduites sont: Température: 27.83°C; L-Asparagine: 1.07%; Glucose: 0.27%.



**Figure 25 :** Graphe d'optimisation de l'activité L-asparaginase de la souche *Streptomyces hydrogenans*.

La figure 25 illustre la réponse maximale obtenue par le modèle de la production de la L-asparaginase par *Streptomyces hydrogenans* (CA04), en fonction des valeurs optimales des variables choisies. L'activité enzymatique optimale obtenue dans cette partie de l'étude est de 5,9812 UI/ml, avec les valeurs optimales codées:  $T = -0.6970$ ,  $SC = -1,0$ ,  $GC = -1,0$ . Les valeurs optimales réelles sont : Température: 25,76°C; L-asparagine: 0,75%; Glucose: 0.10%.

En comparant les valeurs optimales obtenues pour la production de la L-asparaginase par les deux souches sélectionnées *Streptomyces paulus* et *Streptomyces hydrogenans*, nous remarquons que la capacité de la souche *Streptomyces paulus* à produire l'enzyme est supérieure à celle de la *Streptomyces hydrogenans*, avec un maximum de 8,01 UI/ml comparativement à 5,98UI/ml. D'autre part, la production de l'enzyme par *S. paulus* est maximale à une température proche de celle de croissance de la bactérie (27,83°C), cela peut justement expliquer le rendement important chez *Streptomyces paulus*, avec une biomasse élevée, puisque la température de production et de croissance sont très proches.

Chez la souche la même souche, il s'est avéré que l'activité enzymatique optimale est obtenue avec 0,27% de glucose et 0,7% d'amidon. En conséquence, grâce à l'ajout d'amidon, nous avons observé un effet positif du glucose sur la production de l'enzyme (voir tableau XII avec un effet positif (+0,68)). Pour cela, nous spécifions que la source de carbone idéale pour la production optimale de l'enzyme par *S. paulus* est la combinaison: glucose 0,27% / amidon 0,7%. Un résultat proche a été obtenu en 2015, par Meena, avec une production optimale de L-asparaginase (8,93 UI/mL), en présence de l'amidon à 1% dans le milieu ADS.

Nous avons démontré que la concentration en glucose affecte positivement la production de l'enzyme par *Streptomyces hydrogenans*. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par Leonard et al. (1963) ; Khamna et al. (2009) où l'effet positif du glucose sur la production de L-asparaginase au cours de la fermentation a été démontré.

Concernant la source d'azote, nous avons enregistré une absence de production de L-asparaginase, en l'absence de son substrat (L-asparagine), chez les deux souches. En effet, chez la souche *Streptomyces paulus* (CA01), le résultat de DOE démontre que l'effet positif du substrat, obtenu selon le tableau XII (Effet = +0,47) est intéressant car après optimisation, nous avons déduit une valeur optimale de 1,07% permettant d'avoir un maximum de production en enzyme (8,03UI/mL). Des valeurs similaires ont été trouvées dans les travaux de Meena et al. (2015), avec un optimum de 1,5% de L- asparagine. De leur côté, El-Sabbagh et al. (2013), ont conclu que la L-asparagine est le meilleur substrat azoté qui a permis d'obtenir une production optimale de L-asparaginase chez *Pseudonocardia endophytica* VUK-10. Mukherjee et al. (2000), avaient également accordé une grande importance à la L-asparagine en tant que substrat inductible dans le milieu de culture ADS et qui a permis d'obtenir une production optimale de L-asparaginase par *Streptomyces ginsengisoli*, à une concentration de 0,05%. De plus, il a été rapporté précédemment qu'un milieu synthétique riche en L-asparagine permet aux actinomycètes de produire une plus grande quantité de L-asparaginase que des conditions biologiques normales (Mostafa et al., 1979).

Cependant, pour *Streptomyces hydrogenans* (CA04), nous avons obtenu un coefficient négatif pour l'effet de la L-Asparagine, ce qui s'explique par la consommation rapide de ce substrat dans le milieu ADS avec la production de l'enzyme L-asparaginase. Cela engendre, probablement, une alcalinisation excessive du pH du milieu de production. De plus, Sahu et al. (2005) ont conclu que la production maximale de L-asparaginase par une souche d'actinomycète isolée des viscères d'un poisson, était à pH7. Selon le même auteur, les enzymes intracellulaires libérées après la rupture des cellules pourraient expliquer le pic d'activité enzymatique à pH 7. L'effet du pH sur la production de L-asparaginase a également été étudié par Singh et Strivastava en 2012, qui ont démontré que le pH 7,5 était la valeur optimale de la production de la L-asparaginase, par *Bacillus aryabhatai* ITBHU02. Cependant, El Naggar et al. (2015) ont conclu, à l'aide d'un plan d'expérience de *Plackett Burman* (P.B), que parmi les facteurs choisis pour optimiser la production de L-asparaginase produite par *Streptomyces olivaceus* NEAE-119, le pH avait l'effet le moins important avec un coefficient d'influence, négligeable.

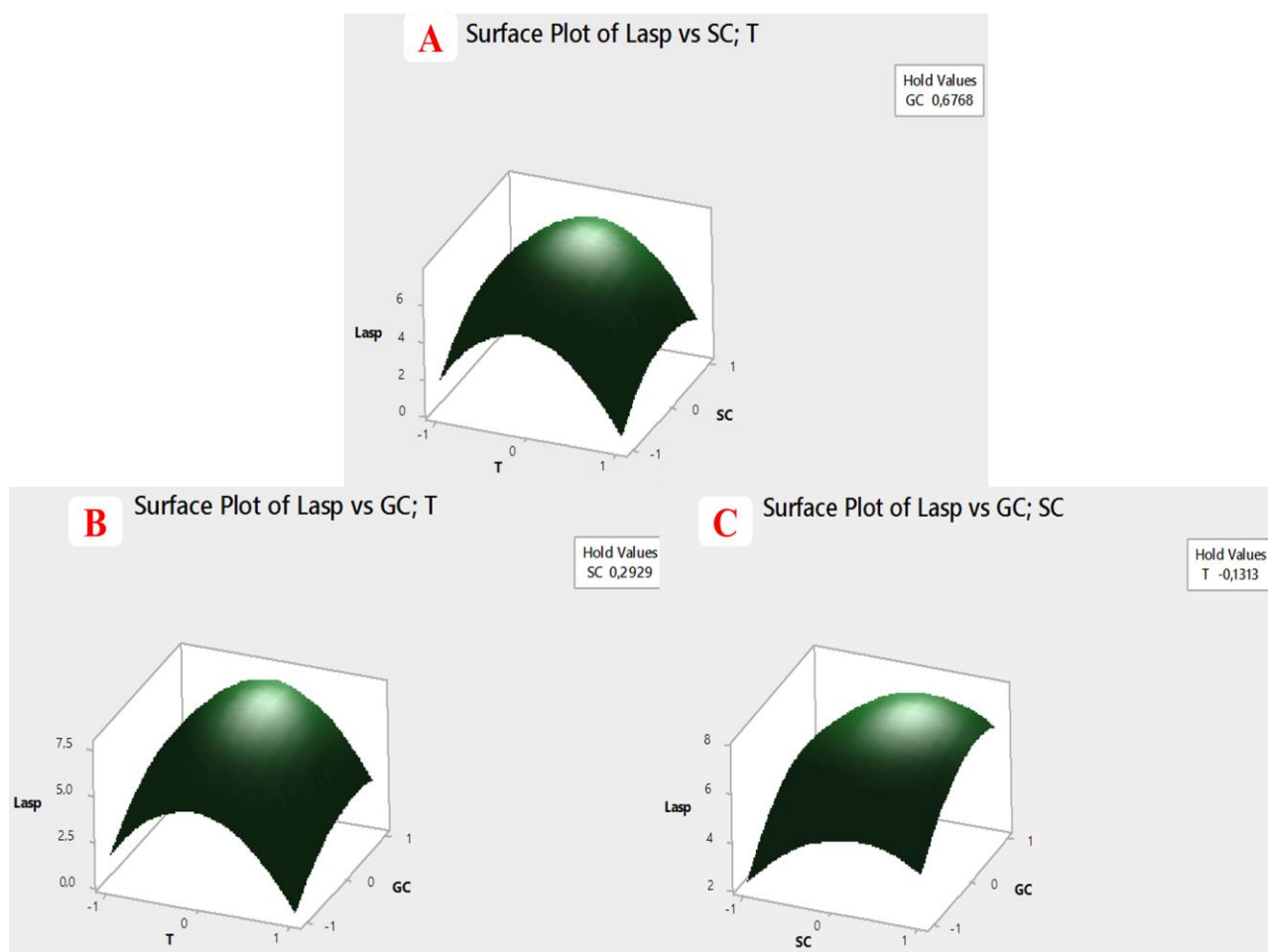
La production de L-asparaginase par la souche *Streptomyces paulus* (CA01) est influencée négativement par la température, avec un effet de -0,52 (tableau XII), avec un optimum enregistré à 27,83°C. Pour cela, une diminution de la température pendant la fermentation serait en faveur d'une augmentation du rendement en L-asparaginase. Par ailleurs, chez *Streptomyces hydrogenans* (CA04) l'optimum de température était de 25,76°C. Nous pensons que ce paramètre physique dépend du genre et de l'espèce et de l'origine de leur isolement.

Plusieurs études sur la production de L-asparaginase par différentes souches d'actinomycètes ont montré que la température optimale de production était de 30°C (Geckil et al., 2006 ; El-Sabbagh et al., 2013 ; El-Naggar et al., 2015), ce qui indique que la production de L-asparaginase ne nécessite pas des températures élevées et les températures optimales chez les actinomycètes producteurs restent dans la plage choisie par notre étude. Selon (Shukla et al., 2013), la température optimale de croissance des actinomycètes est de 28°C, ce qui est proche de la température optimale déduite dans notre étude (27,8°C) a permis d'obtenir le rendement maximal en L-asparaginase.

### **2-7-4-Détermination et interprétation des surfaces de réponse (RSM)**

La conception des surfaces de réponse est basée sur une représentation géométrique en 3D, de l'effet de variables aléatoires appelées stimuli sur une réponse. Dans notre travail, les variables aléatoires sont représentées par les facteurs étudiés, et la réponse est l'activité L-asparaginase qui reflète la production en enzyme par chacune des deux souches sélectionnées.

C'est-à-dire que les surfaces de réponse sont une représentation graphique de l'équation de régression qui décrit la réponse étudiée en fonction des variables aléatoires ou facteurs étudiés (RGUIG, 2005).



**Figure 26 :** Représentation graphique par surfaces de réponse illustrant l'effet des combinaisons de deux facteurs sur la production de L-asparaginase, par la souche *Streptomyces paulus*.

**A :** Effet de la combinaison (Température T, Concentration en substrat SC) sur la production en L-asparaginase L-ASP ; **B :** Effet de la combinaison (Température T, Concentration en glucose GC) sur la production en L-asparaginase L-ASP ; **C :** Effet de la combinaison (Concentration en substrat SC, Concentration en glucose GC) sur la production en L-asparaginase L-ASP.

Les 3 graphes illustrés sur la figure 26, représentent l'influence de deux facteurs combinés, à la fois, sur la production de la L-asparaginase par la souche *Streptomyces paulus*. Dans chaque graphe, un facteur est fixé à sa valeur optimale et les deux autres sont variés. L'étude de la variation de ces deux facteurs sur la réponse (activité L-asparaginase) a fait sortir les surfaces de réponse. Ces surfaces expliquent parfaitement l'effet des interactions entre les facteurs, sur la réponse étudiée.

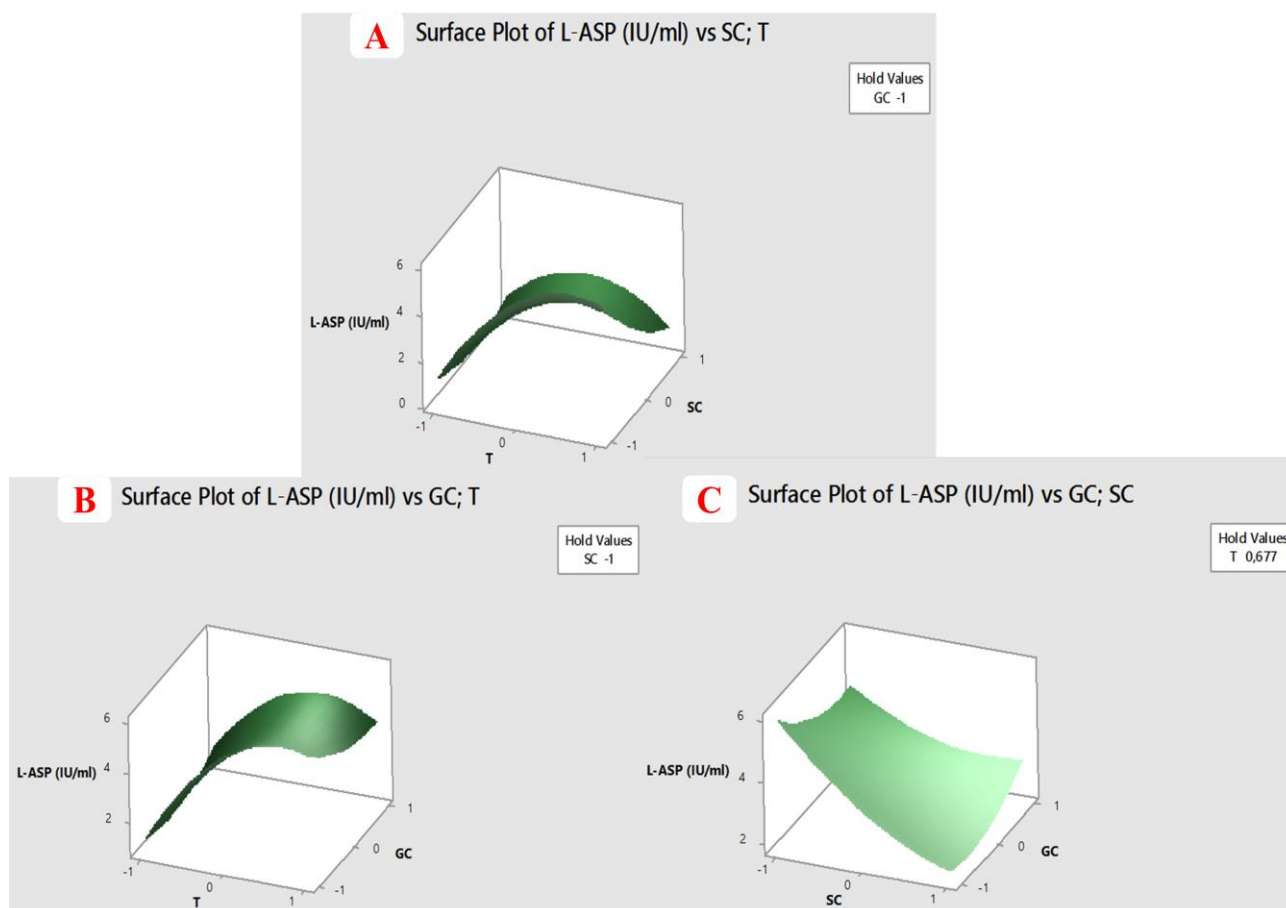
Nous remarquons que les 3 surfaces de réponse sont de forme hyperbolique, ce qui signifie que le signal maximal en termes d'activité L-asparaginase, enregistré, est situé au milieu des intervalles de variation des facteurs choisis.

Dans le graphe A où la concentration en glucose est fixée au seuil optimale et la concentration en substrat ainsi que la température sont variés, nous remarquons qu'à des valeurs optimales de concentration en glucose, l'activité enzymatique la plus importante est obtenue à des valeurs proches de la moyenne (point au centre) en terme de température (27,5°C) et à des concentrations élevées en substrat, dans l'intervalle étudié. Ce qui veut dire, qu'il faut utiliser des concentrations optimales de glucose pour avoir un taux de production en enzyme important si la culture bactérienne est incubée à une température proche de la température de croissance (28°C), et que le taux de L-asparagine rajouté dans le milieu soit proche de la maximale choisie pour l'étude (qui est de 1,25%). Pour conclure, on peut dire que l'effet entre la concentration en substrat et la température, sur la production de L-asparaginase, par la souche *CA01*, est synergique entre les valeurs codées -1 et 0 (correspondant à la première partie de l'intervalle choisi) puis devient antagoniste entre les valeurs codées 0 et +1 (correspondant à la deuxième partie de l'intervalle choisi).

Dans le graphe B, la concentration en substrat est fixée à sa valeur optimale et la température ainsi que la concentration en glucose sont variées. Il apparaît que se sont les valeurs de température, proches du point au centre et les valeurs maximales de la concentration en glucose, qui permettent d'obtenir, des meilleurs rendements de production d'enzyme. Ce qui veut dire qu'à une concentration optimale de substrat, se sont les températures moyennes (de l'intervalle choisi) et les concentrations supérieures de concentration en glucose, qui assurent une bonne production d'enzyme. En conclusion, l'effet entre la concentration en glucose et la température, sur la production de L-asparaginase par la souche *CA01*, est synergique durant la première partie de l'intervalle, et antagoniste durant la deuxième partie du même intervalle.

Dans le graphe C où la température est fixée à l'optimale et les concentrations en substrat et en glucose sont variées, il apparaît qu'à des valeurs optimales de température, ce sont les valeurs supérieures de concentration en glucose et des valeurs moyennes en concentration du substrat, qui permettent d'avoir le meilleur rendement de production de l'enzyme. Ce qui veut dire qu'à une température optimale, un meilleur rendement en enzyme est observé à des valeurs élevées dans l'intervalle choisi, concernant la concentration en glucose et à des valeurs moyennes de la concentration en substrat. Pour conclure, on peut dire que l'effet entre la concentration en substrat et la concentration en glucose, sur la production de la L-asparaginase par la souche *CA01*, est synergique dans la première partie de l'intervalle choisi (-1 à 0) et antagoniste dans la deuxième partie de l'intervalle (0 à +1).

Cependant, selon l'étude de l'analyse de la variance, les effets des interactions quadratiques entre les différents facteurs:  $T \times SC$ ,  $T \times GC$  et  $SC \times GC$ , sur la production de la L-asparaginase par la souche *CA01*, sont non significatives, est donc négligeables, et l'équation (I) du modèle obtenu représente la production en L-asparaginase, en fonction des variables linéaires ainsi que des carrés des variables étudiées.



**Figure 27 :** Représentation graphique par surfaces de réponse illustrant l’effet des combinaisons de deux facteurs sur la production de L-asparaginase par la souche *Streptomyces hydrogenans* CA04.

**A :** Effet de la combinaison (Température T, Concentration en substrat SC) sur la production en L-asparaginase L-ASP ; **B :** Effet de la combinaison (Température T, Concentration en glucose GC) sur la production en L-asparaginase L-ASP ; **C :** Effet de la combinaison (Concentration en substrat SC, Concentration en glucose GC) sur la production en L-asparaginase L-ASP.

Pour la production de l’enzyme par la souche *Streptomyces hydrogenans* CA04, le graphe A est parabolicoïde, ce qui signifie qu’il y a une variation considérable de la valeur maximale de la réponse, selon le domaine de variation, concernant l’influence de l’interaction entre T et SC. Le graphe B est hyperbolique, signifiant que le maximum de production est proche des valeurs moyennes, concernant l’effet d’interaction entre T et GC, tandis que le graphe C est parabolique, expliquant que le maximum d’activité enzymatique est enregistré au niveau des extrémités des intervalles d’interaction entre SC et GC.

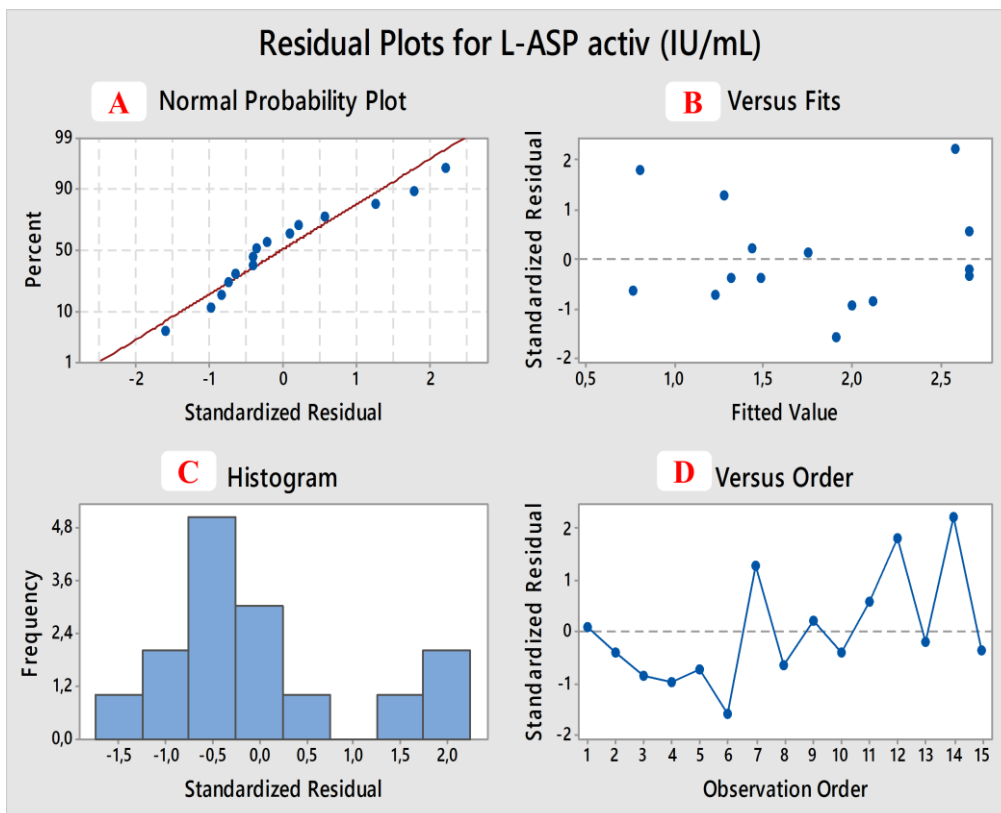
Sur le graphe A, nous avons représenté l’effet de l’interaction entre la température T et la concentration en substrat SC, en fixant la concentration en glucose GC, à sa valeur optimale codée de -1. Dans ce cas, la production maximale en enzyme est située aux valeurs maximales de SC et aux valeurs moyennes de T. Dans le graphe B, nous avons représenté l’effet de l’interaction entre la température T et la concentration en glucose GC sur la production de L-asparaginase, en fixant la concentration en substrat SC à sa valeur optimale codée de -1. Dans

cette situation, on observe bien que le maximum de L-asparaginase est produit aux valeurs minimales de concentrations en glucose et aux valeurs maximales de température.

Enfin le graphe C représente l'effet de l'interaction entre la concentration en substrat et la concentration en glucose, sur la production de L-asparaginase, en fixant la température à son optimum de 0.68. Il apparaît dans ce cas de figure, que la production de L-asparaginase par la souche CA01 est maximale dans toutes la plage de concentration en glucose, à condition de se situer aux concentrations minimales en substrat, dans l'intervalle étudié. Cela appuie l'effet antagoniste (négatif) du taux de substrat, observé dans le tableau ANOVA.

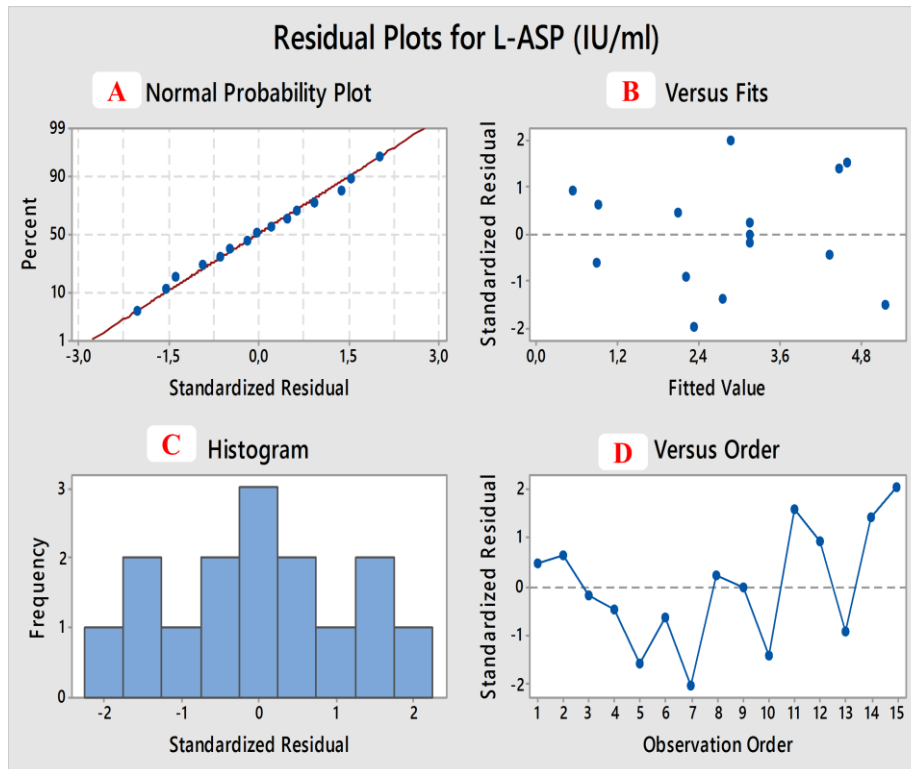
### 2-7-5-Evaluation graphique de l'analyse statistique

Les représentations graphiques ci-après montrent la distribution statistique des réponses obtenues. Ce qui a permis leur traitement par l'analyse de la variance.



**Figure 28:** Graphique de l'ANOVA pour l'analyse des résultats de l'optimisation de la production de la L-asparaginase par la souche *Streptomyces paulus* CA01.

**A:** Droite de Henry; **B:** Analyse en fonction des valeurs ajustées; **C:** Histogramme de l'ANOVA; **D:** Analyse en fonction de l'ordre.



**Figure 29:** Graphique de l'ANOVA pour l'analyse des résultats de l'optimisation de la production de la L-asparaginase par la souche *Streptomyces hydrogenans* CA04.

**A:** Droite de Henry; **B:** Analyse en fonction des valeurs ajustées; **C:** Histogramme de l'ANOVA; **D:** Analyse en fonction de l'ordre.

Le graphe A des deux figures 28 et 29 représente la droite de Henry qui montre une répartition gaussienne des réponses obtenues (selon la loi Normale : *Normal Probability Plot*), où l'ensemble des points sont rapprochés à la droite. Cela démontre la corrélation entre les valeurs prédites et les réponses expérimentales de la production de L-asparaginase par les deux souches sélectionnées. La distribution normale des réponses permet la possibilité de leur analyse statistique et l'évaluation de leur significativité par l'analyse de la variance.

Le graphe B des deux figures 28 et 29 montre l'analyse des données selon les valeurs ajustées (*Versus Fits*). On remarque une distribution aléatoire des valeurs résiduelles (réponses obtenues par l'expérimentation) autour du zéro. Ce qui atteste de leur distribution statistique et leur analyse par la variance.

Le graphe C des deux figures 28 et 29 représente un histogramme (*histogram*) des fréquences d'apparition en fonction des valeurs résiduelles standardisées. Normalement l'histogramme doit apparaître sous forme d'une cloche qui représente une distribution normale des données. Nous remarquons que l'histogramme de distribution des réponses de production de l'enzyme par la souche CA04 répond exactement à une distribution selon la loi Normale, tandis qu'on distingue un léger pic multiple au niveau de l'histogramme de la souche CA01. Ce qui est dû à la différence de significativité des modèles respectifs pour les deux souches, où nous avons

obtenu un  $R^2$  ajusté de 97,01% plus proche du  $R^2$  chez la souche *CA04*, contrairement à un  $R^2$  de 95,28%, chez la souche *CA01*.

Le graphe D représente l'analyse des réponses selon l'ordre (*Versus order*) qui permet de détecter la dépendance temporelle des valeurs résiduelles. Là également, une distribution aléatoire, sans aucun schéma mathématique, prouve une parfaite répartition statistique des données.

### 2-7-6-Validation expérimentale des modèles de production de la L-asparaginase

Afin de valider les modèles obtenus, les expériences de production de l'enzyme par les deux souches *CA01* et *CA04*, ont été réalisées en utilisant les conditions optimales et les résultats obtenus sont illustrés ci-après:

**Tableau XVI** : Tableau récapitulatif des paramètres d'optimisation et de validation des modèles.

Paramètres	Production de l'enzyme par <i>CA01</i>	Production de l'enzyme par <i>CA04</i>
<b>Température</b>	27,83°C	25,76°C
<b>Concentration en L-Asparagine</b>	1,07%	0,75%
<b>Concentration en Glucose</b>	0,27%	0,1%
<b>Activité L-asparaginase optimisée</b>	8,027 UI/ml	5,98 UI/ml
<b>Activité L-asparaginase expérimentale</b>	8,01 UI/ml	5,61 UI/ml
<b>Facteur de corrélation (%)</b>	<b>99,79%</b>	<b>93,81%</b>

Le tableau montre la validation des deux modèles de production de la L-asparaginase par les deux souches *CA01* et *CA04*, respectivement. Nous avons obtenu des facteurs de corrélation très proches de 1 (0,99 et 0,93 pour les deux souches *CA01* et *CA04* respectivement) pour les deux modèles, ce qui démontre une parfaite corrélation entre les valeurs prédites par la modélisation mathématique, et la validation expérimentales des facteurs optimisés. Ce résultat explique la validité des deux modèles et leur pouvoir à prédire la réponse en utilisant les valeurs optimales.

Cette étape d'optimisation de la production en enzyme présente un grand intérêt dans l'augmentation du rendement final, dans l'extrait bactérien représenté par les surnageant des cultures. Car selon Mohana et al. (2011), la maîtrise des conditions de culture du germe producteur, à savoir les différentes sources de carbone et d'azote, la température, le temps d'incubation et le pH du milieu de culture, est primordiale, pour assurer un bon rendement en enzyme.

