

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ DE BOUIRA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques

Présenté par :

GRIM Latifa

*Comparaison de l'activité enzymatique des L-glutaminases
de trois souches bactériennes sur milieu riche en glutamine*

Soutenu le : 29 / 06 / 2017

Devant le jury composé de :

Noms et Prénoms	Grade		
KADRI N.	MCA	UAMOB	Président
CHERGUI A.	MAA	UAMOB	Promoteur
ADRAR N.	MAB	UAMOB	Examineur

Année universitaire : 2016/2017

REMERCIEMENTS

Je remercie :

- Tout d'abord tous ceux qui ont donné aux étudiants du système classique la chance de continuer nos études. Je citerai en particulier, Monsieur Mouni Lotfi, Monsieur Kadri Nabil, Madame Boutheldja Razika et Madame Cherifi Zakia.
- Tous mes enseignants en particulier : Mr Bournine, Melle Bensmail, Mme Boubekka, Mr chergui, Mr Kadri, Mr Dahmoune, Mme Médboua, Mr Adrar , Mr Boughani , Mr Hamzaoui, Mme Ait Mimoune.
- Monsieur Bournine Lamine, mon professeur, pour le travail remarquable qu'il a fait pour notre formation en master1. Merci du fond du cœur.
- Medames Bouteldja Razika et Cherifi Zakia pour leurs encouragements permanents.
- Mon enseignant et promoteur, Mr Chergui Achour pour m'avoir encadré, guidé, appris, initié à la recherche.
- L'ensemble des ingénieurs des laboratoires pour leur présence aux côtés des étudiants.
- Les étudiants qui ont fait de notre laboratoire une oasis de travail, d'entente et d'entraide . Je cite Ahlem, Houda , Rosa , Asma, Naima, Hocine, Ishaq.
- Mes amies, Malika, Akila, Saida, Nadjia, pour leurs encouragements.
- Mes chères Nieces, Yasmine et Malika pour leur soutien et leur aide.
- Ma chère amie Doudi, m^{elle} Mezrag Houda pour son aide, son soutien, sa présence à mes côtés, son amitié vraie. Merci Doudi.

Que Dieu vous Protège tous.

Table des matières

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
CHAPITRE I : Exploitation des actinomycètes en oncologie.....	2
I-1-Généralités sur les actinomycètes.....	2
I-2- Répartition dans la nature.....	2
I-3- Métabolisme et physiologie des actinomycètes.....	3
I-4- Morphologie des actinomycètes.....	3
I-5- Le cycle de vie des actinomycètes.....	4
I-6 - Intérêt des actinomycètes en oncologie.....	4
CHAPITRE II: Exploitation de l'activité de la L-glutaminase en oncologie.....	6
II- 1- Métabolisme de la cellule cancéreuse.....	6
II-2- Rôle de la glutamine dans la cellule cancéreuse	
II-2-1- Glutamine comme source d'énergie.....	7
II-2-2- Glutamine et synthèses d'acides nucléiques	7
II-2-3- Glutamine et synthèses d'acides aminés.....	7
II-2-4- Glutamine et production d'acides gras.....	8
II-2-5-Glutamine et synthèse protéique.....	10
II- 2-6- Glutamine contre le stress oxydatif.....	10
II-3- Addiction à la glutamine de cellules cancéreuses.....	12
II- 3-1- Niveau d'expression de la glutamine synthase et des glutaminases GSL.....	12
II-3-2- Rôle de c-Myc.....	12

II-3-3- Autophagie dans le métabolisme tumoral.....	13
II- 4- Approche thérapeutique par la L-Glutaminase.....	13
II-4-1-La L- Glutaminase.....	13
II- 4-2-Sources de L- Glutaminase.....	14
II- 4-3-Types de L- glutaminases.....	14
II- 4-4-Application des la L glutamine.....	14
II-4-5- Mécanisme d'action de la L-glutaminase	14
II-4-6- Voie d'administration.....	15
II-4-7-Inconvénients de l'utilisation de la L- glutaminase en thérapie.....	15
II-4-8-Propriétés requises pour une enzyme pour usage thérapeutique.....	16
CHAPITRE III : Partie expérimentale	
III-1- Matériel.....	18
III-1-1-Matériel biologique	18
III-1-1-1- Collecte, isolement et identification.....	18
III-1-2- Appareillage	18
III-2-Méthodes	18
III-2-1- Tests préliminaires de la production de L- glutaminase.....	18
III-2-1-1- Ensemencement sur gélose MGA.....	19
III-2-1-2- Ensemencement sur bouillon MGA.....	19
III-2-2- Détermination de la localisation de la L- glutaminase et de son activité enzymatique	19
III-2-2-1- Dosage de NH ₄ ⁺ des surnagants des différentes cultures bactériennes.....	19
III-2-2-1-1- Préparation du blanc et des témoins négatifs	20
III-2-2-1-2- Dosage de l'activité L- glutaminase dans les surnagants des cultures.....	20

III-2-3- Dosage des protéines totales	21
III-2-3- 1- Réalisation de la courbe étalon	21
III-2-3- 2- Dosage des protéines des extraits enzymatiques bruts actifs.....	21
CHAPITRE IV : Résultats et discussion	
IV-1- Tests préliminaires de la production de L-glutamine.....	24
IV-1-1- Lecture des ensemencements sur gélose MGA et bouillon MGA.....	24
IV-2- Localisation de l'activité L- glutaminase	25
IV-2-1- Détermination de la concentration molaire de NH ₄ ⁺ dans les surnagents.....	26
IV-3- Mesure des activités enzymatiques des L- glutaminases.....	27
IV-4- Dosage des protéines	29
IV-5-L'activité spécifiques	32
Conclusion et perspectives.....	35
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

AANE	Acides Aminés Non Essentiel
AE	Activité Enzymatique
AS	Activité Spécifique
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BBC	Bleu de Coomassie
BSA	SerumAlbumin Bovine
C	Concentration
COX	Cycloxygénase
CRM	Chaine Respiratoire Mitochondriale
DKP :	Dicétopipérazines
GPx	Glutathion Peroxydase
GS	Glutamine synthétase
GSL	Glutaminase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
MGA	Minimal Glutamine Agar medium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NOX	NADPH oxydasePolyéthylène Glycol
ROS	ReactiveOxygenSpecies
UI	Unité Internationale

