

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques

Présenté par :

HAMENNI Kahina

Thème

*Effet des différents substrats et sous produits alimentaires
sur l'activité glutaminasique d'un extrait de culture
bactérienne isolée du site Touristique TIKDJDA
Wilaya de BOUIRA.*

Soutenu le : 01 / 07 / 2017

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr. KADRI N.

MCA.

Univ. de Bouira

Président

Mr. CHERGUI A.

MAA.

Univ. de Bouira

Promoteur

Mme. MEDBOUA C.

MAA.

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2016/2017

Remerciements

Avant tout, je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir aidé à surmonter toute, les difficultés lors de mes études et ce ne sont pas ces quelques mots qui exprimeront mes sentiments les plus sincères.

Je tiens en premier lieu à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur M^r Chergui Achour maitre assistant à l'Université Akli Mohand Oulhadj pour avoir dirigé ce travail, pour son aide, ses précieux conseils, sa compréhension et son soutien moral lors de la rédaction de ce manuscrit ; et mes remerciements vont aussi pour mon examinatrice M^{me} Medboua Chafiaa maitre assistante à l'Université Akli Mohand Oulhadj pour son aide, ses orientations et ses corrections sérieuses apportées pour ce travail.

J'exprime également toutes mes reconnaissances à monsieur le Docteur Kadri Nabil, maitre de conférence, d'avoir accepté de présider ce Jury. Je le remercie infiniment et sincèrement.

Ainsi, j'adresse mes sincères remerciements à tous les enseignants du département des Sciences Biologique, les chefs et techniciennes de laboratoire de l'Université Akli Mohand Oulhadj.

Enfin, je remercie ma famille : mes parents pour leurs soutiens sans faille, parfois inquiets mais toujours compréhensifs, tout au long de ces années, ainsi que mes frères, sœurs, oncles, et tantes pour leurs soutiens affectif et moral.

Kahina

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à:

Les deux personnes, les plus chers au monde que

je ne remercierais jamais assez : leurs aides, l'encouragement,

Soutiens, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie:

mes chères parents : Rachid et Hassina.

Mes chères sœurs : Fadhila et Kenza.

Mes chers frères : Farid, Lyes et Amine

La personne la plus cher au cœur : Hamadache Nabil.

Tous mes chères amis :

*Nassima, Hiba, Said, Hocine, Naima, Nesrine, Ahlem, Amel, Hayet,
Meriem, Nassima, Akila, Sarah, Nadjet.*

*A Touts les étudiants, enseignants et personnels du département
des Sciences Biologique.*

Kahina

Liste des abréviations

GSH : Glutathion.

GC% : Pourcentage en Guanine et Cytosine.

ISP2: International Streptomyces Project 2 (projet international Streptomyces 2).

KGA : Kidney-type Glutaminase (glutaminase de type rein).

LGA : Livre-type Glutaminase (glutaminase de type foie).

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique.

MGA: Minimal Glutamine Agar (milieu minimum à base de glutamine).

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

SH : codification de la souche.

α -KG : α -Kétoglutarate (α -cétoglutarate).

Liste des tableaux

Tableau	Titre	page
I	Répartition des actinomycètes dans la nature.	5
II	les différentes origines de la L-glutaminase microbienne.	12
III	Les absorbances des extraits enzymatique à 470 nm.	25
VI	Les activités glutaminasiques mesurées à 37°C, à pH7.	25

Liste des figures

Figure	Titre	page
1	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs).	4
2	Structure des isomères de l'acide diaminopimélique.	8
3	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.	9
4	la réaction d'hydrolyse de la L-glutamine par la L-glutaminase.	11
5	les gènes codant pour les glutaminases humaines et leurs transcrits d'ARNm.	13
6	le son d'orge avant et après broyage.	21
7	Mise en évidence de l'activité L-glutaminase des souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38) sur gélose MGA.	24
8	Effet des sources de carbone sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	26
9	Effet des caséines sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	27
10	Effet de la peptone sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	28
11	Effet de l'extrait de malt sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	28
12	Effet de tryptone sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	29
13	Effet de l'extrait de levure sur la croissance et la production de la L-	29

	glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	
14	Effet de son d'orge sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	30
15	Effet de lactosérum de lait de vache sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	31
16	Effet de lactosérum de lait de chèvre sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de <i>Streptomyces</i> (SH32 et SH38).	31

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste du matériel et réactif utilisés.

Annexe 2 : Composition des milieux de culture utilisés en g/l.

Annexe 3 : Préparation de substrat (L-glutamine) dans le tampon Tris.

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage de sulfate d'ammonium.

Table des matières

Introduction.....	01
-------------------	----

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les actinomycètes

I.1. Définition.....	03
I.2. Morphologie.....	03
I.3. Ecologie et distribution dans la nature.....	05
I.4. Physiologie et métabolisme.....	06
I.5. Critères d'identification des actinomycètes.....	07
I.5.1. Critères morphologiques.....	07
I.5.2. Critères chimiotaxonomiques.....	07
I.5.3. Critères physiologiques.....	07
I.5.4. Critères moléculaire.....	08
I.6. Cycle de développement des actinomycètes (exemple type : <i>Streptomyces</i>).....	08
I.6.1. En milieu solide.....	08
I.6.2. En milieu liquide.....	08
I.7. Intérêt des actinomycètes.....	09
I.7.1. Extrêmozymes.....	09
I.7.2. Dans le domaine médical.....	10

Chapitre II : La L-glutaminase

II.1. Définition de la L-glutaminase.....	11
II.2. Présence et distribution de la L-glutaminase.....	11

II.3. Isoenzymes de la L-glutaminase.....	12
II.4. Métabolisme de la glutamine (glutaminolyse).....	14
II.4.1. Dans les tissus normaux.....	14
II.4.2 Métabolisme de la glutamine dans les cancers.....	14
II.5. Les conditions de production de la l-glutaminase par les actinomycètes.....	15
II.5.1. La composition de milieu de culture.....	15
II.5.2. La technique de culture.....	15
II.5.3. Effet de la température.....	15
II.6. Les applications de la L-glutaminase	16
II.6.1. En thérapie anticancéreuse de la leucémie aigue lymphoblastique (LAL).....	16
II.6.2. Autres applications.....	16
II.6.2.1. En thérapie anti-HIV.....	16
II.6.2.2. En industries alimentaires.....	16

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1. Matériel biologique.....	18
III.2. Méthodes.....	18
III.2.1. Revivification des souches de <i>Streptomyces</i>	18
III.2.2. Préparation de l'inoculum.....	18
III.2.3. Screening de l'activité L-glutaminase (sur milieu solide).....	18
III.2.4. Dosage de l'activité L-glutaminase.....	19
III.2.5. Optimisation de la production de la L-glutaminase.....	20

III.2.5.1. Méthode d'optimisation.....	20
III.2.5.2. Effet des sources de carbone.....	20
III.2.5.3. Effet des sources d'azote.....	21
III.2.5.4. Effet des sous-produits alimentaires en guise de valorisation.....	21
III.2.5.4.1. Préparation des substrats.....	21
III.2.5.4.2. Ensemencement des milieux de culture.....	22

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Screening de l'activité L-glutaminase (sur milieu solide).....	24
IV.2. Dosage de l'activité L-glutaminase.....	25
IV.3. Optimisation de la production de la L-glutaminase.....	25
IV.3.1. Effet des sources de carbone.....	25
IV.3.2. Effet des sources d'azotes.....	27
IV.3.3. Effet des sous-produits alimentaires en guise de valorisation.....	30
Conclusion.....	32

Références bibliographique

Annexes

Introduction

Introduction

La L-glutamine est l'acide aminé non-essentiel le plus abondant dans le plasma humain. Après avoir été transporté dans les cellules, la L-glutamine agit comme précurseurs pour la synthèse de nombreux acides aminés non-essentiels, des protéines, des nucléotides, et d'autres molécules biologiquement importantes, et fournit le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et GSH (glutathion) pour maintenir l'homéostasie redox. Ainsi, cet acide aminé joue un rôle essentiel dans la croissance des cellules en prolifération (Chen and Cui 2015).

Au cours de ces dernières années, la L-glutamine a beaucoup attirée l'attention des chercheurs en raison de l'augmentation et de la rapidité de sa consommation par la plupart des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. C'est pour cela, la privation de ces cellules en glutamine en utilisant des amidases s'est révélée efficace pour supprimer la croissance de ces dernières (Chen and Cui 2015).

La L-glutaminase peut provoquer la dégradation de la L-glutamine et peut donc être le candidat possible pour la thérapie enzymatique (Unissa, Sudhakar et al. 2014).

Divers microorganismes, notamment différentes espèces d'actinomycètes sont reconnus par leur production d'une large variété de structures chimiques dont plusieurs sont les produits pharmaceutiques les plus précieux comme les enzymes (Divya Teja, Sri Devi et al. 2014).

Les actinomycètes sont un groupe de microorganismes procaryotes Gram positifs, avec un coefficient de Chargaff (GC) supérieur à 55% ; elles sont universellement répandues dans presque tous les écosystèmes, avec toutefois une préférence pour les sols grâce à leurs capacités d'adaptation aux différentes conditions environnementales et leurs variabilité métaboliques (Abdallah, Amer et al. 2012). Malgré la lenteur de leur croissance, leur aptitude considérable à produire de nombreuses substances métaboliques leur confère un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique et le recyclage des éléments dans le sol (Belyagoubi 2014).

Pour ces raisons, la recherche de nouvelles souches productrices de la L-glutaminase performante reste un domaine de recherche privilégié. A ce titre, notre étude porte sur une contribution à l'étude de la L-glutaminase produite par des souches d'actinomycètes et plus particulièrement par le genre *Streptomyces*.

Dans le présent travail, deux souches de *Streptomyces* isolées à partir d'échantillons de sol recueillis au site Tikjda (Bouira), ont fait l'objet d'un screening dans cette optique.

Introduction

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique sur les actinomycètes en générale ainsi qu'un aperçu sur la L-glutaminase.

La seconde partie du document développe les méthodes utilisées et les résultats obtenus relatifs aux différentes étapes de ce travail à savoir :

- Le screening de l'activité L-glutaminase des souches de *Streptomyces*.
- Le dosage de l'activité L-glutaminasique.
- L'optimisation de la production de la L-glutaminase par fermentation sur milieu solide (SSF), en utilisant différents substrats complexes comme source de carbone ou d'azote.
- L'optimisation de la production de l'enzyme par fermentation sur milieu solide (SSF), en utilisant des résidus agroalimentaires peu coûteux (lactosérum et son d'orge).

Partie I :
Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Les actinomycètes

I.1. Définition

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires, constituées d'hyphes (filaments), qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination qui provient de deux substantifs grecs : «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» qui veut dire champignon «Champignons à rayons» ou «Champignons rayonnants» (Belyagoubi 2014).

Ces bactéries ont été souvent confondues avec les champignons (eucaryote), du fait : qu'ils forment justement des filaments ramifiés, qu'ils développent des organes de sporulation (morphologie fongicoïde), et aussi du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (Boudemagh 2007). Mais maintenant, ils sont classés définitivement et sans ambiguïté parmi les bactéries (procaryote), en raison de

- Leurs matériels génétiques dépourvus de noyau.
- Diamètre de leurs hyphes qui est plus petit que celui des champignons.
- Leurs parois cellulaires qui ne renferment ni cellulose, ni chitine mais de peptidoglycane.
- Leurs sensibilités aux attaques des bactériophages et lysozymes.
- Leurs sensibilités aux antibiotiques antibactériens et leurs résistances aux antifongiques (Smaoui 2010).

I.2. Morphologie

Morphologiquement, le groupe des actinomycètes inclut des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres au mycélium fugace (certaines *Nocardia*), et enfin des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces* (Belyagoubi 2014).

Parmi les formes mycéliennes, on distingue : celles qui forment seulement un mycélium de base ou du substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture (*Frankia*), celles qui élaborent de plus un mycélium aérien issu du mycélium de base (*Streptomyces*) (figure1) et celles qui forment seulement un mycélium aérien attaché au substratum par des crampons (*Sporichyta*) (Belyagoubi 2014).