## 2-8-Extraction et purification partielle des protéines enzymatiques

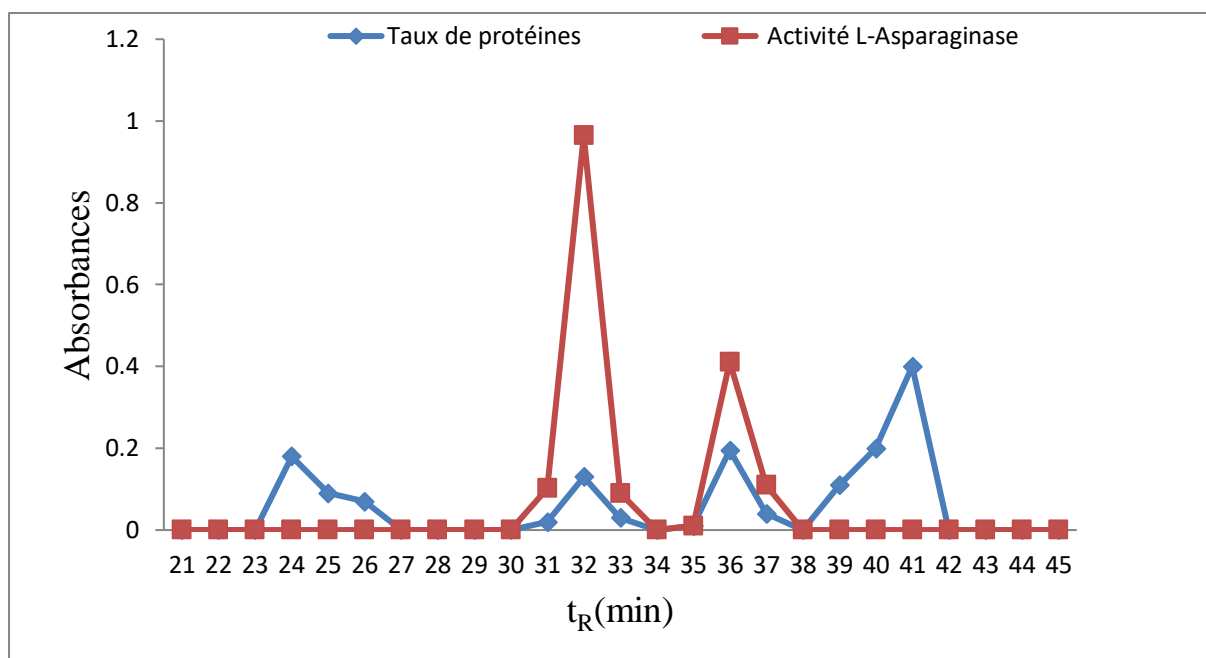
### 2-8-1-Séparation chromatographique et détermination du PM

L'activité L-asparaginase a été repérée au niveau des fractions récoltées en utilisant des concentrations en sulfate d'ammonium de 80% et 90% des extraits enzymatiques bruts des deux souches *Streptomyces paulus* CA01 et *Streptomyces hydrogenans* CA04, respectivement. Dans plusieurs travaux sur la L-asparaginase produite par des actinomycètes, le maximum d'activité L-asparaginase équivalent au rendement en enzyme, est localisé à 80% de saturation en sulfate d'ammonium. C'est le cas des travaux de Dharmaraj et al. (2013) ayant détecté un maximum d'activité L-asparaginase produite par *Streptomyces sp.*, à 80% de sulfate d'ammonium. Rien n'empêche que des concentrations différentes en sel, peuvent être avantageuses, pour aboutir à un meilleur rendement d'extraction, où El-Sabbagh et al. (2013) ont démontré que la meilleure activité L-asparaginase est enregistrée à 70% de sulfate d'ammonium.

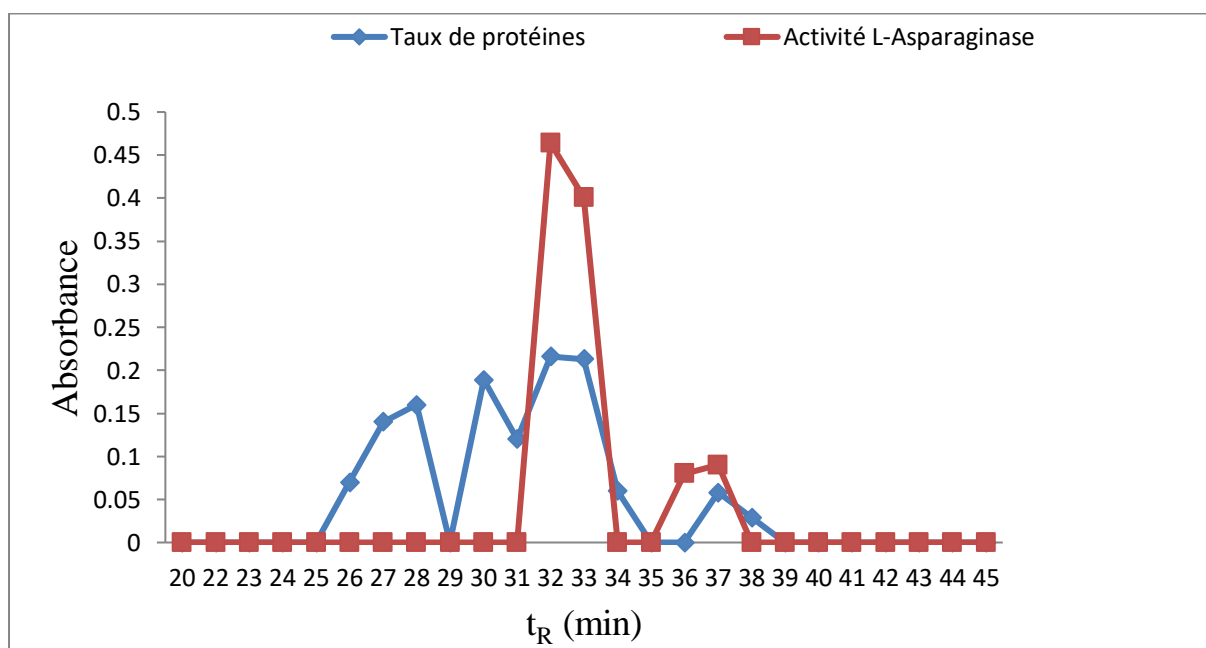
Des concentrations inférieures en sulfates d'ammonium sont utilisées dans certains cas pour l'extraction, par précipitation saline, de la L-asparaginase. C'est le cas des travaux de Basha et al. (2009) où l'enzyme a été extraite à seulement 45% de saturation en sel, avant de passer à sa purification. Une gamme de concentration en sulfate d'ammonium allant de 40% à 60%, a été également utilisée par Amena et al. (2010), lors de l'extraction de la L-asparaginase produite par une souche d'actinomycètes, isolée du milieu marin. D'autre part, il a été possible de réaliser une purification partielle avec, uniquement une précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'une dialyse, d'une L-asparaginase produite par *Streptomyces sp.* TA22, isolée en Inde, par l'équipe de (Mohana et al., 2011). Ce qui prouve que le sulfate d'ammonium est un sel adéquat pour l'extraction, par relargage au sel, de la L-asparaginase, produite par les actinomycètes.

Les fractions que nous avons récupérées ont été dialysées contre le tampon Tris/HCl 0,05M, pH8,4, et les dialysats ont été élués le long d'une colonne de chromatographie basse pression. La séparation est de type exclusion moléculaire réalisée sur gel de Séphacryl S-200, dont les paramètres de séparation ont été mentionnés précédemment.

Les graphes ci-après montrent les pics obtenus, en termes de taux de protéines et d'activité enzymatique L-asparaginase, exprimés en valeur d'absorbance aux longueurs d'onde requises.



**Figure 30:** Graphique illustrant le chromatogramme d'éluion de l'extrait enzymatique extracellulaire brut de la souche *Streptomyces paulus* CA01 sur Séphacryl S-200.  
Taux de protéines :  $\lambda_{\max}$ = 540nm ; Activité L-asparaginase :  $\lambda_{\max}$ = 450nm.



**Figure 31 :** Graphique illustrant le chromatogramme d'éluion de l'extrait enzymatique brut de la souche *Streptomyces hydrogenans* CA04, sur Séphacryl S-200.  
Taux de protéines :  $\lambda_{\max}$ = 540nm ; Activité L-asparaginase :  $\lambda_{\max}$ = 450nm.

Les graphes montrent l'existence de deux pics intéressants pour chaque extrait enzymatique brut, ayant manifesté l'activité L-asparaginase, ainsi que la présence de plusieurs pics contaminants. Pour l'extrait de la souche CA01, le premier pic (A<sub>1</sub>) est obtenu à 32min de temps de rétention, le deuxième (B<sub>1</sub>) à 36min de temps de rétention. Pour l'extrait de la

souche CA04, le premier pic (A<sub>4</sub>) est obtenu à 33min et le deuxième (B<sub>4</sub>) avec une activité L-asparaginase moins importante obtenu à 37min de temps de rétention.

L'intensité d'apparition (aire) des pics reflète le taux de protéines au niveau de la longueur d'onde de 590nm, et l'activité enzymatique L-asparaginase, au niveau de la longueur d'onde de 450nm. En se basant sur ça, on note bien que chacune des deux souches, produit deux isoformes de L-asparaginase, éluées à des temps de rétention différents. Selon le principe de la chromatographie d'exclusion moléculaire, se sont les protéines de grand PM qui sont éluées les premières, tandis que les plus petites molécules sont éluées tardivement. Pour cela, nous pouvons bien remarquer que les deux souches candidates sélectionnées, produisent des isoformes de L-asparaginase de différentes tailles.

Dans le but d'interpréter les pics des fractions actives, obtenus par la séparation chromatographique et détectés par spectrophotométrie UV-V, nous avons calculé les paramètres chromatographiques qui décrivent parfaitement la qualité de la séparation.

Pour cela, les différentes constantes calculées sont :

*Rapport de distribution des molécules enzymatiques*

$$K_A = \frac{[P]_{stat}}{[P]_{mob}}$$

$K_A$  : Rapport de distribution ;  $[P]_{stat}$  : concentration des protéines dans la phase stationnaire ;  $[P]_{mob}$  : concentration des protéines dans la phase mobile (taux de protéines éluées). Avec :  $[P]_{stat} = \text{Taux protéines totales} - [P]_{mob}$

*Temps de rétention réduit  $t'_R$*

$$t'_R = t_R - t_M$$

$t_M$  : Temps mort (temps d'éluion du Bleu de Dextran : 20min) ;  $t_R$  : temps de rétention de la substance éluée.

*vitesse moyenne de déplacement de la protéine éluée  $u$*

$$u = \frac{L}{t_R}$$

$L$  : longueur de la colonne : 30cm (ou 300mm).

*Volume mort  $V_M$*

$$V_M = t_M \cdot D$$

**D** est le débit de la phase mobile : **1ml/min = 0,017ml/s**.

Volume d'élution ou de rétention de la protéine enzymatique  $V_R$

$$V_R = t_R \cdot D$$

Volume de rétention réduit  $V'_R$

$$V'_R = V_R - V_0$$

$V_R$ : Volume de rétention ;  $V_0$ : Volume mort (Volume d'élution d'une molécule non retenue sur la phase stationnaire, équivalent au volume d'élution du Bleu de Dextran, de grand PM, qui passe à travers les interstices du gel qui est de **17ml**).

Facteur de sélectivité ou de séparation  $\alpha$

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{t'_R(B)}{t'_R(A)}$$

$K_B$ : Rapport de distribution de la **protéine B la plus retenue** sur la phase stationnaire ;  $K_A$ : Rapport de distribution de la **protéine A la moins retenue** sur la colonne.

Facteur de rétention  $k'$

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Facteur de résolution  $R$

$$R = 2 \frac{t_R(B) - t_R(A)}{\omega(B) + \omega(A)}$$

$\omega$  est la base de chaque pic correspondant à l'absorbance de chaque molécule, calculé en assimilant le pic de chaque soluté à une courbe de Gauss ou triangle de base  $\omega$ .

Dans nos résultats, les valeurs de  $\omega$  ont été comme suit :

Pour la résolution des pics de l'extrait de CA01 : **Pic A** :  $\omega = 120s$  ; **Pic B** :  $\omega = 150s$ .

Pour la résolution des pics de l'extrait de CA04 : **Pic A** :  $\omega = 160s$  ; **Pic B** :  $\omega = 120s$ .

L'ensemble des paramètres de la séparation chromatographiques des molécules enzymatiques, sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau XVII :** Tableau récapitulatif de l'analyse des spectres des molécules enzymatiques détectées.

Paramètres de séparation	Extrait CA01 <i>Pic A<sub>1</sub></i>	Extrait CA01 <i>Pic B<sub>1</sub></i>	Extrait CA04 <i>Pic A<sub>4</sub></i>	Extrait CA04 <i>Pic B<sub>4</sub></i>
Concentration en protéines déposée (mg/ml)	0,87	1,68	1,42	0,57
Concentration en protéines dans la phase mobile (mg/ml)	0,31	0,79	0,68	0,32
Concentration en protéines dans la phase stationnaire (mg/ml)	0,56	0,89	0,74	0,25
Rapport de distribution <i>K</i>	1,81	1,13	1,09	0,78
<i>t<sub>M</sub></i> (min)	20	20	20	20
<i>V<sub>M</sub></i> (ml)	17	17	17	17
<i>V<sub>R</sub></i> (ml)	32	35	33	37
<i>V'<sub>R</sub></i> (ml)	15	18	16	20
<i>t<sub>R</sub></i> (min)	32	35	33	37
<i>t'<sub>R</sub></i> (min)	12	15	13	17
$\omega$ (min)	2	3	3	3
Facteur de rétention : <i>k'</i>	0,6	0,8	0,7	0,9
<i>L</i> (cm)	30	30	30	30
<i>D</i> (ml/min)	1	1	1	1
<i>u</i> (cm/min)	0,938	0,857	0,909	0,811
Facteur de sélectivité (ou de séparation) : $\alpha$	1,25		1,31	
Facteur de résolution : <i>R</i>	1,20		1,33	

Le facteur de rétention *k'* exprime mathématiquement la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque constituant. Nous remarquons que le facteur de rétention *k'* qui exprime l'effet des temps de rétention de chaque molécule, sur la phase stationnaire (le gel) est inférieur à 1. Cependant, à des temps plus long de séparation, il convient d'éviter des valeurs de  $k' > 10$ , même si réellement, les optimums de séparation sont ceux avec  $2 < k' < 10$ , rencontrés en HPLC. Dans notre cas, à basse pression, les valeurs obtenues de *k'* qui sont inférieures à 10, indiquent une séparation raisonnable, notamment avec des facteurs de résolution *R* proches de 1,5, à savoir 1,20 pour les pics de l'extrait de CA01 et 1,33 pour ceux de CA04.

### -Estimation du poids moléculaire PM

Dans le but de déterminer la taille des molécules actives détectées, nous avons réalisé une corrélation entre le PM et le temps de rétention des protéines standard. D'autre part, une droite de corrélation est obtenue en représentant le log PM en fonction des différents temps de rétention des standards (Annexe 1). Le tableau ci-après illustre les résultats obtenus.

**Tableau XVIII :** Corrélation entre le PM et le temps de rétention.

<i>Standard</i>	<i>PM (KDa)</i>	<i>Log PM</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>
<b>Bêta-Galactosidase</b>	<b>125</b>	<b>2,09691</b>	<b>31</b>
<b>BSA (Sérum albumine bovine)</b>	<b>66,6</b>	<b>1,8234742</b>	<b>39</b>
<b>Pepsine</b>	<b>34,7</b>	<b>1,5403295</b>	<b>51</b>
<b>Trypsine</b>	<b>26,6</b>	<b>1,4248816</b>	<b>57</b>
<b>Lysozyme du blanc d'œuf.</b>	<b>16,7</b>	<b>1,2227165</b>	<b>64</b>

En nous servant de l'équation de la droite ainsi que des données du tableau des paramètres de séparation chromatographique, nous avons estimé les PM des différents isoformes de L-asparaginase, comme suit :

**Tableau XIX :** Représentation des valeurs des PM des différents isoformes de L-asparaginase identifiés.

<i>Extraits enzymatiques</i>	<i>Extrait de CA01</i>		<i>Extrait de CA04</i>	
<b>Isoformes</b>	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>4</sub></b>	<b>B<sub>4</sub></b>
<b>PM (KDa)</b>	<b>114</b>	<b>91</b>	<b>108</b>	<b>86</b>

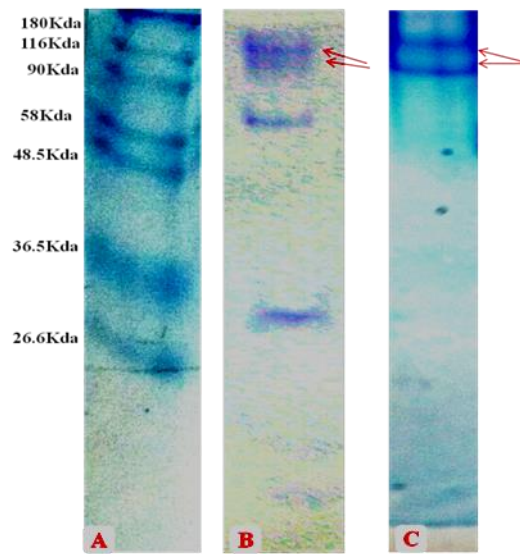
Nous remarquons que les deux souches produisent chacune deux isoformes de L-asparaginase de PM différents. Un isoforme de grand PM (114 KDa par *Streptomyces paulus* CA01 et 108 KDa par *Streptomyces hydrogenans* CA04) et un isoforme de petit PM (91 KDa par *Streptomyces paulus* CA01 et 86 KDa par *Streptomyces hydrogenans* CA04).

Une migration électrophorétique PAGE-SDS dans les conditions non dissociantes a été réalisée afin de vérifier la présence de bandes protéiques au niveau des PM retrouvés pour les différents isoformes enzymatiques. La figure ci-après montre les bandes protéiques apparues. Les résultats trouvés concordent parfaitement avec les données bibliographiques, car la première découverte de la L-asparaginase dans le sérum de porc, a révélé l'existence de deux isoenzymes de PM au voisinage de 100KDa (Yellin et al., 1966). D'autre part, la L-asparaginase utilisée actuellement provient des deux bactéries *E. Coli* et *Erwinia*, où il a été mis en évidence, deux isoenzymes chez ces deux genres bactériens, à des PM voisins de 100KDa (Ohnuma et al., 1972). Borah et al. (2012) ont purifié une L-asparaginase ayant un PM de 153KDa, produite par une souche d'*E. Coli* isolée à partir de l'eau. D'autres L-asparaginase ayant des PM voisins des isoformes que nous avons obtenus, ont été retrouvés chez des souches de même genre comme *Streptomyces* sp. PDK2, *Streptomyces gulbargensis*

avec des PM de 140 et 85 KDa respectivement, *S. paulus*, produisant une L-asparaginase de 110KDa proche des isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> ayant respectivement, des PM de 114KDa et 108KDa (Dharmaraj and Sumantha, 2009). Cependant, des molécules très grandes ont été également signalées chez *Chalmydomonas* sp. (Paul, 1982) avec un PM de 275 KDa pour la L-asparaginase purifiée. En contrario, certaines molécules de L-asparaginase plus petites ont été enregistrées, c'est le cas de l'enzyme produite par une souche de *Bacillus*, ayant un PM de 45 KDa, rapportée dans les travaux de (Moorthy et al., 2010). Enfin il a été rapporté, que même à l'instar de la découverte de la L-asparaginase bactérienne, différents isoformes ont été retrouvés chez différentes souches d'*E. Coli*, avec des PM allant de 133 à 141KDa (Maita et al., 1980), et selon Whelan et al. (1969), tous ces isoformes étaient composés de 4 sous-unités de 29KDa, chacune.

Notre démarche de purification partielle a été adoptée dans des travaux antérieurs où la chromatographie d'exclusion moléculaire est souvent choisie comme moyen d'identification des espèces protéiques présentes dans les extraits bruts de L-asparaginase ou en guise de purification partielle. C'est le cas des travaux de Sivasankar et al. (2013) qui ont localisé d'ailleurs un maximum d'activité L-asparaginase produite par *Streptomyces* sp., au niveau des précipités de 80% de saturation en sulfate d'ammonium, suivi d'une dialyse et d'une purification partielle par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-100. Dharmaraj (2011) avait, à leur tour, purifié une L-asparaginase extracellulaire d'un PM de 102 KDa, produite par *Streptomyces noursei* MTCC10469 en utilisant un protocole basé sur une série de chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100, puis d'un échangeur d'ions sur CM-Séphadex C-50, suivi d'un contrôle sur SDS PAGE. El-Sabbagh et al. (2013) ont identifié une L-asparaginase produite par une souche de *Streptomyces halstedii*, isolée à partir d'un sol en Egypte. Une migration électrophorétique sur PAGE-SDS, après une série de chromatographie, a révélé l'existence d'une bande unique de 100KDa. Toma et al. (2008) ont utilisé, eux aussi un gel Séphacryl S-300 pour la purification de la L-asparaginase produite par *P. vulgaris* Pv.U.92. L'enzyme a été localisée à un PM voisin de 100KDa.

### 2-7-2-Contrôle par électrophorèse PAGE-SDS



**Figure 32:** Profils électrophorétiques sur PAGE-SDS des enzymes extracellulaires.

**A :** marqueur de taille ; **B :** fractions enzymatiques actives de *Streptomyces hydrogenans* CA04 ; **C :** fractions enzymatiques actives de *Streptomyces paulus* CA01.

### 2-8-3-Evaluation du degré de purification des molécules enzymatiques

Nous avons déterminé dans cette partie le degré de pureté de l'ensemble des isoformes enzymatiques actifs produits par les deux souches sélectionnées. Et ce dans le but d'estimer le rendement en L-asparaginase produite par chacune des deux souches candidates.

**Tableau XX :** Diagramme d'identification des isoformes de L-asparaginase extracellulaires produits par la souche *Streptomyces paulus* CA01.

Etapes	AT (UI/ ml)	Taux de protéines (mg/ml)	AS (UI/mg)	Rendement (%)
<b>Extrait brut actif</b>	8,27	4,16	1,99	100
<b>Extrait de 80% Sulfate d'ammonium</b>	6,09	1,07	5,69	73,64
<b>Fraction active A<sub>1</sub> après chromatographie sur Séphacryl S-200</b>	5,7	0,87	6,55	68,92
<b>Fraction active B<sub>1</sub> après chromatographie sur Séphacryl S-200</b>	2,78	1,68	1,65	33,62

**Tableau XXI :** Diagramme d'identification des isoformes de L-asparaginase extracellulaires produits par la souche *Streptomyces hydrogenans* CA04.

Etapes	AT (UI/ml)	Taux protéines (mg/ml)	AS (UI/mg)	Rendement (%)
<b>Extrait brut actif</b>	5,12	1,67	3,07	100
<b>Extrait de 90% Sulfate d'ammonium</b>	3,86	1,55	2,49	75,39
<b>Fraction active A<sub>4</sub> après chromatographie sur Séphacryl S-200</b>	3,28	1,42	2,31	64,06
<b>Fraction active B<sub>4</sub> après chromatographie sur Séphacryl S-200</b>	0,07	0,57	0,12	1,37

Durant les différentes étapes d'extraction et d'identification, nous remarquons que l'activité L-asparaginase a diminué graduellement : de 8,27UI/ml à 6,09UI/ml puis à 5,7UI/ml pour l'isoforme A<sub>1</sub> et de 8,27UI/ml à 6,09UI/ml puis à 2,78UI/ml pour l'isoforme B<sub>1</sub>, produits par la souche CA01 et de 5,12UI/ml à 3,86UI/ml puis à 2,28UI/ml pour l'isoforme A<sub>4</sub> et de 5,12UI/ml à 3,86UI/ml puis à 0,07UI/ml pour l'isoforme B<sub>4</sub>, produits par la souche CA04, en

passant de l'extrait brut actif, à la fraction précipitée au sulfate d'ammonium à 80% et 90% pour CA01 et CA04 respectivement, puis enfin à la fraction active récoltée après chromatographie d'exclusion moléculaire.

Nous remarquons également, que le taux de protéines diminue à travers les différentes phases citées. La quantité de protéines finales obtenue dans les fractions de chromatographie est faible : 0,87mg/ml et 1,68mg/ml pour les deux isoformes A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub> respectivement et 1,42mg/ml et 0,57mg/ml pour les deux isoformes A<sub>4</sub> et B<sub>4</sub> respectivement. Néanmoins l'activité spécifique notée pour les différents isoformes de L-asparaginase produits sont importantes au niveau des deux isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> avec des valeurs de 6,55UI/mg et 2,31UI/mg en comparaison avec les deux isoformes B<sub>1</sub> et B<sub>4</sub> avec des valeurs de 1,65UI/mg et 0,12UI/mg. Nous notons également, que les rendements en enzyme obtenus sont plus élevés au niveau des deux isoformes A, avec des valeurs de 68,92% pour A<sub>1</sub> et 64,06% pour A<sub>4</sub>. En effet, des rendements proches en taux de protéines voir plus faibles sont communément observés dans les travaux de purification partielle de L-asparaginase produite par des souches d'actinomycètes, Selvam et Vishnupriya (2013) avaient enregistré des taux de protéines de 0,23mg/ml dans l'extrait brut, avant extraction et purification et un rendement de purification de 12,05% de la L-asparaginase produite par *Streptomyces acrimycini* NGP. Pourtant les mêmes auteurs avaient adopté une chromatographie d'exclusion moléculaire, sur gel séphadex G-100. Ce qui montre l'intérêt des étapes de standardisation et d'optimisation de la production de la L-asparaginase, par nos deux souches qui nous a permis d'augmenter, d'emblée, les rendements en enzyme, avant l'extraction et la purification partielle.

Notons que pour les molécules de références, actuellement utilisées en chimiothérapie anticancéreuse, et qui ont été isolées notamment à partir d'*E. Coli* en 1972 par Howard et al., elles possèdent des activités spécifiques largement supérieures à celles de nos enzymes avec des valeurs et comprises entre 300 et 400 UI/mg. Ce qui requiert des techniques de purification fine pour aboutir à un produit finale de haut degré de pureté et présentant une activité spécifique plus importante.

Des quantités différentes en L-asparaginase sont produites par différents micro-organismes, et souvent, des grandes variations sont observées. En plus, le taux de protéines n'est pas dépendant du groupe microbien ou de l'espèce, car Patro et Gupta (2012) avait obtenu un taux de protéines très proche de notre résultat au niveau de l'isoforme B<sub>4</sub>, d'une valeur de 0,4mg/ml, lors de la purification de la L-asparaginase produite par une souche de moisissure du genre *Penicillium*, en utilisant une colonne de chromatographie sur Séphadex G-100. Basha et al. (2009) ont également appliquée une colonne de chromatographie sur Séphadex G-100 pour la purification de la L-asparaginase produite par une souche d'actinomycètes d'origine marine. Ces auteurs ont obtenu une activité enzymatique totale largement plus grande que ce que nous avons obtenu, avec 49,2UI/ml, pourtant le rendement en protéine a été 10 fois plus faible que le nôtre, avec des valeurs de 0,065mg/ml. Cela démontre que le taux de protéines n'influence pas, à lui seul, l'activité de l'enzyme, mais l'affinité au substrat est à considérer. C'est ce qui est d'ailleurs évalué dans les parties suivantes, de notre démarche expérimentale, où les conditions physico-chimiques de pH, température et temps de la

réaction, ainsi que l'étude de la cinétique enzymatique et l'influence de quelques inhibiteurs et activateurs sont traités. Cependant nous précisons que seuls les deux isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> ayant été élués avec des rendements importants, sont choisis pour cette étude.

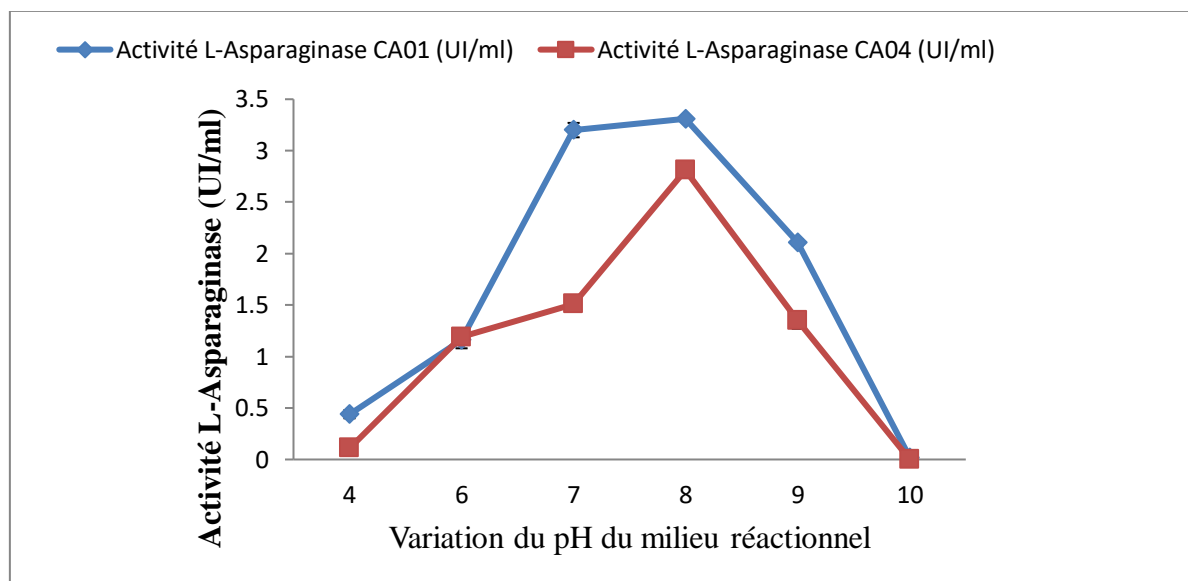
Dans le but d'avoir des rendements élevés ainsi qu'une meilleure pureté, il serait intéressant de réaliser une purification fine des enzymes produites par les deux souches candidates, en mettant en œuvre des protocoles sophistiqués utilisant des équipements scientifiques de haute performance (HPLC), afin d'éviter les pertes en protéines et de préserver des taux élevés en terme d'activité enzymatique. Dans les travaux d'El-Sabbagh et al. (2013) où une purification fine en utilisant l'HPLC a été réalisée, des taux d'activité spécifique en L-asparaginase augmentant de 37,5 à 228,7UI/mg ont été enregistrés, durant le protocole de purification, pourtant, avant élution sur la colonne, le taux de pureté obtenu par ces auteurs, n'était pas loin du nôtre, avec approximativement 6,09% dans la fraction du précipité avec le sulfate d'ammonium.

## 2-9- Caractérisation de la L-asparaginase

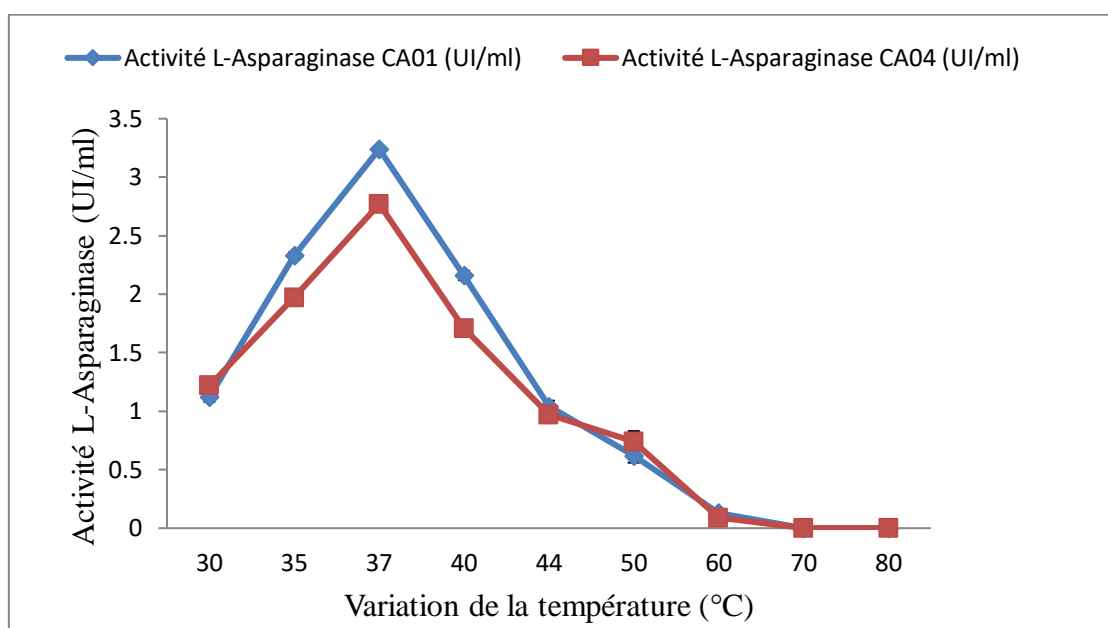
Pour la suite du travail concernant les enzymes extracellulaires, nous avons sélectionné les fractions apparues avec un maximum d'activité enzymatique et un meilleur rendement, pour les études de caractérisation et de cinétique enzymatique. Pour cela, les isoformes choisis pour la suite de la présente étude sont A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub>.