Liste des figures

N° Figure	Titre	Page
1	Les caractéristiques morphologiques de base des actinomycètes	2
2	Représentation schématique du cycle de vie de Streptomyces	4
3	Différence de métabolisme entre cellules quiescentes et cellules en prolifération	6
4	Récapitulation du métabolisme dans la cellule cancéreuse	8
5	Participation de la glutamine à la régulation du stress oxydatif	11
6	Photos montrant la mise en évidence qualitative de la production de L-glutaminase sur gélose MGA	24
7	Photos montrant la mise en évidence qualitative de la production de L-glutaminase sur bouillon MGA	24
8	Représentation graphique de la concentration des surnagants en NH ₄ ⁺	26
9	Représentation graphique des activités enzymatiques des surnagants	28
10	Représentation graphique de la concentration en protéine des surnagants	30
11	Représentation graphique comparative de activités spécifiques des L-glutaminase issues des souches CA28, CA30 et CA36.	32

Liste de tableaux

N° Tableau	Titre	Page
I	Concentration en NH_4^+ des surnagents	26
II	Activités enzymatiques dans les différents surnagents	28
III	Concentration en protéine totale des surnagents	29
IV	Valeurs des activités spécifiques des différentes L-glutaminases	32

Liste des annexes

N° de l'annexe	Titre
1	Listes du matériel et réactifs utilisés
2	Composition du tampon Tris et de la solution mère $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
3	Composition des milieux de culture utilisés
4	Courbe d'étalonnage pour le dosage de NH_4^+

Introduction

Le cancer reste l'un des problèmes de santé humaine les plus graves. Les méthodes thérapeutiques pour son traitement sont nombreuses : chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie. Mais en raison du développement de résistances à de multiples médicaments chimiothérapeutiques, de leur toxicité, de leur effets indésirables et des problèmes de rechute, la recherche de nouveaux médicaments anti tumoraux actifs, avec moins d'effets secondaires, une plus grande efficacité thérapeutique et ciblant les cellules tumorales exclusivement reste un objectif prioritaire pour sa thérapie. Parmi ces nouvelles thérapies, la thérapie enzymatique qui consiste en l'administration d'enzymes dans l'organisme pour traiter une maladie en visant une cible donnée. Mais pour une large utilisation, faut-il encore une production industrielle de celles-ci. Les sources sont nombreuses : plantes, animaux, microorganismes (bactéries, levures, champignons), mais en raison de la faisabilité économique (production en grandes quantités, simplicité, optimisation et modélisation des procédés de production), les sources microbiennes sont préférables.

Les actinomycètes sont bien reconnues pour la production de précieuses structures pharmaceutiques dont les enzymes utilisées en thérapie anticancéreuse notamment (Thadikamala S. 2011). Ils sont considérés comme une source d'enzyme préférée en raison de leur production d'enzymes extracellulaires.

Parmi celles-là, la L- Glutamine aminohydrolase (EC 3.5.1.2) communément appelée la L- Glutaminase utilisée actuellement en thérapie antinéoplasique (Kyoko 2004). Mais une enzyme destinée à un usage thérapeutique pour doit satisfaire certains critères dont celui d'avoir une activité enzymatique maximale à pH physiologique (Rahamat U. 2014). A cet égard, la présente étude établit une comparaison de l'activité enzymatique de trois L- glutaminase issues de trois souches différentes de *Streptomyces*.

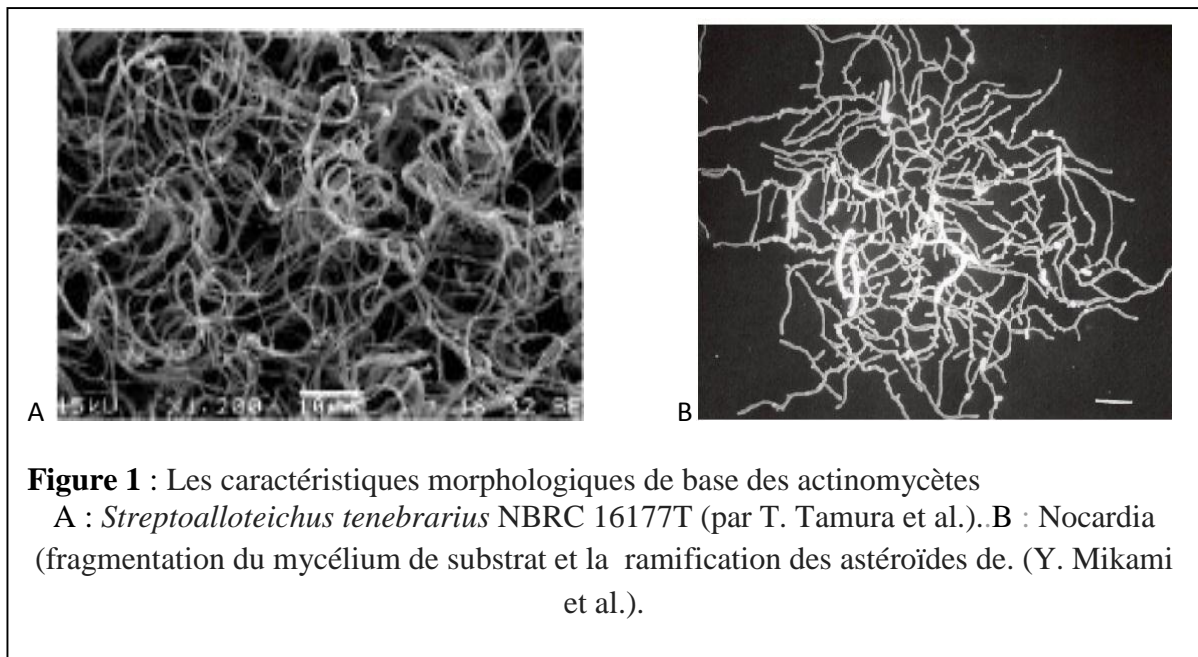
Chapitre I

Exploitation des actinomycètes en oncologie

I- 1-Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries Gram positif (Dgigal 2003) qui appartiennent au règne des procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobacteria, contenant l'ordre des Actinomycetales (Alauzet 2009). Ce sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires à la morphologie complexe (Colombié 2005) constituées d'hyphes c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Lechevalier 1981) . Cette morphologie, analogue à celle des champignons a été à l'origine de leur confusion avec ces derniers et leur a valu leur dénomination d'Actinomycète dérivé des mots grecs «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» qui veut champignon «Champignons à rayons» (Lamari 2006) (Figure 1). Mais leur propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les rangent inéluctablement parmi les procaryotes (Lechevalier 1981) .