De nombreux actinomycètes peuvent produire des spores non-mobiles ou parfois mobiles. Les spores d'actinomycètes sont de deux types :

- Les endospores produites par les actinomycètes thermophiles, proviennent de la cassure de la paroi de l'hyphe.
- Les exospores ou les spores de segmentation qui naissent par suite de cloisonnements à l'intérieur des hyphes.

Selon, le genre, les spores d'actinomycètes se classent en diverses structures :

- Les conidies : sont des spores asexuées. Elles peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*) ou en longues chaînes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. Ainsi, la surface des spores peut être : lisse, ridée, avec piquants ou d'aspect velu.
- Les Sporangies : sont des sacs contenant des spores. Les sporangies peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles.
- Les sclérotés : trouvés chez *Chainia* constitués d'une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.
- Les Synnemata (ou corémies) : sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema* (Fateh 2017).

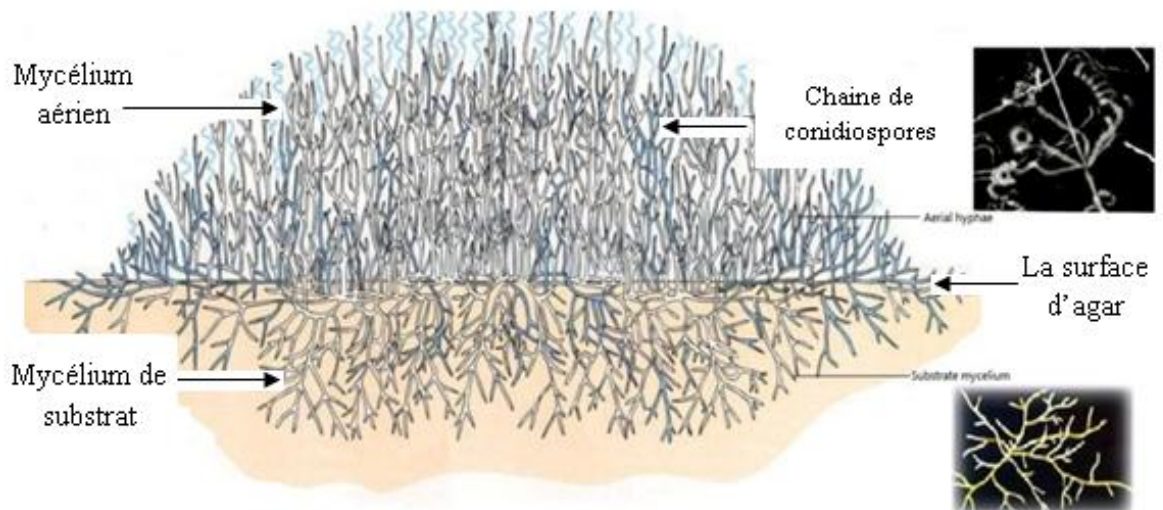


Figure 1 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs) (Li, Chen et al. 2016).

I.3. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont des microorganismes Gram positif omniprésents dans la nature. Comme le montre le tableau I, ils sont capables de se développer sur une large gamme de substrats (Kitouni 2007) et principalement dans les sols de différentes natures, notamment les sols polaires gelés, les sols désertiques chauds et secs, et les sols hautement contaminés par les métaux lourds et le pétrole. On les trouve également dans les eaux, les composts, l'air et dans les substrats les plus divers (Boudemagh 2007).

Tableau I : Répartition des actinomycètes dans la nature (Fateh 2017).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines (Symbiose)
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

Dans le sol, les actinomycètes représentent 10 à 20 % de la population microbienne totale et ils sont essentiellement présents en surface entre 0 et 2 m de profondeur. Les actinomycètes telluriques sont généralement saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols (Belyagoubi 2014).

Ces bactéries sont aussi abondantes en milieu hydrique : dans les eaux des lacs, des rivières, des ruisseaux et également dans l'eau douce, l'eau issu de marécages salés, eau de mer et des sédiments marins (Boudemagh 2007).

L'air constitue pour les actinomycètes un moyen de transport et non pas un habitat. Les spores d'actinomycètes thermophiles tels que les spores de l'espèce *Actinomyces invulnerabilis* sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air, ce qui facilite leur dissémination (Boudemagh 2007).

Certains genres d'actinomycètes semblent préférer certains habitats par rapport à d'autres, comme *Thermoactinomyces* qui se trouvent fréquemment dans les composts (Ameur 2014).

I.4. Physiologie et métabolisme

Physiologiquement, les actinomycètes sont classés en deux groupes : Le premier groupe rassemble les germes ayant un métabolisme fermentatif, anaérobie stricte ou facultatif et hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs, tel que le genre *Actinomyces*. Alors que, le deuxième groupe rassemble les germes ayant un métabolisme oxydatif, aérobie et habitant surtout le sol, comme le genre *Streptomyces* (Smaoui 2010).

Les actinomycètes sont des bactéries mésophiles, leur température optimale de croissance est de 25-30°C, mais il existe des espèces thermophiles principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale se situe entre 50 et 60°C. Le genre *Streptomyces* comporte aussi des espèces thermophiles comme *Streptomyces thermocoprophilus* et même psychrophiles. Ainsi, la plupart des actinomycètes ont un comportement neutrophile, leur pH optimal de croissance est de 6.5-8, mais on peut observer quelques souches acidophiles qui se développent à des valeurs de pH inférieur à 4 tel que *Streptacidiphilus jiangxiensis* et *Streptacidiphilus oryzae* (Kitouni 2007).

La majorité de ces germes croient dans des conditions humides mais en aérobie et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau est très basse (Boudemagh 2007).

Ces bactéries sont généralement chimioorganotrophes. Elles peuvent utiliser une grande variété de source de carbone, d'énergie et d'azote, y compris les bio polymères complexes tels que : la cellulose, la chitine, la kératine, la caséine, le xylane ...etc. Cependant, il existe plusieurs espèces qui sont chimioautotrophes, utilisent l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Belyagoubi 2014).

I.5. Critères d'identification des actinomycètes

L'identification des actinomycètes est basée sur un ensemble de critères : morphologiques, chimiotaxonomiques, physiologiques et moléculaires. La reconnaissance des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les caractères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (Saker 2015).

I.5.1. Critères morphologiques

L'analyse préliminaire dans l'identification des actinomycètes se fait par l'étude des caractères culturels de ces bactéries (ex la production ou non d'un mycélium aérien, la présence ou non de mycélium du substrat, la production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture, la fragmentation ou non des mycéliums, la présence des spores (forme, mobilité, disposition...) (Boudemagh 2007).

I.5.2. Critères chimiotaxonomiques

Certains constituants cellulaires des actinomycètes (les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires ' principalement les phospholipides' et les sucres cellulaires sont très importants pour l'identification et la classification de ces bactéries (Aour 2012).

L'étude de la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes montre qu'elle est composée soit d'une glycoprotéine contenant de la lysine, rencontrée principalement chez les formes fermentatives (*Actinomyces*) soit d'une glycoprotéine contenant de l'acide 2,6 diaminopimélique (DAP) (sous deux formes isomériques, LL ou DL), rencontrée chez les formes oxydatives (*Streptomyces*). Comme elle montre aussi que les principaux sucres constituant la paroi sont : arabinose, galactose, xylose, madurose (ou 3-O-méthylgalactose) (Zerizer 2014).

I.5.3. Critères physiologiques

En plus des critères morphologiques, la détermination des espèces se base sur les caractères physiologiques tels que : la capacité à dégrader différents composés glucidiques, lipidiques et protéidiques, la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance des conditions extrêmes (température, pH, salinité). Pour l'identification des espèces, l'étude physiologique doit être complétée par l'étude moléculaire (Zerizer 2014).

I.5.4. Critères moléculaire

Les analyses moléculaires sont très importantes pour l'identification des espèces d'actinomycètes et les principales techniques utilisées dans ce but sont : le séquençage de l'ADN ribosomique 16s (ADNr16s) (c'est le plus significatif), l'hybridation ADN-ADN, et le pourcentage en guanine-cytosine (GC)(Zerizer 2014).

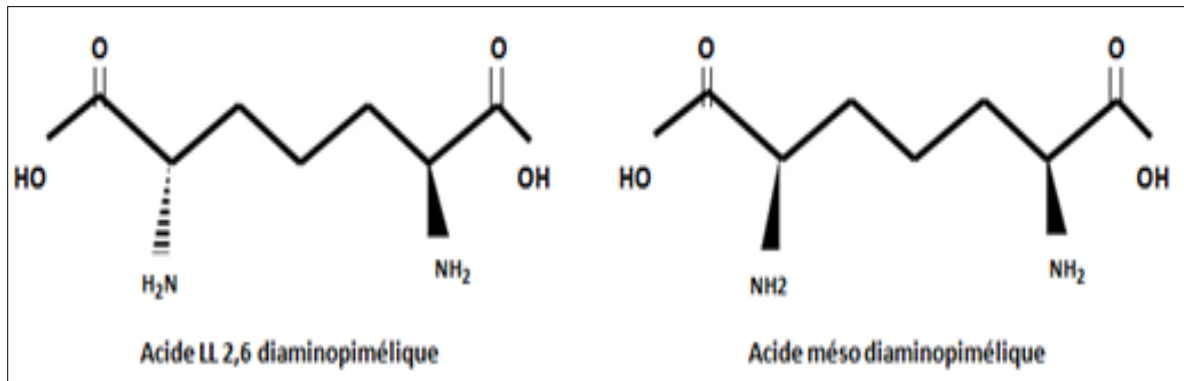


Figure 2: Structure des isomères de l'acide diaminopimélique (Zerizer 2014).

I.6. Cycle de développement des actinomycètes (exemple type : *Streptomyces*)

I.6.1. En milieu solide

Le cycle de développement des actinomycètes et en particulière le genre *Streptomyces*, débute, quand les conditions nutritionnelles sont favorables, par la germination d'une spore donnant naissance à un ou plusieurs mycéliums de substrats (ou végétatifs), ramifié et non fragmenté (Boudemagh 2007).

Sur ce même mycélium, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes de ce dernier, se spiralisent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores, qui sont des agents de dissémination (Figure 3) (Smaoui 2010).

I.6.2. En milieu liquide

Dans ce milieu, les actinomycètes se développent uniquement sous forme de mycélium de substrat, mais de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement (Smaoui 2010).

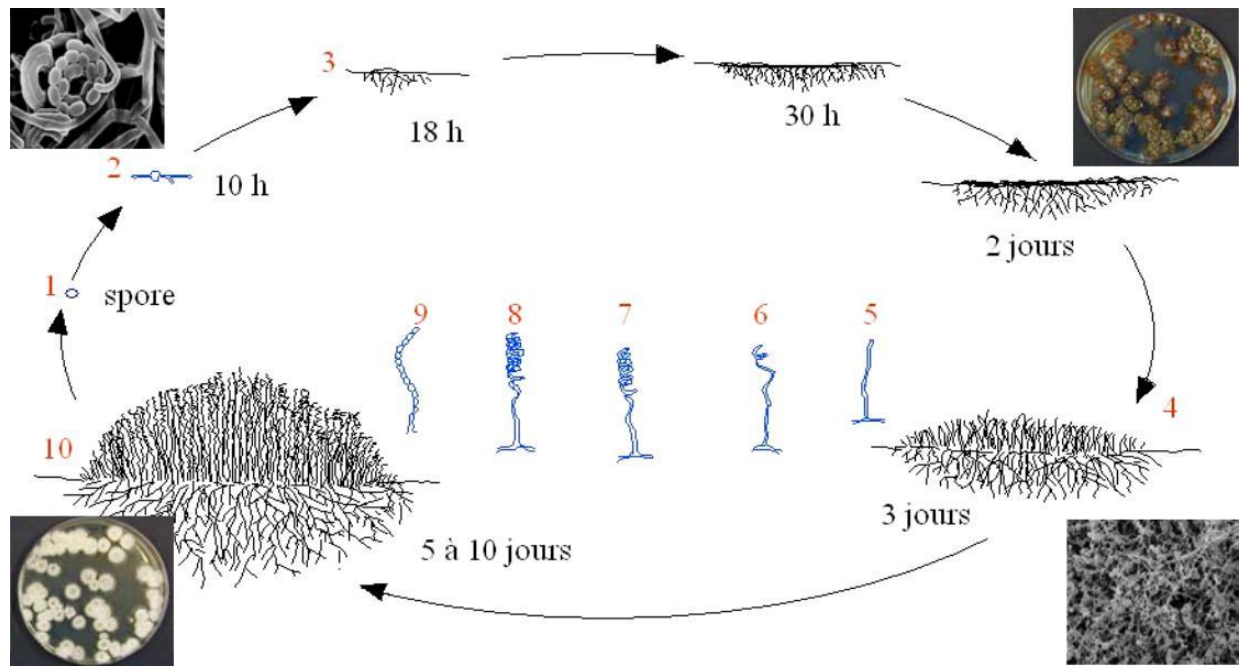


Figure 3 : Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Smaoui 2010).