### 2-9-1- Effet du pH et de la température

Sur les deux figures 33 et 34, nous avons représenté l'effet de la variation du pH et de la température, du milieu réactionnel, sur l'activité L-asparaginase, en choisissant des plages de pH allant de 4 à 10 et de température allant de 30 à 80°C.



**Figure 33:** Effet de la variation du pH sur la réaction enzymatique catalysée par la L-asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04.



**Figure 34 :** Effet de la variation de la température sur la réaction enzymatique catalysée par la L-asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04.

Il apparaît bien que l'activité L-asparaginase est maximale pour les deux souches, entre pH 7 et 8,6 avec un optimum à pH8,0 et à une température comprise entre 35 et 40°C avec un optimum à 37°C. D'autre part, nous remarquons que l'activité enzymatique est plus importante chez la souche CA01, qui atteint 5,7UI/ml par rapport à celle de CA04 qui atteint 3,29UI/ml, à pH8 et à 37°C. Sauf que pour des valeurs de pH acides (entre pH4 et 6), l'activité L-asparaginase est plus grande chez la souche CA04. Enfin, il est important de signaler, que selon les graphes (figures 33 et 34), l'activité L-asparaginase chez les deux souches sélectionnées est enregistrée, uniquement à des pH allant de 4 à 10 et des températures variant de 30 à 60°C. A des valeurs de pH extrêmes (trop acides ou trop basiques), l'activité enzymatique est inexistante, ce qui est dû, probablement, à des modifications structurales, au niveau des sites actifs, ou même à des agitations moléculaires touchant la stabilité des liaisons entre l'enzyme et son substrat. El-Sabbagh et al., (2013) avaient conclu, pendant leur travaux sur une L-asparaginase produite par *Streptomyces halstedii* à des optimums d'activité de : pH8 ; température de 37°C. Cependant, cette balance pH/température peut varier considérablement, selon les germes producteurs du même genre. D'ailleurs dans les travaux de Dharmaraj et al. (2013), des valeurs optimales d'activité L-asparaginase produite par une souche de *Streptomyces*, étaient enregistrées à pH 8 mais à une température plus élevée, de 40°C. Nous remarquons, donc, que pour la plupart des molécules de L-asparaginase étudiées, le pH8 est toujours favorable à une meilleure activité enzymatique.

En dépit des optimales généralement de pH 7 à 8 et d'une température de 35 à 37°C, des valeurs très éloignées ont été obtenues dans certains travaux, sur la L-asparaginase

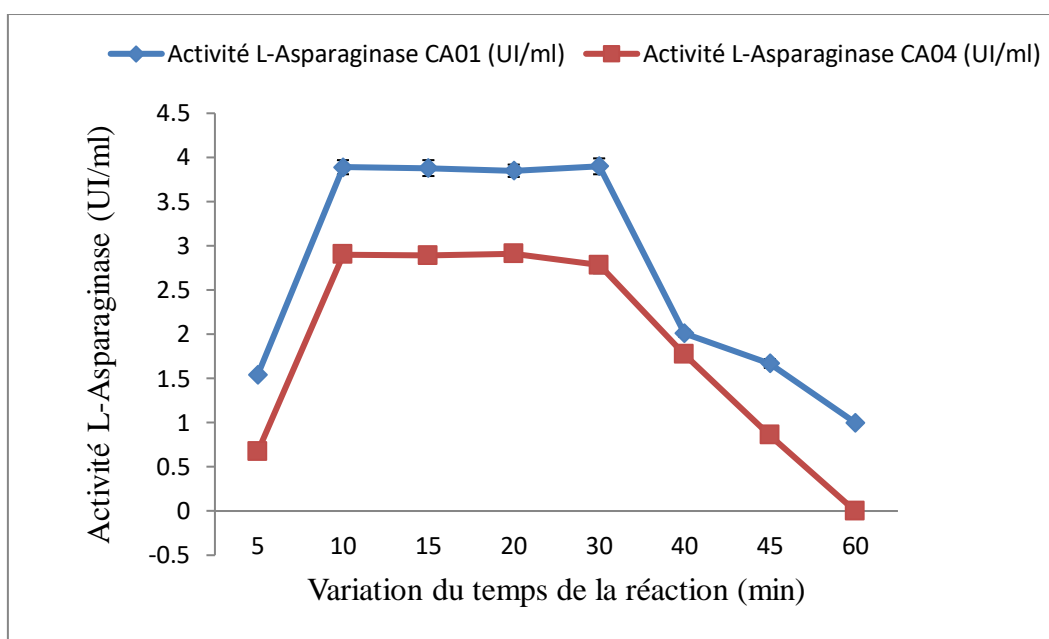
microbienne. Justement, les valeurs optimales en pH et température d'une L-asparaginase, produite par un actinomycète d'origine marine et partiellement purifiée par Basha et al. (2009) ont été de pH7,5 à 50°C. De leur part, Borah et al. (2012) avaient conclu à des optimums de pH6 et une température de 55°C, d'une L-asparaginase produite par *E. Coli*. Sivasankar et al. (2013) ont conclu qu'un pH8,5 et une température de 40°C étaient des optimums pour l'activité d'une L-asparaginase produite par une souche de *Streptomyces* marine.

Nous pouvons facilement remarquer, selon les travaux cités, que les optimales d'activité L-asparaginase, notamment en terme de pH et température, sont situées, pour les actinomycètes, à pH allant de 7 à 8 et des températures proches de la température corporelle (physiologique). Cela présente un intérêt considérable pour la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de la substance, vu que l'idéal est d'avoir un maximum d'activité, dans ces conditions. En plus, selon Narta et al. (2007), la L-asparaginase est une substance qui présente une grande affinité pour l'espace intra-vasculaire, et se retrouve donc, rapidement dans le sang, juste après son administration intraveineuse, lors du traitement. Ce qui nécessite une stabilité de l'enzyme, à pH et température physiologique.

Toute fois, pour certaines souches productrices, isolées de milieux extrêmes, des valeurs de températures plus élevée ont été notées. Ce qui permet une stabilité de l'enzyme, dans les conditions industrielles. Néanmoins, dans ce cas, il va falloir réaliser des études d'optimisation, pour situer les optimums d'activité, et les corrélés aux conditions retrouvées *in vivo*.

### **2-9-2-Effet du temps de la réaction**

La figure 34 ci-après illustre la variation de l'activité L-asparaginase des isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> des deux souches *Streptomyces paulus* CA01 et *Streptomyces hydrogenans* CA04, en fonction de la variation du temps de la réaction enzymatique.

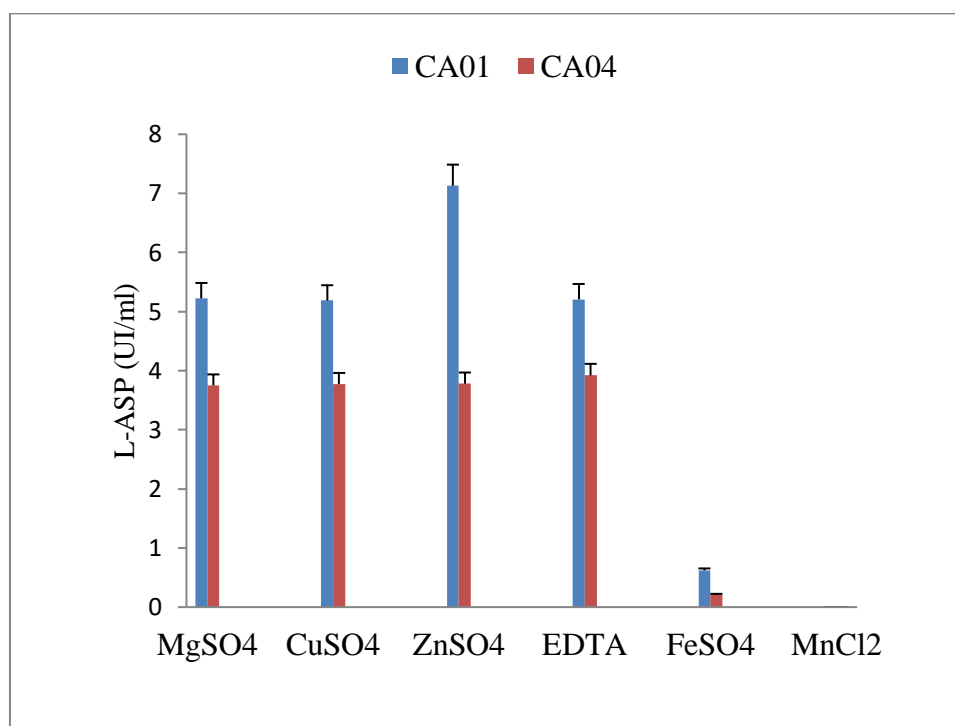


**Figure 35 :** Effet de la variation du temps sur la réaction enzymatique catalysée par la L-asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04.

Lors de l'étude de l'activité enzymatique de la L-asparaginase en fonction du temps de la réaction, nous avons remarqué que l'activité augmente d'une façon continue, jusqu'à 10min, puis devient pratiquement stationnaire jusqu'à 30min, où l'activité décline graduellement jusqu'à disparition presque complète mais complète pour l'enzyme A<sub>4</sub>, au voisinage de 60min de temps d'incubation de la réaction enzymatique. Un résultat proche avait été trouvé par Dharmaraj, en 2011, où le temps de réaction optimal pour l'activité L-asparaginase produite par le genre *Streptomyces* est équivalent à 35min.

### 2-9-3-Effet des cofacteurs sur la stabilité de la L-asparaginase

Dans la figure 36, nous avons représenté l'influence de certains sels sur l'activité L-asparaginase produite par les deux souches *S. paulus* CA01 et *S. hydrogenans* CA04.



**Figure 36:** Effet de sels métalliques sur la réaction enzymatique catalysée par la L-asparaginase semie-purifiée des deux souches candidates CA01 et CA04.

Dans cette partie, nous avons étudié la stabilité des isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> de L-asparaginase, produits par les deux souches *Streptomyces paulus* CA01 et *Streptomyces hydrogenans* CA04 en présence de certains sels de différentes natures chimiques, afin d'avoir une idée sur la stabilité des enzymes dans certaines conditions physico-chimiques, notamment en présence de minéraux, qui peuvent être des activateurs ou des inhibiteurs de l'enzyme.

En comparant l'activité L-asparaginase obtenue en présence de chacun des sels, à l'activité de chaque enzyme, nous remarquons que la plupart des cofacteurs utilisés n'affectent pas l'activité des deux isoformes. Cependant, nous notons que le Zn<sup>2+</sup> a augmenté considérablement l'activité L-asparaginase produite par CA01, et que le Fe<sup>2+</sup> a diminué d'une manière remarquable, l'activité des enzymes produites par les deux souches. Enfin, le Mn<sup>+</sup> s'est avéré un inhibiteur puissant de tous les isoformes.

Dans le même contexte, Patro et Gupta (2012) ont étudié la stabilité de la L-asparaginase produite par une moisissure du genre *Penicillium*, et ont constaté que l'enzyme a été inhibée par l'EDTA, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup>. Son activité n'est, par contre pas affectée par le Ca<sup>2+</sup> et le Fe<sup>2+</sup>.

### 2-9-4-Affinité aux différents substrats

Le tableau ci-après résume les résultats de l'activité enzymatique des deux isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> de L-asparaginase, produits par les deux souches *Streptomyces paulus* CA01 et *Streptomyces hydrogenans* CA04 à l'égard des trois substrats, à savoir le substrat habituel : L-asparagine pris comme référence et les deux autres substrats choisis dans cette études, à savoir : la L-Glutamine et l'acide L-Aspartique. Le tableau XXII montre les activités relatives des deux substrats choisis, en comparaison avec l'activité de dégradation de la L-Asparagine, représentant l'activité L-asparaginase complète

**Tableau XXII :** Tableau résumant les activités enzymatiques des molécules L-asparaginase A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> produites par les deux souches *Streptomyces paulus* CA01 et *Streptomyces hydrogenans* CA04 vis-à-vis des trois substrats.

Les isoformes	Activités enzymatiques à l'encontre des différents substrats (UI/ml)					
	L-Asparagine	Activité Relative (%)	L-Glutamine	Activité Relative (%)	Acide l-aspartique	Activité relative (%)
L-asparaginase A <sub>1</sub> de CA01.	5,66	100	0,19	3,36%	0,01	0,18%
L-asparaginase A <sub>4</sub> de CA04.	3,28	100	0,09	2,74%	0,012	0,36%

Nous remarquons que les enzymes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> produites par nos deux souches CA01 et CA04 possèdent des activités hydrolytiques faibles à l'égard des autres substrats : L-Glutamine et acide L-Aspartique, avec des activités relatives de 3,36% et 2,74%, pour les enzymes des deux souches CA01 et CA04, respectivement, vis-à-vis de la L-Glutamine, ainsi que des activités relatives encore plus faibles, de 0,18% et 0,36%, vis-à-vis de l'acide L-Aspartique. Ces résultats démontrent que les isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> produites par nos souches présentent une forte affinité à la L-Asparagine, substrat habituel, et de très faibles affinités à l'égard des autres substrats. D'autre part, il est important de signaler que se sont les L-asparaginase possédant de fortes activités catalytiques résiduelles à l'encontre de la L-Glutamine, qui présentent de fortes toxicités, sur l'organisme (Narta et al., 2007). Car ces dernières abolissent beaucoup de protéines jouant des rôles vitaux, et qui s'avèrent riche en L-Glutamine. Cela engendre l'apparition de troubles au niveau de la coagulation du sang, des pancréatites conduisant à l'apparition du diabète, de l'hépatotoxicité (Mashburn et al., 1964).

Pour cela, les enzymes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> produites par nos souches peuvent être moins toxiques sur l'organisme, vu l'activité relative faible sur la L-Glutamine. Wade et al. (1987) ont, en plus précisé qu'en tout cas, même la L-asparaginase utilisée actuellement dans la chimiothérapie anticancéreuse, notamment à l'égard des lymphomes, possèdent des activités Glutaminase, de 10%. Selon Broome (1968), la toxicité est rarement due à l'hydrolyse de la L-Asparagine dans les cellules normales, puisque ces dernière présentent une résistance vis-à-vis de la L-asparaginase, en plus les cellules cancéreuses sont sensibles à l'attaque de l'enzyme, à des concentrations en L-Asparagine supérieures à celles des cellules normales.

La L-asparaginase a faible activité glutaminase est actuellement un sujet d'étude sur la recherche de nouvelles molécules de L-asparaginase moins toxiques et plus efficaces. Dans les travaux de Huang et al. (2013) une nouvelle L-asparaginase dépourvue d'activité glutaminase, a été purifiée et séquencé. Il s'agit d'une molécule produite par une moisissure du genre *Rhizomucor*, qui s'est avérée efficace dans la diminution du taux de résidus d'acrylamide dans les biscuits ainsi que l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuse K562.

Néanmoins, différents types de toxicité ont été rencontrés, lors des traitements par la L-asparaginase. En plus de la destruction des protéines fonctionnelles riches en Glutamine (Ex. facteurs de coagulation du sang), des réactions d'hypersensibilité ou d'inactivation de la L-asparaginase par la fabrication *in vivo*, d'anticorps anti-asparaginase, ont été repérées, lors de l'injection de ces molécules (Gallagher et al., 1989).

La notion d'affinité de la L-asparaginase microbienne à différents substrats est discutée par les chercheurs du domaine, ainsi selon Warangkar et khobragade, (2010), l'espère microbienne ainsi que son environnement de croissance naturel, jouent un rôle important dans l'affinité de l'enzyme produite, vis-à-vis des différents substrats. Mais la plupart des molécules utilisées actuellement en thérapie anticancéreuse ont des activités L-Glutaminase nulles ou presque, avec 0% pour l'enzyme isolée à partir du sérum de porc, 2% pour l'isoforme produit par *E. Coli*, 5% pour l'enzyme de *Serratia* et 10% pour l'enzyme d'*Erwinia* (Wade, 1987).

### 2-10-Etude de la cinétique enzymatique (détermination de $K_M$ et $V_{max}$ )

Afin de déterminer la cinétique des isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> produites par les deux souches, nous avons tracé la courbe de l'activité enzymatique (UI/ml) en fonction du temps de la réaction, en considérant la phase où l'activité enzymatique est en croissance, c'est-à-dire la période allant de 0 à 10min. Le résultat est montré dans la figure ci-après.

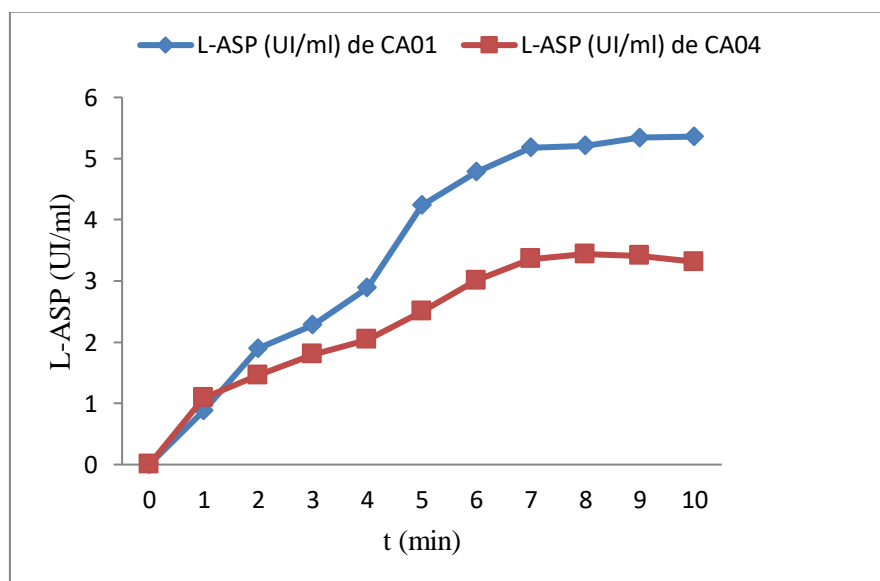


Figure 37 : Cinétique de l'activité L-asparaginase des deux isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub>.

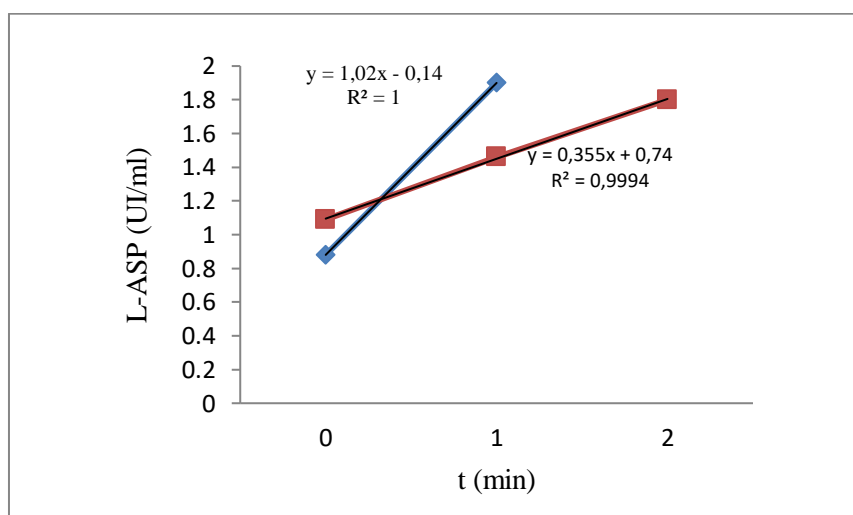
Selon Michaelis-Menten, la vitesse maximale est déterminée de la courbe de  $V = f(t)$ .

Avec :  $V$  : Vitesse de la réaction enzymatique qui exprime l'activité enzymatique en UI/ml.

$t$  : Temps de la réaction enzymatique en min.

Et dans cette courbe (figure 37), les maximales correspondent aux vitesses maximales ( $V_{max}$ ) qui sont respectivement de 5,36UI/ml et 3,44UI/ml pour les L-asparaginase  $A_1$  et  $A_4$  des deux souches *CA01* et *CA04* respectivement. Nous signalons que nous avons estimé les activités enzymatiques ainsi que les vitesses des réaction en terme d'activité enzymatique totale (UI/ml) afin de nous situer, par rapport aux valeurs utilisées avec les molécules de L-asparaginase commercialisées et utilisées en chimiothérapie anticancéreuse, actuellement.

Pour déterminer les vitesses initiales, nous avons réalisé une linéarisation des courbes de cinétique en considérant, selon l'équation de Michaelis-Menten, uniquement les points linéaires. Le résultat est montré dans la figure ci-après :

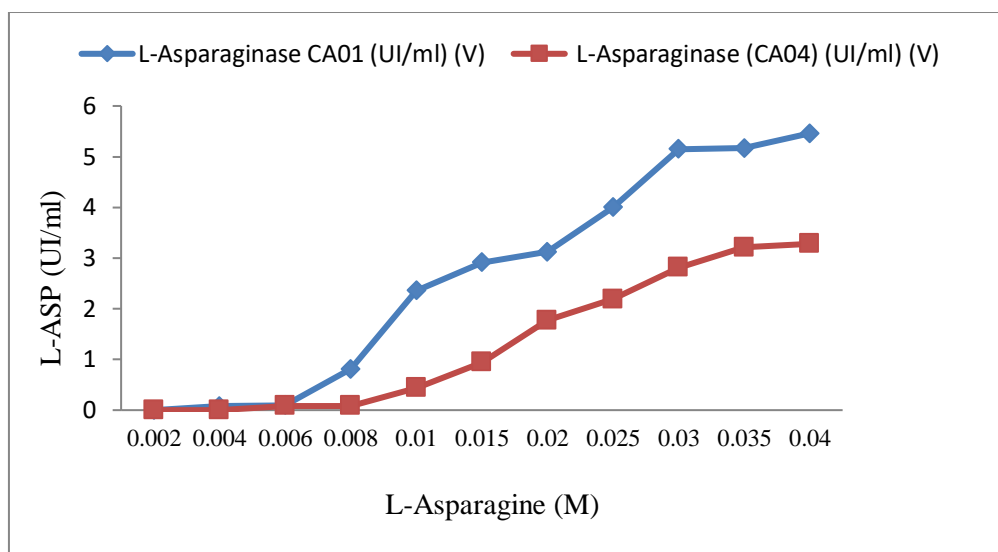


**Figure 38** : Graphiques représentant les vitesses initiales ( $V_i$ ) des isoformes  $A_1$  et  $A_4$  de L-asparaginase, produits par les deux souches *Streptomyces paulus* CA01 et *Streptomyces hydrogenans* CA04.

Les vitesses initiales  $V_i$  sont déterminées à partir des équations des droites des activités enzymatiques produites par les deux souches *CA01* et *CA04*, sachant que les  $V_i$  sont représentées par les pentes des droites.

Pour cela les valeurs de  $V_i$  sont de 1,02UI/ml et 0,36UI/ml pour les isoformes  $A_1$  et  $A_4$  de L-asparaginase des deux souches *CA01* et *CA04*, respectivement. Ce qui illustre que l'isoforme produit par *Streptomyces paulus* CA01 possède une activité L-asparaginase plus forte et plus rapide par rapport à l'isoforme de *Streptomyces hydrogenans* CA04.

Selon Michaelis-Menten, la  $K_M$  est la concentration en substrat qui sature l'enzyme à moitié, donc la  $K_M$  peut être déterminée, graphiquement à partir de la figure 39 qui suit :



**Figure 39** : Représentation graphique de l'activité (ou vitesse) enzymatique L-asparaginase des isoformes A1 et A4 (V) en fonction de la concentration en substrat (S).

Pour cela les valeurs de  $K_M$  sont de 0,012M et 0,02M pour les isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> respectivement.

L'affinité de la L-asparaginase à son substrat est en corrélation avec son degré d'attaque des cellules tumorales (El-Besoumy et al, 2004). Cette affinité est étudiée par la mesure de la  $K_M$  et de la  $V_{max}$  vis-à-vis de la L-Asparagine. Ces paramètres cinétiques sont souvent déterminés par l'analyse de *Lineweaver-Burk*, dans le cas d'une enzyme pure. Cependant dans notre étude où nous avons travaillé sur des fractions partiellement purifiées, nous avons réalisé l'étude de la cinétique enzymatique dans le but d'avoir une idée sur l'affinité des molécules de L-asparaginase produites par les deux souches sélectionnées, notamment les deux isoformes A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub>, vis-à-vis du substrat L-Asparagine, et d'envisager plus tard des études de purification approfondies qui nous permettront d'étudier les paramètres physico-chimiques et cinétiques des molécules pures.

D'ailleurs, en comparant nos résultats à d'autres travaux sur la L-asparaginase d'origine microbienne, nous remarquons que nos isoformes ( $K_{MA1}$  de  $1,2 \cdot 10^{-2}M$  et  $K_{MA4}$  de  $2 \cdot 10^{-2}M$ ), même non purifiés, présentent des affinités proches des enzymes pures. Patro et Gupta (2012) ont obtenu une valeur de  $K_M$  de  $4 \cdot 10^{-3}M$ , d'une L-asparaginase produite par une moisissure du genre *Penicillium*. De leur part, El-Sabbagh et al. (2013) ont obtenu une valeur de  $K_M$  de 0.1939 mM. Basha et al. (2009) ont, de leur côté conclu à des valeurs cinétiques de  $K_M$  et  $V_{max}$  de la L-asparaginase partiellement purifiée, de 24  $\mu M$  et 51 IU/ml, respectivement. L'enzyme produite par *E. Coli* possède une  $K_M$  de  $1,25 \cdot 10^{-5}M$ , celle de *Proteus Vulgaris* avec  $K_M$  de  $2,6 \times 10^{-5} M$  et celle d'*Erwinia Aroideae* NRRLQ-138 avec une  $K_M$  de  $3,0 \times 10^{-5} M$ . Ces constantes catalytiques sont déterminées par la courbe linéaire de *Lineweaver-Burk* pour une L-asparaginase suivant une cinétique Michaelienne (Basha et al., 2009).

El-Bessoumy et al. (2004) ont déterminé les constantes cinétiques  $K_M$  de 0,147mM et  $V_{max}$  de 35,7UI, en se basant sur l'analyse de Lineweaver-Burk de la L-asparaginase produite par, ce qui indique, selon ces auteurs, une forte affinité au substrat.

### **2-11-Etude de la L-asparaginase intracellulaire**

Nous avons pensé à chercher et à réaliser une étude préliminaire sur la L-asparaginase intracellulaire des deux souches sélectionnées, vu que cette enzyme est très peu étudiée. Cela est dû notamment au coût économique de son extraction et purification. Cependant il peut s'agir d'une molécule ayant des propriétés chimiques et pharmacologiques intéressantes. D'autre part, le potentiel de nos souches à produire la L-asparaginase nous a permis d'ouvrir l'axe de cette étude. Pour cela, il nous a fallu, d'abord mettre en évidence l'existence de cette enzyme intracellulaire, puis d'optimiser le rendement de sa production. Enfin nous avons procédé à son extraction par précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une séparation par chromatographie sur Séphacryl S-200 et un contrôle par électrophorèse PAGE-SDS.

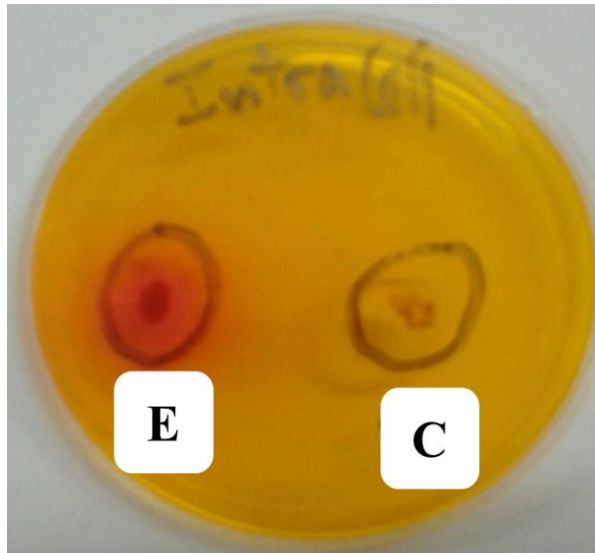
#### **2-11-1-Mise en évidence de l'activité L-asparaginase intracellulaire sur milieu solide**

Après la récupération des fractions protéiques intracellulaires des deux souches sélectionnées, le screening de l'activité L-asparaginase a été réalisé sur celles-ci.

Pour cela, suivant la méthode d'ANDERSON et McKay (1983), nous avons mis la fraction protéique intracellulaire préalablement lavées 03 fois par le tampon Tris/HCl 0,5M à pH8,4 ; en contact avec le substrat (L-asparagine) par la méthode de diffusion des puits. Selon le résultat illustré sur la figure 40, ci-après, on voit clairement l'apparition du virage de la couleur du milieu, vers le rose, au niveau du puits sur lequel nous avons déposé l'extrait correspondant à la fraction protéique intracellulaire de la souche CA01, contrairement au contrôle négatif. Ce qui prouve l'existence de l'activité L-asparaginase intracellulaire produite par la souche CA01.

Tandis que pour la souche CA04, le résultat est négatif, ce qui veut dire, que cette souche bactérienne ne produit pas une L-asparaginase intracellulaire.

La même démarche de diffusion sur puits, a été suivie par (El Naggar et al, 2014) pour mettre en évidence la production d'une L-asparaginase extracellulaire par *Streptomyces olivaceus* NEAE-119.



**Figure 40** : Photo montrant le résultat de l'activité L-asparaginase de la fraction protéique intracellulaire de *Streptomyces paulus* CA01.

C : Témoins négatif contenant du bouillon ADS non ensemencé ; E : Extrait de la fraction protéique intracellulaire de la souche CA01.

Pour le reste du travail concernant l'optimisation de la production de l'enzyme intracellulaire, le dosage de l'activité enzymatique L-asparaginase a été effectué, par le réactif de Nessler.

### **2-11-2-Optimisation de la production de la L-asparaginase intracellulaire par la souche *Streptomyces paulus* CA01.**

Le tableau suivant montre la matrice des expériences donnée par le logiciel Minitab 17. Les réponses représentent les moyennes des valeurs de l'activité L-asparaginase, dépendante des 03 facteurs choisis.

**Tableau XXIII :** Matrice des expériences pour l'optimisation de la production de la L-asparaginase intracellulaire par la souche *CA01*.