Les actinomycètes possèdent un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% (Larpent, 1989)



I- 2-Répartition dans la nature

Les actinomycètes dont les *Streptomyces* sont des micro-organismes ubiquitaires que l'on rencontre dans les sols, l'air , de nombreux environnements aquatiques : eau de mers, sédiments marins (Ghanem 2000), les eaux douces (Kitouni 2005) l'eau issue de marécages salés (Al-Zarban 2002), dans des écosystèmes spécifiques présentant des conditions de vie hostiles : sols polaires gelés (psychophilie) , sols désertiques chauds et secs, lacs très alcalins, lacs salés (halophilie), sources hydrothermales à températures très élevées (Lakshmipathy D.

T. 2009). Certains genres sont hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (Le Minor 1989) et peuvent être pathogènes (Van de Sande 2013). D'autres sont symbiotes de plantes (Larrent 1985).

Dans le sol, les *Streptomyces* produisent beaucoup de substances dont la géosmine et le 2-méthyle isoborneol responsables de l'odeur caractéristique du sol (Wellington et al., 1987), des enzymes impliquées dans la biodégradation de nombreux polymères insolubles tels que les protéines, l'amidon, la cellulose, la lignine provenant des plantes, la pectine, la kératine et la chitine contribuant ainsi à former l'humus. Certaines espèces peuvent aller jusqu'à dégrader des polluants dus à l'activité de l'homme (Lacey, 1997).

I-3-Métabolisme et physiologie des actinomycètes

La plupart des actinomycètes sont immobiles, chimioorganotrophes utilisant des substrats carbonés organiques (lignine, chitine, et cellulose). Mais certains sont chimio autotrophes utilisant comme source de carbone le CO₂ (Mariat 1990). Les actinomycètes sont généralement mésophiles avec une température optimale de croissance de 25°C à 30°C, et ont une proximité optimale à la neutralité (Goodfellow et Williams, 1983). Mais, il existe des espèces thermophiles, qui peuvent croître à des températures de 55°C à 65°C (Rangaswami et al, 2004), et des espèces acidophiles vivants sur des PH compris entre 3.5 et 6.5 dans des sols acides (Alexander 1977).

On distingue deux groupes physiologiques parmi les Actinomycètes :
- Le plus important rassemble les bactéries aérobies à métabolisme oxydatif. Exemple, les *Streptomyces*.

Le second représente les bactéries à métabolisme fermentatif anaérobie stricte ou facultatif qui correspondent aux espèces hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux notamment de la cavité buccale. Elles peuvent être pathogènes (Le Minor 1989). Les actinomycètes peuvent être retrouvés dans des environnements à salinité élevée. Ceux-ci sont halophiles (Chun et al., 2000).

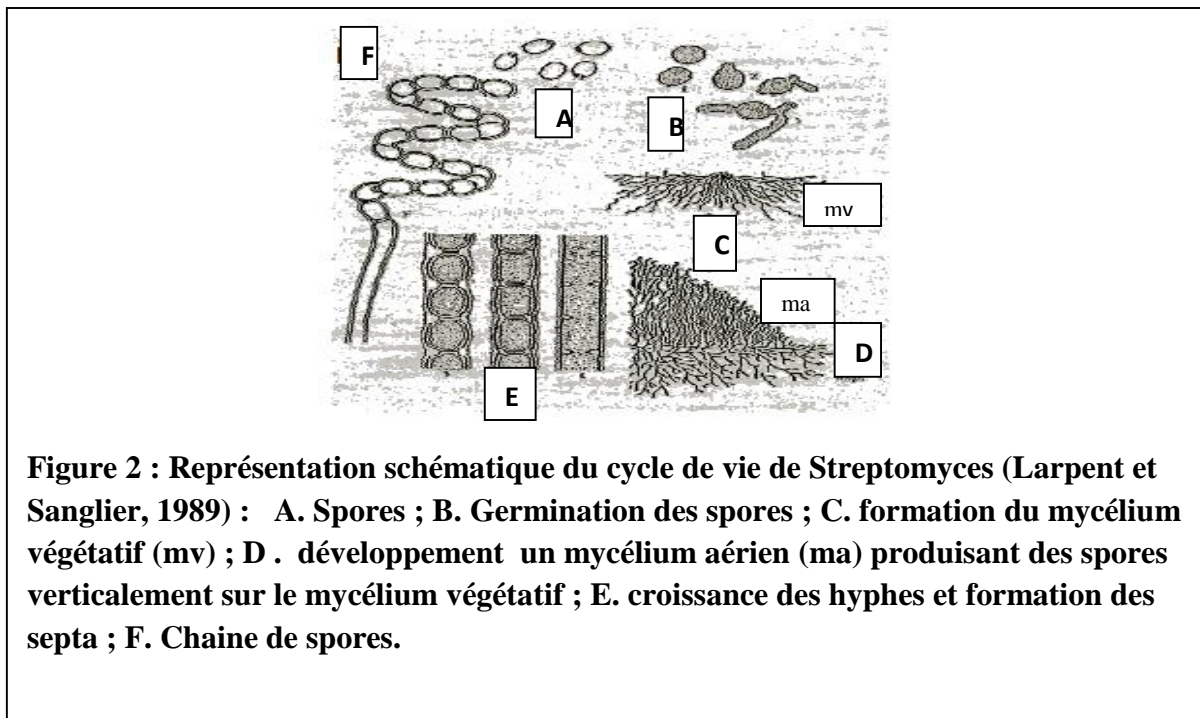
I-4- Morphologie des actinomycètes

La morphologie des actinomycètes ressemble à celles des mycètes (Prescott et al., 1995), avec des hyphes de diamètre 2 à 10 fois plus petit (Gottlieb 1973).

Les actinomycètes présentent une importante diversité morphologique. On distingue des espèces à mycélium rudimentaire voir inexistant, des espèces à mycélium fragmentaire, et des

espèces à mycélium développé et persistant formé soit du seul mycélium végétatif , du seul mycélium aérien (Djaballah 2010) ou du mycélium végétatif et du mycélium aérien mûri en conidies (Figure 2 , D).