1: spore, 2: tube germinal, 3: mycélium végétatif, 4: colonie jeune, 5: mycélium aérien, 6: sporophore, 7: sporulation, 8 et 9: maturation des spores, 10: colonie mature.

I.7. Intérêt des actinomycètes

Les actinomycètes sont une source importante de nombreuses molécules d'intérêt biotechnologique ayant des applications dans divers domaines industriels, et en particulier pharmaceutique (Smaoui 2010).

I.7.1. Extrêmozymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes. En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes industrielles telles que les protéases, des chitinases, des amylases, des cellulases, des xylanases. Les protéases d'actinomycètes sous formes libres ou immobilisées sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, en tannerie et comme additifs dans les détergents.

Comme ils produisent aussi une large gamme d'enzymes hydrolytiques (les nucléases, les lipases et les enzymes hydrolysant les polysaccharides) (Smaoui 2010).

I.7.2. Dans le domaine médical

Dans le domaine thérapeutique, de nombreux composés intéressants sont isolés à partir des actinomycètes : les antibiotiques chimio-thérapeutiques (l'actinomycine D et la mitomycine), les antibiotiques anti-infectieux (Rifampicine, Vancomycine, Chloramphénicol, Acide clavulonique), les antifongiques systémiques ou topiques, les vitamines, les enzymes (L-asparaginase, L-glutaminase), les antihistaminiques, les vasodilatateurs et les immuno- stimulants (Fateh 2017).

Chapitre II :

La L-glutaminase

II.1. Définition de la L-glutaminase

La L-glutaminase (L-glutamine amidohydrolase EC 3.5.1.2) est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acide aminé L-glutamine en L-glutamate et ammoniac (NH_3) selon la réaction suivante :

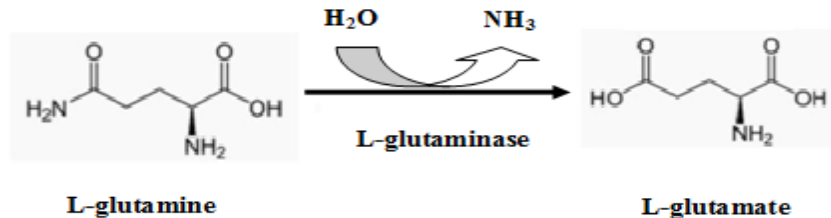


Figure 4 : la réaction d'hydrolyse de la L-glutamine par la L-glutaminase (Unissa, Sudhakar et al. 2014).

Cette enzyme joue un rôle majeur dans le métabolisme de l'azote cellulaire chez les procaryotes et les eucaryotes (Divya Teja, Sri Devi et al. 2014).

1. Nomenclature de la L-glutaminase

- ✓ Nom codifié : E.C.3.5.1.2.
- ✓ Nom systématique : L-glutamine amidohydrolase.
- ✓ Nom commun : L-glutaminase.
- ✓ D'autres noms communs : peptidoglutaminase II, glutaminyl-peptide glutaminase, destabilase et peptidylglutaminase II (Divya Teja, Sri Devi et al. 2014).

II.2. Présence et distribution de la L-glutaminase

L'activité L-glutaminase est largement distribuée dans les plantes, les tissus animaux et dans les microorganismes y compris les bactéries, les levures et les champignons (tableau II).

Ces dernières années, les recherches se sont accentuées sur la production microbienne de la L-glutaminase à cause de nombreux avantages qu'elle présente (Sarada 2013) :

- ✓ Le temps de fermentation court.
- ✓ La possibilité de choix des conditions de fermentation.
- ✓ Les moyens peu coûteux.
- ✓ La croissance rapide des microbes.

- ✓ La facilité de développer des procédures de dépistage rapide.
- ✓ La concentration enzymatique peut être augmentée par manipulation génétique.
- ✓ Le taux de production élevé (Divya Teja, Sri Devi et al. 2014).

Tableau II : les différentes origines de la L-glutaminase microbienne (Sarada 2013).

Bactéries	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> (<i>P.aurantiaca</i> , <i>P.fluoroscens</i> , <i>P.aeroginosa</i> , et <i>P.aureofaciens</i>), <i>Acinetobacter sp</i> , <i>Bacillus sp</i> , <i>Erwinia caratovora</i> , <i>Klebsiella sp</i> , <i>Enterobacter sp</i> , <i>Streptomyces sp</i> etc.
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus sojae</i> , <i>Beauveria sp</i> , <i>Tilachlidium humicola</i> , <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Verticillium</i> etc.
Levures	<i>Rhodotorula</i> , <i>Candida scotii</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Torulopsis sp</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> etc.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à la production de la L-glutaminase par les actinomycètes et particulièrement par le genre *Streptomyces* car ces bactéries sont reconnues par leur production d'une large variété d'enzymes ayant des applications dans différents domaines : pharmaceutique, agrochimique et industriel (Divya Teja, Sri Devi et al. 2014).

II.3. Isoenzymes de la L-glutaminase

Chez les mammifères, il en existe quatre iso enzymes mitochondriales de la L-glutaminase codées par deux gènes paralogues (apparentés) situés sur des chromosomes différents :

- La L-glutaminase de type 1 (GLS1 ou KGA pour kidney glutaminase), et la L- glutaminase C (GAC), un variant de l'épissage de KGA. Ces deux variant d'épissage ont la même extrémité N-terminale mais différentes extrémités C-terminale (figure 5).
- La L-glutaminase de type 2 (GLS2 ou LGA pour liver type glutaminase) dont une forme courte vient d'être découverte (GAB). Ces deux variant d'épissage ont la même extrémité C-terminale mais différentes extrémités N-terminale(figure 5)(Obre 2014).

Le gène qui code pour la L-glutaminase de type 1 est situé sur le chromosome 2 (Sarada 2013) alors que le gène qui code pour la L-glutaminase de type 2 est situé sur le chromosome 12 (Martín-Rufián, Tosina et al. 2012).

L'isoenzyme KGA s'est fortement exprimé dans le rein, le cerveau, l'intestin grêle et les cellules de l'immunité (lymphocytes) mais pas dans le foie. Tandis que l'isoenzyme GAC s'est exprimé dans le cœur, le poumon et dans certaines cellules transformées, mais pas dans le cerveau et le foie. La GLS2 s'est exprimée essentiellement dans le foie, le cerveau et le pancréas. Ces deux types de glutaminase ont des propriétés structurales et cinétiques différentes (Sabu, Nampoothiri et al. 2005).

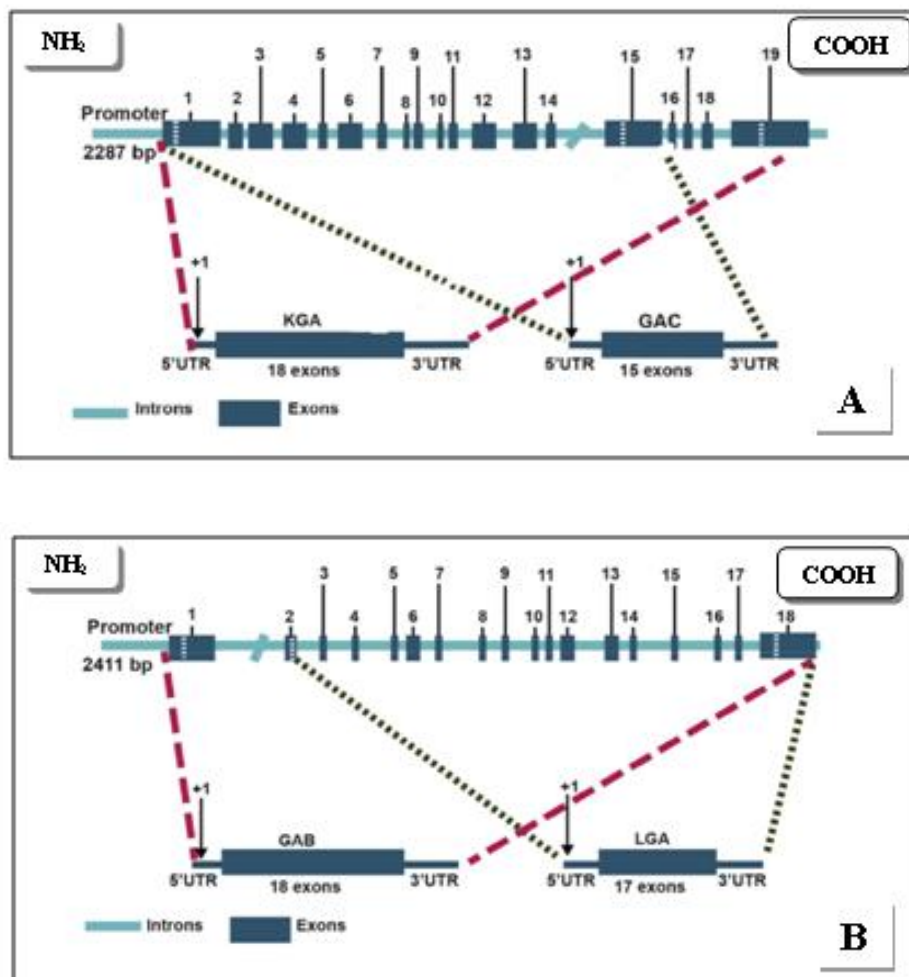


Figure 5 : les gènes codant pour les glutaminases humaines et leurs transcrits d'ARNm (Campos-Sandoval, Martín-Rufián et al. 2015).

A : le gène codant pour GLS1 et les transcrits alternatifs KGA et GAC. B : le gène codant pour GLS2 et les transcrits alternatifs LGA et GAB.

Comme il existe chez les mammifères deux isoenzymes spécifiques de tissu, on trouve aussi chez les bactéries deux isoenzymes nommées chez *Escherichia coli* l'iso enzyme A et B.

II.4. Métabolisme de la glutamine (glutaminolyse)

II.4.1. Dans les tissus normaux

La glutamine circule dans le sang et est stockée principalement dans les muscles squelettiques, ainsi que dans d'autres organes comme le poumon et le cerveau. Les hépatocytes servent de producteurs de glutamine et de consommateurs selon les besoins métaboliques du corps. De plus, l'intestin grêle et le rein utilisent également la glutamine pour maintenir l'équilibre acide-base (Ratnikov, Jeon et al. 2015).

La glutamine est un acide aminé non-essentiel, et provient en partie de l'amidation de l'acide glutamique par l'ammoniac dérivé du métabolisme des purines et /ou retiré de la circulation, en partie de la transamination et de l'amination ultérieure de l' α -oxoglutarate dérivé du glucose (Lukey, Wilson et al. 2013).

La glutamine est d'abord catalysée par la L-glutaminase pour former du glutamate et un ion ammonium. Le glutamate est converti ultérieurement en α -cétoglutarate (α -KG) par le glutamate déshydrogénase, puis l' α -KG entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) pour fournir des sources d'énergie et des intermédiaires métaboliques. En particulier, le métabolisme de la glutamine fournit du carbone pour l'acide oxaloacétique (OAA), l'acétyl coA et le citrate pour la lipogénèse, l'azote pour la synthèse des bases puriques et pyrimidiques d'ADN et le pouvoir NADPH pour soutenir la prolifération cellulaire (Chen and Cui 2015).