StdOrder	RunOrder	Blocks	T	SC	GC	L-ASP (IU/mL)
15	1	1	0	0	0	7,5
14	2	1	0	0	0	6,98
9	3	1	0	-1	-1	2,14
4	4	1	1	1	0	3,94
10	5	1	0	1	-1	4,25
6	6	1	1	0	-1	1
11	7	1	0	-1	1	4,11
8	8	1	1	0	1	3,11
13	9	1	0	0	0	6,53
7	10	1	-1	0	1	3,61
3	11	1	-1	1	0	3,66
12	12	1	0	1	1	8,01
5	13	1	-1	0	-1	1,64
2	14	1	1	-1	0	0,46
1	15	1	-1	-1	0	2,02

**Tableau XXIV :** Coefficients codés des réponses transformées.

Term	Effect	Coefficient	SE Coefficient	T-value	P-value	VIF
Constant		3.7414	0.0753	49.68	0.000	
T	-0.3812	-0.1906	0.0461	-4.13	0.009	1.00
SC	1.3068	0.6534	0.0461	14.17	0.000	1.00
SG	1.1281	0.5640	0.0461	12.23	0.000	1.00
T <sup>2</sup>	-2.9811	-1.4906	0.0679	-21.96	0.000	1.01
SC <sup>2</sup>	-0.9288	-0.4644	0.0679	-6.84	0.001	1.01
GC <sup>2</sup>	-1.0292	-0.5146	0.0679	-7.58	0.001	1.01
T×SC	0.5719	0.2859	0.0652	4.38	0.007	1.00
T×GC	0.0845	0.0422	0.0652	0.65	0.546	1.00
SC×GC	0.2498	0.1249	0.0652	1.92	0.114	1.00

**S** = 0.130433 ; **R<sup>2</sup>** = 99.47% ; **adjusted R<sup>2</sup>** = 98.5% ; **predicted R<sup>2</sup>** = 96.79%.

**Tableau XXV :** Analyse de la variance des réponses obtenues pour l'optimisation de la production de la L-asparaginase intracellulaire, par la souche *CA01*.

Source	DF	Adj. SS	Adj. MS	F-value	P-value
<b>Model</b>	9	15.8306	1.75896	103.39	0.000
<b>Linear</b>					
<b>T</b>	1	0.2906	0.29064	17.08	0.009
<b>SC</b>	1	3.4154	3.41543	200.76	0.000
<b>GC</b>	1	2.5452	2.54520	149.60	0.000
<b>Square</b>					
<b>T<sup>2</sup></b>	1	8.2036	8.20360	482.20	0.000
<b>SC<sup>2</sup></b>	1	0.7963	0.79620	46.80	0.001
<b>GC<sup>2</sup></b>	1	0.9777	0.97774	57.47	0.001
<b>2-Way interaction</b>					
<b>T×SC</b>	1	0.3270	0.32704	19.22	0.007
<b>T×GC</b>	1	0.0071	0.00714	0.42	0.546
<b>SC×GC</b>	1	0.0624	0.06241	3.67	0.114
<b>Error</b>					
<b>Lack of Fit</b>	3	0.0232	0.00774	0.25	0.857
<b>Pure Error</b>	2	0.0618	0.03092		
<b>Total</b>	14	15.9157			

Suivant le même principe de l'analyse de la variance, nous remarquons que selon le tableau de l'ANOVA, les variables significatives sont *T*, *SC*, *GC*, *T<sup>2</sup>*, *SC<sup>2</sup>*, *GC<sup>2</sup>* et *T×SC*. Selon le tableau XIII, des coefficients des facteurs codés, c'est uniquement la température (T) qui influence négativement, sur la production de la L-asparaginase intracellulaire. Cela peut être dû à la stabilité de l'enzyme à une température moins élevée, à l'intérieur des cellules bactériennes.

Nous avons tout de même procédé à l'élimination des variables non significatives, et nous avons, de ce fait obtenu un modèle simplifié, dont l'analyse statistique est montrée ci-après.

**Tableau XXVI :** Tableau des coefficients codés pour les réponses transformées.

Term	Effect	Coefficient	SE Coefficient	T-Value	P-Value	VIF
Constant		2,6453	0,0537	49,28	0,000	
T	-0,2721	-0,1360	0,0329	-4,14	0,004	1,00
SC	0,8000	0,4000	0,0329	12,17	0,000	1,00
GC	0,6790	0,3395	0,0329	10,33	0,000	1,00
T <sup>2</sup>	-1,7554	-0,8777	0,0484	-18,14	0,000	1,01
SC <sup>2</sup>	-0,5365	-0,2682	0,0484	-5,54	0,001	1,01
GC <sup>2</sup>	-0,5632	-0,2816	0,0484	-5,82	0,001	1,01
T×SC	0,4074	0,2037	0,0465	4,38	0,003	1,00

**Tableau XVII :** Analyse de la variance des réponses de l'activité L-asparaginase intracellulaire.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	7	5,65915	0,80845	93,53	0,000
Linear		2,35021	0,78340	90,64	0,000
T	1	0,14805	0,14805	17,13	0,004
SC	1	1,28009	1,28009	148,10	0,000
GC	1	0,92207	0,92207	106,68	0,000
Square		3,14294	1,04765	121,21	0,000
T <sup>2</sup>	1	2,84434	2,84434	329,08	0,000
SC <sup>2</sup>	1	0,26568	0,26568	30,74	0,001
GC <sup>2</sup>	1	0,29279	0,29279	33,87	0,001
2-Way Interaction		0,16600	0,16600	19,21	0,003
T×SC	1	0,16600	0,16600	19,21	0,003
Error	7	0,06050	0,00864		
Lack-of-Fit	5	0,04370	0,00874	1,04	0,557
Pure Error	2	0,01680	0,00840		
Total	14	5,71966			

**Résumé du modèle :**  $S = 0,0929696$  ;  $R\text{-sq} = 98,94\%$  ;  $R\text{-sq(aj)} = 97,88\%$  ;  $R\text{-sq(pred)} = 93,37\%$ .

En nous basant sur le même principe d'analyse statistique que l'enzyme extracellulaire, notre modèle est évalué par le  $R^2$ , car selon Kaushik et al. (2006), le  $R^2$  est situé entre 0 et 1, et plus ce dernier est proche du 1, plus le modèle représenté est fort et permet de prédire la réponse. Pour cela, un  $R^2$  ajusté ( $Adj\text{-}R^2$ ) de 0.9788 indique une très haute significativité de notre modèle, et un  $R^2 = 0.9894$  traduit une meilleure corrélation entre les différentes variables représentées dans l'équation du modèle, ce qui signifie une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites. Ce résultat renforce notre hypothèse de départ, concernant l'influence des 3 facteurs choisis, sur la production de l'enzyme. D'autre part, une telle valeur de  $R^2$  signifie que 98.94% de variabilité de la réponse étudiée est expliquée par l'effet des facteurs choisis, et uniquement 1.06% de la variation de la réponse est influencée par des facteurs non étudiés (incontrôlables). Les coefficients du modèle déterminent la significativité des variables étudiées. Selon (Akhazarova and Kafarov, 1982), la significativité de chaque coefficient est déterminée par le test de Student's  $t$ -test et la  $P$ -value où les variables significatives ont des  $P\text{-value} < 0.05$ . Dans nos résultats, en référence aux tableaux XXIV et XXV, nous remarquons que les effets significatifs du modèle ont été : T, SC, GC, T<sup>2</sup>, SC<sup>2</sup>, GC<sup>2</sup> et T×SC.

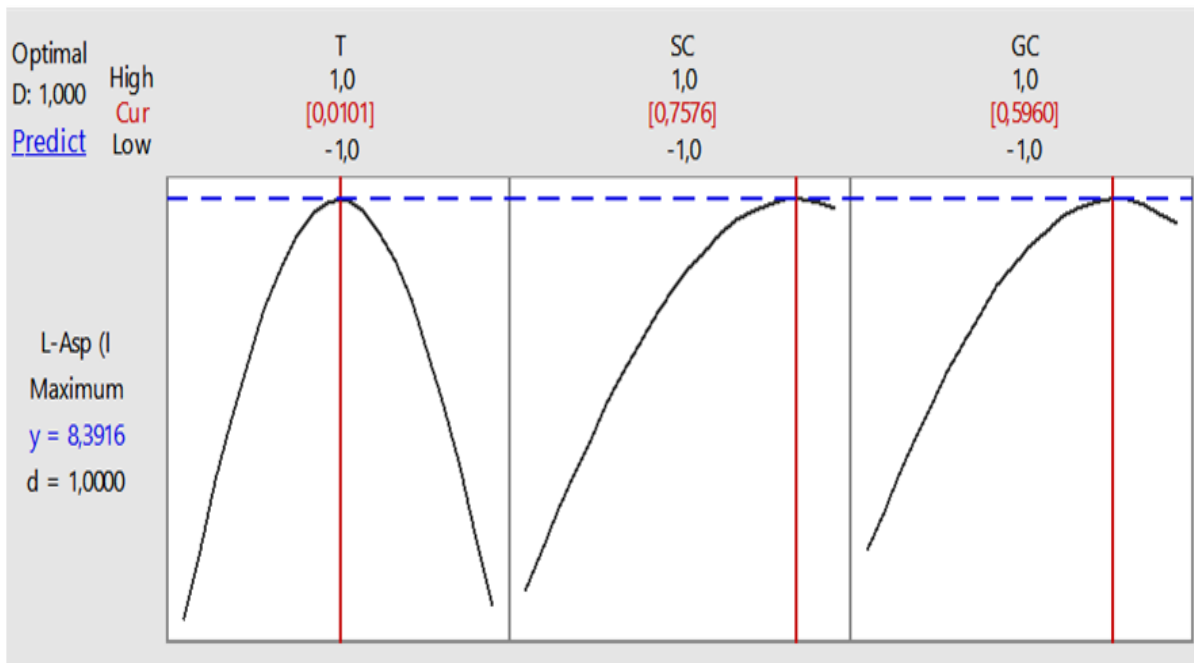
D'autre part, en nous basant sur le test de Fischer et les effets, nous remarquons que c'est la concentration en substrat (SC) qui est la plus significative (avec une  $F\text{-value}$  de 200.76 et un effet de 1.031), suivie de la concentration en glucose (GC) (avec une  $F\text{-value}$  de 149.60 et un effet de 1.13). Il est à signaler que les coefficients positifs de ces deux effets démontrent leurs influences positives sur la production de l'enzyme. Contrairement à la température qui influence négativement, mais à un degré moindre, sur la production de l'enzyme (avec une

F-value de 17.08 et un effet de -0.38). Nous remarquons également que c'est le carré de la température ( $T \times T$ ) qui présente un effet très important sur la production de la L-asparaginase par notre souche CA01, avec une F-value de 482.20. Ces résultats nous indiquent d'une part, que l'augmentation des taux respectifs, de substrat (L-Asparagine) et de glucose dans le milieu de culture, aux intervalles étudiés, induisent l'augmentation significative du rendement en L-asparaginase produite par notre bactérie, et d'autre part, l'augmentation de la température dans l'intervalle étudié, provoque quant à elle, la diminution de la quantité de LA. Il est également important de se pencher sur l'influence de la variable d'interaction T et SC qui a montré une influence significative sur la production de l'enzyme, avec une F-value de 19.22 et un effet de 0.57. Ce résultat prouve que l'effet de la température interagit avec celui de la SC. Autrement dit, l'influence de la concentration de L-Asparagine sur la production de la L-asparaginase est fortement dépendante de la température. En nous basant sur les effets des variables linéaires, nous pouvons conclure que des concentrations élevées en L-Asparagine, dans l'intervalle étudiée, induisent, à faibles température, la production importante de LA par la souche CA01.

L'équation des valeurs codées du modèle :

$$L\text{-asparaginase activity} = 2,6453 - 0,1360 T + 0,4000 SC + 0,3395 GC - 0,8777 T^2 - 0,2682 SC^2 - 0,2816 GC^2 + 0,2037 T \times SC$$

La figure ci-après représente les courbes des valeurs optimale codées, données par le logiciel Minitab17 et permettant d'obtenir la valeur maximale réelle de la réponse.

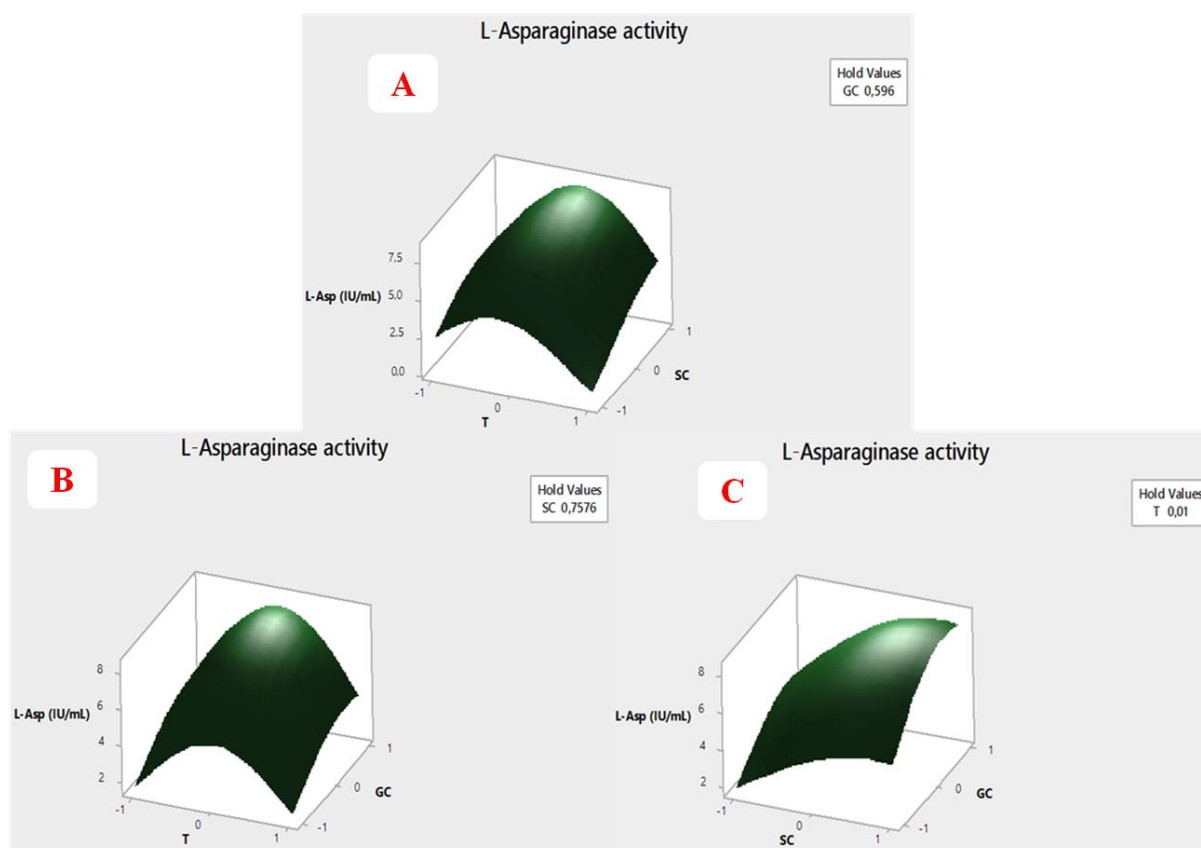


**Figure 41** : Les valeurs optimales de la production de la L-asparaginase intracellulaire par *Streptomyces paulus* CA01.

En nous basant sur le graphe de la figure 41 qui représente les valeurs optimales codées, les optimums réels sont : Température 27,52°C ; concentration en substrat 1,19% ; concentration en glucose 0,26%.

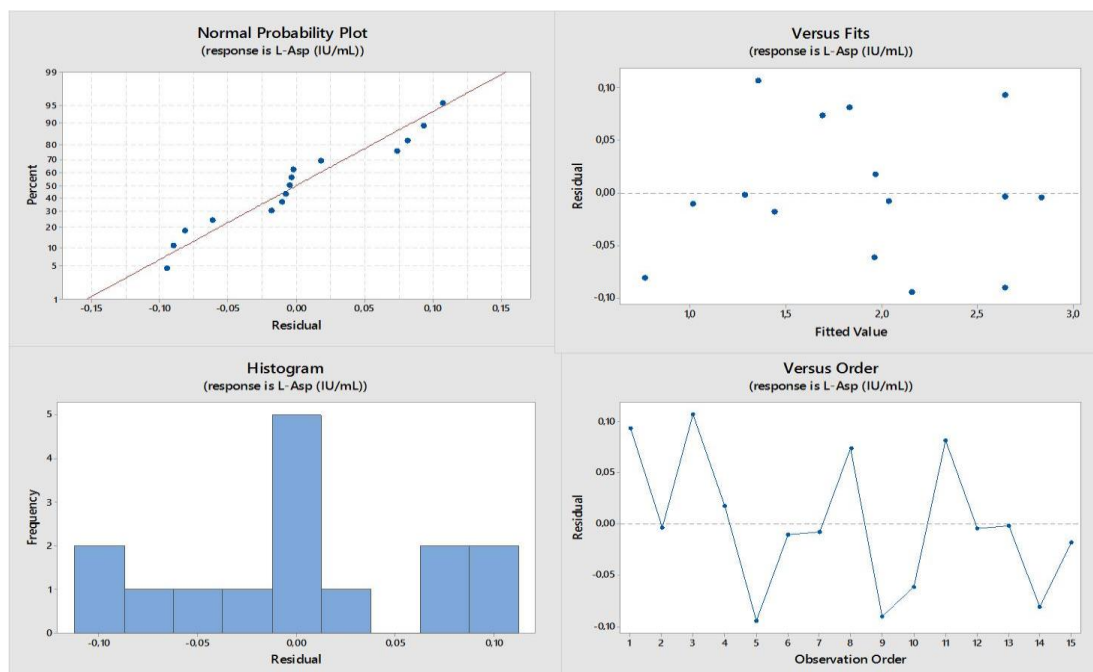
Nous remarquons que ces valeurs sont proches des valeurs optimales de production de l'enzyme extracellulaire, par la même souche et qui sont : 1,07% de L-Asparagine ; 0,27% de glucose, à une température d'incubation de 27,83°C.

D'autre part, des activités L-asparaginase totales très proches sont obtenues dans ces conditions : 8,03UI/ml de L-asparaginase extracellulaire et 8,39UI/ml de L-asparaginase intracellulaire. Ces résultats démontrent que la souche *Streptomyces paulus CA01* présente un grand intérêt industriel, du fait qu'elle est capable de produire plusieurs molécules de L-asparaginase de taille moléculaire différente dont deux isoformes extracellulaires mis en évidence lors des étapes d'extraction et purification partielle et au moins une molécule L-asparaginase intracellulaire, dans des conditions physico-chimiques de culture, très proches.



**Figure 42 :** Les surfaces de réponse de la production de la L-asparaginase intracellulaire par la souche *CA01*.

Suivant le même principe, chaque facteur a été fixé à sa valeur optimale, et l'interaction entre les deux autres facteurs ainsi que leurs effets sur la production de l'enzyme, ont été mis en évidence, à travers la représentation graphique des surfaces de réponse.



**Figure 43 :** Evaluation de l'analyse statistique du modèle de production de la L-asparaginase intracellulaire par la souche *CA01*.

Suivant la figure 43 et en se basant sur le même principe que l'évaluation statistique des modèles de production des enzymes extracellulaires, nous remarquons une distribution aléatoire des points représentant les expériences réalisées, ce qui démontre la fiabilité de la démarche statistique réalisée, et du coup, l'exactitude des résultats obtenus.

La validation expérimentale du modèle obtenu a montré un facteur de corrélation de 95,02%, ce qui appuie la significativité importante de ce dernier pour représenter la réponse étudiée.

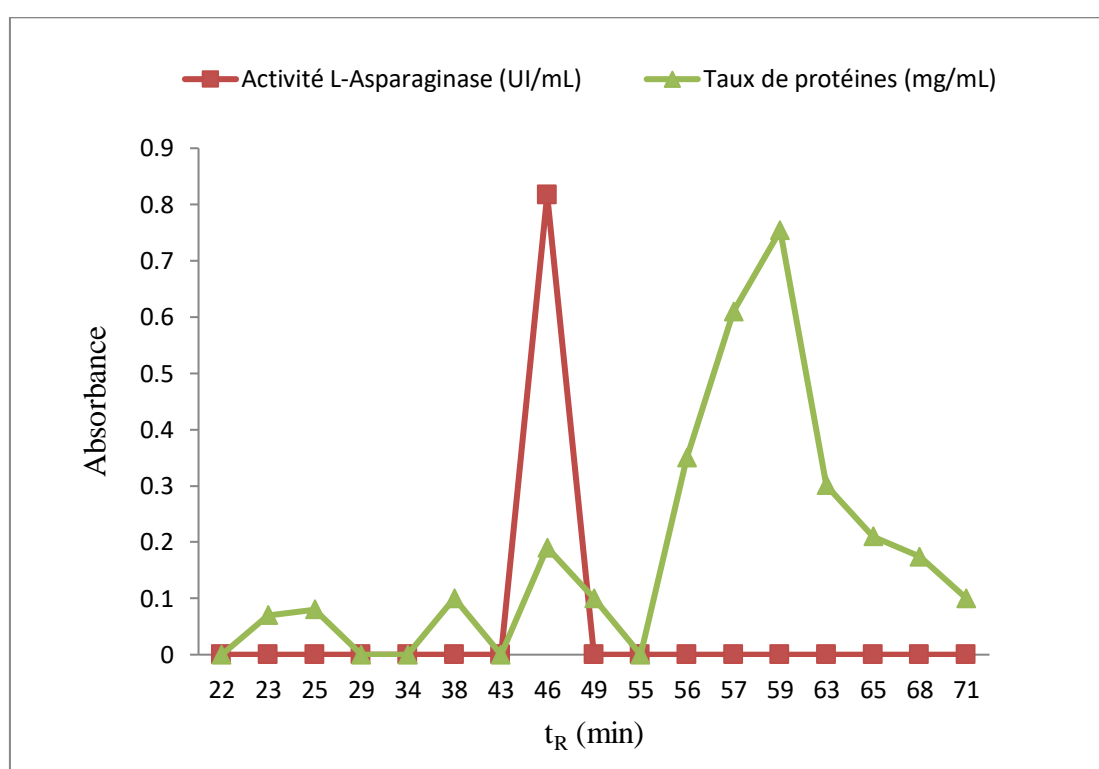
Nous tenons à signaler qu'à travers cette étape de notre travail, nous avons appuyé notre hypothèse sur l'isolement de souches d'actinomycètes potentiellement productrices de la L-asparaginase, et ce, vue la diversité de l'activité enzymatique retrouvée, et les rendements obtenus. Dans des travaux récents dont quelques uns ont été pris comme repères dans cette démarche, c'est la L-asparaginase extracellulaire qui est la plus étudiée. Cependant dans certains travaux rares, l'enzyme intracellulaire a été abordée. C'est le cas des travaux d'Aly et al. (2013) qui ont réalisé une optimisation basée sur un plan OFAT de la production de la L-asparaginase intracellulaire par *Streptomyces sp.*, isolée de la rhizosphère de palmier. Les mêmes auteurs ont d'ailleurs adopté un protocole renfermant une étape de sonication, ayant permis, comme dans notre cas, d'augmenter la lyse cellulaire pour l'extraction de la fraction protéique intracellulaire. D'autre part, Mostafa (1979) a mis en évidence la production d'une L-asparaginase intracellulaire, par des isolats d'actinomycètes du sol.

Même si selon Amena et al. (2010) se sont les molécules L-asparaginase extracellulaires qui sont avantageuses, vue qu'elles sont produites en abondance dans le milieu de culture, il apparaît que notre souche *CA01* isolée du son de blé, exprime presque le même degré

d'activité L-asparaginase entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, et à des conditions physico-chimiques très proches. Cela atteste, encore une fois, de l'intérêt de la souche *Streptomyces paulus* CA01, comme source intéressante de L-asparaginase.

### 2-11-3-Extraction et purification partielle de la L-asparaginase intracellulaire de *Streptomyces paulus* CA01

La figure ci-après montre le pic d'absorbance de la L-asparaginase intracellulaire de *Streptomyces paulus* CA01, séparée sur Séphacryl S-200 à basse pression. Nous rappelons que c'est la fraction précipitée à 80% de sulfate d'ammonium, et qui a montré la forte activité L-asparaginase, que nous avons soumis à une dialyse suivie d'une séparation chromatographique sur Séphacryl S-200.

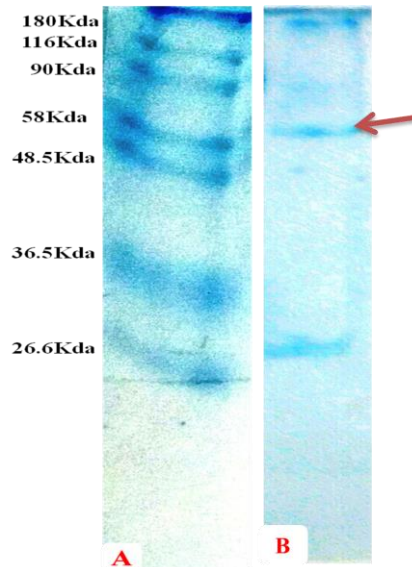


**Figure 44** : Représentation graphique des pics d'absorbances de la fraction L-asparaginase intracellulaire de *Streptomyces paulus* CA01.

Taux de protéines :  $\lambda_{\max}$  = 540nm ; Activité L-asparaginase :  $\lambda_{\max}$  = 450nm.

L'activité L-asparaginase de la fraction protéique intracellulaire de la souche *Streptomyces paulus* CA01 est repérée à un temps de rétention de 46min sur la colonne de chromatographie basse pression utilisée. En utilisant la courbe d'étalonnage de la phase stationnaire, le PM est estimé à 51KDa. Ce résultat montre que la molécule enzymatique intracellulaire est d'une taille inférieure à celle de l'enzyme extracellulaire produite par la même souche. De plus, un seul pic existe dans la fraction intracellulaire évoquant la présence d'une seule molécule L-asparaginase intracellulaire chez la souche *S. paulus* CA01, ayant une activité enzymatique très proche des isoformes extracellulaires.

La figure ci-après illustre la migration de la même fraction sur PAGE-SDS.



**Figure 45 :** Profile protéique séparé sur PAGE-SDS de la fraction intracellulaire de L-asparaginase produite par *Streptomyces paulus* CA01.

Le profile électrophorétique montre l'apparition d'une bande protéique située à un PM très proche de 51KDa, ce qui confirme le résultat obtenu sur les pics de chromatographie, représenté sur la figure 44. Néanmoins des bandes de protéines contaminatrices existent, puisqu'il s'agit d'une purification partielle, nécessitant d'autres étapes de séparation chromatographiques, voir même des techniques performantes à haute performance. Les études sur la L-asparaginase intracellulaire sont très rares. Cependant, Zhu et al. (2007) ont réalisé l'extraction de l'enzyme intracellulaire chez *E. coli* en adoptant une nouvelle approche basée sur l'utilisation d'un homogénéisateur à haute pression pour la réalisation de la lyse cellulaire. De leur part, Raha et al., (1990) avaient extrait et purifié la L-asparaginase intracellulaire d'un champignon ascomycète, et ont estimé son PM à 216KDa. Sinclair-Jon et al., (1994) avaient identifiés deux isozymes de L-asparaginase produits par *Saccharomyces cerevisiae* dont une enzyme intracellulaire et une autre membranaire.

*Conclusion*

*Et*

*Perspectives*

Dans ce travail, il a été question de chercher de nouvelles molécules de L-Asparaginase pouvant avoir des propriétés physico-chimiques intéressantes du point de vue industriel et thérapeutique. Pour cela, nous avons choisi les actinomycètes comme source de production. Pour se faire, nous avons ciblé des niches écologiques très peu ou même non exploitées pour un tel intérêt. Le screening de l'activité L-Asparaginase a été fait sur 17 souches isolées, parmi lesquelles, deux ont été sélectionnées comme productrices potentielles et identifiées sur la base du séquençage complet du gène codant l'ARNr 16S, comme *Streptomyces paulus* CA01 et *Streptomyces hydrogenans* CA04. Nous avons optimisé les conditions de culture pour la production de l'enzyme afin de maximiser le rendement, en adoptant une démarche statistique du plan d'expérience *BBD* utilisant les surfaces de réponse. Cela nous a permis de gagner du temps en réduisant le nombre d'expériences réalisées et d'avoir des rendements plus élevés en enzyme. Nous nous sommes rendus compte de l'intérêt de cette étape d'optimisation, lorsque nous avons obtenu des quantités en protéines ainsi que des activités enzymatiques, qui sont proches des valeurs trouvées, dans d'autres travaux, qui utilisent des méthodes plus performantes d'extraction et de purification. Nous avons constaté que les deux souches choisies *S. paulus* et *S. hydrogenans* ont produit chacune, deux isoformes de L-Asparaginase extracellulaire élués à des temps de rétention, relativement éloignés, ce qui est confirmé d'ailleurs, dans l'évaluation de la résolution des pics apparus et dans les profils électrophorétiques. Ce qui nous a incités à supposer l'existence de deux isoformes dont les PM ont été estimés. D'autre part, les caractéristiques physico-chimiques et cinétiques des isoformes L-Asparaginase A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> obtenus à meilleurs rendements, ont été étudiées. La stabilité de l'activité L-asparaginase produite par les deux souches a été obtenue à des pH et températures physiologiques, ce qui présente un grand intérêt quant à l'utilisation des enzymes, en thérapie, après leur purification complète. D'autre part, la grande affinité à la L-Asparagine coïncidant avec des activités relatives faibles, à l'égard des autres substrats choisis, à savoir la L-glutamine et l'acide L-aspartique est en faveur de molécules enzymatiques moins toxiques sur l'organisme, en considérant les données bibliographiques parlant des différentes formes de toxicité des molécules de L-asparaginase actuelles, notamment celles agissant sur les protéines de l'organisme, riches en L-glutamine. Enfin, une étude préliminaire sur la recherche et la caractérisation de L-asparaginase intracellulaire est réalisée sur les deux souches choisies. Dans ce cas, la seule souche productrice a été *Streptomyces paulus* chez laquelle nous avons trouvé une forme intracellulaire de l'enzyme, à un PM relativement inférieur à celui des enzymes extracellulaires.

Néanmoins, même si nous avons touché à plusieurs volets concernant l'étude de la L-asparaginase produite par les souches d'actinomycètes isolées et sélectionnées en Algérie, il apparaît bien que notre investigation est préliminaire sur les souches productrices et les fractions L-Asparaginase. Pour cela et afin de compléter ce travail, il serait intéressant de faire :

-Séparation fine et purification des différents isoformes de L-Asparaginase produits et études physico-chimiques et cinétiques relatives aux molécules pures, afin de connaître les constantes cinétiques réelles qui serviront à déterminer les doses thérapeutiques ;

## Conclusion et perspectives

-exploration des autres isoformes produits, à savoir B<sub>1</sub> et B<sub>4</sub> en réalisant des études de caractérisation et des essais de synergie avec les autres isoformes, déjà caractérisés dans cette étude ;

-identification des gènes codant aux molécules d'intérêt et clonage sur modèle bactérien peu exigeant du point de vu croissance, comme certaines souches de référence d'*E. Coli* ;

-essais d'activité anticancéreuse sur des cellules tumorales en culture, afin de maitriser les cibles des enzymes, ainsi que les temps et vitesses d'actions.

-séquençage des protéines enzymatiques et identification de l'orientation spatiale de leurs sites actifs.

-réalisation d'essais *in vivo* sur modèles animaux, concernant la pharmacodynamique et la toxicodynamique des molécules étudiées afin de déduire les doses létales et les concentrations maximales plasmatiques, ce qui nous aidera à déterminer l'indice thérapeutique exigé dans les dossiers toxicologiques pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché, ultérieurement.

*Références*  
*Bibliographiques*

Abdallah A., N., Khairy Amer S. and Khalil Habeeb M. (2012). Screening Of L-Glutaminase Produced By Actinomycetes Isolated From Different Soils In Egypt. *International Journal of ChemTech Research*. ISSN : 0974-4290. 4 : 1451-1460.