I-5- Le cycle de vie des actinomycètes , exemple genre *Streptomyces* Le cycle de vie du genre *Streptomyces* commence par la germination d'une spore quand elle se retrouve dans des conditions nutritionnelles adéquates. La figure 2 illustre le cycle de vie d'un *Streptomyces*



I-6-Intérêt des actinomycètes en oncologie

Les Actinomycètes en général, et plus particulièrement les *Streptomyces* ont un grand intérêt biotechnologique vu leur production de biomolécules d'intérêts biotechnologiques mais aussi thérapeutiques (antibiotiques, antifongiques, enzymes à intérêts industriels (textile, papeterie, industrie alimentaire (boulangerie, ..), enzymes thérapeutiques, ...etc. Parmi les molécules bioactives anti tumorales produites par les actinomycètes les molécules suivantes : Asterobactine, Salinosporamide A, Mechercharmucine, Marinomycine, Borrelidine , IB-00208 (Loucif ,2010), Leptomycine (Solanki et *al.*, 2008) , Anthracyclines (aclarubicine, daunomycine et doxorubicine), peptides (bleomycine et actinomycine D , acides auréoliques (mithramycine), enediynes (néocarzinostatine), Carzinophiline, mitomycines (*Olano 2009*), dicétopipérazines DKP (BenAmeur 2006).

Les DKP , cyclo (L-leucyl-L-propyl) et cyclo (L-phenyl-L-propyl) inhibent la croissance de plusieurs lignées de cellules tumorales à savoir :HL60 et W937 (Leucémie humaine) et SNU-1 (cancer de l'estomac (Rhee 2001). Les Derivés de DKP :l'ambewelamide, la verticilline et la phényl-ahistine possèdent des activités antitumorales sur plusieurs lignées cellulaires(William 1998).

La molécule cyclotérapeptide appelée picidin a été isolée à partir d'une souche de *Streptomyces* et possède des activités Antitumorales (Okada 2006).

Les actinomycètes produisent également des enzymes à application thérapeutique *anti-tumorale*, la L- asparaginase et la L- glutaminase (Loucif, 2010).

Chapitre II

Exploitation de la L- glutaminase en oncologie

Les cellules cancéreuses sont des cellules qui ont acquis certaines caractéristiques leur conférant l'immortalité. Ainsi, elles présentent entre autres une résistance à la mort, une prolifération anarchique, une évasion aux suppresseurs de tumeurs, une instabilité génétique et des modifications métaboliques (Hanahan 2011). Ces dernières ont

suscitées un grand intérêt de la part des chercheurs et des approches thérapeutiques diverses ont vu le jour suite à de nombreuses découvertes.

II- 1- Métabolisme de la cellule cancéreuse

L'existence d'un métabolisme différent chez la cellule cancéreuse a été mise en évidence en 1926 par Otto Warburg qui remarqua que les cellules cancéreuses dégradent le glucose en lactate via la glycolyse et cela même en condition de normoxie. Cette caractéristique confirmée dans un grand nombre de cancer reçut le nom d'effet Warburg. Elle peut être favorisée par diverses anomalies génétiques identifiées depuis (Mazzio 2012). Les modifications dans la cellule cancéreuse auraient comme but de favoriser l'obtention rapide de l'ATP et la biosynthèse de macromolécules nécessaires à la prolifération (Mazzio 2012) et s'accompagnent d'une consommation accrue de glucose mais aussi de glutamine, un acide aminé non essentiel. En effet, les cellules tumorales incorporent massivement glucose et glutamine (Levine 2010). (Figure 3)

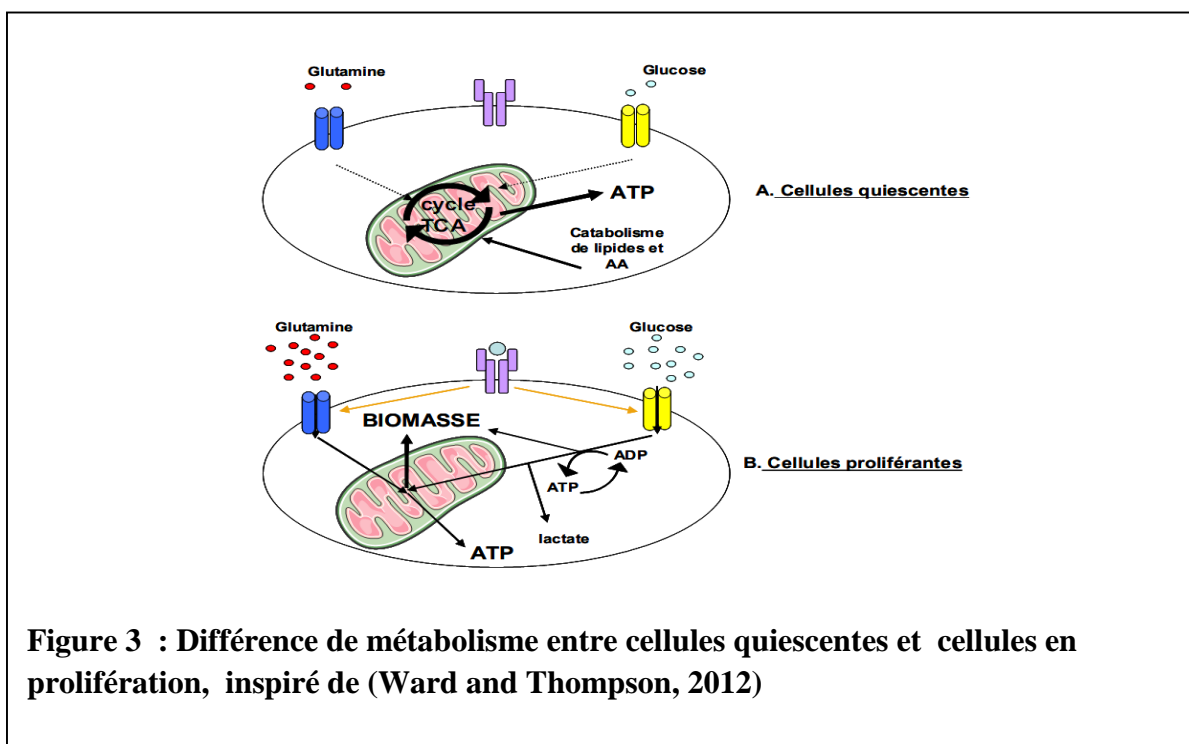


Figure 3 : Différence de métabolisme entre cellules quiescentes et cellules en prolifération, inspiré de (Ward and Thompson, 2012)

Ce dernier a un rôle très important dans un certain type de cellules cancéreuses qui augmentent leur consommation en cet acide aminé telles que les cellules du cancer du sein triple négatif MX-1 (Gross 2014), la cellule de neuroblastome (Qiug 2012) et la cellule myéloïde humaine KU812F (Lian Chen, 2015). Dans les adénocarcinomes coliques, les transporteurs nécessaires à la captation de glutamine entre autre SLC1A5 sont surexprimés pour lui permettre une entrée

massive dans la cellule (Witte 2002) . Il en est de même quant à la lignée SK-Hep qui consomme beaucoup de glutamine pour sa croissance (Lise Willems, 2012). La glutamine est impliquée dans diverses voies métaboliques de la cellule cancéreuse et son absence peut conduire à sa mort : on a montré que la privation en glutamine induit une apoptose dans l'hépatome, la leucémie, l'hybridome, cellule de myéloïde et de fibroblaste (Matés 2006).