II.4.2 Métabolisme de la glutamine dans les cancers

Il est très bien connu que les cellules cancéreuses utilisent le glucose de manière dissipative pour produire de l'ATP (adénosine triphosphate) par glycolyse aérobie, quelle que soit la disponibilité en oxygène (effet Warburg). Cependant, pour satisfaire une prolifération rapide, ces cellules doivent utiliser une autre source d'énergie, la glutamine, qui produit l'ATP par phosphorylation oxydative (Lukey, Wilson et al. 2013).

En raison de la perte continue de citrate, intermédiaire de cycle TCA, dans les cellules proliférantes, en particulier dans les cellules cancéreuses, la reconstitution des intermédiaires TCA est nécessaire et la consommation de la glutamine augmente (Chen and Cui 2015).

La consommation élevée de la glutamine dans les cancers est utilisée pour les besoins anabolisants, ce qui produit plusieurs intermédiaires métaboliques tels que les acides nucléiques, les lipides et les protéines et augmente la production de GSH pour rendre les cellules plus résistantes à la mort. En outre, une consommation plus élevée de glutamine dans les cancers est utilisée pour la synthèse des acides gras et l'activation de la voie mTOR (cible de mammifère pour la rifamycine), qui initie la traduction des protéines et la croissance cellulaire (Chen and Cui 2015).

II.5. Les conditions de production de la L-glutaminase par les actinomycètes (*Streptomyces*)

II.5.1. La composition de milieu de culture

La composition de milieu de culture influence le taux de croissance de la souche et la production de la L-glutaminase. Parmi les milieux de culture utilisés pour la production de l'enzyme, le milieu MGA (medium glutamine agar) dont la source de carbone et d'azote est la L-glutamine est celui permettant une production accrue de la L-glutaminase (Divya Teja, Sri Devi et al. 2014).

II.5.2. La technique de culture

La fermentation submergée est la méthode couramment utilisée pour la production de la L-glutaminase par les actinomycètes mais elle peut être aussi produite par une technique de fermentation sur milieu solide (Divya Teja, Sri Devi et al. 2014).

II.5.3. Effet de la température

La température a une grande influence sur l'enzyme et le métabolisme cellulaire. Les actinomycètes producteurs de glutaminase dont les *Streptomyces* sont essentiellement mésophiles et croissent à une température optimale de 25°C à 30°C (généralement 28°C) (Abdallah, Amer et al. 2012).

II.5.4. Effet de pH

La plupart des actinomycètes dont les *Streptomyces* sont neutrophiles et ont une croissance optimale à un pH compris entre 7 et 8 (Abdallah, Amer et al. 2012).

II.6. Les applications de la L-glutaminase

II.6.1. En thérapie anticancéreuse de la leucémie aigue lymphoblastique (LAL)

Les LAL sont des hémopathies malignes. Elles se caractérisent par la prolifération dans la moelle osseuse d'un clone cellulaire anormal issu des lignées lymphocytaires, bloqué à un stade précis de différenciation donnant des lymphocytes immatures. Ces cellules n'ont que très peu de glutamine synthétase contrairement aux cellules normales et n'ont plus la capacité de synthétiser la glutamine dont elles ont besoin pour la synthèse des protéines glutamines dépendantes. Elles doivent donc se procurer de la glutamine du milieu extracellulaire (glutamine sérique) (Willems 2012).

Or, la L-glutaminase, agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement de LAL, hydrolyse la glutamine circulante en glutamate et ammoniac, privant ainsi les cellules leucémiques de leur principale source de glutamine d'où une diminution de la synthèse protéiques conduisant à leur apoptose (Unissa, Sudhakar et al. 2014).

II.6.2. Autres applications

II.6.2.1. En thérapie anti-HIV

La L-glutaminase a été utilisée comme un agent antirétroviral efficace dans le traitement de SIDA/HIV car elle abaisse le taux de la L-glutamine dans le sérum et les tissus pendant des périodes prolongées, ce qui entraîne une réduction substantielle de l'activité de la transcriptase inverse du sérum (RTA). Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) a des bénéfices de survie à long terme. Cette approche unique peut être appliquée à d'autres virus pathogènes qui dépendent de l'identification des besoins nutritionnels pour la propagation virale et du développement d'enzymes bioactives pour épuiser ces nutriments à proximité des cellules infectées (Sarada 2013).

II.6.2.2. En industries alimentaires

En industries alimentaires, la L-glutaminase est généralement considérée comme une enzyme clé pour améliorer le goût et l'arôme des aliments fermentés telle que la sauce de soja. Lors de la fermentation, la L-glutaminase améliore et confère un goût palatable aux aliments fermentés tout en augmentant leur teneur en acide glutamique qui résulte de l'action hydrolytique de la L-glutaminase sur la L-glutamine. Mais dans les conditions où l'activité de

la L-glutaminase est faible, la L-glutamine sera convertie chimiquement et irréversiblement en acide pyroglutamique, qui est un composé sans saveur.

Les acides glutamique et aspartique sont des acides aminés bien connus qui contribuent non seulement au goût fin, et au goût amer, mais aussi aux effets nutritionnels des aliments (Sarada 2013).

Partie II :
Etude expérimentale

Chapitre III :

Matériel et méthodes

III.1. Matériel biologique

Deux souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38) isolées par M. CHERGUI et aimablement fournies par le Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologies (Unité de recherche LABAB) de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

III.2. Méthodes

III.2.1. Revivification des souches de *Streptomyces*

Les souches de *Streptomyces* ont été isolées à partir de sol recueilli dans la région de Tikjda (Willaya de Bouira) puis ont été purifiés et ont été conservées à -20°C dans des cryotubes contenant le bouillon ISP2 additionné de 30% de glycérol stérile comme agent cryoprotecteur.

Afin de les revivifier, les deux souches de *Streptomyces* ont fait objet d'un ensemencement en stries sur deux boites de gélose ISP2 (International Streptomyces Project 2) (voir composition en annexe 2), puis les boites de gélose ont été incubées à 28°C pendant 7 jours.

III.2.2. Préparation de l'inoculum

Des fragments mycéliens et des spores de chaque souche ont été prélevés à partir de la gélose ISP2 précédemment ensemencée. Puis, ils sont introduits dans deux flacons contenant de l'eau physiologique stérile.

Cet inoculum sert à ensemercer tous les milieux utilisés pour le screening et pour l'optimisation de la production de l'enzyme (Kumar, Muthuvelayudham et al. 2013).

III.2.3. Screening de l'activité L-glutaminase (sur milieu solide)

L'activité L-glutaminase des souches a été évaluée sur le milieu MGA (Minimal Glutamine Agar Medium) (voir composition en annexe 2) contenant la L-glutamine comme seule source de carbone et d'azote et le rouge de phénol comme indicateur de pH.

Le virage de la couleur du milieu du jaune au rose est une indication quant à la production de la L-glutaminase par les souches bactériennes.

Le changement de la couleur est dû à une alcalinisation du milieu suite à l'hydrolyse de la L-glutamine par la L-glutaminase et la libération d'ammoniac (Abd-Alla, El-Sayed et al. 2013).

Une goutte de chaque suspension bactérienne a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis a étéensemencée en stries sur deux boites de gélose MGA, puis les boites de géloseensemencées ont été incubées à 28°C pendant 7 jours.

III.2.4. Dosage de l'activité L-glutaminase

L'activité L-glutaminase a été déterminée en estimant la quantité d'ammoniac libérée suite à l'hydrolyse de L-glutamine par la L-glutaminase en utilisant le réactif de Nessler (voir composition en annexe 1).

Le dosage a été effectué en se basant sur le protocole de (Rajan, Mahalakshmi priya et al. 2015) et pour se faire, chaque une des deux de *Streptomyces* a étéensemencée dans 30 ml de bouillon MGA sans rouge de phénol, puis les deux bouillons ont été incubés à 28°C pendant 7 jours.

Après incubation, 10ml de chaque culture bactérienne ont été centrifugées (à 10000 tour par minute pendant 30 minutes) et les surnageants (ou les extraits enzymatiques bruts) ont été récupérés. Ensuite, pour chaque culture bactérienne, un mélange de : 200µl de surnageant et 800µl de substrat (L-glutamine) préparé dans le tampon Tris 0.5M à pH7 (voir annexe 3) a été préparé et puis complété avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 2 ml. Le tout a été incubé à 37°C pendant 30 min.

Après 30 min d'incubation, les réactions enzymatiques ont été arrêté par addition de 0.5 ml d'acide chlorhydrique (HCL) 1N ;

Enfin, à 0.2 ml de chaque mélange réactionnel, 10ml d'eau distillée et 0.4 ml de réactif de Nessler ont été ajoutées. Après 10 min, la lecture des absorbances a été effectuée à 470nm contre le blanc.

Une UI d'activité L-glutaminase a été définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une µmole d'ammoniac, par minute, dans un ml d'extrait brut, et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

La courbe d'étalonnage a été réalisée avec une solution de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) à 10mM (voir annexe 4).

La concentration d'ammoniac a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, et l'activité glutaminase est calculée d'après la relation suivante :

$$\text{L'activité enzymatique (AE) (UI) = } [\text{NH}_4^+] / \text{Vez. Tinc}$$

UI : unité international.

[NH₄⁺] : la concentration des ions ammonium.

Vez : volume d'extrait enzymatique prélevé.

T incu : Temps d'incubation.

III.2.5. Optimisation de la production de la L-glutaminase

III.2.5.1. Méthode d'optimisation

Il est très connu que la production d'enzymes microbiennes est très influencée par la composition du milieu de fermentation (en particulier la source de carbone, d'azote et les sels minéraux), les facteurs physicochimiques (température, pH, oxygène dissous, densité d'inoculum) et par le temps d'incubation.

La méthode adoptée pendant notre étude préliminaire d'optimisation est la technique d'un facteur à la fois (*one factor at a time*), basée sur la variation d'un facteur alors que les autres sont gardés à des niveaux constants. Cette méthode permet d'évaluer l'effet individuel d'un paramètre et d'incorporer par la suite sa valeur optimale avant de passer à l'optimisation du paramètre suivant.

Cette stratégie présente l'avantage d'être simple et facile. Néanmoins, elle présente des limites du fait qu'elle ignore les interactions entre les paramètres, le temps consommé est important, les coûts élevés surtout en cas d'un grand nombre de variables, conduisant à une expérimentation étendue (Abd-Alla, El-Sayed et al. 2013).

III.2.5.2. Effet des sources de carbone

La croissance des souches des *Streptomyces* et la production de la L-glutaminase ont été évaluées sur la gélose MGA (modifiée), au pH optimum et à température optimale, en

utilisant différentes sources de carbone à raison de 1% dans le milieu de culture. L'amidon et le glycérol ont été testés. Après incubation à 28°C pendant une semaine, l'activité enzymatique a été déterminée par le changement de la couleur de milieu (Mousumi and Dayanand 2013).

III.2.5.3. Effet des sources d'azote

La croissance des souches de *Streptomyces* et la production de la L-glutaminase ont été évaluées sur la gélose MGA (modifiée), au pH optimum et à température optimale, en utilisant différentes sources d'azote à raison de 1% dans le milieu de culture. Les caséines, l'extrait de levure, l'extrait de malt, la peptone, le tryptone ont été testés. Après incubation à 28°C pendant une semaine, l'activité enzymatique a été déterminée par le changement de la couleur de milieu (Abd-Alla, El-Sayed et al. 2013).

III.2.5.4. Effet des sous-produits alimentaires en guise de valorisation

L'objectif de cette étape est l'optimisation de la production de la L-glutaminase en utilisant des sous-produits agroalimentaires (le son d'orge et le lactosérum) en raison de leur richesse en protéines, en vitamines et en sels minéraux, et d'ouvrir, en même temps, une fenêtre vers la valorisation industrielle de ces produits considérés comme des déchets du secteur agroalimentaire.

III.2.5.4.1. Préparation des substrats

- Le son d'orge

Le son d'orge a été broyé à l'aide d'un moulin électrique de manière à obtenir une poudre, puis conservé dans des boîtes stériles avant son utilisation.

Ce traitement mécanique du son d'orge a pour but, l'augmentation de l'accessibilité à ses constituants et la confection d'une structure physique sensible à la pénétration du mycélium dans le milieu de culture.