Abdel-Fatah M. K. (1996). Studies on the asparaginolytic enzymes of *Streptomyces*. Culture conditions for the production of L-Asparaginase enzyme from *Streptomyces longsporusflavus* (F-15) strain. *Egyptian Journal of Microbiology*. 30: 247-60.

Abdulla H. (2009). Bioweathering and Biotransformation of Granitic Rock Minerals by Actinomycetes. *Microbial Ecology*. 58 (4): 753 – 761.

Agarwal A., Kumar S. and Veeranki V. D. (2010). Effect of chemical and physical parameters on the production of L-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. *Letters in Applied Microbiology*. 52 : 307–313.

Aghaiypour K., Wlodawer A., and Lubkowski J. (2001). Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry*, 40 : 5655–5664.

Agostinelli E., Vianello F., Magliulo G., (2015). Nanoparticle strategies for cancer therapeutics: nucleic acids. Polyamines, bovine serum amine oxidase and iron oxide nanoparticles. *International Journal of Oncology*. 46: 5–16. PubMed: 25333509.

Ait Barka E., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H-P., Clément C., Ouhdouch Y., Van Wezel J. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 80 : 1 – 43.

Akhazarova S. and Kafarov V. (1982). Experiment Optimization in Chemistry and Chemical Engineering, *Journal of polymer science, Part C : Polymer Letters. Book Review*. Mir Publishers, Moscow, Russia. 312 p.

Alvarez O. A., Zimmerman G. (2000). Pegaspargase-induced pancreatitis. *Medical Pediatrics and Oncology*. 34:200-205.

Alves C., Chaves C., Souza M. (2007). Transient diabetes mellitus related to L-asparaginase therapy. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 51(4) : 635.

Aly M. M., Jastaniah S. and Kuchari M. G. (2013). L- Asparaginase from *Streptomyces* sp. isolated from the rhizosphere of a palm tree, its separation, purification and antitumor activity. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*. 4(2) : 12 – 21.

Al-Zarban S. S., Al-Musallam A. A., Abbas I., Stackebrandt E., Kroppenstedt R. M. (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh

soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**:555-558. PubMed.

Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., and Lingappa, K. (2010). Production, purification and characterization of Lasparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41 (1): 173–178.

Amy L. Swain M. J., Houssett D., Mohana J. K. and Wlodawer A. (1993). Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceeding in National Academy Science*. 90 : 1474-1478.

Amylon M. D., Shuster J., Pullen J. (1999). Intensive high-dose lasparaginase improves survival for pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*. 13: 335–42.

Anderson A. S. and Wellington E. M. H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 797–814.

Angiolillo A. L., Schore R. J., Devidas M. (2014). Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of calaspargase pegol Escherichia coli L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia: results from children's oncology group study AALL07P4. *Journal of Clinical Oncology*. 32:3874–3882. PubMed: 25348002.

Appel I. M., Van Kessel-Bakvis C., Stigter R., Pieters R. (2007). "Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia". *Leukemia*. 21 (11): 2377–80. PMID: 17554375.

Appel I. M., Kazemier K. M., Boos J. (2008). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and intracellular effects of PEG-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: results from a single agent window study. *Leukemia*. 22:1665-1679.

Armstrong R. A. and Hilton A. C. (2004). The use of analysis of variance (ANOVA) in applied microbiology. *Microbiologist*. 18–21.

Ashrafi H., Amini M., Mohammadi-Samani S. (2013). Nanostructure Lasparaginase- fatty acid bioconjugate: synthesis, preformulation study and biological assessment. *International Journal of Biological Macromolecules*. 62:180–187. PubMed: 23994737.

Asselin B., Rizzari C. (2015). Asparaginase : pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leukemic Lymphoma*. 56:2273–2280. PubMed: 25586605.

Asselin B. L., Ryan D., Frantz C. N. (1989). *In vitro* and *in vivo* killing of ALL cells by l-asparaginase. *Cancer Research*. 49:4363–9.

## Références bibliographiques

- Avramis V. I., Tiwari P. N. (2006). Asparaginase native ASNase or pegylated ASNase. in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Nanomedicine*. 1:241-254.
- Bachet J. B., Gay F., Maréchal R. (2015). Asparagine synthetase expression and phase I study with L-asparaginase encapsulated in red blood cells in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 44:1141–1147. PubMed: 26355551.
- Bagert U. and Rohm K. H. (1989). On the role of histidine and tyrosine residues in E. coli asparaginase. Chemical modification and 1H-nuclear magnetic resonance studies. *Biochimica and Biophysica Acta*. 999 : 36-41.
- Bahreini E., Aghaiypour K., Abbasalipourkabar R. (2014). Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. *Nanoscale Research Letters*. 9:340. PubMed: 25114635.
- Balachandran C., Durairandiyani V., Ignacimuthu S. (2012). Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S392 – S400.
- Balagurunatha R., Radhakrishnon M., Somasundaram S. T. (2010). L-Glutaminase producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semiquantitative assay and characterization of potential strain. *Australian Journal of Basic and Applied Science*. 4:698–705.
- Baldacci E. (1962). Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*. (4) : 633–646
- Ballav S., Kerkar S., Thomas S., Augustine N. (2015). Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 119 (3) : 323-330.
- Baltz R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion of Pharmacology*. 8:557–563. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2008.04.008>.
- Baltz R. H. (2010). Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster. *The Journal of Antibiotics*. 63:506–511. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2010.82>.
- Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H-P., Clément C., Ouhdouch Y., Van Wezel G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 80: 1 – 43. doi:10.1128/MMBR.00019-15.

- Barry E., DeAngelo D. J., Neuberg D., Stevenson K., Loh M. L., Asselin B. L., Barr R. D., Clavell L. A., Hurwitz C. A., Moghrabi A., Samson Y., Schorin M., Cohen H. J., Sallan S. E., Silverman L. B. (2007). Favorable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols. *Journal of Clinical Oncology*. 1; 25(7):813-9.
- Bartolomé B., Cordovés C. G., ISancho A., Díez N., Ferreira P., Soliveri J. and Patiño J. L. C. (2003). Growth and release of hydroxycinnamic acids from Brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Enzyme Microbialial Technology*. 32 (1) : 140 – 144.
- Basha, N. S., Rekha, R., Komala, M. and Ruby, S. (2009). Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme L-asparaginase from Marine Actinomycetes by Solid state and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8 (4): 353-360.
- Baskar G., Chandhuru J., Sheraz Fahad K., Praveen A. S., Chamundeeswari M., Muthukumar T. (2015). Anticancer activity of fungal L-asparaginase conjugated with zinc oxide nanoparticles. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. 26:5380. PubMed: 25589205.
- Batool T., Makky E. A., Jalal M., Yusoff M. M. (2016). A Comprehensive Review on L Asparaginase and Its Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 178:900–923.
- Becker B., Lechevalier M. P., Lechevalier H. A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*. 13:236–43.
- Behal V. (2000). Bioactive products from Streptomyces. *Advances in Applied Microbiology*. 47:113–157.
- Bell T. L., and Adams M. A. (2004). Ecophysiology of ectomycorrhizal fungi associated with Pinus spp. *Plant Ecology*. 171 (1-2): 228-231.
- Bennett J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 66:101–107.
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M., Challis G. L., Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 417:141–147.

- Boos J., Werber G., Ahlke E., Schulze-Westhoff P., Nowak-Göttl U., Würthwein G., Verspohl E. J., Ritter J., Jürgens H. (1996). Monitoring of l-asparaginase activity and asparaginase levels in children on different l-asparaginase preparations. *European Journal of Cancer*. 32A:1544–50.
- Borah D., Yadav R. N. S., Sangra A., Shahin L. et Chaubey A. K. (2012). Production, purification and process optimization of asparaginase (an anticancer enzyme) from *E. Coli*, isolated from sewage water. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 5 (3) : 202 – 204.
- Borek D. and Jaskólski M. (2001). Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonia*. 48 (4) : 893 – 902.
- Borek D., K. Michalska, K. Brezezinski, A. Kisiel, J. Podkowinski, D. T. Bonthron, D. Krowarshch, J. Otlewski. and M. Jaskolski. (2004). Expression, purification and catalytic activity of *Lupinus luteus* aspergines beta. amidohydrolaseand its *Escherichia coli* homolog. *European Journal of Biochemistry*, 271(15):3215-3226. PMID: 15265041.
- Borkotaky B. and Bezbaruah R. L. (2002). Production and properties of asparaginase from a new *Erwinia* sp. *Folia Microbiologica*. 47 (5):473-476. PMID: 12503389. 2002.
- Boughachiche F., Reghioia S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemaghe A. et Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de Sebkhha de Ain M'lila. *Sciences et Technologie C*. N°23. pp 5 – 10.
- Bradford MM. (1976) Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.
- Broome J. D. (1968). Studies in the mechanism of the tumour inhibition by L-Asparaginase. Department of Pathology. *Journal of Experimental Medicine*. New York University school of medicine. New York 10016. USA.
- Broome J. D. (1961). Evidence that the l-asparaginase activity in guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*. 191:1114–5.
- Brotelle T., Bay J. O. (2016). PI3K-AKT-mTOR pathway: Description, therapeutic development, resistance, predictive/prognostic biomarkers and therapeutic applications for cancer. *Bulletin du Cancer*. 103 (1) : 18-29.
- Busscher G. F., Rutjes F. P., Van Delft F. L. (2005). 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics. *Chemical Reviews* 105: 775–791.

## Références bibliographiques

- Butler M. S., Hansford K. A., Blaskovich M. A., Halai R., Cooper M. A. (2014). Glycopeptide antibiotics: back to the future. *The Journal of Antibiotics* 67:631–644.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou S. (2005). Isolation and characterization of endophytic Streptomycete antagonists of *fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters*. 247 :147–152.
- Capizzi R. L., Aggarwal K. (1992). Asparaginase. In: Fisher J. W. Biochemical pharmacology of blood and blood forming agents. *Heidelberg*. 548–65.
- Cedar H. and Schwartz J. H. (1967). Localization of the two-L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 242 : 3753-3755.
- Challis G. L., Hopwood D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(2):S14555–S14561.
- Cheng P. N., Lam T. L., Lam W. M., Tsui S. M., Cheng A. W., Lo W. H., Leung Y. C. (2007). Pegylated recombinant human arginase (rhArg-peg5.000mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Research*. 67:309–317.
- Chiewchengchol D., Wanankul S., Noppakun N. (2009). L-Asparaginase. *Pediatric Dermatology*. 26(1) : 47.
- Claessen D., De Jong W., Dijkhuizen L., Wösten H. A. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiology*. 14: 313–319.
- Claessen D., Rink R., De Jong W., Siebring J., De Vreugd P., Boersma F. G., Dijkhuizen L., Wösten H. A. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Development*. 17:1714–1726.
- Claessen D., Rozen D. E., Kuipers O. P., Sogaard-Andersen L, Van Wezel GP. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *National Review of Microbiology*. 12:115–124.
- Clementi A. (1922). La désamination enzymatique de l-asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme. *Archives Internationales de Physiologie*. 19: 369–76.
- Collins M. D., Faulkner M., Keddie R. M. (1984). Menaquinone Composition of Some Sporeforming Actinomycetes. *Systematic and Applied Microbiology*. 5 (1): 20-29.

- Colombié. V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces* ambofaciens : Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. *Thèse de Doctorat*. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.
- Coombs J. T. and Franco C. M. M. (2003). Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (9) : 5603–5608.
- Covini D., Tardito S., Bussolati O., Chiarelli L. R., Paschetto M. V., Digilio R., Valentini G., Scotti C. (2012). Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent Pattern Anticancer Drug Discovery*. 7:4–13.
- David S. Goodsell (2005). The Molecular Perspective: L-Asparaginase. *The Oncologist*. 10(3) : 238-239.
- De Reijke T. M., De Boer E. C., Schamhart D. H., Kurth K. H. (1997). Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell wall skeleton preparation (Rubratin) for superficial bladder cancer immunotherapy: a phase I/II study. *Urology Research*. 25:117–120.
- Debbache A. (2017). Tamda Ouguelmim, une splendeur au cœur du Djurdjura. Revue de Web : Ecologie en Algérie.
- Derst C., Henseling J. and Rohm K. H. (1992). Probing the role of threonine and serine residues of *E. coli* asparaginase II by site-specific mutagenesis. *Protein Engineering*. 5 : 785-789.
- Deshpande N., Choubey P. and Agashe M. (2014). Studies on optimization of growth parameters for L-Asparaginase Production by *Streptomyces ginsengisoli*. *The Scientific World Journal*. ID 895167, 6 p.
- Dhanam J. G. and Kannan S. (2013). L-asparaginase: types perspectives and applications. *Advance Biology Technology*, 13, 1–5.
- Dharmaraj S., Sumantha A. (2009). Bioactive potential of *Streptomyces* isolated from marine sponges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:1971-1979.
- Dharmaraj S., hevendaran K. (2010). Evaluation of *Streptomyces* as a probiotic feed for the growth of the ornamental fish *Xiphophorus helleri*. *Food Tech Biotechnol*. 48: 497-504.
- Dharmaraj S. (2011). Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Iranian Journal of Biotechnology*. 9 (2) : 102 – 108.

- Dharmaraj S. (2013). Study of L-Asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Iran Journal of Biotechnology*. 9: 102-8.
- Dhevagi P., Poorani E. (2006). Isolation and characterization of L-asparaginase from marine actinomycetes. *Indian Journal of Biotechnology*. 5: 514-520.
- Dietrich D. C., Landwehr M., Reissner C., Smalla R. H., Richter K., Wolf G., Bockers T. M., Grundelfinger E. D. and Kreutz Gliap M. R. (2003). A novel untypical L- asparaginase localized to rat brain astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 85(5): 1117-1125.
- Donadio S., Sosio M., Lancini G. (2002). Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60(4):377-80.
- Turgut D. N. (2012). Food and industrial bioproducts and bioprocessing. *Wiley-Blackwell*; 392 P.
- Duraipandiyan V., Sasi A. H., Islam V. I. H., Valanarasu M., Ignacimuthu S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale*. 20 (1) : 15 – 20.
- Duval M., Suciu S., Ferster A., Riolland X., Nelken B., Lutz P., Benoit Y., Robert A., Manel A. M., Vilmer E., Ottenand J. and Philippe N. (2002). Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer<remove-image>Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 99:2734–9.
- Egler R. A., Ahuja S. P. et Matloub Y. (2016). L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 7: 62-71.
- El-Bessoumy A. A., Sarhan M and Mansour J. (2004). Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas Aeruginosa* 50071 Using Solid-state Fermentation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 37 (4) : 387-393.
- Elliot M. A., Buttner M. J., Nodwell J. R. (2008). Multicellular development in *Streptomyces*, p 419–438. In Whitworth DE (édition), Myxobacteria: multicellularity and differentiation. ASM Press, Washington, DC.
- El-Naggar, N. E. A., Moawad, H., El-Shweihy, N. M., El-Ewasy, S. M. (2015). Extracellular Production of the Oncolytic Enzyme, L-Asparaginase, by Newly Isolated *Streptomyces* sp.

Strain NEAE-95 as Potential Microbial Cell Factories: Optimization of Culture Conditions Using Response Surface Methodology. *Biomed Research International*. 17p.

El-Sabbagh S. M., El-Batanony N. H. and Salem T. A. (2013). L-Asparaginase produced by *Streptomyces* strain isolated from Egyptian soil: Purification, characterization and evaluation of its anti-tumor. *African Journal of Microbiology Research*. 7(50) : 5677-5686.

El-Sayed A. S., Shouman S. A., Nassrat H. M. (2012). Pharmacokinetics, immunogenicity and anticancer efficiency of *Aspergillus flavipes* L-methioninase. *Enzyme Microbial Technology*. 51:200–210. PubMed: 22883554.

Euzeby J. P.(2015). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>

Farmer P. B., Suhadolnik R. J. (1972). Nucleoside antibiotics. Biosynthesis of arabinofuranosyladenine by *Streptomyces antibioticus*. *Biochemistry*. 11: 911–916.

Felsenstein J. (2005). PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.65. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.

Ferster A., Glinoe D., Van G., Otten J. (1992). Thyroid function during lasparaginase therapy in children with acute lymphoblastic leukemia: difference between induction and late intensification. *American Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 14:192–6.

Flärdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion of Microbiology*. 6(6): 564–71.

Flärdh K., Buttner M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Natural Review of Microbiology* 7:36–49.

Fu C., Nandy P., Danenberg P., Avramis V. I. (1998). L-Asparaginase (ASNase) induced cytotoxicity depend on *p53* status of the cells. ProcAmAssoc. *Cancer Research*. 39:602.

Fu C. H., Sakamoto K. M. (2007). PEG-asparaginase. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*. 8:1977-1984.

Gallagher M. P., Marshall R. D., Wilson R. (1989). L-Asparaginase a drug for treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Essays in Biochemistry*. 24:1–40.

Gao B., Gupta R. S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 76:66–112.

- Geckil H. and Gencer S. (2004). Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing Vitreoscillahemoglobin for efficient oxygen uptake. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63, (2004): 691–697.
- Ghanem N. B., Sabry S. A., El-Sherif Z. M. and Abu El-Elal G. A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 105 – 111.
- Gil M. S., Cho J., Thambi T., Phan V. H. G., Kwon I., Lee D. S. (2017). Bioengineered robust hybrid hydrogels enrich the stability and efficacy of biological drugs. *Journal of Controlled Release*. 267:119–132. PubMed: 28412223.
- Girard G., Traag B. A., Sangal V., Mascini N., Hoskisson P. A., Goodfellow M., Van Wezel G. P. (2013). A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biology*. 3:130073.
- Glockner F. O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A. and Amann R. (2000). Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (11) : 5053–5065.
- Goekbuget N., Baumann A., Beck J., Boos J., Brueggemann M., Diedrich H., Hüttmann A., Leimer L., Lipp T., Naumann R., Mohren M., Reichle A., Schäfer-Eckart K., Schmalzing M., Schmid M., Schmitz N., Therwey T. and Hoelzer D. (2008). PEG-asparaginase in adult acute lymphoblastic leukemia ALL: efficacy and feasibility analysis with increasing dose levels. *Blood*. 112 (11) : 302.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H. J., Trujillo M. E., Suzuki, K., Ludwig W., Withman W. B. (2012). Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The *Actinobacteria* (2ème Eds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2083 p. In: Saker R. (2015). Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de Doctorat. Université Sétif 1. Algérie.
- Goodfellow M., Williams S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 37:189 –216.
- Goodfellow M., Minnikin D. E. (1985). Chemical methods in bacterial systematics. *Academic Press*, London, United Kingdom.
- Gottlieb D., (1973). General considerations and implications of the actinomycetes. In: Sakes G., Skinner FA. Actinomycetales: Characteristics and practical importance. (Eds). Academic Press, New York. pp 1–10.

## Références bibliographiques

- Gross H. (2009). Genomic mining: a concept for the discovery of new bioactive natural products. *Current Opinion in Drug Discovery Development*. 12: 207–219.
- Gunasekaran S., McDonald L., Manavathu M. Effect of culture media on growth and L-Asparaginase production in *Nocardia asteroides*. *Biomed Lett*. 1995. 52:197-201.
- Gupta N., Mishra S., Basak U. C. (2007). Occurrence of *Streptomyces aurantiacus* in mangroves of Bhitarkanika. *Malaysian Journal of Microbiology*. 3: 7-14.
- Haj-husein L. (2013). Impact de l'agitation et de l'aération sur la réponse physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors de sa culture en bioréacteurs mécaniquement agité et gazosiphon. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine. France. 267p.
- Hamedi J., Mohammadipanah F., Von J. M., Pötter G., Spröer C., Klenk H. P., Kroppenstedt R. M. (2010). *Nocardiopsis sinuspersici* sp. nov., isolated from the sandy soil of Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60:2346–2352.
- Han R. Z, Xu G. C., Dong J. J., Ni Y. (2016). Arginine deiminase: recent advances in discovery, crystal structure, and protein engineering for improved properties as an anti-tumor drug. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:4747–4760. PubMed: 27087524.
- Harry J. G., Blazek R., Hillary M. S. B., Nigel P. M. (1986). Cloning and expression of *Erwinia caryophylli* asparaginase gene in *E. coli* and *Erwinia carotovora*. *Journal of Genetic Microbiology*. 132:151–60.
- Hasani A., Kariminik A., Issazadeh K. (2014). Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International Journal of Advanced Biology and Biomedicine Research*. 2 (1) : 63-75.
- Hawkins D. S., Park J. R., Thomson B. G., Felgenhauer J. L., Holcenberg J. S., Panosyan E. H., Avramis V. I. (2004). Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research*. 10: 5335-5341.
- Heinemann B. and Howard A. J. (1969). Production of tumour-inhibitory l-asparaginase by submerged growth of *Serratia marscescens*. *Applied Microbiology*. 18: 550–554.
- Hellman K., Miller D. S. and Cammack K. A. (1983). The effect of freeze drying on the quaternary structure of L- asparaginase EC-3.5.1.1 from *Erwinia carotovora*. *Biochimica-et-Biophysica-Acta*. 749(2):133-142. PMID: 6652094. 1983.
- Heumann S., Eberl A., Pobeheim H. (2006). “New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres,” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 69 (1-2) : 89–99.

- Holcenberg, J. S., Ericsson, L. and Roberts, J. (1978). Amino acid sequence of the diazooxonorleucine binding site of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* 7A glutaminase-asparaginase enzymes. *Biochemistry*. 17 : 411-417.
- Holmquist N. D. (1963). Effect of normal sera of several related rodents on 6C3HED lymphoma in vivo. *Experimental Biology and Medicine*. 113 : 444-445.
- Howard J. B., Carpenter F. H. (1972). L-Asparaginase from *Erwinia caratovora*. Substrate specificity and enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry*. 247:1020-30.
- Huang L., Liu Y., Sun Y., Yan Q., Jiang Z. (2013). Biochemical Characterization of a Novel L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity from *Rhizomucor miehei* and Its Application in Food Safety and Leukemia Treatment. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (5) : 1561 – 1569.
- Igarashi Y., Trujillo M. E., Martinez-Molina E., Yanase S., Miyanaga S., Obata T., Sakurai H., Saiki I., Fujita T., Furumai T. (2007). Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 17:3702-3705.
- Iboshi Y., Papst P. J., Hunger S. P., Terada N. (1999). L-asparaginase inhibits the rapamycin-targeted signaling pathway. *Biochemistry and Biophysical Research Community*. 260 (2) : 534-539.
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Ikuchi H., Shiba T., Omura S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*. 21 : 526- 531.
- Ilic<sup>^</sup> S., Konstantinovic<sup>^</sup> S., Todorovic<sup>^</sup> Z., Lazic<sup>^</sup> M., Veljkovic<sup>^</sup> V., Jokovic<sup>^</sup> N., Radovanovic<sup>^</sup> B. (2007). Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Mikrobiologiya* (Russia). 76: 480-487.
- Illarionova N. G., Petrov L. N., Olennikova L. V., Roshchin S. N., Pasechnik A., Khalyapin B. D., Polotskii A. E., Voinova N. E. and Shtukina T. B. (1980). Study of L- asparaginase EC-3.5.1.1 secondary structure in a wide pH region. *Molekulyamaya Biologiya* (Moscow). 14(4): 951-955.
- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. and Isono, M. (1973). Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Journal of Genetic Microbiology*. 76: 85-99.
- Irion E., Arens A. (1979). Biochemical characterization of l-asparaginase from *E. coli*. In: Grundmann E, Oettgen HF, editors. Experimental and Clinical effects of l-asparaginases. RRCR, Heidelberg. p39-57.

- Ivens I. A., Achanzar W., Baumann A., Brändli-Baiocco A., Cavagnaro J., Dempster M., Depelchin B. O., Irizarry Rovira A. R., Dill-Morton L., Lane J. H., Reipert B. M., Salcedo T., Schweighardt B., Tsuruda L. S., Turecek P. L., Sims J. (2015). PEGylated biopharmaceuticals: current experience and considerations for nonclinical development. *Toxicology and Pathology*. 43:959–983. PubMed: 26239651.
- Jacque, N., Bouscary, D. (2014). Targeting glutamine uptake in AML. *Oncoscience*. 1 (1) : 1–2.
- Jakimowicz D., Zydek P., Kois A., Zakrzewska-Czerwińska J., Chater KF (2007). Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces* hyphae. *Molecular Microbiology*. 65(3):625-41.
- James H. S., Jane Y. R. and Broome J. D. (1966). Two Lasparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *Journal of Applied Microbiology*. 56:1516-1519.
- Jayaprakashvel M. (2012). “Therapeutically active biomolecules from marine actinomycetes,” *Journal of Modern Biotechnology*, 1(1) : 1–7, 2012.
- Jha S. K., Pasrija D., Sinha R. K., Singh H. R., Nigam V. K. and Vidyarthi A. S. (2012). Microbial L-Asparaginase: A review on current scenario and future prospects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3 (9) : 3076 – 3090.
- Jin X., Xu L. H., Mao P. H., Hseu T. H., Jiang C. L. (1998). Description of *Saccharomonospora xinjiangensis* sp. nov. based on chemical and molecular classification. *Int Journal of Systematic Bacteriology*. 48:1095-1099. PubMed <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-48-4-1095>.
- Jizba J., Sedmera P., Zima J, Beran M., Blumauerová M., Kandybin N., Samoukina G. (1991). Macrotetrolide antibiotics produced by *Streptomyces globisporus*. *Folia Microbiologica (Praha)* 36:437–443. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02884062>.
- Jorge J. C., Perez-solar R., Morais J. G., Cruz M. E. (1994). Liposomal palmitoyl l-asparaginase: characterization and biological activity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 34:230–41.
- Körholz D., Bruck M., Nurnberger W. (1989). Chemical and immunological characteristics of four different l-asparaginase preparations. *European Journal of Hematology*. 42: 417–24.
- Kamble K. D., Bidwe1P. R., Muley V. Y., Kamble L. H., Bhadange D. G. and saddiq M. M. (2012). Characterization of L-asparaginase Producing Bacteria from Water, Farm and Saline Soil. *Bioscience discovery*, 3(1):116-119.

Kang Q., Shen Y., Bai L. (2012). Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Natural Product Reports* 29:243–263. <http://dx.doi.org/10.1039/C2NP00019A>.

Kaushik R. Saran S., Isar J. and Saxena R. K. (2006). Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40 (3-4) : 121–126.

Kavitha A. and Vijayalakshmi M. A. (2012). Study on L-Asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL 113. *The Scientific World Journal*. 1-5.

Kavitha, A., Vijayalakshmi, M., Sudhakar, P. and Narasimha, G. (2010). Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolite. *African Journal of Microbiology Research*. 4(1), 27-32.

Kearney S. L., Dahlberg S. E., Levy D. E., Voss S. D., Sallan S. E., Silverman L. B. (2009). Clinical course and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia and asparaginase-associated pancreatitis. *Pediatric Blood Cancer*. 53:162-167.

Kermiche M. (2013). Caractérisation de certaines souches microbiennes évoluant dans le blé fermenté et mise en évidence de leurs activités enzymatiques. Thèse de Doctorat. Université Constantine 1. Constantine. Algérie. P 91.

Keulen G.V., Jonkers H. M., Cloesson D. L. D., Woston H. A. B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*. 185 (4):1455–1458.

Khamna S., Yokota A., Lumyong S. (2009). L-Asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *International Journal of Integrative Biology*. 6 (1): 22 – 26.

Kharel M. K., Pahari P., Shepherd M. D., Tibrewal N., Nybo S. E., Shaaban K. A., Rohr J. (2012). Angucyclines: biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Natural Product Reports*. 29: 264–325. <http://dx.doi.org/10.1039/C1NP00068C>.

Kidd J. G. (1953). Regression of transplanted lymphoma induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum I. *Journal of Experimental Medicine*. 98: 565–82.

Kidd J. G. (1953). Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal Guinea pig serum II. *Journal of Experimental Medicine*. 98:583–606.

Kim M., Oh H. S., Park S. C., Chun J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation

of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 346–351. DOI 10.1099/ijms.0.059774-0.

Kim S. B., Seong C. N., Jeon S. J., Bae K. S. and Goodfellow M. (2004). A taxonomic study on neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonesnsis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 (1) : 211-4.

Kiranmayi M. U., Poda S., Vijayalakshmi M. (2013). Production and optimization of L-Asparaginase by an actinobacterium isolated from Nizampatnam mangrove ecosystem. *Journal of Environmental Biology*. 35 : 799 – 805.

Kitouni. M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. *Thèse Doctorat* : université Mentouri-Constantine. P 176.

Konečná, P., Klejdus, B., Hrstková, H. (2004). Monitoring the Asparaginase activity and asparagine levels in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with different asparaginase preparations. *Scripta Medica*. 2004. (BRNO) – 77 (2): 55–62.

Kotzia G. A. and Labrou N. E. (2007). L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning expression and characterization. *Journal Biotechnology*. 127 : 657–669.

Kozak M., Jasloski M. and Rohm K. H. (2000). Preliminary crystallographic studies of 425F mutant of periplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase. *Acta Biochimica Polonica*. 47 : 807–814.

Krasotkina J., Anna A., Borisova Yuri V. and Nikolay N. S. (2004). One step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia caratovora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 39 : 215-22.

Kroppenstedt R. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms, p 173–199. Chemical methods in bacterial systematics. SAB Technical Series 20, *Academic Press*, London, United Kingdom.

Kroppenstedt RM. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Chemical methods in bacterial systematics. Goodfellow M. and Minnikin DE., (Eds). *Academic Press*, London. pp173–199.

Kulikova T., Aldebert P., Althorpe N., Baker W., Bates K., Browne P., Van Den Broek A., Cochrane G., Duggan K., Eberhardt R., Faruque N., Garcia-Pastor M., Harte N., Kanz C., Leinonen R., Lin Q., Lombard V., Lopez R., Mancuso R., McHale M., Nardone F., Silventoinen V., Stoehr P., Stoesser G., Tuli A., Tzouvara K., Vaughan R., Wu D., Zhu W.,

- Apweiler R. (2004). The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Research*, 32: 27-30.
- Kumar K. and Verma N. (2012). The various sources and application of L-asparaginase. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*. 3 : 197–205.
- Kwon Y. M., Chung H. S., Moon C. Yockman J., Park Y. J., Gitlin S. D., David A. E., Yang V. C. (2009). L-Asparaginase encapsulated intact erythrocytes for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Journal of Controlled Release*. 139:182–189. PubMed: 19577600.
- Labeda D. P. (1987). Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Development in Industrial Microbiology*. 28:115–121.
- Labeda D. P., Lechevalier MP. (1989). Amendment of the genus *Saccharothrix* and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39: 420–423.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lakshmi pathy T. D., Prasad A. S. A. and Kannabiran K. (2010). Production of Biosurfactant and Heavy Metal Resistance Activity of Streptomyces Sp. VITDDK3-a Novel Halo Tolerant Actinomycetes Isolated from Saltpan Soil. *Advances in Biological Research*. 4 (2): 108-115.
- Lambert D.H. and Loria R. (1989). *Streptomyces scabies* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39 (4) : 387 – 392.
- Larpent J. P., Sanglier J. J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481p.
- Lechevalier H. A. and Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: The prokaryotes, Volume 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), Springer – Verlag, Berlin. p 1915–1922.
- Lechevalier H.A and Lechevalier M.P. (1970). A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In: The *Actinomycetales* (edited by Prauser). Gustav Fisher, Verlag Jena P. 395- 405.
- Leonard R. H. (1963). Quantitative range of Nessler's reaction with ammonia. *Clinical Chemistry*. 9 (4): 417 – 22.
- Leyral G., Vierling E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. Edition DOIN / CRDP AQUITAINE. 4<sup>ème</sup> édition. 287 P.