II-2-Rôle de la glutamine dans la cellule cancéreuse

II- 2-1-Glutamine comme source d'énergie

Pour satisfaire une prolifération rapide, les cellules cancéreuses doivent utiliser une autre source d'énergie, la glutamine, qui produit de l'ATP grâce à la phosphorylation oxydative à base de glutamine (Zhdanov 2014) . Il a été observé que dans certaines conditions, la glutamine peut servir au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) (DeBerardinis 2007).

Le rôle du métabolisme oxydatif dans les cellules tumorales a été mis en évidence en 1971 par Kovacevic et al. qui observèrent la présence d'atomes de carbone issus de la glutamine dans le CO₂ relargués par des cellules de carcinome d'Ehrlich (Kovacevic 1971) .

II- 2-2-Glutamine et synthèse d'acides nucléiques

Les cellules en croissance doivent synthétiser des acides nucléiques qui sont des composés azotés. La glutamine y est impliquée (Gonzalez Herrera, 2015). Elle est le donneur d'azote obligatoire dans trois étapes enzymatiques indépendantes de la synthèse des bases puriques et dans deux réactions indépendantes de la synthèse des bases pyrimidiques.

II-2-3-Glutamine et synthèse d'acides aminés

Les cellules en croissance doivent synthétiser des acides aminés, et la glutamine est le donneur essentiel d'azote pour leur synthèse (DeBerardinis 2007) . Le glutamate issu de la glutamine est le principal donneur d'azote pour la synthèse de l'alanine, la sérine, l'aspartate

et l'ornithine, les autres AANEs sont ensuite formés à partir de ces derniers ou du glutamate pour la proline. La glutamine est le donneur d'azote obligatoire pour la synthèse d'asparagine à partir d'aspartate. L' α -cétoglutarate issu de la glutamine peut favoriser la production d'acides aminés importants dans la prolifération tels que l'aspartate et l'alanine (DeBerardinis 2007).

La tyrosine est le seul AANE qui n'est dérivé ni du glucose ni de la glutamine (Wise 2010).

II- 2-4-Glutamine et production d'acides gras

La glutamine est impliquée dans la production des lipides. En effet, le glutamate issu de la glutamine sera transformé en α -cétoglutarate qui sera transformé dans le cycle de krebs en citrate, lequel transporté dans le cytosol sera utilisé pour la synthèse des acides gras (DeBerardinis 2007).

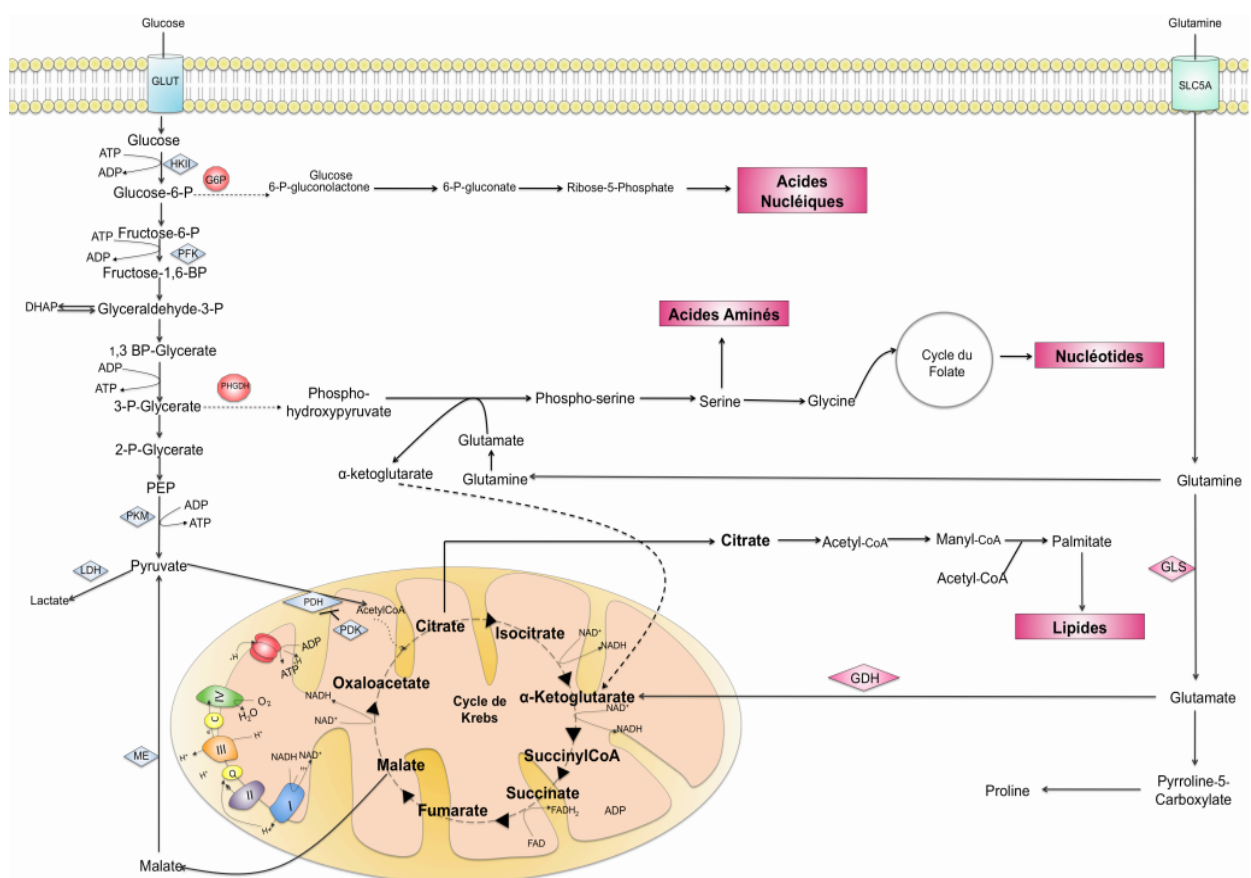


Figure 4 : Récapitulation du métabolisme dans la cellule cancéreuse (PAOLA CORAZAO-ROZAS (2014)).