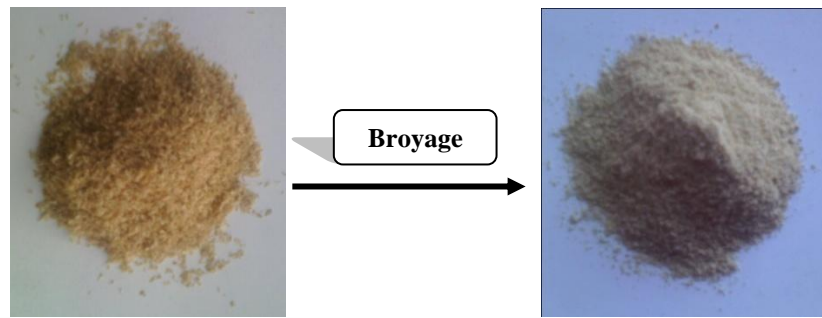


Figure 6 : le son d'orge avant et après broyage.

- **Le lactosérum**

Deux échantillons de lait (lait de vache et lait de chèvre) ont été laissés à température ambiante pendant 24h puis centrifugés et les surnageants ont été récupérés.

III.2.5.4.2. Ensemencement des milieux de culture

La croissance des souches de *Streptomyces* et la production de la L-glutaminase ont été évaluées sur le milieu MGA (modifié) à base de son d'orge ou de lactosérum à raison de 1% dans le milieu de culture. Après incubation à 28°C pendant une semaine, l'activité enzymatique a été déterminée par le changement de la couleur du milieu.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus portant sur l'optimisation de la production de la L-glutaminase par deux souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38) en utilisant différents substrats et sous-produits agroalimentaires.

IV.1. Screening de l'activité L-glutaminase (sur milieu solide)

Après 7 jours d'incubation à 28°C, un virage de la couleur du milieu du jaune au rose a été observé (figure 7).

Ce changement de couleur s'explique probablement par la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* et l'hydrolyse de la L-glutamine en ammoniac causant ainsi l'alcalinisation du milieu et le virage de l'indicateur coloré au rose (Balagurunathan, Radhakrishnan et al. 2010).

Remarque : La différence de couleurs entre les deux milieux de culture des deux souches bactériennes étudiées est due à notre utilisation de deux concentrations différentes de rouge de phénol.

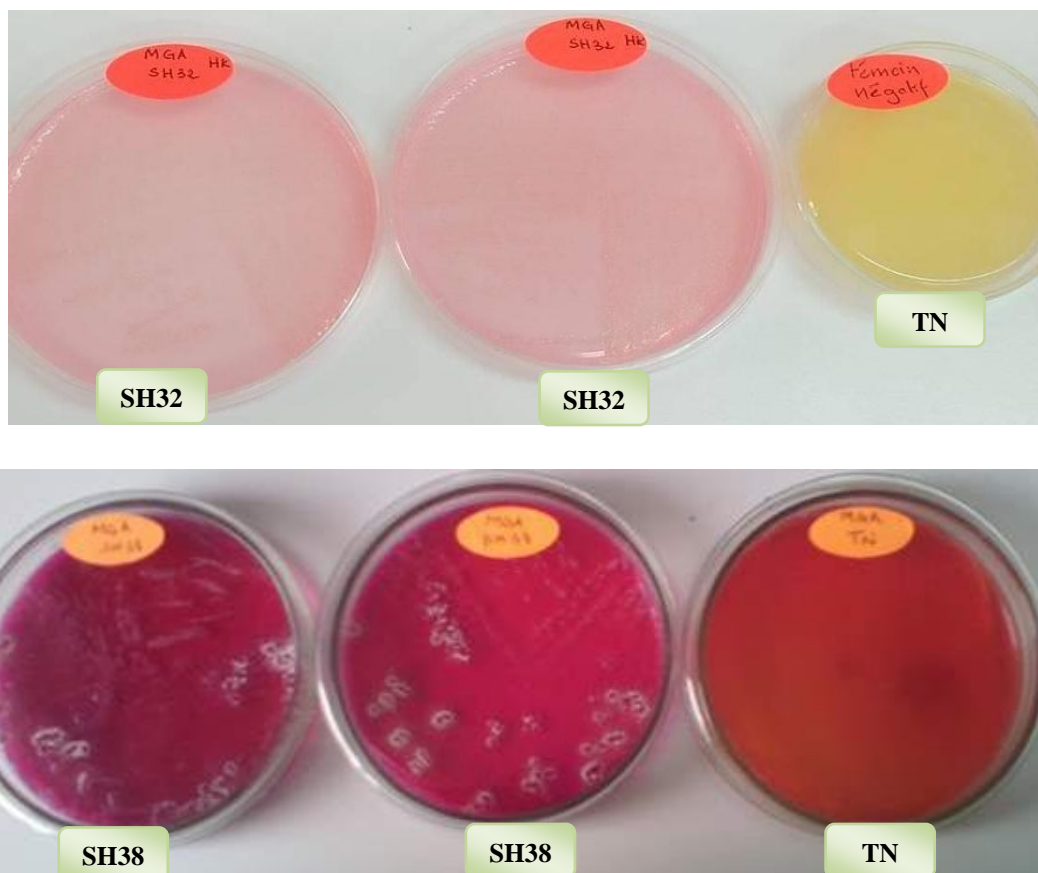


Figure 7: Mise en évidence de l'activité L-glutaminase des souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38) sur gélose MGA (culture de 7 jours).

IV.2. Dosage de l'activité L-glutaminase

Après dosage au spectrophotomètre, les absorbances des deux extraits enzymatiques bruts sont données dans le tableau suivant :

Tableau III : Les absorbances des extraits enzymatique à 470 nm.

	Blanc	Extrait SH32	Extrait SH38
DO à 470 nm	0	0,529	0,603

Les concentrations des ions ammonium ont été calculées d'après l'équation de la courbe d'étalonnage (voir annexe 4).

Les activités glutaminasiques calculées sont données dans le tableau suivant :

Tableau IV : Les activités glutaminasiques mesurées à 37°C, à pH7.

	La souche SH32	La souche SH38
Activité enzymatique (UI/ml)	170	211

- D'après les résultats obtenus on conclue que la souche (SH 38) présente une activité glutaminasique plus importante que la souche (SH32).
- La détection d'une activité enzymatique dans les surnageants des cultures bactériennes nous a indiqué que les glutaminases sont secrétées par les souches de *Streptomyces* (c'est-à-dire, elles sont probablement extracellulaires).

IV.3. Optimisation de la production de la L-glutaminase

IV.3.1. Effet des sources de carbone

Les substrats carbonés servent à la fois comme source de croissance et d'énergie pour les actinomycètes.

La production d'enzyme extracellulaire dépend de la composition du milieu de culture. Parmi les deux sources de carbone testées, l'amidon s'est révélé comme étant le seul stimulant de la croissance des souches et de la production de la L-glutaminase (figure8), Tandis que le glycérol a complètement inhibé la croissance des *Streptomyces* et la production de l'enzyme.

Les résultats obtenus ont été confirmés par rapport à Mousumi et Dayanand qui ont montré, en utilisant la fermentation en milieu liquide, que l'amidon est la meilleure source de carbone pour la production de la L-glutaminase par *Streptomyces enissocaesili* (Mousumi and Dayanand 2013), par rapport à qui Chidambara Rajan qui ont rapporté que la plupart des actinomycètes utilisent l'amidon comme source de carbone et par rapport à Reda qui a montré que le glycérol exerce un effet inhibiteur sur la croissance des cellules bactériennes (Reda 2015)


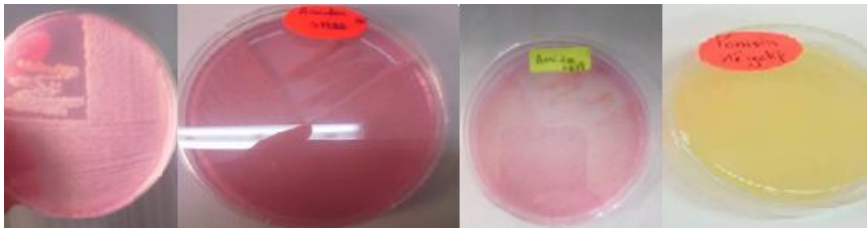

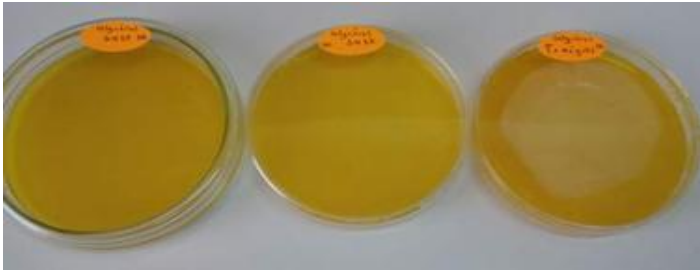
Substrat	Résultats
Amidon	<p data-bbox="467 663 679 696">la souche SH32</p> 
	<p data-bbox="467 972 679 1005">la souche SH38</p> 
Glycérol	<p data-bbox="467 1270 687 1303">la souche SH 32</p> 
	<p data-bbox="467 1592 679 1626">la souche SH38</p> 

Figure 8: Effet des sources de carbone sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

IV.3.2. Effet des sources d'azotes

Parmi les différentes sources d'azote testées, la meilleure croissance des souches a été obtenue avec les caséines et la peptone (figures 9 et 10), suivies de tryptone et l'extrait de malt (figures 11 et 12) et enfin l'extrait de levure (figure 13).

Le virage de la couleur des milieux à base des différents substrats azotés, du jaune au rose indique que les souches peuvent assimiler les différents substrats utilisés comme seule source d'azote et produire la L-glutaminase. De plus, il a été noté qu'en présence des caséines, la croissance et la production de la L-glutaminase sont faites tôt (après 3 jours d'incubation), alors qu'en présence de l'extrait de levure, la croissance et la production de l'enzyme sont faites de manière tardive (après 15 jours d'incubation).

En présence des autres substrats (la peptone, le tryptone, l'extrait de malt), la L-glutaminase est produite après 4 à 5 jours d'incubation.

De ce fait, on déduit que dans le cas de l'extrait de levure, la production commence pendant la phase stationnaire, alors qu'en présence des caséines, la peptone, l'extrait de malt et le tryptone, elle commence pendant la phase de croissance continue (Lagzouli, Charouf et al. 2007).

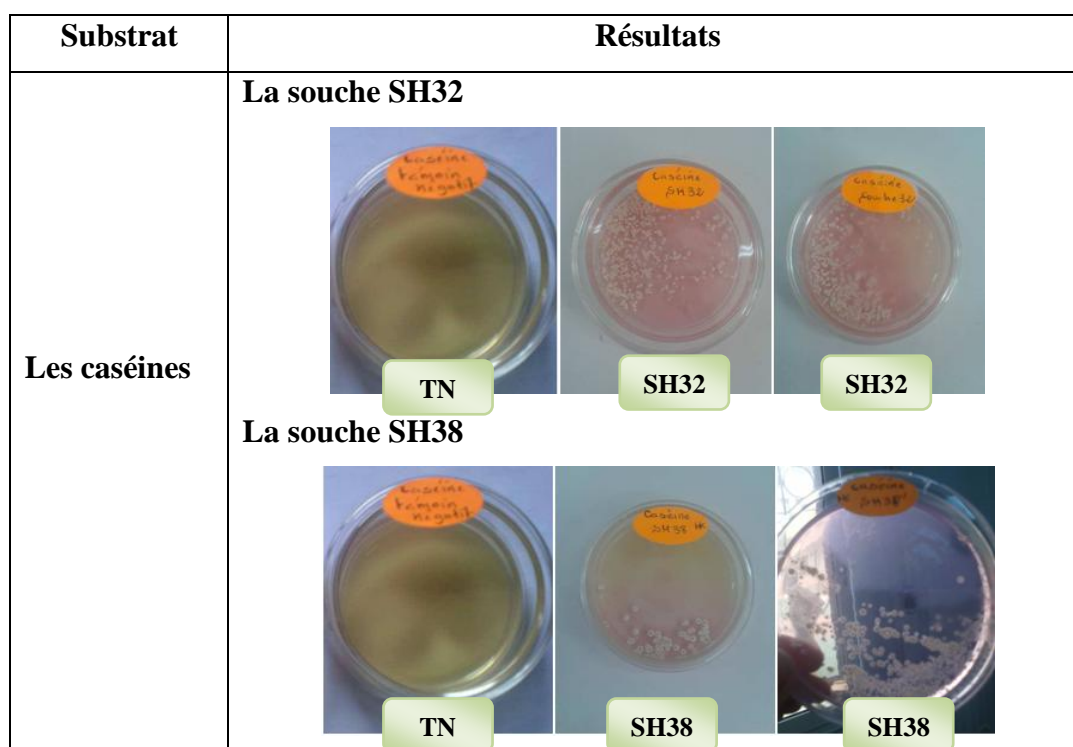


Figure 9 : Effet des caséines sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