## Références bibliographiques

- Li W. J., Tang S. K., Stackebrandt E., Kroppenstedt R. M., Schumann P., Xu L. H., Jiang C. L. (2003). *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1591-1594. PubMed
- Li W. J., Zhang L. P., Xu P., Cui X. L., Lu Z. T., Xu L. H. & Jiang C. L. (2002). *Streptomyces beijiangensis* sp. nov., a psychrotolerant actinomycete isolated from soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 : 1695-1699.
- Lindholm, P., Kortemaa, H., Kokkola, M., Haahtela, K., Salkinoja-Salonen, M., Valkonen, J.P.T. (1997). *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Dis*, 81(11): 1317–1322.
- Liu Z., Li Y., Zheng L. Q., Huang Y. J., Li W. J. (2010). *Saccharomonospora marina* sp. nov., isolated from ocean sediment of the East China Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 1854-1857. PubMed <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.017038-0>
- Lubkowski J., Dauter M., Aghaiypour K., Wlodawer A. and Dauter Z. (2002). Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Acta Crystallographica D*. 59 : 84–92.
- Ludwig W., Euzéby J., Schumann P., Buss H. J., Trujillo M. E., Kämpfer P., Whiteman W. B. (2012). Road map of the phylum *Actinobacteria*, p 1–28. In Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H. J., Trujillo M. E., Suzuki K. I., Ludwig W., Whiteman W. B. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer-Verlag, New York, NY.
- Macagnan D., Romeiro R. D. S., De Souza J. T., Pomella A. W. V. (2006). Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*. 3:122–132.
- Madigan M. T., Martinko, J. M. and Parker J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms*, 10th edition. Prentice- Hall, New Jersey, USA.
- Madigan, M. and Martinko, J. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*. 11th edition. Prentice- Hall, New Jersey, USA.
- Mannan S., Sinha A., Sadhukhan R., Chakrabarty S. L. (1995). Purification, characterization and antitumor activity of Lasparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. *Current Microbiology*. 30 : 291-298.
- Mariat F. and Sebald M. (1990). Les actinomycetes. Bactériologie médicale. *Le Minor*. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.

- Mashburn L., Wriston J. C. (1964). Tumor inhibitory effects of l-asparaginase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 105:450–2.
- Maya K., Dhevendaran K. and Natarajan P. (1992). Studies on L-asparaginase activity in *Bacillus* of retting ground. *Fish Technology*. 29: 62-66.
- McCormick J. R., Flärdh K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Review*. 36(1): 206–31.
- Meena B., Lawrance A., Thadikamala S., Rangamaran V. R., Gopal D., Nambali V. V. et Ramalingam K. (2015). L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-Asparaginase gene. *Scientific Reports* | 5:12404 | DOI: 10.1038/srep12404.
- Meier-Kolthoff J. P., Göker M., Spröer C., Klenk HP. (2013). When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy. *Archives of Microbiology*. 195:413–418.
- Messis A., Bettache, A., Brahami A., Kecha M., Benallaoua S. (2013). Optimization of antifungal production from a novel strain *Streptomyces sp.* TKJ2 using response surface methodology. *Medicinal Chemistry Research*. DOI 10.1007/s00044-013-0627-z.
- Mikami, Y., Miyashita, K. & Arai, T. (1982). Diaminopimelic acid profiles of alkalophilic and alkaline-resistant strains of actinomycetes. *Journal of Genetic Microbiology*. 128 : 1709-1712.
- Miki A., Koichi S., Toshiyuki K., Makoto S., Kouichi M., Jun A., Motoki E., Sheldon M. S. and Kazuo O. (2005). Selective apoptosis of natural killer-cell tumours by L-Asparaginase. Blackwell Publishing Ltd. *British Journal of Haematology*. 130 : 860–868.
- Mitchell L., Hoogendoorn H., Giles A. R., Vegh P. and Andrew M. (2018). Increased Endogenous Thrombin Generation in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Risk of Thrombotic Complications in L'Asparaginase-Induced Antithrombin I11 Deficiency. *American society of hematology*. 83 (2) : 386 – 391.
- Mohana P. P., Radakrishnan M. and Balagurunathan R. (2011). Production and optimization of L-asparaginase from *Streptomyces sp.* (TA22) isolated from Western Ghats, india. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3 (4) : 618 – 624.
- Moharib S. A. (2018). Anticancer Activity of L-Asparaginase Produced from *Vigna Unguiculata*. *The World Scientific Research*. 5 (1) : 1-12.
- Moola Z. B., Scawen M. D., Atkinson T., Nicholls D. J. (1994). *Erwinia chrysanthemi* l-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochemistry Journal*. 302:921–7.

- Moorthy V., Ramalingam A., Sumantha A. et Shankaranaya R. T. (2012). Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. *African Journal of Microbiology Research*. 4(18) : 1862-1867.
- Mostafa S. A. and Salama M. S. (1979). L- asparaginase producing *Streptomyces* from soil of Kuwait. *Zentralbl Bakteriologia*. (Naturwiss). 134. 325-334.
- Mostafa S. A. (1979). Activity of L-Asparaginase in cells of *Streptomyces karnatakensis*. *Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*. 134 (4) : 343-351.
- Mukherjee J., Majumdar S., Scheper T. (2000). Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-Asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Applied Microbiology and Biology*. 53(2):180-4.
- Muthukumar T., Chamundeeswari M., Prabhavathi S., Gurunathan B., Chandhuru J., Sastry T. P. (2014). Carbon nanoparticle from a natural source fabricated for folate receptor targeting, imaging and drug delivery application in A549 lung cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 88:730–736. PubMed: 25305584.
- Muvva V., Munaganti R. K., Indupalli M. D. (2015). Studies on optimization of L-Asparaginase production by *arthrobacter kerguelensis* vl-rk\_09 isolated from mango orchards. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7 (9) : 112-115.
- Nandy P., Fu C., Danenberg P., Avramis V. I. (1998). Apoptosis induced by antimetabolite taxanes or l-asparaginases in vitro depend on the *p53* status of the leukemic cells. *Cancer Research*. 39:602.
- Narayana K. J. P., Kumar K. G. and Vijayalakshmi M. (2008). L-Asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology*, 2008. 48 (3): 331–336.
- Narta U. K., Kanwar S. S., Azmi W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 61: 208–221.
- Neuman R. E. and McCoy T. A. (1956). Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for l-asparagine and glutamine. *Science*. 124:124–31.
- Nippon K. and Chugai. (1981). Polynactins as anthelmintics. *Chemical Abstract*. 95:108 866n. Japan patent Kokai Tokkyo Koho 8157.714.
- O'Donnell A. G. (1988). Recognition of novel actinomycetes, p 69–88. In Goodfellow M. M., Williams S. T., Mordarski M. Actinomycetes in biotechnology. *Academic Press*, London, United Kingdom.

Oettgen R. F., Old J. L., Boyse E. A., Campbell H. A., Phillips F. S., Clarkson B. D., Tallal L., Leeper R. D., Schwartz M. K., Kim J. H. (1967). (1967). Inhibition of leukemias in man by l-asparaginase. *Cancer Research*. 27:2619–31.

Ohnuma T., Holland J. F., Meyer P. (1972). *Erwinia carotovora* l-asparaginase in patients with prior anaphylaxis to l-asparaginase from *E. coli*. *Cancer*. 30:376–81.

Omura S. (1992). The search for bioactive compound from microorganisms. Ed: Springer Verlag, New York. Inc. pp 281-303.

Oncospar. Summary of Product Characteristics. *Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.* 2006.

Ortac I., Simberg D., Yeh Y. S., Yang J., Messmer B., Trogler W. C., Tsien R. Y. and Esener S. (2014). Dual-porosity hollow nanoparticles for the immunoprotection and delivery of nonhuman enzymes. *Nano Letters*. 14:3023–3032. PubMed: 24471767.

Ott P. A., Carvajal R. D., Pandit-Taskar N., Jungbluth A. A., Hoffman E. W., Wu B. W., Bomalaski J. S., Venhaus R., Pan L., Old L. J., Pavlick A. C., Wolchok J. D. (2013). Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma. *Investigational New Drugs*. 31:425–434. PubMed: 22864522.

Palm G. J., Lubkowski J., Derst C., Schleper S., Rohm K.-H. and Wlodawer A. (1996) A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase; crystal structure of a Thr89Val mutant, *FEBS Letters*. 390 : 211 -216.

Pamboukian C., Guimarães L., Facciotti M. (2002). Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 17-21.

Panosyan E. H., Seibel N. L., Martin-Aragon S., Gaynon, P. S., Avramis L. A. Sather H., Franklin J., Nachman J., Ettinger L. J., La M. Steinherz P. Cohen L. J. Siegel S. E. Avramis V. I. (2004). Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 26:217-226.

Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*. 22: 189–259.

Parsons S. K., Skapek S. X., Neufeld E. J., Kuhlman C., Young M. L., Donnelly M., Brunzell J. D., Otvos J. D., Sallan S. E. and Rifai N. (1997). Asparaginase associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 89:1886-1895.

## Références bibliographiques

- Patro K. K. R., Satpathy S. and Gupta N. (2011). Evaluation of Some Fungi For L-Asparaginase Production. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 1(4): 219-221.
- Patro K. R. and Gupta N. (2012). Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*. 3(3) : 30-34.
- Paul J. H. (1982). Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* L-asparaginase. *Biochemistry Journal*. 203: 109-115.
- Perez G. R. M., Avila J. G., Zavala M. A., Perez G. S., Perez G. C. (1990). *In vitro* antibacterial activity of *Loeselia mexicana* and *Croton ehrenbergii*. *Phytomedicine*. 3: 186.
- Perry J. J., Staley J. T., Lory S. (2004). Microbiologie. *Dunod*, Paris. 497–498.
- Peterson R. G., Richards F. F. and Handschumacher R. E. (1977). Structure of peptide from active site region of *E. coli* L-asparaginase. *Journal of Biological Chemistry*. 252 : 2072 - 2076.
- Pieters R., Appel I., Kuehnel H. J., Tetzlaff-Fohr I., Pichlmeier U., Van der Vaart I., Visser E. and Stigter R. (2008a). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. *Blood*. 112: 4832 - 4838.
- Pieters R, Carroll WL. (2008b). Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*. 55: 1-20.
- Pieters R., Hunger S.P., Boos J., Rizzari C., Silverman L., Baruchel A., Goekbuget N., Schrappe M., and Pui C-H. (2010). L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*. DOI: 10.1002/cncr.25489.
- Pirouz T., Karbasian M. A. and Goodfellow M. (1999). Isolation of some aerobic actinomycetes species from the soil of Zahedan County, South-East of Iran. *Iranian Journal of Medicinal Science*. 24 : 65-67.
- Pokrovsky V. S., Chepikova O. E., Davydov D. Z. (2017). Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*. DOI:10.2174/0929867324666171006132729. [PMID: 28990519].
- Poorni E., Saseetharan M. K., Devagi P (2009). L-asparaginase production and molecular identification of marine *Streptomyces* sp. strain EPD 27. *International Journal of Integrative Biology*. 7(3):150-155.

- Pradeep S. M., Mahmood R. and Jagadeesh K. S. (2010). Screening and characterization of L-asparaginase producing microorganisms from tulsi (*Ocimum sanctum*. L). *Karnataka Journal of Agriculture Science*. 23 (4): 660-661.
- Prakash D., Nawani N., Prakash M., Bodas M., Mandal A., Khetmalas M. and Kapadnis B. (2013). Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. 8p <http://dx.doi.org/10.1155/2013/264020>.
- Prakash R. S., Subba Rao C., Sreenivas Rao R., Suvarna Lakshmi G., Sarma P. N. (2006). L-asparaginase production by isolated staphylococcus sp-6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. *Journal of Applied Microbiology*. (doi:10.1111/j.1365-72.2006.03173.x published online).
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (2003). Microbiologie. *De Boeck* : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1164.
- Prista A. A. and Kyriakidis D. A. (2000). L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. *Journal of Molecular and Cellular Biochemistry*. 216 : 93-101.
- Raha S. K., Roy S. K., Dey S. K., Chakrabarty S. L. (1990). Purification and properties of an L-Asparaginase from *Cylindrocarpum obtusisporum* MB-10. *International Biochemistry*. 21 (6) : 987 – 1000.
- Rainey F. A., Klatt S., Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. (1995). *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45:32–36.
- Ramakrishnan M. S., and Joseph R. (1996). Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospiridium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. *Canadian Journal of microbiology*. 42(4): 316-325.
- Ramya L. N., Doble M., Rekha V. P. B. and Pulicherla K. K. (2011). In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for the effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 33 : 617–621.
- Reda F. M. (2015). Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L-glutaminase and its anticancer efficiency. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46:957–968. PubMed: 26691453.
- Remya M., Vijayakumar R. (2008). Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from West Coast of India. *Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology*. 15 (1) :13 – 19.

- Rguig M. (2005). Méthodologie des surfaces de réponse pour l'analyse en fiabilité des plates-formes pétrolières offshore fissurées. *Thèse de Doctorat*. Université de Nantes. France. 195p.
- Richrad-Molard M. (1998). Microbiologie des céréales et des farines In « Les industries de première transformation des céréales. Edition *Techniques et Documentation Lavoisier.*, Paris : 159 -173.
- Rigali S., Nothaft H., Noens E. E., Schlicht M., Colson S., Muller M., Joris B., Koerten H. K., Hopwood D. A., Titgemeyer F., Van Wezel G. P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular Microbiology*. 61:1237–1251. .
- Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A. W., Hopwood D. A., Van Wezel G. P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*. 9: 670–675. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2008.83>.
- Roberts J., Holcenberg J. S., Dolowy W. C. (1972). Isolation, characterization and properties of Achromobacteriaceae glutaminase-asparaginase with anti tumor activity. *Journal Biological Chemistry*. 247, 84-90. 1972.
- Ronghe M., Burk G. A. A., Lowis S. P., Estlin E. J. (2001) Remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia : Clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids and anthracyclines. *Cancer treatment review*. 27: 327 – 337.
- Royet J., Dziarski R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *National Review of Microbiology*. 5(4): 264–77.
- Sadoff J., Hwartig S., Rosenfeld D., Ettinger L., Spigland N. (1997). Surgical complications induced by l-asparaginase. *Journal of Pediatric Surgery*. 32:860–3.
- Sahu M. K., Sivakumar K., Poorani E., Thangaradjou T. and Kannan L. (2005). Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *Journal of Environmental Biology*. 28(2), (2005): 465-474.
- Saker (2015). Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. *Thèse de Doctorat*. Sétif. Algérie. 181P.
- Sanches M., Barbosa J. A., De O., Abrahão N. and Polikarpov I. (2003). Structural comparison of *Escherichia coli* L-asparaginase in two monoclinic space groups. *Acta Crystallographica D*. 59 : 416–422.

## Références bibliographiques

- Sarquis M. I., Oiiiviera E. M., Santos A. S., and Da-Costa G. L. (2004). Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias-do-Instuto-Oswaldo-Cruz*. 99(5): 489-492.
- Saudagar P. S., Survase S. A., Singhal R. S. (2008). Clavulanic acid: a review. *Biotechnology Advances*. 26:335–351.
- Savitri A. N., Azmi W. (2003). Microbial l-asparaginase: a potent antitumor enzyme. *Indian Journal of Biotechnology*. 2:184–94.
- Schatz A., Waksman S. A. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 57:244–248.
- Scheetz R. W., Whelan H. A. and Wriston J. C. (1971). Purification and properties of an L-asparaginase from *Fusarium tricinctum*. 142: 184-189.
- Schleifer K.H., Kandler O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriology Review*. 36(4): 407–77.
- Seghezzi N. (2009). *Métabolisme énergétique et régulation de la biosynthèse d'antibiotiques chez Streptomyces*. Thèse de Doctorat. UFR scientifique d'ORSAY, Université Paris XI, Paris, France.
- Selvam K., Vishnupriya B. (2013). Partial purification and cytotoxic activity of L-asparaginase from *Streptomyces acrimycini* NGP. *International Journal of Research Pharmaceutical and Biomedicine Science*. 4: 859-869.
- Sharma B., Singh S., Kanwar S. S. (2014). L-Methionase: a therapeutic enzyme to treat malignancies. *Biomed Research International*. 506287. PubMed: 25250324.
- Shichi H., Tanouchi Y., Kamada Y. (1989). Immunosuppressive agent. *Chemical Abstracts*. 112 (91 787) : 843 - 092.
- Shirling E. B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16(3): 313-340.
- Shrivastava A., Khan A. A., Khurshid M., Kalam M. A., Jain S. K., Singhal P. K. (2016). Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical Review in Oncology and Hematology*. 100:1-10.
- Shukla S. and Mandal S. K. (2012). Production optimization of extracellular L-asparaginase through solidstate fermentation by isolated bacillus subtilis. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*. 4.

- Shukla S. and Mandal S. K. (2013). Production purification and characterization of extracellular anti-leukaemic L-Asparaginase from isolated *Bacillus subtilis* using solid-state fermentation. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 4: 89-99.
- Siddalingeshwara K. G. and Lingappa K. (2011). Production and characterization of L-Asparaginase – A Tumour inhibitor. *International Journal of PhamTech Research*. 3 (1) : 314 – 319.
- Silverman L. B., Gelber R. D., Dalton V. K., Asselin B. L., Barr R. D., Clavell L. A., Hurwitz C. A., Yvan Samson A. M., Schorin M. A., Arkin S., Declerck L., Cohen H. J. and Sallan S. E. (2001). Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol. *Blood*. 97:1211-1218; doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V97.5.1211>.
- Sinclair J. K., Warner P., Bonthron D. T. (1994). The *ASPI* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. *Gene*. 144 (1) : 37-43
- Singh Y. and S. K. (2012). Strivastava, Statistical and evolutionary optimization for enhanced production of an anti-leukemic enzyme, L-asparaginase, in a protease deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02 isolated from the soil contaminated with hospital waste. *Indian Journal of Experimental Biology*. 51, (2012): 322-335.
- Sivasankar P., Sugesh S., Vijayanand P., Sivakumar V., Vijayalakshmi S., Balasubramanian T. and Mayavu P. (2013). Efficient production of l-asparaginase by marine *Streptomyces* sp. isolated from Bay of Bengal, India. *African Journal of Microbiology Research*. 7(31) : 4015-4021.
- Smaoui. S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. *Thèse Doctorat*. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). Pp : 207.
- Stackebrandt E., Rainey F. A., Ward-Rainey N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47:479–491.
- Stams W. A. G., Den Boer M. L., Beverloo H. B., Meijerink J. P. P., Stigter R. L., Van Wering E. R., Janka-Schaub G. E., Pieters R. S. R. (2003). Sensitivity to lasparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t (12, 21) + pediatric ALL. *Blood*. 101:2743–7.
- Suvarna K., Stevenson D., Meganathan R. and Hudspeth M. E. S. (1998). Menaquinone (Vitamin K2) Biosynthesis: Localization and Characterization of the *menA* Gene from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180 (10) : 2782–2787.

Suzuki K., Goodfellow M., O'Donnell A. G. (1993). Cell envelopes and classification, p 195–250. In Goodfellow M, O'Donnell AG (ed), Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London, United Kingdom.

Swain A. I., Jaskolski M., Housset D., Mohana Rao J K., Wlodawer A. (1993). Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceedings in National Academy of Sciences*. 90 (4) 1474-1478.

Swami R. and Shahiwala A. (2013). Impact of physiochemical properties on pharmacokinetics of protein therapeutics. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 38(4): 231–239.

Syed D. G., Tang S. K., Cai M., Zhi X. Y., Agasar D., Lee J. C., Kim C. J., Jiang C. L., Xu L. H., Li W. J. (2008). *Saccharomonospora saliphila* sp. nov., a halophilic actinomycete from an Indian soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 570-573. PubMed <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.65449-0>

Tabandeh M. R. and Aminlari M. (2009). Synthesis, physicochemical and immunological properties of oxidized inulin-L-asparaginase bioconjugate. *Journal of Biotechnology*. 141:189–195. PubMed: 19433225

Taber, W.A. (1960). Evidence for the existence of acid-sensitive actinomycetes in soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 6(5): 503-514.

Taechowisan T., Peberdy J. F. and Lumyong S. (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19 (4): 381–385.

Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2013). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 6.0. *Molecular Biology Evolution*. 30 (12) : 2725 - 9.

Tang S.K., Li W. J., Dong W., Zhang Y. G., Xu L. H. and Jiang C. L. (2003). Studies of the Biological Characteristics of Some Halophilic and Halotolerant Actinomycetes Isolated from Saline and Alkaline Soils. *Actinomycetol*. 17 (1): 06–10

- Tang S. K., Wang Y., Klenk H. P., Shi R., Lou K., Zhang Y. J., Chen C., Ruan J. S., Li W. J. (2011). *Actinopolyspora alba* sp. nov. and *Actinopolyspora erythraea* sp. nov., isolated from a salt field, and reclassification of *Actinopolyspora iraqiensis* as a heterotypic synonym of *Saccharomonospora halophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 (7):1693–1698.
- Thenmozhi C., Sankar R., Karuppiyah V., Sampathkumar P. (2011) L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus Cereus* MAB5: optimization by response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4(6): 486 -491.
- Tindall B. J., Kämpfer P., Euzéby J. P., Oren A. (2006). Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 2715–2720.
- Toma R. J., Suo'd A. M., Hassan S. A., Abd Aon M. A., Salman S. K. (2011). Extraction and purification of L-Asparaginase II from local isolate of *Proteus vulgaris*. *Baghdad Science Journal*. 8(1) : 509 – 518.
- Tosa T., Sano R., Yamamoto K., Nakamura M. and Chibata I. (1972). L-asparaginase from *Proteus vulgaris*; purification, crystallization and enzymic properties. *Journal of Biochemistry*. 11:217- 222.
- Turgut Kara N., Çakır Ö., Arıkan B. and Şule A. (2018). Molecular cloning and biotic elicitation response of phenylalanine ammonia-lyase gene of *Astragalus chrysochlorus*. *Cellular and Molecular Biology*. (Noisy-Le-Grand). 64 (5):102–106. [PMID: 29729701].
- Ueno T., Ontawa K., Mitusi K., Kodera Y., Hiroto M., Matsushima A., Inada Y., Nishimura H. (1977). Cell cycle arrest and apoptosis induced by lasparaginase. *Leukemia*. 11:1858–61.
- Ulu A., Ozcan I., Koytepe S. and Burhan A. (2018). Design of epoxy-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MCM-41 core-shell nanoparticles for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 115:1122–1130. [PMID: 29727644].
- Umesh K., Shamsher S., and Wamik A. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of Lasparaginase in the treatment of Leukemia. *Critical Review of Oncology and hematology*. 61 : 208- 221.
- Vaddavalli R., Peddi S., Kothagauni SY., Begum Z., Gaddam B., Periketi M., Linga VR. (2014). *Saccharopolyspora indica* sp. nov., an actinomycete isolated from the rhizosphere of *Callistemon citrinus* (Curtis). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64:1559–65.

## Références bibliographiques

- Vakulenko S. B. and Mobashery S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Review*. 16:430–450.
- Valan Arasu M., Duraipandiyan V., Agastian P., Ignacimuthu S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale*. 19 (1) : 22 – 28.
- Van Bambeke F. (2006). Glycopeptides and glycodepsipeptides in clinical development: a comparative review of their antibacterial spectrum, pharmacokinetics and clinical efficacy. *Current Opinion Investigational Drugs*. 7:740 –749.
- Van de Sande, W.W. (2013). Global burden of human mycetoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(11) : e2550.
- Van Dissel D., Claessen D., Van Wezel G. P. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Advances in Applied Microbiology*. 89:1–45.
- Van Keulen G., Alderson J., White J., R. Gary Sawers. (2007). The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress. *Environmental Microbiology*. 9 (12) : 3143 – 3149.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F., Van Sinderen D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 71(3): 495–548.
- Verma M. K and Pulicherla K. K. (2016). Enzyme promiscuity in earthworm serine protease: substrate versatility and therapeutic potential. *Amino Acids*. 48:941–948. [PubMed: 26739820].
- Verma S. K. and A. Kumar. (2011). Therapeutic uses of *Withania somnifera* (Ashwagandha) with a note on withanolides and its pharmacological actions. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 4(1) : 01-04.
- Vining L. C. and Stuttard C. (1994). Chloramphenicol, genetics and biochemistry of antibiotic production. *Butterworth-Heinemann*, Boston, MA.
- Vollmer W., Blanot D., De Pedro M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Review*. 32(2): 149–67.
- Wade H. E. (1987). Development of Erwinase (*Erwinia asparaginase*). In: Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 61 (2007) : 208–221.

## Références bibliographiques

- Waksman S. A. and Woodruff H. B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomyces. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*. 45:609.
- Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M. and Rodriguez C. (2006). *Streptacidiphilus Orizae* sp. nov., an actinomycete isolated race field soil in Thailand. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.* 56 : 1257 – 1267.
- Warangkar S. C. and Khobragade C. N. (2010). Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-Asparaginase. *Enzyme Research*. 1-10.
- Wenner K. A., Vieira Pinheiro J. P., Escherich G., Wessalowski R. , Jorch N., Wolff J., Stehn M., Kohlschütter A. , Boos J. , Janka-Schaub G. E. (2005). Asparagine concentration in plasma after 2,500 IU/m<sup>2</sup>. PEG-asparaginase i.v. in children with acute lymphoblastic leukemia. *Klinische Pädiatrie*. 217: 321-326.
- Whitman W. B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H. J., Trujillo M. E., Ludwig W. and Suzuki K. I. (2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: *The Actinobacteria*. Springer Publishing Company, New York.
- Willey J. M., Van der Donk W. A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*. 61:477–501.
- Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. (2010). Prescott's microbiology, 7th edition. McGraw-Hill, New York, NY.
- Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL, p 2452–2492. In Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, 1st edition, vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Review*. 51: 221–271.
- Woo M. H., Hak L. J., Storm M. C., Sandlund J. T., Ribeiro R. C., Rubnitz J. E., Harrison P. L. , Wang B., Evans W. E. , Pui C. H., Relling M. V. (2000). Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 18:1525-1532.
- Wösten H. A., Willey J. M. (2000). Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology*. 146:767–773.
- Wuyts J., Perrie Áre G., Van de Peer Y. (2004). The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research*. 32: 101-103.

- Xu C. P., Kim S. W., Hwang H. J. and Yun J. W. (2006). Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. *Bioresource Technology*. 97: 770–777.
- Xu L. H., Tiang Y. Q., Zhang Y. F., Zhao L. X. and Jiang C. L. (1998). *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48 : 1089-1093.
- Yadav S., Verma S. K., Singh J., Kumar A. (2014). Industrial Production and Clinical Application of L-Asparaginase: A Chemotherapeutic Agent. *International Journal of Medical, Pharmaceutical Science and Engineering*. 8 (1) : 1 -7.
- Yamaguchi T. (1965). Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J Bacteriol.*, 89:444–453.
- Yan S., Yang L., Lu L., Guo Q., Hu X., Yuan Y., Li Y., Wu M. and Zhang J. (2018). Improved pharmacokinetic characteristics and bioactive effects of anticancer enzyme delivery systems. *Expert Opinion On Drug Metabolism and Toxicology*. 14 (9) : 951 – 960.
- Yang L., Yan S., Zhang Y., Hu X., Guo Q., Yuan Y. and Zhang J. (2018). Novel enzyme formulations for improved pharmacokinetic properties and anti-inflammatory efficacies. *International Journal of Pharmaceutics*. 537(1–2): 268–277.
- Yau T., Cheng P. N., Chan P., Chen L., Yuen J., Pang R., Fan S. T., Poon R. T. (2013). A phase 1 dose-escalating study of pegylated recombinant human arginase 1 (Peg-rhArg1) in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Investigational New Drugs*. 31:99–107. PubMed: 22426640.
- Yeh T. H., Chen Y. R., Chen S. Y., Shen W. C., Ann D. K., Zaro J. L., Shen L. J. (2016). Selective intracellular delivery of recombinant arginine deiminase (ADI) using pH-sensitive cell penetrating peptides to overcome ADI resistance in hypoxic breast cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*. 13:262–271. PubMed: 26642391.
- Yellin T. O. and Wriston J. C. (1966). Purification and properties of guinea pig serum l-asparaginase. *Biochemistry*. 5:1605–12.
- Yokota A. and Tamura T. (1994). Transfer of *Nocardioides fastidiosa* Collins and Stackebrandt 1989 to the genus *Aeromicrobium* as *Aeromicrobium fastidiosum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 608–611.
- Zaitlin B. and Watson S. B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water. Myths, tenets and truths. *Water Research*. 40 : 1741 – 1753.

ZERIZER H. (2014). Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. *Thèse Doctorat*. Université de Constantine 1. Constantine – Algérie.