II-2-5-Glutamine et synthèse protéique

Une cellule cancéreuse a besoin d'une synthèse protéique accrue pour ses besoins prolifératifs, et la glutamine joue un rôle très important (Gonzalez Herrera 2015). La glutamine peut favoriser la synthèse protéique en activant mTORC1 (mammalian target of rapamycin, ou cible de la rapamycine chez les mammifères), une enzyme de la famille des sérine thréonine kinase qui régule la transcription, la biosynthèse des protéines, la croissance et la prolifération cellulaire. La voie

mTORC1 est activée lorsque la concentration intracellulaire en acides aminés est augmentée. Bien que les acides aminés branchés à savoir l'isoleucine, la valine et notamment la leucine aient un rôle prépondérant dans le contrôle de mTOR (Krause 2002), c'est la présence de glutamine qui permet une activation maximale de S6K1 (Krause 2002). La protéine S6K1 est une protéine kinase, qui, lorsqu'elle est activée, phosphoryle la protéine ribosomale S6 de la sous-unité 40S conduisant à la traduction d'ARNm comportant une série de motifs pyrimidines, les 5'TOP (terminal oligopyrimidine tract) ARNm. Ces ARNm constituent une petite famille de transcrits présents en grande quantité dans la cellule, et codent des protéines ribosomales et des composants de l'appareil traductionnel. Ainsi, en contrôlant la traduction des 5'TOP ARNm, mTOR active les processus traductionnels en présence de facteurs favorisant la croissance cellulaire.

Dans les cellules leucémiques de type Jurkat, la privation en glutamine inhibe la phosphorylation de S6K1, indépendamment de la concentration intracellulaire en acides aminés branchés non modifiée (Fumarola 2005). (Les cellules

Jurkat sont une lignée cellulaire immortalisée de lymphocyte TCD4 humain). Une autre étude de la régulation de la voie mTORC1 par la disponibilité en acides aminés a permis de mettre en évidence la sensibilité accrue des cellules de LAM à la privation en glutamine (Willems 2013). Pour sa part, Nicklin montre que la glutamine est indispensable à l'entrée de la leucine dans la cellule par l'intermédiaire de la coopération de deux transporteurs membranaires d'acides aminés, SLC1A5 et le SLC7A5. (Nicklin 2009).

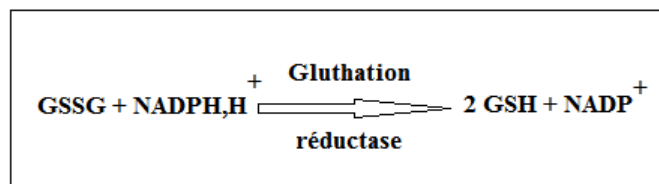
II- 2-6- Glutamine contre le stress oxydatif

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou *Reactive Oxygen Species* et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières provoquant une accumulation de celles-ci. Dans les cellules tumorales, les ROS sont produits par les mêmes sources que dans les

conditions physiologiques qu'elles soient enzymatiques tels que les NADPH oxydase (NOXs), les cycloxygénases (COX), les lipoxygénases,...etc. ou non enzymatiques dont la principale est la mitochondrie du fait de l'activité de la chaîne respiratoire (Murphy 2009) par la fuite d'électrons au niveau de certains sites (Quinlan 2012) qui vont réagir avec l'oxygène présent dans la mitochondrie et forment l'anion superoxyde (O₂⁻). Néanmoins, il y'a augmentation suite à des aberrations d'expression : surexpression des NOX1 dans les adénocarcinomes , des cyclogénases COXs dans le cancer gastrique (Song 2014), des lipoxygénases dans le cancer du colon, ou suite à l'excès d'activité des cellules cancéreuses : l'accentuation significative de la synthèse des protéines en vue de leur prolifération et la maturation de la majorité de celles-ci favorise la production et l'accumulation des ROS. (Gorrini C., 2013).

L'accroissement excessif du taux de ROS peut induire la mort des cellules tumorales par apoptose par provocation d'oxydations irréversibles et de dommages trop importants de molécules clés telle que l'ADN (De Zio D. *et al.*, 2013). La production de ROS doit donc y être régulée pour prévenir la mort cellulaire (Cairns R. *et al.*, 2011) et ce par différents mécanismes d'élimination .

La principale molécule antioxydante dans la cellule est le glutathion (GSH) qui sert de cofacteur à plusieurs enzymes anti oxydantes, telle que la glutathion peroxydase (GPx). Le glutathion est un tripeptide (γ-glutamyl-cystéinyglycine) résultat de la condensation de trois substrats limitants sa synthèse : la cystéine, la glycine et le glutamate issu de la transformation de la glutamine par la glutaminase GSL (Xiang L. *et al.*, 2013). Après son oxydation en glutathion oxydé (GSSG), le glutathion doit être régénéré et cela dépend essentiellement de la disponibilité du NADPH qui apporte le pouvoir réducteur nécessaire pour la régénération du glutathion réduit (GSH), selon l'équation :



La glutamine est fortement associée à la production du NADPH. En effet, la transformation du malate dérivant de la glutamine, en pyruvate au niveau du cytosol est accompagnée par la production du NAPDH (DeBerardinis 2007) .(Figure5)

Par ailleurs, le NADPH sert de cofacteur à la thioredoxyne, qui est un autre système de détoxification très importante dans la cellule (Handy 2012).