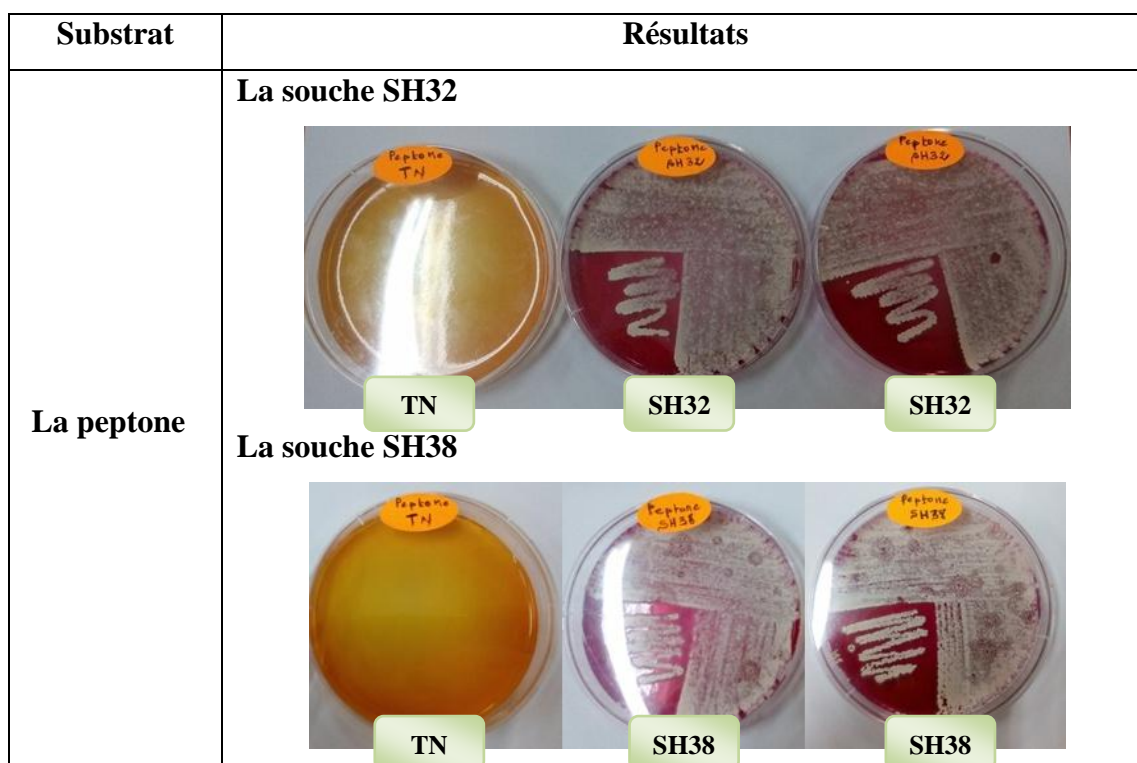


Figure 10 : Effet de la peptone sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

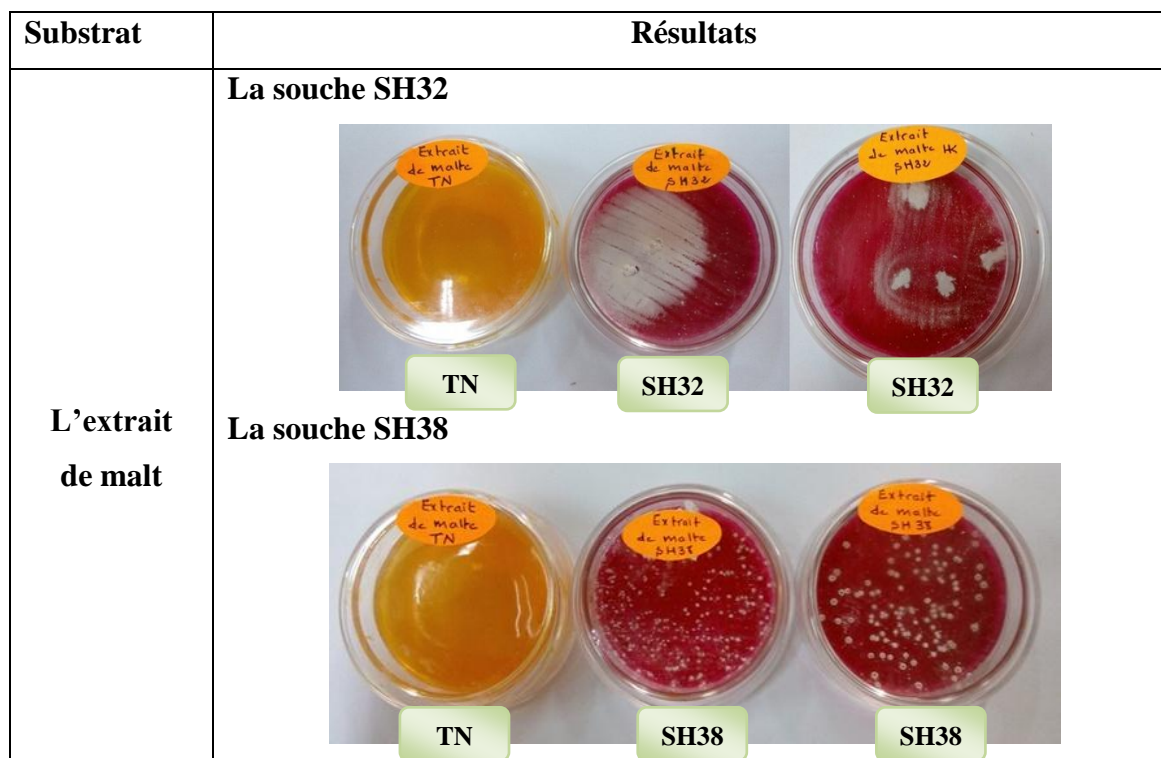


Figure 11 : Effet de l'extrait de malt sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

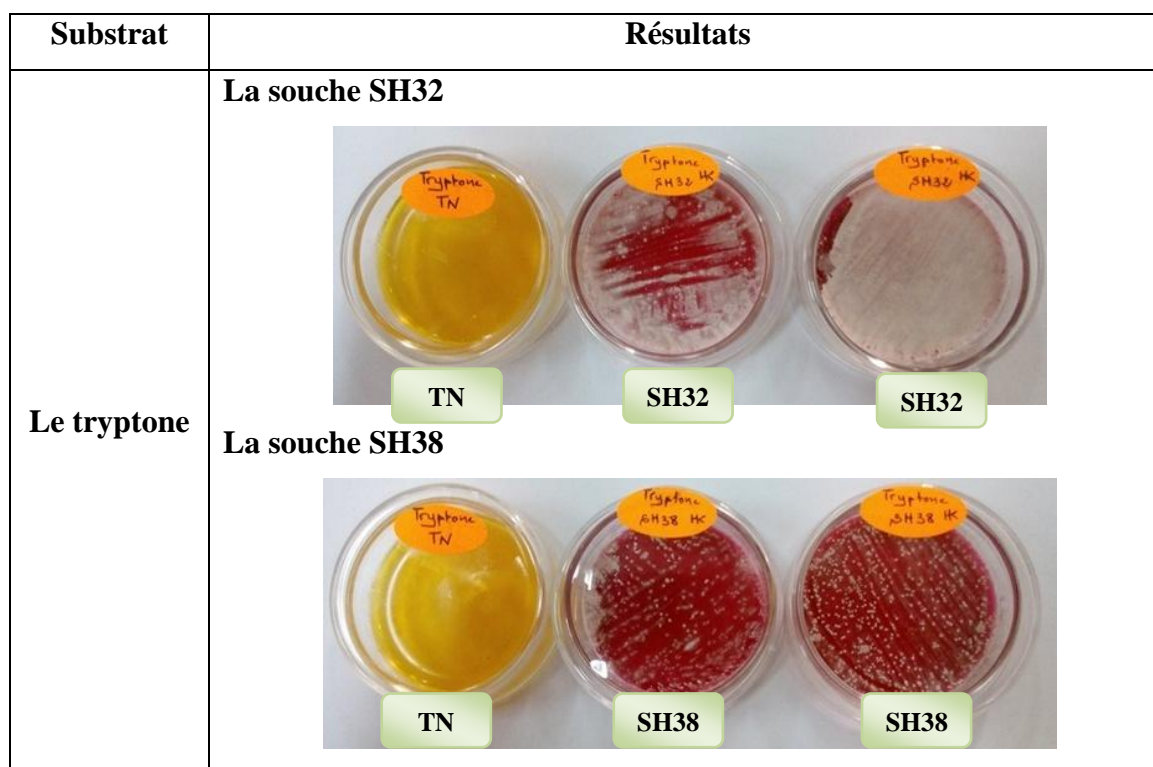


Figure 12: Effet de tryptone sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

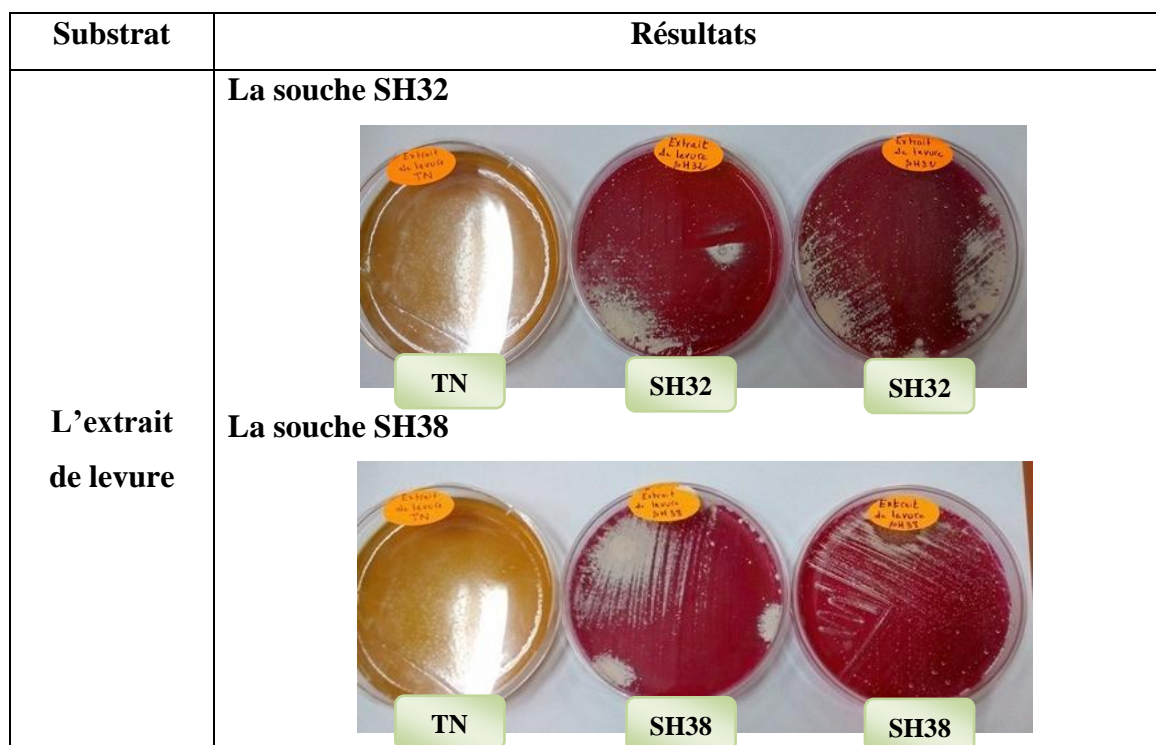


Figure 13 : Effet de l'extrait de levure sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

IV.3.3. Effet des sous-produits alimentaires en guise de valorisation

Parmi les deux sous-produits alimentaires testés, le son d'orge s'est révélé comme étant l'unique stimulant de la croissance des souches et de la production de la L-glutaminase (figure 14). Par ailleurs, le lactosérum a complètement inhibé la croissance des souches et la production de l'enzyme (figure 15).