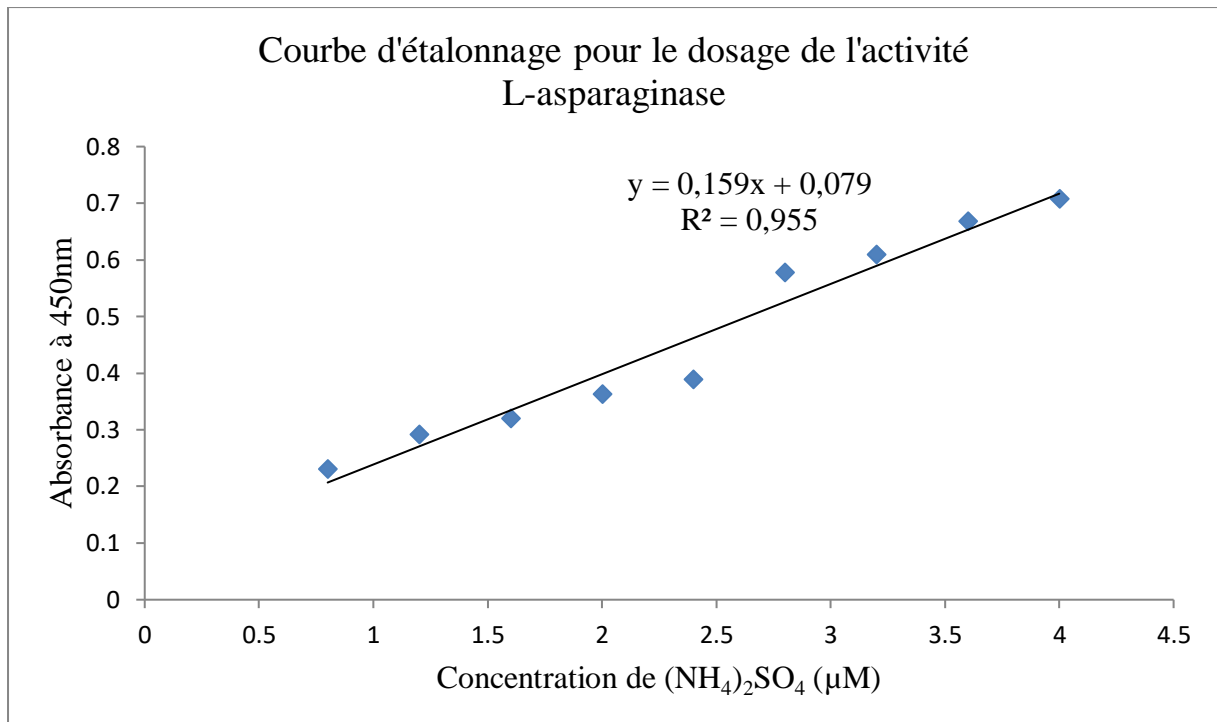
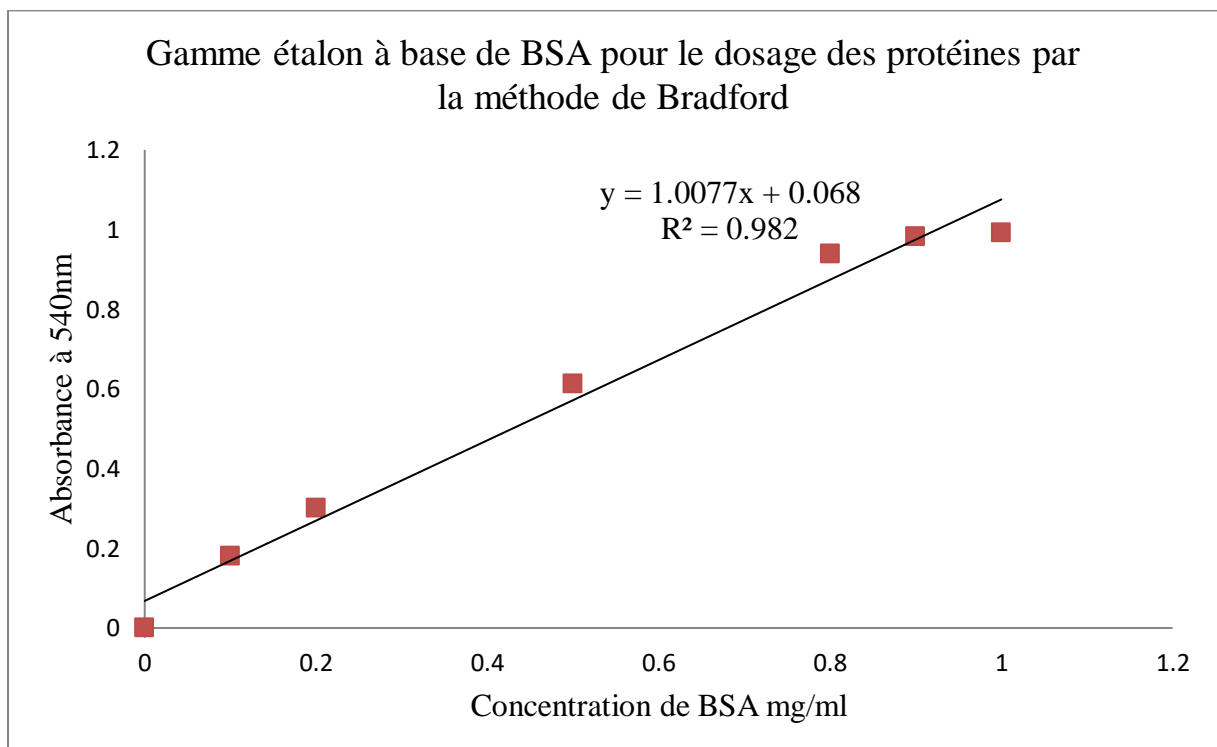
Zhi X.Y., Li W. J. and Stackebrandt E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 (3): 589–608.

Zhu H., Sandiford S. K. and Van Wezel G. P. (2014). Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*. 41: 371–386.

Zhu J. H., Yan X. L., Chen H. J. and Wang Z. H. (2007). In situ extraction of intracellular L-asparaginase using thermoseparating aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. 1147. (1) : 127-134

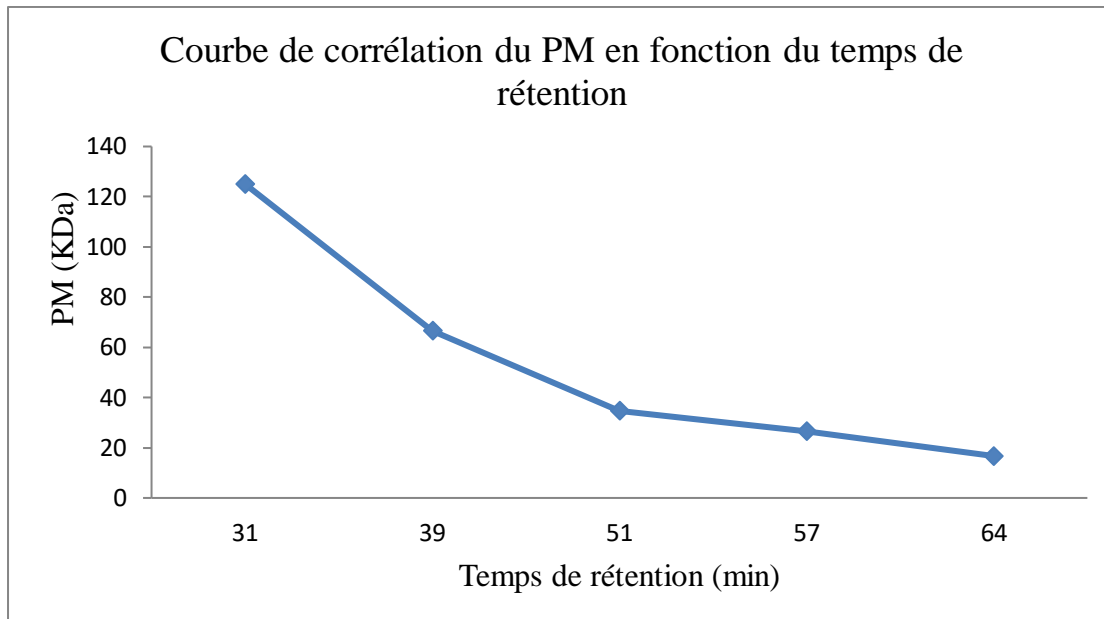
Zhu L., Wu Z., Jin J. M. Tang S. Y. (2016). Directed evolution of leucine dehydrogenase for improved efficiency of L-tert-leucine synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(13):513–5805. PMID: 26898942.

# *Annexes*

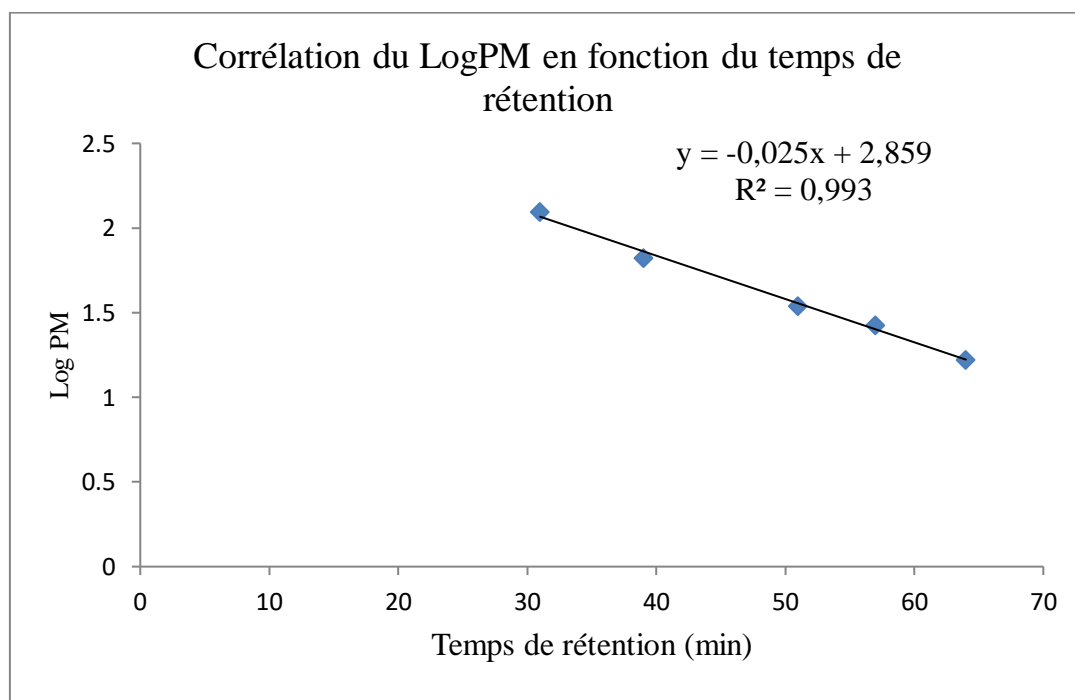
**Annexe 1 : Courbes d'étalonnage et tableau de précipitation saline.****Dosage spectrophotométrique de l'activité L-asparaginase****Dosage spectrophotométrique des protéines par la méthode de Bradford**

**Graphe permettant l'estimation du PM sur chromatographie d'exclusion moléculaire en utilisant le Séphacryl S-100 :**

**Courbe du PM = F (temps de rétention)**



**Droite du Log PM = F (temps de rétention)**



**Tableau de la précipitation par le sulfate d'ammonium (Green and Hughes, 1955)**

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95		100
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

**Annexe 2 : Equipements scientifiques utilisés.**

- Spectrophotomètre Visible *medline MD-1105 U.K* pour le dosage des protéines et le dosage de l'activité enzymatique.
- Spectrophotomètre UV-V *BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO. LTD (UK)* : UV – 9200 pour le dosage du Bleu de Dextran et l'estimation du  $V_0$ .
- Centrifugeuse réfrigérée *SIGMA 4-16K*.
- Cuve d'électrophorèse verticale des protéines *Hoefler SE260*.
- Générateur de courant électrique *ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY Hoefler Consort EV 243*.
- Tubes de concentration *VIVASCIENCE MWCO 10.000*.
- Bain Marie *MEMMERT*.
- Microscope optique *CETI* muni d'une caméra.
- Balance de précision *DENVER Instrument Company TR-403* : Max : 410g, Min : 0,001g.
- pH mètre *METROHM 620-SWISS MADE*.
- Plaque chauffante pour tubes Eppendorf *BIOBLOCK*. (Pour la dénaturation thermique des protéines à séparer en SDS-PAGE).
- Agitateur réglable *APELEX* de 5 à 30 oscillations par min (pour la fixation, coloration et décoloration des gels SDS-PAGE).
- Vortex *BIOBLOCK SCIENTIFIC TOP-MIX 94323*.
- Colonne de chromatographie basse pression type *Kontes™ Chromaflex™* (30 × 2,5 cm).
- Bain de sonication *JP031S* de 50Hz.
- Séquenceur *ABI3730XL* de 96 capillaires pour nucléotides.

## Annexe 03 : Réactifs et milieux de culture

### Réactifs de biologie moléculaire :

-Kit d'extraction de l'ADN : *Pathogène universel Omega Biotech Mag-Bind* : Qui comprend une étape d'homogénéisation mécanique utilisant des billes de céramique de 0,1 mm à 2,7 mm pour lyser efficacement divers agents pathogènes. Les tampons de lyse formulés ne moussent pas pendant la lyse, ce qui permet une meilleure homogénéisation des échantillons.

-Séquences universelles pour amplification de l'ADN : *16S-27f* et *16S-1492r*.

-Mix *HOTBIOAmp 5X* à 12.5mM MgCl<sub>2</sub> pour PCR.

-Enhancer *10X* riche en GC : Il est utilisé comme additif de PCR pour les matrices difficiles riches en GC. La solution optimisée modifie le comportement de fusion des acides nucléiques et améliore souvent l'amplification de systèmes PCR sous-optimaux présentant un degré élevé de structures secondaires et de régions riches en GC. Un amplificateur riche en GC 10x doit être utilisé à une concentration de travail définie (solution 1x, 2x ou 3x) et uniquement si une amplification non spécifique se produit.

-Amorces d'amplification PCR du gène ADNr 16S (*Primers*): *16S-27F* ; *16S-1492R*.

-Amorces de séquençage : *16S-27f*; *16S-515f*; *16S-805R* et *16S-1492R* des produits de la PCR.

-Kit de séquençage *BigDyeV3.1 Dye Terminator Kit (Thermo Fisher Scientific)*.

-Kit *terminateur BigDye X (Thermo Fisher Scientific)* pour la purification des produits du séquençage.

-Réactif de purification et de nettoyage des produits d'amplification : *ExoSap-It* (Mélange enzymatique d'Exonucléase I et de Phosphatase Alcaline de crevette).

### Réactifs et milieux de cultures utilisés pour l'identification morphologique, physiologique et biochimique des souches bactériennes

#### Milieux de culture utilisés pour l'identification biochimique des souches bactériennes

-ISP<sub>9</sub> additionné de Caséines à 1% : Etude de la dégradation de la Caséine.

-Milieux VP et RM pour l'étude des voies fermentaires.

-Milieu Citrate de Simmons pour l'étude de la dégradation du citrate.

-Milieu NR pour l'étude de la production de la Nitrate Réductase.

-Milieu MEVAG pour l'étude des voies d'attaque des glucides.

-Milieu TSI (Three-Sugars-Iron) pour l'étude de la dégradation des sucres : Glucose, Lactose et Fructose ainsi que la production de gaz et de H<sub>2</sub>S.

-Milieu ISP<sub>9</sub> additionné d'amidon soluble pour l'étude de la dégradation de l'amidon.

-Milieu Mannitol-Mobilité pour l'étude de la dégradation du Mannitol et du caractère de mobilité dans le milieu semi-solide.

- Disque à oxydase pour la recherche de la production de l'Oxydase.
- Eau oxygénée pour l'étude de la production de la Catalase.
- Eau péptonée exempte d'indole et réactif de Kovacs pour l'étude de la production de l'indole.
- Milieu TDA pour l'étude de la production de la Tryptophane Désaminase.

**Composition chimique des milieux de culture :**

**Milieu ISP<sub>2</sub>** (International *Streptomyces* Project 2) (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glucose: .....4 g  
 Extrait de levure: .....4 g  
 Extrait de malt: .....10 g  
 Agar: .....20 g  
 Eau distillée: q.s.p. 1000 ml  
 pH = 7,2.  
 Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

**Milieu ISP9 (Milieu de base)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : .....2,64g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : .....2,38g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : .....5,65g  
 MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : .....1g  
 Solution saline\* : .....1 ml  
 Eau distillée : .....1000 ml  
 Agar : .....20g  
 pH : 6,8-7.

\*Solution saline: CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O: 0,64g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,11 g; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 0,79 g; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0.15 g; eau distillée : 1000 ml.

**Bouillon ADS** (Asparagine Dextrose Salt Broth) :

L-Asparagine.....1%  
 D-Glucose.....0,2%  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,05%  
 MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0,01%  
 H<sub>2</sub>O : Qsp 100%  
 Additionné de Rouge Phénol à 0,009%  
 pH = 7,0

**Gélose semi-solide ADS** (Asparagine Dextrose Salt agar) :

L-Asparagine.....1%  
 D-Glucose.....0,2%  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,05%  
 MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0,01%  
 Agar.....0,9%  
 H<sub>2</sub>O : Qsp 100%

Additionné de Rouge Phénol à 0,009%  
pH = 7,0

**Gélose ADS (Asparagine Dextrose Salt agar) :**

L-Asparagine.....1%  
D-Glucose.....0,2%  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,05%  
MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0,01%  
Agar.....2%  
H<sub>2</sub>O : Qsp 100%  
Additionné de Rouge Phénol à 0,009%  
pH = 7,0

**Réactifs d'électrophorèse PAGE-SDS :**

**Solution d'acrylamide prête à l'emploi (solution A)**

Acrylamide.....36g.  
Bisacrylamide.....1g.  
Eau distillée.....qsp 100mL.

**Tampon de gel de séparation (solution S)**

Tris.....9,25g.  
Eau distillée.....qsp 50mL.  
pH ajusté à 8,8 avec du HCl 1N.

**Tampon de gel de concentration (solution C)**

Tris.....3g.  
Eau distillée.....qsp 50mL.  
pH ajusté à 6,8 avec du HCl 1N.

**Tampon d'échantillon**

Solution C.....500µL.  
Eau distillée.....250 µL.  
SDS (10%).....250 µL.  
Solution de Bleu de bromophénol.....1 mL.

**Solution de bleu de bromophénol**

- Bleu de Bromophénol.....2 mg.  
- Glycérol 50%.....10 g.  
- Tris HCl 0.5M pH 6.8.....1.25 ml.  
- H<sub>2</sub>O.....qsp 10 ml.

**Tampon d'électrode**

- Tris .....15 g.  
- Glycine.....72 g.  
- SDS.....6g.  
- H<sub>2</sub>O.....qsp 1L.

**Solution de fixation**

-TCA.....	12g.
-Eau distillée.....	100ml.

#### Solution de coloration

-Bleu de Coomassie R250.....	0,5g.
-TCA.....	4g.
-Méthanol.....	100ml.
-Eau distillée.....	100ml.

#### Solution de décoloration

-Acide acétique.....	37,5ml.
-Eau distillée.....	312,5ml.
-Méthanol.....	150ml.

#### Préparation des échantillons

20 µl d'échantillon + 20 µl de tampon d'échantillon.

Dépôt de 10 à 20µL du mélange.

- Migration pendant 15 min à 10 mA et à 80V par gel.
- Migration pendant 80 min à 20 mA et à 180V par gel.

#### Solution de persulfate d'ammonium 10%.

Persulfate d'ammonium.....	0,1g.
Eau distillée.....	qsp 1mL.

#### Gel de séparation (T = 17% et C = 207% pour une plaque)

Solution A.....	4,60mL.
Solution S.....	2,51mL.
Eau distillée.....	2,73mL.
SDS 10%.....	100µL.
TEMED.....	13µL.
Persulfate d'ammonium 10%.....	75µL.

#### Gel de concentration (T = 4,8% et C = 2,7% pour une plaque)

Solution A.....	1,3mL.
Solution C.....	2,5mL.
Eau distillée.....	5,8mL.
SDS 10%.....	100µL.
TEMED.....	20µL.
Persulfate d'ammonium 10%.....	10µL.

**Marqueur de taille (Prestained Molecular Weight Marker :**  $\alpha$ -2-Macroglobuline de sérum de cheval (180000),  $\beta$ -Galactosidase d'*E. Coli* (116000), Lactoferrine de lait humain (90000), Pyruvate kinase du muscle de lapin (58000), fumarase du cœur de porc (48500), Lactate Déshydrogénase du muscle de lapin (36500), triose phosphate isomérase du muscle de lapin (26600).

#### Traitement du gel après migration

Fixation : 45min sous agitation dans la solution de fixation.  
 Coloration : 1heure sous agitation dans la solution de coloration.  
 Décoloration : 1heure sous agitation dans la solution de décoloration.

**Réactifs de la lyse cellulaire :**

**-Saccharose 6,7% - Tris 50mM – EDTA 1mM, pH8,0 :**

-Saccharose .....1,34g.  
 -Tris-base .....0,12g.  
 -EDTA .....0,006g.  
 -Eau distillée .....qsp 20ml.  
 -pH8,0.

**-Lysozyme 25mg/ml dans Tris 25mM, pH8,0 :**

-Tris-base .....0,06g.  
 -Eau distillée qsp .....20ml.  
 -Lysozyme .....0,5g.  
 pH8,0.

**-EDTA 0,25M – Tris 50mM, pH8,0 :**

-EDTA .....1,46g.  
 -Tris .....0,12g.  
 -Eau distillée .....qsp 20ml.  
 pH8,0.

**-SDS 20% dans Tris 50mM – EDTA 20mM, pH8,0 :**

-Tris .....0,12g.  
 -EDTA .....0,006g.  
 -Eau distillée qsp .....20ml.  
 -SDS .....4g.  
 pH8,0.

**Réactif de Nessler pour le dosage de l'activité enzymatique L-asparaginase :**

Chlorure mercurique..... 10 g  
 Iodure de potassium ..... 7 g  
 Hydroxyde de sodium..... 16 g  
 Eau (exempte d'ammoniac)..... jusqu'à 100 mL

**Réactif de Bradford pour le dosage des protéines (Bradford, 1976) :**

Bleu de Coomassie G250 ..... 100mg  
 Ethanol à 95% ..... 50mL  
 Acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à 85% ..... 100mL  
 dH<sub>2</sub>O QSP 1L

**A conserver à +4°C à l'abri de la lumière.**

**Réactifs de la chromatographie d'exclusion moléculaire :**

**Phase stationnaire**

Gel de Séphacryl S-200 stabilisé par le tampon Tris/HCl 0,02M, pH8,4.

**Tampon de la phase stationnaire**

Tris (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol).....2,45g.  
 Eau distillée.....qsp 1L.  
 pH ajusté à 8,4 avec du HCl 1N.

**Phase mobile**

Tris (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol).....6,12g.  
 Eau distillée.....qsp 1L.  
 pH ajusté à 8,4 avec du HCl 1N.

**Protéines standard pour l'étalonnage de la phase stationnaire**

**β-Galactosidase (Coli-prev<sup>R</sup>) (PM 116KDa) :** solution commercialisée, utilisée en pharmacie.

**BSA 2mg/mL (PM 66.5KDa)**

BSA.....20mg.  
 Tampon phosphate PBS pH7.....qsp 10mL.

**Trypsine 2mg/mL (PM 26,6KDa)**

Trypsine 2000UI.....20mg.  
 Tampon phosphate PBS (0,1M, pH 6).....qsp 10mL.  
 Filtrer avec un filtre de 0,22µm (stérilisation);  
 Conserver à + 4°C.

**Pepsine 2mg/mL (PM 34,7KDa)**

Pepsine.....20mg.  
 HCl (0,02M, pH 2).....qsp 10mL.  
 Filtrer avec un filtre de 0,22µm (stérilisation).  
 Conserver à + 4°C.

**Lysozyme du blanc d'œuf 25mg/mL (PM 16.7KDa)**

Tris-base .....0,06g.  
 Eau distillée qsp .....20ml.  
 Lysozyme .....0,5g.  
 pH8,0.

**PBS 10X**

NaCl.....	76.5 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	7.25 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2.1 g.
H <sub>2</sub> O.....	qsp 1 L.

**Annexe 04 : Séquences complètes des gènes codant l'ARNr 16S des deux souches candidates sous forme de contig de nucléotides :**

**>Contig de la souche *Streptomyces hydrogenans* CA04\_16S-Comple**

GAGTTTGANTCATGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG  
 ATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGC  
 CCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGC  
 ATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTG  
 GTGAGGTAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCAC  
 ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA  
 TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACC  
 TCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC  
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
 GAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGC  
 AGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGAC  
 GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
 AACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTA  
 AGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 GCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTT  
 GACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGC  
 ATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCC  
 TTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGT  
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCA  
 CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAA  
 AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAG  
 TAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGT  
 CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCT  
 GTCGAAGGTGGGACTGCGATTGGACAATC

**>Contig de la souche *Streptomyces paulus* CA01\_16S-Comple**

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGCTTTC  
 GGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGG  
 ACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTG  
 TAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGAGTAGTGGC  
 TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA  
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAATGGGCGAAAGCCT  
 GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGG  
 AAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  
 CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGC  
 GCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACAGGG  
 AGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT  
 CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAA  
 AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGCACT  
 AGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTG  
 GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGG  
 AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGCATACACCGGA  
 AACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCA

GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTG  
CCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA  
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT  
GGCCGGTACAATGAGCTGCGATAACCGGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAG  
TTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA  
GCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAG  
TCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTCTGAAGGTGGACT  
GCGA

**Annexe 05 : Photo illustrant l'éluion du Bleu de Dextran sur le gel de Séphacryl S-200.**



Photo montrant l'éluion du Bleu de Dextran sur la colonne de chromatographie sur Séphacryl S-200 pour mesurer le volume mort ( $V_0$ )

*Publication*

## Characterization and optimization of extracellular L-Asparaginase production by selected Actinomycete strain isolated from an algerian wheat bran

Achour Chergui<sup>1,2,3</sup>, Mouloud Kecha<sup>3</sup>, Abderrahmane Tighrine<sup>1</sup>, Nabil Adrar<sup>2,4</sup>, Samira Bouzida<sup>1</sup>, Yacine Titouche<sup>1</sup>, Lhadi Boughani<sup>5</sup>, Nabil Kadri<sup>2,5</sup>, Karim Houali<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnologies (LABAB) 15000 Tizi-Ouzou, Algeria

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Bouira, 10000 Bouira, Algeria

<sup>3</sup> Laboratory of Applied Microbiology, 06000 Bejaia, Algeria

<sup>4</sup> Laboratory of Plant Biotechnology and Ethnobotany, 06000 Bejaia, Algeria

<sup>5</sup> Laboratory of Biochemistry, Biophysics, Biomathematics and Scientometry, 06000 Bejaia, Algeria

Correspondence to: [hualitizi@yahoo.fr](mailto:hualitizi@yahoo.fr)

Received April 14, 2018; Accepted November 15, 2018; Published November 30, 2018

Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.14.9>

Copyright: © 2018 by the C.M.B. Association. All rights reserved.

**Abstract:** L-Asparaginase is an enzyme that hydrolyses the amino acid L-Asparagine into aspartic acid and ammonia. As a medication, L-Asparaginase is used in chemotherapy to treat acute lymphoblastic leukaemia by depleting circulating Asparagine and depriving tumor cells. Interest in Actinomycetes as potential producers of antibiotics and enzymes encouraged us to investigate an isolated strain (*CA01*) from soft wheat bran. The Actinomycete strain was characterized based on its morphological and biochemical characteristics and selected due to a proved promising ability to produce L-Asparaginase optimized in both solid and liquid media cultures. The conditions of enzyme production were standardized according to a one-factor-at-a-time (OFAT) experimental design. To obtain optimal medium combination, a Box-Behnken Response Surface Methodology (RSM) has been adopted by choosing the most influential factors. The optimal conditions for the enzyme production were (g/l): L-Asparagine 10.7; Glucose 2.7; starch 7, in based medium containing (g/l):  $K_2HPO_4$  0.5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1, corresponding to an optimal enzymatic activity of 8.03 IU/ml at 27.83°C. The maximum production of enzyme was reached on the sixth day of experiment. The ANOVA test (P value < 0.05) and adjusted  $R^2$  values close to the experimental  $R^2$  show that the obtained model of the active L-Asparaginase of *CA01* strain production is significant with the following linear terms: temperature, substrate concentration, Glucose concentration and there squared.

**Key words:** L-Asparaginase; Actinomycetes; Enzyme; Optimization; Box Behnken Design; RSM.

### Introduction

L-Asparaginase (L-Asparagine amidohydrolase EC.3.5.1.1) is the enzyme that catalyses the hydrolysis of amid group in the side chain of L-Asparagine to yield L-aspartate and ammonia (1). L-Asparaginase is nowadays recognized as a therapeutic enzyme used in anticancer chemotherapy, in particular in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. The transformed lymphocytes unlike normal cells are unable to produce their own L-Asparagine because of their Asparagine synthetase deficiency. For this, these cells use L-Asparagine from the plasma and surrounding tissues to ensure their growth (2). As a result, administration of L-Asparaginase and the hydrolysis of L-Asparagine from the medium deprives the transformed lymphocytes of L-Asparagine which is considered as a growth factor and therefore essential for their development (3), and as a result, most of the cells die (4). This molecule is also used in food industry sector to prevent the formation of acrylamide recognized as a carcinogenic compound formed in foods at high temperatures (5). L-Asparaginase is marketed under the names: ELSAPAR, ERWINASE, KIDROLASE and ONCASPAR. For clinical use, only the enzyme produced by microorganisms that is exploited. Today, it is the enzyme produced by *E. coli*

that dominates the market, sold in Germany under the name of GRASNTIN and in Japan under the name of LEUMASE (6).

There are several types of L-Asparaginase which differ in particular according to their location in bacterial cells. We can find intracellular enzymes which are most often located in the periplasmic space, between the plasma membrane and the bacterial wall (7) as well as an extracellular enzymes secreted in the growth medium. This last type of L-Asparaginase is the subject of the present study in which the conditions of its production by a bacterial strain belonging to Actinomycetes is standardized and optimized. Actinomycetes are known for their biotechnological uses, especially in the pharmaceutical field where 70% of conventional antibiotics are produced from them (8). They are also powerful producers of enzymes for industrial and therapeutic interests (9). Our strain is isolated from the soft wheat bran. We chose this product in order to promote it because it is not valued locally. At the beginning, we looked for the cellulase activity, an enzyme responsible for the hydrolysis of cellulosic polymers on the walls of vegetable seeds (10). More specifically, the present paper focused on the research and the optimization of the L-Asparaginase production by the Actinomycete strain

*CA01* with interesting activities.

## Materials and Methods

### Isolation of the bacterial strain

The selected Actinomycete *CA01* strain isolated from a sample of soft wheat bran obtained from a local Algerian Mill (Tizi-Ouzou region) was air-dried at room temperature for 21 days to target Actinomycetes spores and eliminate unwanted microorganisms (11). The wheat bran was then crushed and sieved to achieve the finest powders. A stock solution preparation was performed according to (12) where 1g of fine powder was dispersed in 9 ml of sterile physiological water. Then, a series of decimal dilutions is carried out up to a dilution of  $10^{-3}$  (13). The isolation was performed by inoculating 1 ml of the  $10^{-3}$  dilution on an ISP2 (International Streptomyces Project 2) (14), an agar supplemented with 100 µg/ml nalidixic acid to inhibit Gram-negative bacteria and nystatin with 50 µg/ml to prevent the development of fungi. (14). the culture was incubated for 7 days at 28°C (15, 16). Typical Actinomycete colonies have been partially identified based on their morphological, biochemical and physiological characters.

### Detection of L-Asparaginase activity

#### On agar medium

The production of L-Asparaginase was revealed using medium Asparagine Dextrose Salt agar (ADS) (17) which contains L-Asparagine as the unique source of Nitrogen and the following chemicals (g/L): L-Asparagine 10; D-Glucose 2;  $K_2HPO_4$  0,5 ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 ; phenol red 0,09 (18). The culture was incubated at 28°C for 7 days. The change of coloration from yellow to pink around bacterial colonies indicates the alkalisation of the medium due to the presence of ammonia produced by L-Asparagine hydrolysis reaction catalyzed by L-Asparaginase. The pink color corresponds to the turn of the pH indicator. Alkalisation is shown by a color change of the Phenol Red (18).

#### On liquid medium

Following the same method, the ADS broth was inoculated with strain *CA01* and incubated at 28°C for 7 days. The change of color medium from yellow to pink indicates the production of ammonia following the hydrolysis of L-Asparagine.

### Quantification of L-Asparaginase activity

The applied approach is a modification of the Nesslerization protocol. The parameters have been standardized after several tests based on significant related studies. To allow an oxygen supply in aerobic culture, a volume of 100 ml of ADS broth was prepared in 250ml. An inoculum size of  $10^7$  UFC/ml of the isolated strain was added to the culture and incubated at 28°C for 7-10 days. After centrifugation of the bacterial culture at 10000 g for 20 min at +4°C, the obtained supernatant was used as a crude extract for the enzymatic activity assay. This test is based on the detection of ammonia produced by L-Asparagine hydrolysis using Nessler's reagent. 0.2 ml of the crude extract were mixed with 0.9 ml of the substrate (L-Asn: 0.04 M solubilized in

Tris/HCl: 0.5 M, pH 7.2) and incubated at 37°C for 20-30 min. The reaction was stopped by adding 1.5 M trichloroacetic acid. Then; 0.2 ml of the mixture was diluted with 1 ml of distilled water and mixed with 0.5 ml of Nessler's reagent. The resulting reacting mixture was incubated at room temperature for 10-15 minutes before reading the absorbance by spectrophotometry at 450 nm. The blank was treated the same way except that the enzymatic extract was replaced by the ADS broth (Asparagine Dextrose Agar) (19, 20, 11). A calibration curve was plotted using a series of ammonium sulphate solution with known concentration as source of ammonia (15).