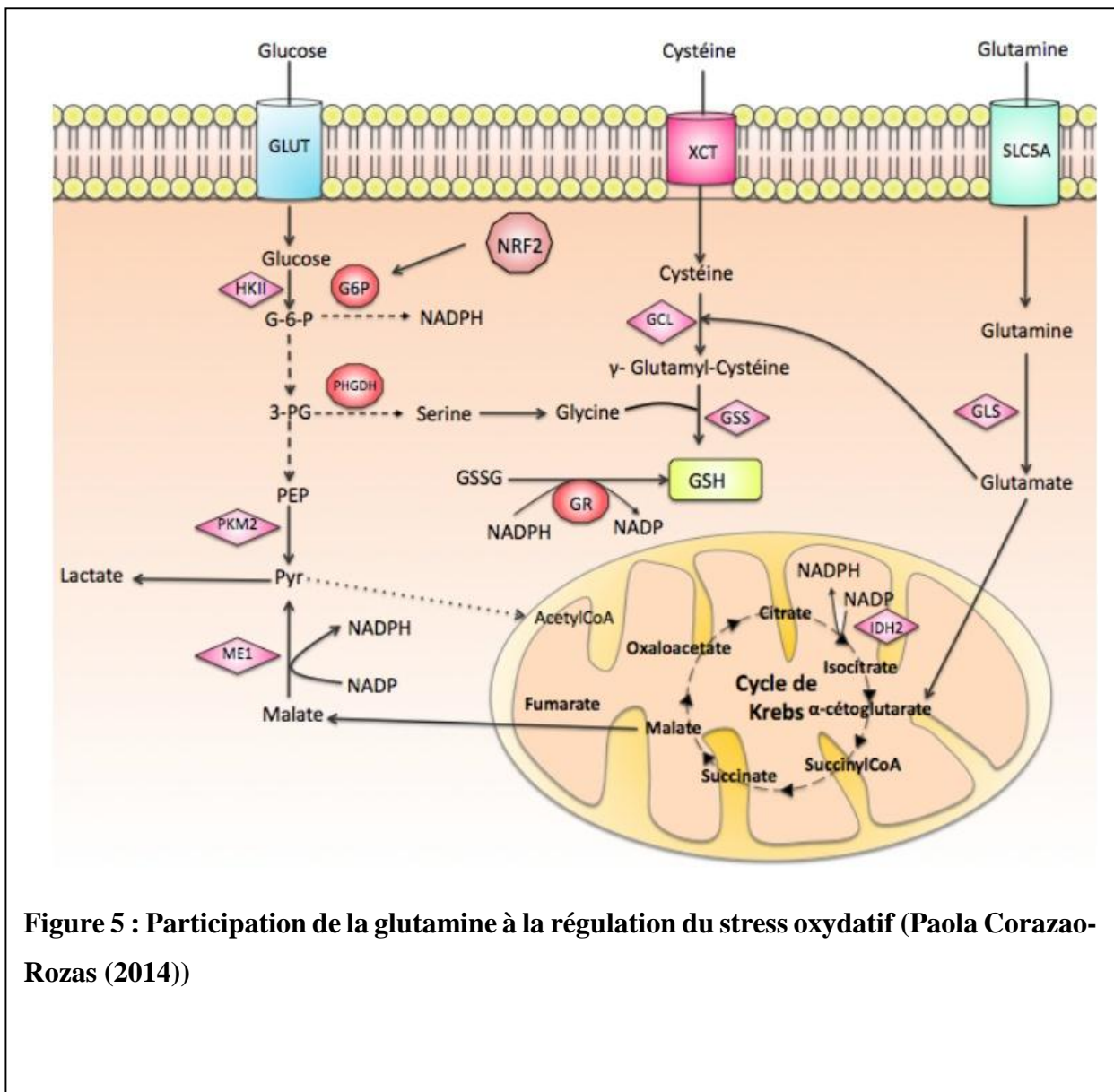


Figure 5 : Participation de la glutamine à la régulation du stress oxydatif (Paola Corazao-Rozas (2014))

II- 3- Addiction de cellules cancéreuses à la glutamine

Les cellules cancéreuses de certains types de cancer sont particulièrement dépendantes de la glutamine qui nourrit leur prolifération et utilisent préférentiellement la glutamine, comme substrat donneur de carbone pour la biosynthèse de macromolécules au lieu du glucose (Le 2012). Ces divergences de métabolisme dépendent du type de tumeur et des anomalies moléculaires sous-jacentes. Différents processus sont impliqués dans l'addiction des cellules tumorales à la glutamine.

II-3-1-Niveau d'expression de la glutamine synthase et des glutaminases

La glutamine est un acide aminé non essentiel synthétisé dans la cellule à partir d'acide glutamique et d'ammoniac en présence d'ATP, une réaction catalysée par une enzyme très répandue, la glutamine synthétase (GS) . Le niveau d'expression des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de la glutamine apparaît être un élément majeur dans la dépendance des cellules tumorales à la glutamine. Des études ont montrées que les tumeurs hépatiques dans lesquelles l'expression de GS est diminuée ont des besoins en glutamine extracellulaire accrus contrairement aux tumeurs hépatiques associées à une augmentation de glutamine synthase (GS) et à une diminution des glutaminases (GLS) qui ont des besoins en glutamine extracellulaires faibles. (Yuneva 2012). Pour sa part, l'étude de la prolifération et de la viabilité cellulaire en réponse à la privation en glutamine dans des lignées de cancer du sein a montré que les lignées de type basal, sensibles à la privation en glutamine, ont une expression faible de GS et élevée de GLS1, contrairement aux lignées de type luminal relativement indépendantes de la glutamine (Kung 2011). Par ailleurs, l'inhibition spécifique de la glutamine synthase supprime la relative indépendance des cellules de type luminal à la glutamine.

II- 3-2- Rôle de c-Myc

Myc est un facteur de transcription qui est activé dans les cellules saines par différents facteurs de croissance. Il se trouve dans la cellule sous forme de proto-oncogène. Mais l'apparition d'une mutation provoque l'activation de cet oncogène. Myc joue un rôle très important dans le métabolisme tumoral. Il peut augmenter l'expression de transporteurs de glucose et de certaines enzymes participant à la glycolyse (Shim 1997) . Cependant, son rôle principal est l'induction de modifications dans l'utilisation de la glutamine (Li 2005). Myc active la transcription de deux transporteurs de haute affinité pour la glutamine : SLC38A5 et SLC1A5, ce qui augmente

la captation de la glutamine (Wise et al., 2008) et favorise l'expression de la glutaminase GLS1 et donc la glutaminolyse (Gao 2009). De cette manière, Myc rend les cellules cancéreuses dépendantes à la glutamine. La privation en glutamine et non en glucose induit l'apoptose dans des cellules cancéreuses transformées par l'oncogène Myc (Yuneva 2007).

Remarque : L'addiction à la glutamine peut varier selon le tissu cellulaire. Il a été montré que l'activation d'un même oncogène peut induire des modifications très hétérogènes d'un type de cancer à l'autre. En ce qui concerne le métabolisme de la glutamine, Myc induit dans les cellules du poumon une forte addiction pour ce substrat, contrairement aux cellules du foie où le métabolisme de la glutamine reste faible (Yuneva 2012).