L'activité glutaminasique observée en présence du son d'orge est attribuée à la richesse de ce dernier en éléments nutritifs (32.8% de carbone, 36.2% d'azote, 23% d'acides aminés et 10% de sels minéraux) et sa dégradabilité (Zouaghi 2007). En effet le développement d'un procédé de production de la L-glutaminase basé sur le son d'orge comme source de carbone et d'azote est très attrayant car ces substrats sont bon marché et facilement disponibles.

En ce qui concerne le lactosérum, son effet inhibiteur peut être probablement dû à son acidité et Les bactéries du genre *Streptomyces* semblent préféré un pH neutre ou peu alcalin ce qui a empêché leur développement dans le milieu à base de lactosérum acide (Kumar, Muthuvelayudham et al. 2013).

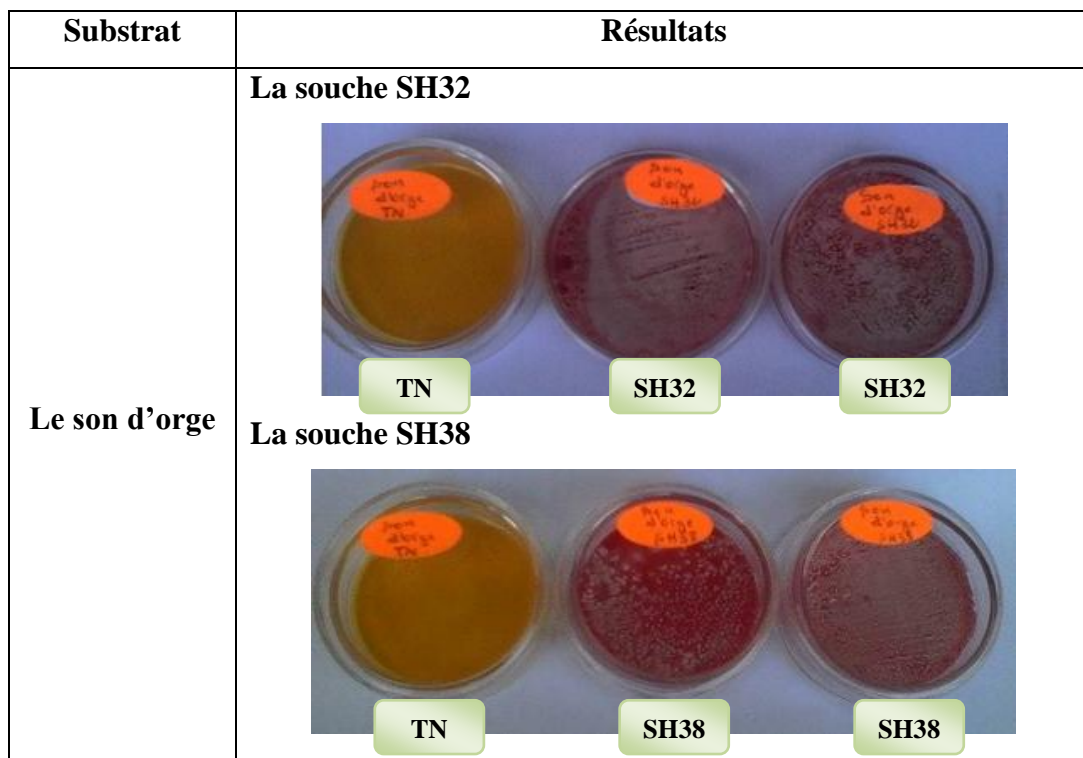


Figure 14 : Effet de son d'orge sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

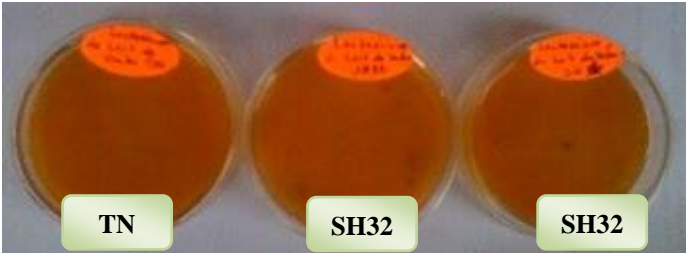
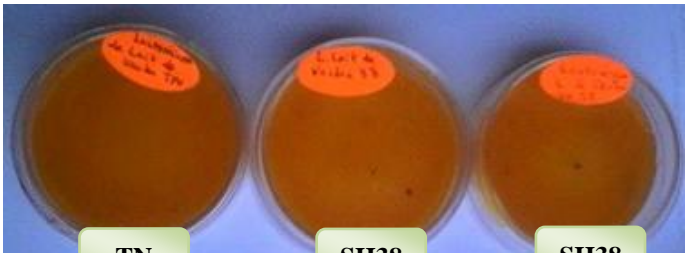
Substrat	Résultats
Lactosérum De lait de vache	La souche SH32 
	La souche SH38 

Figure 15 : Effet de lactosérum de lait de vache sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

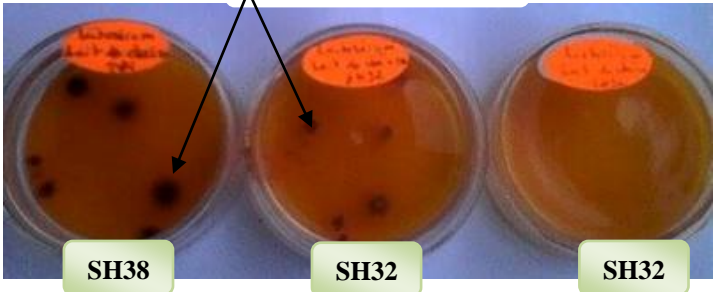
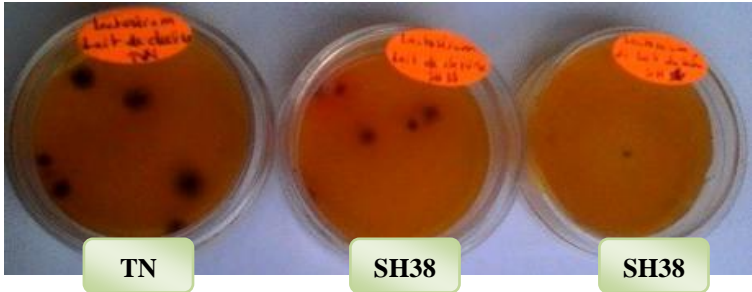
Substrat	Résultats
Lactosérum De lait de chèvre	La souche SH32 
	La souche SH38 

Figure 16 : Effet de lactosérum de lait de chèvre sur la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, nous signalons leur capacité à produire une variété de substances intéressantes du point de vue industriel et les enzymes occupant une place importante après les antibiotiques.

Ce travail nous a permis le screening de l'activité glutaminasique de deux souches d'actinomycètes (SH32 et SH38) (Genre *Streptomyces*) isolées à partir de sol recueilli au site Tikjda (Bouira).

Le dosage des activités enzymatiques (à 37°C et à pH7) des glutaminases produites a montré que la L-glutaminase sécrétée par la souche SH38 est plus active (211UI/ml) que celle sécrétée par la souche SH32 (170UI/ml).

La croissance des souches et la production des glutaminases ont été optimisées en utilisant différents substrats et sous produits agroalimentaires comme source de carbone et d'azote dans le milieu de culture.

Parmi les deux substrats hydrocarbonés qui ont été testés, l'amidon était le meilleur substrat permettant la croissance des souches et la production de l'enzyme, à l'opposé de glycérol qui a inhibé totalement ces derniers.

Parmi les substrats azotés testés, les caséines et la peptone se sont révélés comme étant les meilleurs substrats permettant la croissance des souches de *Streptomyces*, suivies de tryptone et l'extrait de malt et enfin par l'extrait de levure. Ainsi, la production de l'enzyme a été notée après 3 jours d'incubation en présence des caséines, 15 jours en présence de l'extrait de levure et enfin 4 à 5 jours en présence de tryptone et l'extrait de malt.

En ce qui concerne, les sous-produits alimentaires qui ont été testés, le son d'orge s'est révélé comme étant le meilleur stimulant de la croissance des souches et de la production de l'enzyme tandis que le lactosérum a inhibé totalement ces derniers.

A l'issue de ce travail, nous émettons quelques réflexions et voies d'investigations sous forme de perspectives pour une meilleure exploitation de ces résultats préliminaires :

- L'application d'une étude statistique basée sur un plan d'expériences composites à fin d'évaluer l'effet de la combinaison des substrats complexes sur la croissance et la production de la L-glutaminase.

Conclusion et perspectives

- L'optimisation des autres paramètres physicochimiques à savoir le pH, la température, la taille de l'inoculum pour une meilleur croissance et production de l'enzyme.
- Essai de production de l'enzyme dans un milieu a base de lactosérum doux.
- Purifier l'enzyme produite pour un usage pharmaceutique ou alimentaire.

Références bibliographique

Références bibliographiques

Abd-Alla, M. H., E.-S. A. El-Sayed, et al. (2013). "Biosynthesis of L-glutaminase by *Streptomyces variabilis* ASU319 isolated from rhizosphere of triticum vulgaris." Universal Journal of Microbiology Research **1**(3): 27-35.

Abdallah, N. A., S. K. Amer, et al. (2012). "Screening of L-Glutaminase produced by actinomycetes isolated from different soils in Egypt." International Journal of ChemTech Research **4**(4): 1451-1460.

Ameur, H. (2014). "Effet d'osmoprotecteur naturels sur la restriction de croissance de *Streptomyces* et plantes d'intérêt agricole sur sol salé et aride."

Aour, L. (2012). "Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes."

Balagurunathan, R., M. Radhakrishnan, et al. (2010). "L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments—selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain." Aust J Basic Appl Sci **4**(5): 698-705.

Belyagoubi, I. (2014). "Antibiotiques produits par des bactéries (Actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens."

Boudemagh, A. (2007). "Isolement, à partir des sols sahariens, de bactérie actinomycéales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches active."

Campos-Sandoval, J. A., M. Martín-Rufián, et al. (2015). "Glutaminases in brain: multiple isoforms for many purposes." Neurochemistry international **88**: 1-5.

Chen, L. and H. Cui (2015). "Targeting glutamine induces apoptosis: a cancer therapy approach." International journal of molecular sciences **16**(9): 22830-22855.

Divya Teja, D., V. Sri Devi, et al. (2014). "Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes." International Journal of Advanced Research **2**: 485-491.

Fateh, M. (2017). "Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c, et tests biologiques."

kitouni, m. (2007). Isolement de bactéries actinomycéales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. identification moléculaire des souches active et caractérisation préliminaire des substances élaborée, université Mentouri-constantine.