### Standardization of the medium for L-Asparaginase production

We adopted an OFT experience plan to study the effects of adding each of the following substrates in the ADS medium : Carbon sources (0.2% Glucose; 2% starch; 0.1% Glucose + 0.7% starch) and Nitrogen sources (organic : 1% L-Asparagine or mineral : 1%  $NaNO_3$ ).

### Kinetic study of L-Asparaginase production

The kinetic of L-Asparaginase production by the Actinomycete strain *CA01* was carried out. This approach was also used to standardize the incubation time. The production of the active enzyme was estimated each time by the method of Nessler.

### Optimization of the medium for L-Asparaginase production

After defining the types of Carbon and Nitrogen sources and the incubation time in the standardization step, we adopted an DOE (Design of experiments approach) to evaluate the main effects and interaction of the independent variables (factors) which are: temperature (T°C), substrate concentration of L-Asparagine (SC%) and Glucose concentration (GC%) on the production of L-Asparaginase by the strain *CA01*. It is useful to consider the factor response relationship in terms of a mathematical model such as the response function. The use of variance analysis and response surface design of experiments allowed us to express the L-Asparaginase activity as a polynomial model. Three factors to be investigated at limit points (-1; +1): (T (25°C, 30°C); SC (0.75%, 1.25%); GC (0.1%, 0.3%)) given 12 combinations and 3 points in the domain center (0; 0) were performed. A plan of 15 experiments was studied and the corresponding design matrix is shown in the table 2. The response value in the matrix is the average value obtained in three parallel experiments. The order in which the experiments were made was randomized to avoid systematic errors and the results were analyzed with Minitab17® software. The model which can describe the behavior of the system can be expressed by a quadratic equation 1 :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ii} x_i^2 + \sum a_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Where x is the factor in the coded value, Y is the predicted response in actual value,  $a_0$  the intercept term,  $a_i$  the linear effect,  $a_{ii}$  the squared effect, and  $a_{ij}$  is the interaction effect. The regression equation was optimized

for maximum value to obtain the optimum conditions giving the maximum yield of L-Asparaginase.

**Results**

**Isolated Actinomycete strain**

Specific colonies of Actinomycetes were successfully isolated using appropriate selective media (ISP2). For an effective development, the colonies were maintained on this rich malt extract as reported in several studies (21). We have isolated our strain by a serially diluted samples, after obtaining an initial solubilisation of 1g of soft wheat bran in 9 ml of physiological water. It should be noted that literature data concerning the isolation of Actinomycetes strains from wheat bran are not available which implies that there is no work already done in this direction. For this, our approach is based on the isolation of a very active strain from our wheat bran powder. After isolating, typical Actinomycete colonies were morphologically, biochemically and physiologically identified. The results were summarized in Table 1.

We have identified strain *CA01* as an Actinomycete after a series of observations on the colonies : powdered appearance on the surface of agar plate ( Fig.1-A ) , solidity and binding on the ISP2 medium, filamentous hyphae structure ( Fig.1-B ) , spore production, presence of aerial mycelium and substrate , and finally Gram + character ( Table 1).The studied characters are presented in Bergey’s manual of systematic bacteriology (2012), in section Actinobacteria.

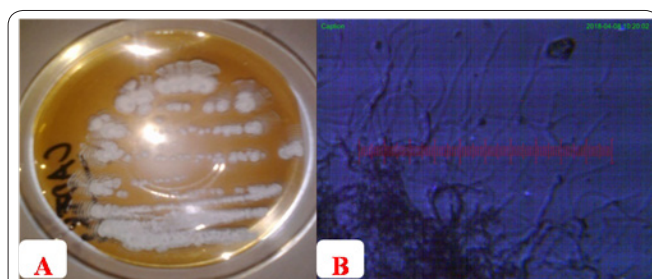
By comparing the results obtained with the negative control, the change from the yellow colour of the ADS medium to the pink, around the bacterial colonies, indicates the alkalisation of the medium confirming the production of ammonia by L-asparagine hydrolysis owing to L-Asparaginase production (19). The same test in the liquid medium showed the same results (Fig.3). In similar work aimed at researching and optimizing

the production of L-Asparaginase by Actinomycetes, the ADS medium supplemented with phenol red as a pH indicator is the most used for the screening of enzy-

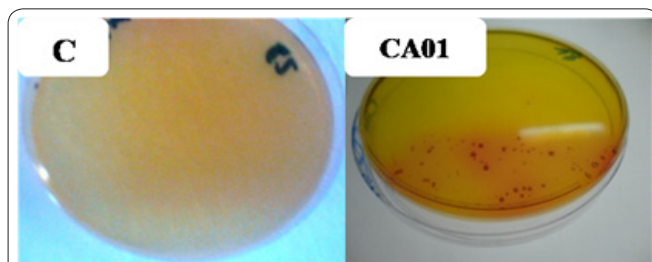
**Table 1.** Biochemical and physiological characteristics of the identification of the selected Actinomycete strain *CA01*.

Studied Characteristics	<i>CA01</i> Strain
Sugars and derived degradation	
Glucose	+
Fructose	-
Lactose	+
Starch	+
Citrate	+
Mannitol	+
Gas production	-
H <sub>2</sub> S production	-
Indole production	-
Sugars attack pathway (MEVAG)	
Aerobic	+
Anaerobic	-
Urease	-
Catalase	+
Oxidase	-
Tryptophane Deaminase (TDA)	+
Nitrate Reductase	+
VP	+
RM	-
Caseins hydrolysis	+
Mobility test	-
Growth at different temperatures	
4°C	-
25°C	+
28°C	+
37°C	+
44°C	-
50°C	-
Growth at different pH	
5	-
6	+
7	+
8	+
9	+
10	-
11	-
Tolerance of different concentrations of NaCl	
5%	+
10%	+
15%	+
20%	+
25%	-
30%	-
Morphology and color of spores	Round colonies, spores located on the Aerial Mycelium (AM)
Color of Substate Mycelium (SM) / Color of Aerial Mycelium.	Greyish/White
Appearance of spore mass	Powdery, greyish
Gram	Gram +

+ : Presence of the studied character; - : Absence of the studied character.



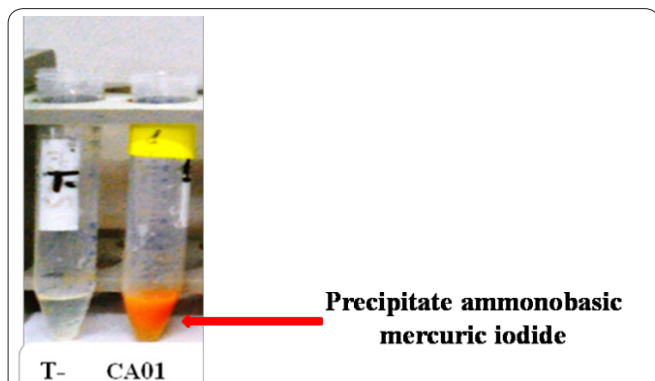
**Figure 1.** Morphological characteristics of strain *CA01*. **A:** Macromorphology and colony appearance. **B:** Micromorphology and filamentous hyphae observed under light microscopy CETI with G×100.



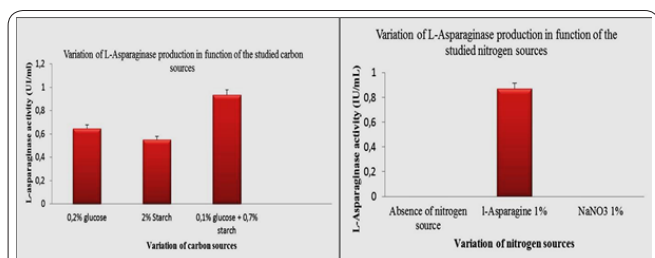
**Figure 2.** Detection of L-Asparaginase production in ADS agar medium. **C:** negative control represented by ADS non-inoculated agar; **CA01:** *CA01* strain in ADS agar medium.



**Figure 3.** Detection of L-Asparaginase production in ADS broth medium. C: negative control containing the ADS broth non-inoculated S: CA01 strain in ADS broth medium.



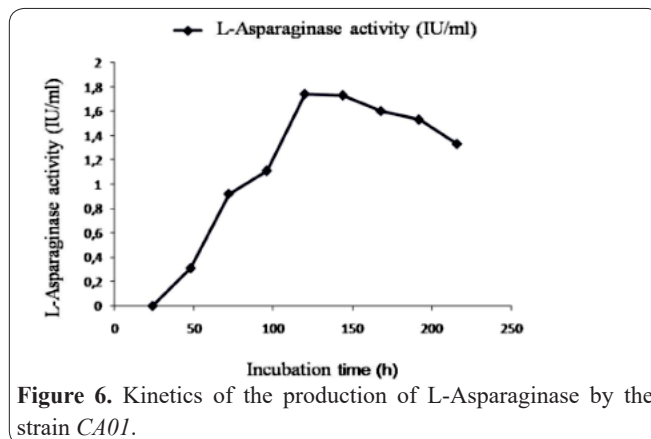
**Figure 4.** Results of quantification of L-Asparaginase activity according to the Nessler assay protocol. T- : Blank of the enzymatic reaction: no inoculated ADS broth + substrate (L-Asparagine 0,04M); CA01: culture supernatant of CA01 + substrate (L-Asparagine 0,04M).



**Figure 5.** Variation in L-Asparaginase production expressed in terms of enzyme activity (IU/ml) as a function of the source type of Carbon (A) and Nitrogen (B).

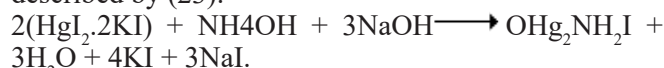
matic activity following the turn from the middle color. In the work of Konečná and *al.*, (21), an Actinomycete strain of the genus *Arthrobacter* was isolated in ISP2 medium and had screened the L-Asparaginase activity on modified ADS agar. The same authors optimized the production of the enzyme on ADS broth taking into account the temperature and the chemical composition of the medium.

The L-Asparaginase activity assay was performed by the Nessler reagent (19, 22). The appearance of an orange-yellow precipitate (Fig.4) in the tube containing the crude extract of the bacterial culture, unlike the control tube (T-), is due to the formation of a chemical complex ammonobasic mercuric iodide between the Nessler reagent (composed of potassium iodide KI



**Figure 6.** Kinetics of the production of L-Asparaginase by the strain CA01.

and mercuric iodide HgI<sub>2</sub>, in a basic medium containing NaOH) and ammonia NH<sub>3</sub>. The reaction was yet described by (23):



Ammonia comes from the hydrolysis reaction of L-Asparagine by L-Asparaginase action. For this, we can support our initial hypothesis on the production of the targeted extracellular L-Asparaginase enzyme by our strain CA01.

### Standardization of the medium for L-Asparaginase production

#### Effect of Carbon and Nitrogen sources on L-Asparaginase production

By changing the Carbon source, it was found that the production of L-Asparaginase is higher (0.93IU/ml) using the combination of 0.1% Glucose / 0.7% starch. In contrast for the same strain, the production is decreasing significantly (0.64IU/ml) by using 0.2% Glucose and usual ADS medium (Fig. 5-A).

By using a starch alone at 2%, we observed for strain CA01 an enzymatic activity of 0.55 IU/ml. This was probably due to the high capability of the bacterial strain on degrading the carbohydrate polymers of the starch-rich wheat bran. We have standardized the enzyme production following the approach undertaken by other works (24) where better L-Asparaginase activity in a strain of *Streptomyces* were observed using the Glucose/starch combination at 2/20 ratio. However, in our study the ratio was 1/7 revealed a relatively less demanding substrate additions while maintaining a reasonable enzyme production level. This property is very interesting for developing large-scale cost-effective production methods. For the variation of the source of nitrogen, the strain produced the enzyme in the presence of L-Asparagine at 1%, the substrate of the enzyme, have an enzymatic activity of 0.87IU/ml. However, in the presence of a mineral Nitrogen source: NaNO<sub>3</sub> 1%, or in the absence of any source of Nitrogen, there was no L-Asparaginase production (Fig. 5-B). This finding reinforces the probably that L-Asparaginase is an inducible enzyme, since its production has been repressed in the absence of its specific substrate (Fig.5-B).

#### Kinetics of L-Asparaginase production and standardization of the incubation time

The graph in figure 6 represents the kinetics of L-Asparaginase production expressed as total enzyme activ-

**Table 2.** Box Behnken Design matrix of experiments.

StdOrder	RunOrder	Coded experiments matrix			L-ASP activ (IU/mL)
		T	SC	GC	
3	1	-1	1	0	3,11
8	2	1	0	1	2,08
11	3	0	-1	1	4,11
7	4	-1	0	1	3,61
4	5	1	1	0	1,33
10	6	0	1	-1	3,01
1	7	-1	-1	0	2,02
2	8	1	-1	0	0,48
9	9	0	-1	-1	2,14
5	10	-1	0	-1	1,64
15	11	0	0	0	7,5
6	12	1	0	-1	1
14	13	0	0	0	6,98
12	14	0	1	1	8,01
13	15	0	0	0	6,88

**Table 3.** Statistical parameters estimation.

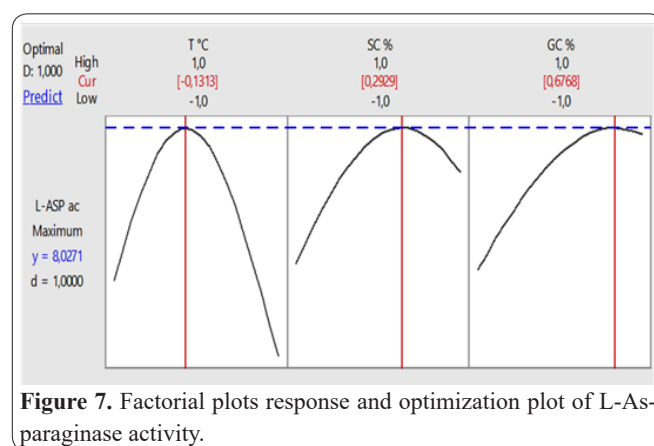
Term	Effect	Coefficient	SE Coefficient	T-value	P-value	VIF
<b>Constant</b>		2.6679	0.0842	31.63	0.000	
<b>T</b>	-0.5193	-0.2596	0.0517	-5.03	0.004	1.00
<b>SC</b>	0.4694	0.2347	0.0517	4.54	0.006	1.00
<b>GC</b>	0.6803	0.3402	0.0517	6.59	0.001	1.00
<b>T<sup>2</sup></b>	-2.0183	-1.0091	0.0760	-13.27	0.000	1.01
<b>SC<sup>2</sup></b>	-0.8020	-0.4010	0.0760	-5.27	0.003	1.01
<b>GC<sup>2</sup></b>	-0.5060	-0.2530	0.0760	-3.33	0.021	1.01
<b>T×SC</b>	0.0591	0.0295	0.0730	0.40	0.703	1.00
<b>T×GC</b>	-0.0886	-0.0443	0.0730	-0.61	0.571	1.00
<b>SC×GC</b>	0.2654	0.1327	0.0730	1.82	0.129	1.00

ity (IU/ml). On a usual ADS medium, the production of the enzyme started from day 02 (48h) and increased exponentially until day 06 (144h) with a value of 1.73 IU/ml. After 144 h the production decreased significantly.

### Optimization of L-Asparaginase production

This randomized matrix represents the responses obtained during all the 15 carried out experiments where each was repeated three times. The mean value of each experiment refers to the responses.

The analysis of variance is used to determinate the statistical significant effect of the factors. According to the ANOVA (Table 4) we can note that the linear and the square effects of all the factors studied are significant with a probability *P-value* < 5%. On the other hand, the interactions of factors are not significant. From the results (Table 3), we can see that in L-Asparaginase production, the effect of temperature has a negative sign meaning that the yield of enzyme production decrease as the temperature increase in the domain of variation of the studied factors. This temperature range was chosen according to the results of (11) indicating that the production of L-Asparaginase does not necessarily require high temperature. The significance of the obtained model is evaluated with an adjusted correlation factor *R<sup>2</sup> adj* of 95.28% which is close to the real *R<sup>2</sup>* of 98.31%. This demonstrates a perfect correlation of the experimental

**Figure 7.** Factorial plots response and optimization plot of L-Asparaginase activity.

values with the values adjusted by the model. However, the non-significant variables should be eliminated in order to obtain a representative model of the response studied, with a better correlation between L-Asparaginase activity and the factors. The reduced model can be expressed in according to the equation 2 as:

$$Y = 2.6679 - 0.2596T + 0.2347SC + 0.3402GC - 1.0091T^2 - 0.4010SC^2 - 0.2530GC^2 \quad (2)$$

### Optimization

The figure 7 illustrates the maximum response obtained by the model as a function of the optimal values of the chosen variables. The optimal enzymatic activity

**Table 4.** Analysis of Variance for L-Asparaginase.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	P-value
<b>Model</b>	9	6.22248	0.69139	32.39	0.001
<b>Linear</b>	1				
<b>T</b>	1	0.53930	0.53930	25.27	0.004
<b>SC</b>	1	0.44069	0.44069	20.65	0.006
<b>GC</b>	1	0.92568	0.92568	43.37	0.001
<b>Square</b>	1				
<b>T<sup>2</sup></b>	1	3.76002	3.76002	176.17	0.000
<b>SC<sup>2</sup></b>	1	0.59375	0.59375	27.82	0.003
<b>GC<sup>2</sup></b>	1	0.23637	0.23637	11.07	0.021
<b>2-Way interaction</b>	1				
<b>T×SC</b>	1	0.00349	0.00349	0.16	0.703
<b>T×GC</b>	1	0.00785	0.00785	0.37	0.571
<b>SC×GC</b>	1	0.10672	0.10672	3.30	0.129
<b>Error</b>	5	0.10672	0.02134		
<b>Lack-of-fit</b>	3	0.09903	0.03301	8.58	0.106
<b>Pure Error</b>	2	0.00769	0.00385		
<b>Total</b>	14	6.32920			

S = 0.146094 ; R<sup>2</sup> = 98.31% ; R<sup>2</sup> adjusted = 95.28% ; R<sup>2</sup> predicted = 74.69%

obtained through our approach is then 8.0271 IU/mL at the optimal coded values of the factors: T = -0.1313, SC = 0.2929, GC = 0.6768. These values correspond to the actual optimum values: Temperature: 27.83°C; L-Asparagine: 1.07%; Glucose: 0.27%.

## Discussion

In order to demonstrate the production of L-Asparaginase, strain CA01 was cultured on ADS medium. The same medium is used in many studies related to the production and characterization of L-Asparaginase (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31). The production yield of the enzyme depends substantially on the physicochemical conditions of the bacterial culture which implies an optimization of all the factors that can influence this production. In our study, we started by normalizing Carbon and Nitrogen sources and incubation time. The study was performed by adopting a surface methodology using Box–Behnken experimental design (BBD) to optimize temperature and concentration of the substrate and Glucose. The using of BBD showed that the pH, starch, yeast extract and L-asparagine concentration were the factors directly correlated with the production of L-Asparaginase by strain *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29 (11). The use of Glucose at 2.0% as the only source of Carbon exhibited a low L-Asparaginase production comparatively to 1.0%. This can be explained by the acidity of fermentation medium hindering enzyme production (32, 33). Glucose is known to lower the enzyme yield by acting as a repressor (34, 35). Thus, the addition of starch in the culture would be positive for increasing this productivity due to the alkalization of the medium (11). In the same context, it has been reported that starch is the best source of Carbon for the production of L-Asparaginase by the strain *Streptomyces longporus flavus* (27). Muvva *et al.* (36) concluded that starch with Glucose is the best source of Carbon for maximum L-Asparaginase production. This supports our results where we

obtained a better yield of the enzyme in the presence of the combination 0.1% Glucose / 0.7% Starch. Interestingly, Agarwal *et al.* (37) insisted that the bacteria use Glucose preferentially during the first fermentation period and then the acidity generated by its degradation is often neutralized by the production of ammonia from hydrolysis of L-Asparagine. After conducting the BBD study in a basic medium containing starch (0.7%) and Glucose at a variable rate (0.1 to 0.3%), it was found that the optimal concentration of Glucose for optimal L-Asparaginase was 0.27%. The addition of starch at 0.7% revealed a positive effect (+0.68) of Glucose on the enzyme production (see Table 1 for additional statistical parameters estimation). Meena *et al.* (11) obtained close results to our values (8.03 IU/mL) with an optimal production of 8.93 IU/mL in the presence of 1% starch in the ADS medium. Regarding the Nitrogen source, we recorded an absence of L-Asparaginase production in the absence of its substrate (L-Asparagine). The positive effect (+0.47) of the substrate L-asparagine is interesting because after optimization, we have deduced an optimal value of 1.07% allowing to have a maximum of production of the enzyme (8.03 IU/mL). Similar values were found in the production of L-Asparaginase by *S. griseus* NIOT-VKMA29 at 1.5% of asparagine (11). Kiranmayi *et al.* (2013) (38) concluded that L-Asparagine is the best Nitrogenous substrate that has resulted in optimal production of L-Asparaginase on ADS broth by an actinomycete strain, *Pseudonocardia endophytica* VUK-10. L-Asparagine is also considered as an inducible substrate in the ADS culture medium, which produced an optimal of L-Asparaginase, by an Actinomycete strain, *Streptomyces ginsengisoli* at a concentration of 0.05% (36). In addition, the medium with high concentration of L-Asparagine prompts the actinomycetes to produce a greater amount of L-Asparaginase than under normal biological conditions (25). The production of L-Asparaginase by our strain is negatively influenced by temperature with an effect of -0.52 (Table 3).

For this, a decrease in temperature during fermentation can increase the L-Asparaginase yield. This result is expected because it is common in Actinomycetes where practically the maximal activity of L-Asparaginase activity of L-asparaginase is recorded at growth temperature (28°C). of incubation on ADS medium. In our study, Production of L-Asparaginase reached the maximum after 144 h of incubation (6<sup>th</sup> day). We assume that the maximum enzyme production growth was achieved during the stationary growth phase. Ramesh and Lonsane (40) obtained a maximum of L-Asparaginase at 51 hours of incubation of *Serratia marcescens* SB08 that corresponds to the stationary phase of the growth. According to the same authors, the decrease of the enzymatic level from this phase is due to its interaction with the molecules resulting from the cells lysis. Furthermore, it has been proved that the maximum production of L-Asparaginase on the ADS broth by *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29, was reached after 144 h (06 days) of incubation, (11, 25, 41). However, in the work of Alapati and Muvva in 2010 (42), a maximum of L-Asparaginase activity was observed after 72 hours of incubation. Of the various conditions tested in our study, temperature of 27.83 °C, an incubation time of 6 days, a rate of L-asparagine 1.07%, Glucose 0.27% and 0.7% of starch were found to be optimum for L-Asparaginase production with a significant yield of 8.03 IU/mL. The present study revealed that the experimental approach based on BBD significantly increased the enzyme production yield compared to the usual starting conditions where the maximum activity of L-Asparaginase recorded was 0.87 IU / mL.

### Acknowledgements

Our heartfelt thanks for the hakim mill located in Tizi-Ouzou (Algeria) for providing us with the sample of wheat bran.

### Author's contribution

A.C. made and performed the experiments and interpreted the results. M. K. co-directed the work and identified the bacterial strains. K.H. directed the work in his research laboratory. N.A. has done the translation and revision of the English language. A. T. realized the DOE approach. Y.T. and S.B. participated in the realization of cultures. L. B and N.K. contributed in the redaction style.

### References

1. Singh, Y. and Srivastava, S. K. Statistical and evolutionary optimization for enhanced production of an anti leukemic enzyme, l-asparaginase, in a protease-deficiency *Bacillus aryabhatai* ITBHU02 isolated from the soil contaminated with hospital waste. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2012. 51 : 322 – 335.
2. Savitri N. A. and Wamik A. Microbial L-Asparaginase : A potent antitumour enzyme. *Indian Journal of Biotechnology*. 2002. 02 : 184 – 194.
3. Verma, N., Kumar, K., Kaur, G. and Anand, S. L-Asparaginase : a promising chemotherapeutic agent. *Crit rev. Biotechnol*. 2007. 27: 45.
4. Selvakumar D. Study of L-Asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Iran J Biotech*. 2011. 9: 102-8.
5. Pedreshi, F., Kaack, K. and Granby, K. The effect of L-Asparaginase on acrylamide formation of French fries, *Food Chem*. 2008. 109: 386.
6. Warangkar, S. C. Andkhobragade, C. N. Screening, enrichment and media optimization for L-Asparaginase production. *Journal of Cell and Tissue Research*, 2009. 9(3) : 1963-1968
7. Keating, M. J., Holmes, R., LERNER, S. H. L-Asparaginase and PEG asparaginase past, present and future. *Leuk Lymphoma*, 1993. 10: 153-157.
8. Fernandes T. A. R., Da Silveira W. B., Lopes Passos F. M., Zucchi T. D. Laccases from *Actinobacteria*—What We Have and What to Expect. *Advances in Microbiology*, 2014, 4 : 285-296
9. Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. and Inamori, Y. A Thermostable Laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2003. 67 : 2167-2175.
10. Soni R., Nazir A., Chadha B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products*. 2010. 31: 2. 277-283.
11. Balakrishnan, M., Lawrance, A., Thadikamala, S., Rangamaran, V. R., Gopal, D., Nambali, V. V. and Ramalingam, K. L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-Asparaginase gene. *Scientific Reports*. 2015. 5:12404 | DOI: 10.1038.
12. Sahu M. K., Sivakumar K., Poorani E., Thangaradjou T. and Kannan L. Studies on L-Asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *Journal of Environmental Biology*. 2007, 28 (2) : 465-474.
13. Taechowisan T., Peberdy J. F., Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2003. 19 (4): 381–385.
14. Aly, M. M., Jastaniah, S. and Kuchari, M. G. L- Asparaginase from *Streptomyces* sp. isolated from the rhizosphere of a palm tree, its separation, purification and antitumor activity. *Int J Pharm Bio Sci 2013 Apr*; 2013. 4(2): (b) 12 – 21.
15. Ahmed Abdallah, N., Khairy Amer, S. and Khalil Habeeb, M. Screening Of L-Glutaminase Produced By Actinomycetes Isolated From Different Soils In Egypt. *International Journal of ChemTech Research*. ISSN : 0974-4290. 2012. 4 : 1451-1460.
16. Sivasankar, P., Sugesh, S., Vijayanand, P., Sivakumar, V., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. and Mayavu, P. Efficient production of L-Asparaginase by marine *Streptomyces* sp. isolated from Bay of Bengal, India. *African Journal of Microbiology Research*. 2013. 7(31) : 4015-4021
17. Basha, N. S., Rekha, R., Komala, M. and Ruby, S. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme L-Asparaginase from Marine Actinomycetes by Solid state and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2009. 8 (4): 353-360.
18. Shukla, S. and Mandal, S. K. Production purification and characterization of extracellular anti-leukaemic L-Asparaginase from isolated *Bacillus subtilis* using solid-state fermentation. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2013. 4: 89-99.
19. Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. & Isono, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Journal of Genetic Microbiology*. 1973. 76: 85–99.
20. Khamna, S., Yokota, A., Lumyong, S. L-Asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *International Journal of Integrative Biology*. 2009. ISSN 0973-8363. 6 (1): 22 – 26.

21. Konečná, P., Klejdus, B., Hrstková, H. Monitoring the Asparaginase activity and asparagine levels in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with different asparaginase preparations. *Scripta Medica*. 2004. (BRNO) – 77 (2): 55–62.
22. Wriston J. C., Yellin T. O. L-Asparaginase: a review. *Advances in Enzymology*. 1973. 39: 185-248.
23. Leonard R. H. Quantitative range of Nessler's reaction with ammonia. *Clinical Chemistry*. 1963. 9 (4): 417 – 22.
24. El-Naggar, N. E. A., Moawad, H., El-Shweihy, N. M., El-Ewasy, S. M. Extracellular Production of the Oncolytic Enzyme, L-Asparaginase, by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain NEAE-95 as Potential Microbial Cell Factories: Optimization of Culture Conditions Using Response Surface Methodology. *Biomed Res Int*. 2015. 17p.
25. Mostafa, S. A. and Salama, M. S. L-Asparaginase producing *Streptomyces* from soil of Kuwait. *Zentralbl Bakteriologie*. 1979. 134: 325–334.
26. Gunasekaran S., McDonald L., Manavathu M. Effect of culture media on growth and L-Asparaginase production in *Nocardia asteroides*. *Biomed Lett*. 1995. 52:197-201.
27. Abdel-Fatah MK. Studies on the asparaginolytic enzymes of *Streptomyces*. Culture conditions for the production of L-Asparaginase enzyme from *Streptomyces longsporusflavus* (F-15) strain. *Egypt J Microbiol*. 1996. 30: 247-60.
28. Narayana, K. J. P., Kumar, K. G. and Vijayalakshmi, M. L-Asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology*, 2008. 48 (3): 331–336.
29. Kavitha A, Vijayalakshmi M. A. Study on L-Asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL 113. *Sci World J*. 2012:1-5.
30. Balachandran C., Duraipandiyani V., Ignacimuthu S. Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. S392 – S400.
31. Muvva V., Munaganti R. K., Indupalli M. D. Studies on optimization of L-Asparaginase production by *arthrobacter kerguelensis* vl-rk\_09 isolated from mango orchards. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015. 7 (9) : 112-115.
32. Kiranmayi M. U., Poda S., Vijayalakshmi M. Production and optimization of L-Asparaginase by an actinobacterium isolated from Nizampatnam mangrove ecosystem. *Journal of Environmental Biology*. 2013. 35 : 799 – 805.
33. Mohana, P., Radhakrishnan, M. and Balagurunathan, R. Production and optimization of L-Asparaginase from *Streptomyces* sp (TA22) isolated from Western Ghats, India. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2011. 3(4): 618-624.
34. Mukherjee J, Majumdar S, Scheper T. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-Asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Appl Microbiology Bio*. 2000;53(2):180-4.
35. Geckil H, Gencer S, Ates B, Ozer U, Uckun M, Yilmaz I. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-Asparaginase by *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio*. 2006;1(2):203-8.
36. El-Sabbagh S. M., El-Batanony N. H. and Salem T. A. L-Asparaginase produced by *Streptomyces* strain isolated from Egyptian soil: Purification, characterization and evaluation of its anti-tumor. *African Journal of Microbiology research*. 2013. 7(50) : 5677-5686.
37. Geckil, H., Salih, G., Burhan, A., Ufuk, O., Mirac, U. and Ismet, Y. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, l-asparaginase by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Journal*. 2006. 1: 203–208.
38. Heinemann, B. and Howard, A. J. Production of tumour-inhibitory l-asparaginase by submerged growth of *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*. 1969. 18: 550–554.
39. Deshpande, N., Choubey, P., and Agashe, M. Studies on optimization of growth parameters for L-Asparaginase Production by *Streptomyces ginsengisoli*. *The Scientific World Journal*. 2014. ID 895167, 6 p.
40. Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., and Lingappa, K. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010. 41 (1): 173–178.
41. Ghasemi, Y., Ebrahimezhad, A., Rasoul-Amini, S., Zarrini, G., Ghoshoon, M. B., Raee, M. J., Morowvat, M. H., Kafizadeh, F. and Kazemi, A. An optimized medium for screening of L-Asparaginase production by *Escherichia Coli*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2008. 4 (4): 422 – 424.
42. Prakasham, R.S., Subba Rao, C. H., Sreenivas Rao, R., Suvarna Lakshmi, G. and Sarma, P.N. L-Asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. – 6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. 102: 1382–1391.