Références bibliographiques

- Kumar, S. S., R. Muthuvelayudham, et al. (2013). "Production and optimization of L-Glutaminase (EC. 3.5. 1.2) by *serratia marcescens* using wheat bran under statistical designs." Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS) **3**(4): 2601.
- Lagzouli, M., R. Charouf, et al. (2007). "Optimisation de la croissance et de la production de gluco amylase extra cellulaire par *Candida guilliermondii*." Bull. Soc. Pharm. Bordeaux **146**: 251-270.
- Li, Q., X. Chen, et al. (2016). Morphological Identification of Actinobacteria. Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications, InTech.
- Lukey, M. J., K. F. Wilson, et al. (2013). "Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism." Future medicinal chemistry **5**(14): 1685-1700.
- Martín-Rufián, M., M. Tosina, et al. (2012). "Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism." PloS one **7**(6): e38380.
- Mousumi, D. and A. Dayanand (2013). "Production and antioxidant attribute of l-glutaminase from *Streptomyces enissocaesilis* DMQ-24." Int J Latest Res Sci Technol **2**(3): 1-9.
- Obre, E. (2014). Régulation du métabolisme énergétique: étude du remodelage bioénergétique du cancer, Université de Bordeaux.
- Rajan, P. C., A. Mahalakshmi, et al. (2015). "Production of L-Glutaminase by Marine *Streptomyces* Sp., Isolated From West Coast, Kerala, India." World **1**(1): 38-54.
- Ratnikov, B., Y. J. Jeon, et al. (2015). "Right on TARGET: glutamine metabolism in cancer." Oncoscience **2**(8): 681.
- Reda, F. M. (2015). "Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L-Glutaminase and its anticancer efficiency." Brazilian Journal of Microbiology **46**(4): 957-968.
- Sabu, A., K. M. Nampoothiri, et al. (2005). "L-Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin." Microbial Enzymes and Biotransformations: 75-90.
- Saker, R. (2015). "Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potialités antagonistes."
- Sarada, K. (2013). "Production and applications of L-Glutaminase using fermentation technology." Asia Pac J Res **1**: 1.

Références bibliographiques

Smaoui, S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, INPT.

Unissa, R., M. Sudhakar, et al. (2014). "A review on biochemical and therapeutic aspects of glutaminase." International Journal of pharmaceutical sciences and research **5**(11): 4617.

Willems, L. (2012). Implication de la glutamine dans l'activation de mTORC1 dans les leucémies aiguës myéloïdes et inhibition ciblée, Université René Descartes-Paris V.

Zerizer, h. (2014). "Les genres d'actinomycètes (hors mycobactérium) impliqués dans les infections dans la région de constantine.".

Zouaghi, A. (2007). "Optimisation de la production de l'oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*.".

Annexes

Annexe 1 : Liste du matériel, appareillage et réactif utilisés.

1. Matériel

- Bec bunsen.
- Tubes à essais stériles.
- Boites pétri.
- Pipettes pasteur.
- Erlen-meyer de 250 ml.
- Eprouvettes de 30 ml.
- Portoir pour tubes à essais.

2. Appareillage

- Balance électronique (Ohaus).
- Balance électronique de précision 0,001g (Ohaus).
- Agitateur magnétique à plaque chauffante (Lab Tech).
- Autoclave (Wisd).
- Bain marie (nüve bath).
- étuve (Venticell).
- Réfrigérateur domestique.
- Congélateur à -20°C.
- Centrifugeuse (EZ Swing 3K).
- Spectrophotomètre UV-Visible (Optizen 3220UV).

3. Réactif et colorants

- Eau distillée stérile.
- Rouge de phénol 0,9%.
- Acide nalidixique à 100µg/ml.
- Réactif de Nessler.
- Solution de sulfate d'ammonium 10mM.

4. Composition de réactif de Nessler (Abdellah 2004)

- Solution A

Iodure mercurique	50g
Iodure de potassium	36,5g
Eau distillée	1l

- Solution B

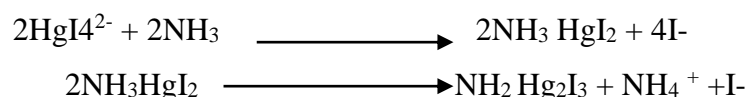
Potasse en pastilles	150g
Eau distillée	1l

Annexes

Triturer les deux sels de la solution A au mortier en ajoutant de l'eau distillée puis mélanger les deux solutions en partie égales.

Principe

Le réactif de Nessler (iodo-mercure de potassium alcalin) en présence d'ammoniaque est décomposé avec formation d'iodure de dimercuriammonium qui permet le dosage colorimétrique des ions ammonium (NH_4^+).



Annexe 2 : Composition des milieux de culture utilisés en g/l :

Composition du milieu de revivification des *Streptomyces*.

- **ISP2** (International Streptomyces Project 2) (Abd-Alla, EL-Sayed et al. 2013)

Extrait de levure	4
Extrait de malte	10
D-glucose	4
Agar	15
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,3

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

Composition du milieu de culture utilisé pour la mise en évidence de l'activité glutaminasique

- **MGA (Minimal glutamine agar medium)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
L-glutamine	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

Composition des milieux utilisés pour l'optimisation de la production de la L-glutaminase.

• **MGA (modifié) (a base d'amidon)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
L-glutamine	10
Amidon	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

• **MGA (modifié) (a base de glycérol)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
L-glutamine	10
Glycérol	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

• **MGA (modifié) (a base de caséines)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
Caséines	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

- **MGA (modifié) (a base de la peptone)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
Peptone	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

- **MGA (modifié) (a base de tryptone)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
Tryptone	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

- **MGA (modifié) (a base d'extrait de malt)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
Extrait de malt	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

- **MGA (modifié) (a base d'extrait de levure)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5

Annexes

KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
Extrait de levure	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

- **MGA (modifié) (a base de lactosérum)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
Lactosérum	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

- **MGA (modifié) (a base d'extrait de son d'orge)**

KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
FeSO ₄	0,1
ZnSO ₄	0,1
NaCl	0,5
Son d'orge	10

pH = 7

Stérilisation par autoclavage : 20 min à 120°C.

Remarque :

- Le milieu MGA ainsi que les milieux d'optimisation ont été préalablement complétés par 1ml/l de 0,9% de rouge phénol comme indicateur de pH puis stérilisé et complété par 100µl/100ml de l'acide nalidixique afin de retarder la croissance des bactéries Gram négatives.

Annexes

- l'ajustement de pH des milieux de culture a été effectuée à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou une solution d'HCL 1N selon le cas.

Annexe 3 : Préparation de substrat (L-glutamine) dans le tampon Tris.

- Calcul de la masse de tris à peser pour préparer 20 ml de solution de concentration 0,5M
- La masse molaire de tris : 121,14g/mole.

$$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mole} \longrightarrow 121,14 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ 0,5 \text{ M} \longrightarrow X \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \end{array} \right.$$

$$X = 121,14 \times 0,5 = 60,57 \text{ g.}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} 60,57 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ X' \longrightarrow 20 \text{ ml} \end{array} \right.$$

$$X' = 60,57 \times 20 / 1000 = 1,21 \text{ g.}$$

- Calcul de la masse de la L-glutamine à peser pour préparer 20 ml de solution de concentration 0,04M.
- La masse molaire de la L-glutamine : 146,14g/mole.

$$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mole} \longrightarrow 146,14 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ 0,04 \text{ M} \longrightarrow X \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \end{array} \right.$$

$$X = 146,14 \times 0,04 = 5,85 \text{ g.}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} 5,85 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ X' \longrightarrow 20 \text{ ml} \end{array} \right.$$

$$X' = 5,85 \times 20 / 1000 = 0,12 \text{ g.}$$

- Introduire les quantités pesées dans un bécher.
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 20 ml.
- Agiter sur plaque agitatrice.

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage de sulfate d'ammonium.

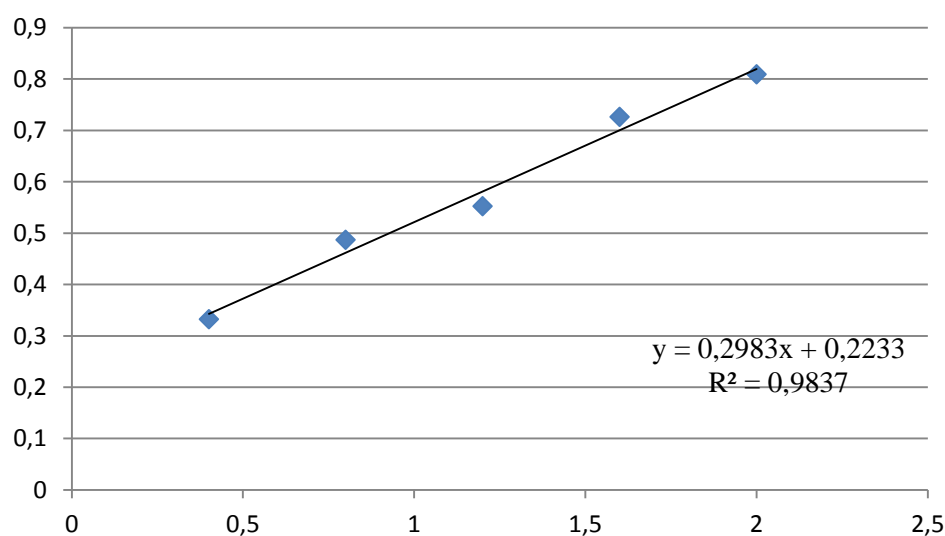
Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) (10mM) selon les concentrations suivantes 0,4 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 ; 2 mM.

Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 1ml. Après addition de 0,4ml de réactif de Nessler et agitation, l'absorbance est mesurée à 470 nm contre le blanc.

Tableau V : préparation de la gamme d'étalonnage de sulfate d'ammonium (10 μM).

N° du tube	Blanc	1	2	3	4	5
Solutions et réactifs						
Solution de (NH ₄) ₂ SO ₄ (μl)	0	40	80	120	160	200
Réactif de Nessler (ml)	0.4					
Absorbance à 470 nm	0	0,332	0,487	0,552	0,726	0,809

Absorbance à 470 nm



Concentrations des ions ammonium en mM.

Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la solution de sulfate d'ammonium (10Mm).

Les concentrations des ions ammonium sont calculées d'après l'équation de la courbe.

$$y = 0,2983x + 0,2233$$

y : absorbance de la solution de sulfate d'ammonium à 470 nm.

x : la concentration des ions ammonium

Résumé

La L-glutaminase est une amidohydrolase produite par divers microorganismes comprenant les bactéries, les levures et les champignons. Elle est actuellement utilisée dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique (LAL), le traitement de syndrome de l'immunodéficience humaine SIDA/HIV et comme agent améliorant le goût lors de la fermentation de la sauce de soja. Bien que l'activité L-glutaminase ait été rapportée dans divers microorganismes, la L-glutaminase chez les actinomycètes est très rares.

Dans ce présent travail, deux souches de *Streptomyces* (SH32 et SH38) isolées à partir du sol, ont fait l'objet d'un screening de l'activité L-glutaminase sur milieu MGA (milieu minimum à base de glutamine).

Ensuite, les activités enzymatiques des glutaminases produites ont été dosées par une réaction colorimétrique en utilisant le réactif de Nessler. La souche SH 38 a montré une activité enzymatique plus importante (211UI) par rapport à la souche SH 32 (170UI).

Enfin, la production de la L-glutaminase par les deux souches étudiées a été optimisée en utilisant différents substrats et sous-produits agroalimentaires comme source de carbone et d'azote dans le milieu de culture. L'amidon, les caséines et la peptone se sont révélés comme étant les meilleures sources de carbone et d'azote respectivement pour la croissance des souches et la production de la L-glutaminase et le son d'orge s'est montré comme étant le meilleur sous produit agroalimentaire permettant la croissance et la production de la L-glutaminase par les souches de *Streptomyces*.

Mots clés : L-glutaminase, *Streptomyces*, sol, screening, Nessler, optimisation.

Summary

L-glutaminase is an amidohydrolase produced by various microorganisms including bacteria, yeasts and fungi. It is currently used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), the treatment of human immunodeficiency syndrome AIDS / HIV and as a taste enhancer during the fermentation of soy sauce. Although L-glutaminase activity has been reported in various microorganisms, L-glutaminase in actinomycetes is very rare.

In this work, two strains of *Streptomyces* (SH 32 and SH 38) isolated from soil were screened for L-glutaminase activity on MGA medium (minimum medium based on glutamine).

Subsequently, the enzymatic activities of the produced glutaminases were assayed by a colorimetric reaction using the Nessler reagent. The SH 38 strain showed a greater enzymatic activity (211UI) compared to the SH 32 strain (170UI).

Finally, the production of L-glutaminase by the two strains studied was optimized using different complex substrates and agro-food by-products as a source of carbon and nitrogen in the culture medium. Starch, caseins and peptone were found to be the best sources of carbon and nitrogen for strain growth and L-glutaminase production, respectively, and barley sound was the best under agri-food product allowing the growth and production of L-glutaminase by *Streptomyces* strains.

Key words: L-glutaminase, *Streptomyces*, soil, screening, Nessler, optimization.