II- 3-3- Autophagie dans le métabolisme tumoral

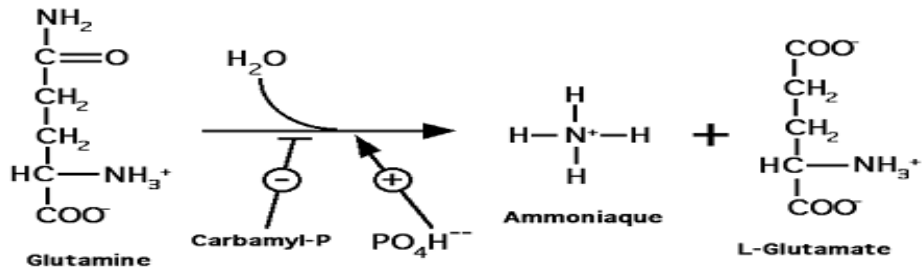
En condition physiologiques, l'autophagie joue un rôle de recyclage dans la cellule lui permettant de se débarrasser des organites endommagés et des protéines aberrantes. Dans les cellules cancéreuses, l'autophagie permet à la cellule l'adaptation aux conditions de stress métabolique et l'obtention de substrat nécessaire à la synthèse de macromolécules. Il a été montré que dans le cancer du poumon, l'autophagie représente la première source de glutamine. L'inhibition de ce processus se traduit par une forte dépendance à son apport externe conditionnant ainsi la prolifération (Strohecker 2013)

II- 4- Approche thérapeutique par la L-glutaminase

L'approche thérapeutique par la L-glutaminase est basée sur le caractère acquis de certains type de cancers dont les cellules deviennent des consommatrices d'un taux élevé de glutamine (Levine 2010). Il s'agit de priver les cellules néoplasiques de la L-glutamine (Lyer 2008).

II- 4-1 - La L- glutaminase

La L-glutaminase (EC.3.5.1.2) est une amidohydrolase qui catalyse la désamination hydrolytique de la L-glutamine induisant la production d'acide L-glutamique et d'ammoniac selon la réaction :



Il s'agit d'une enzyme essentielle pour la synthèse de divers intermédiaires métaboliques azotés.

La L-Glutaminase jouit d'une grande importance en raison de son potentiel d'application dans la thérapie du cancer, comme agent antirétroviral, en industrie alimentaire, Etc.

II- 4-2- Sources de L- Glutaminase

Les L-glutaminases sont synthétisées par différents organismes, plantes, animaux, microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) à la fois du sol et de l'habitat marin dont les actinomycètes (Sarada, K.V., 2013).

II- 4-3- Types de L- glutaminases

La famille d'amidohydrolase qui catalyse la désamination de la glutamine contient deux types de glutaminases :

- Des glutaminases très spécifiques pour la glutamine et catalysent l'hydrolyse de cet acide aminé en acide glutamique (Elshafei 2014).
- Des glutaminases moins spécifiques qui catalysent l'hydrolyse de la L- glutamine en acide glutamique et l'asparagine en acide aspartique. Il s'agit d'amidohydrolases qui ont fait l'objet d'une attention considérable ; certaines sont utilisées dans le traitement de la leucémie, particulièrement la leucémie lymphocytaires aigus (LAL) (Sabu, 2000).

II- 4- 4- Application des L-glutaminases

La L- glutaminase est utilisée pour lutter contre certains cancers en particulier la leucémie lymphoblastique aigue (Kyoko 2004). Il s'avère qu'elle inhibe quatre lignées de cellules tumorales humaines, nommément Hép-G2 [Lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire humain], MCF-7 [Lignée cellulaire de cancer du sein], HCT-116 [Ligne cellulaire du colon] et A549 [Carcinome du poumon humain]. (Rahamat U. 2014).

II- 4-5- Mécanisme d'action de la L- glutaminase

Le maintien de niveaux élevés de la glutamine dans le sang fournit une source de carbone et d'azote prête à être exploitée par les cellules cancéreuses dépendantes de la glutamine extracellulaire pour stimuler la croissance tumorale (Brian 2016).

L'administration de L-glutaminase est suivie d'un épuisement rapide de la concentration de glutamine dans le plasma sanguin en raison de son hydrolyse en acide glutamique et ammoniac. Cette déplétion dans le sérum prive les cellules néoplasiques de leur principale source ce qui induit à terme la mort sélective des cellules tumorales par apoptose , puisque contrairement à celles-ci , le mécanisme de biosynthèse de la glutamine dans les cellules normales fonctionne correctement (Dang 2010).

La privation en glutamine entraîne :

- 1- Une autophagie (Cardaci 2012) .
- 2- l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses (Cardaci 2012).
- 3- L'apoptose dans la lignée cellulaire du cancer du foie, par réduction de GSH, principal antioxydant cellulaire.
- 4- Sensibilité au ligand Fas (Fuchs 2006): la stimulation du récepteur Fas (CD95) exprimé à la surface de nombreux types cellulaires par son ligand physiologique, ou par un anticorps anti-Fas, va induire le recrutement d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique

II-4-6- voie d'administration

La L-glutaminase n'est pas absorbée par voie digestive car elle est détruite par les protéases digestives de part sa nature protéique ,et est administrée par voie intraveineuse.

II-4-7- Inconvénients de l'utilisation de la L- glutaminase en thérapie

Les problèmes rencontrés dans l'application clinique de la L- glutaminase dans le traitement de la leucémie ont été décrits par (Spiers 1979).

L'un des principaux problèmes rencontré dans le traitement par la L -glutaminase est son immunogénicité.

Afin de remédier à cet inconvénient, plusieurs recherches ont été faites :

Jaafar Belgoudi étudie la tentative d'immobilisation de l'enzyme dans le polyéthylène glycol PEG et a constaté que l'enzyme montre une activité optimale sur une plus grande plage de pH (Belgoudi 1999) . Ce procédé appelé PEGylation a été créé par Frank F. Davis au début des

années 80. Il consiste à lier des protéines avec le PEG, par adsorption ou par des liaisons covalentes (Stolnik 1994).

La fonction principale des PEGs est de constituer une barrière entre le vecteur et les opsonines du sang (Owens 2006), un lien qui réduit l'immunogénicité des protéines recombinantes, réduit la phagocytose et par conséquent l'élimination rapide des vecteurs d'où l'augmentation du temps de circulation dans le sang.

La L-Glutaminase et la L-asparaginase sont les premières enzymes PEGylées produites pour l'utilisation thérapeutiques (Davis 2002) proposent une administration extracorporelle de l'enzyme dans la leucémie lymphoblastique aigue via la cavité péritonéale. Cependant, les résultats n'ont pas été aussi satisfaisants.

II- 4-8- Propriétés requises pour une enzyme pour usage thérapeutique

Toute enzyme destinée à un usage thérapeutique doit satisfaire certains critères (Rahamat U. 2014) :

- Etre stable sur le stockage à long terme dans son état purifié.
- Avoir un K_m pour un substrat en dessous de la concentration du substrat dans le sang (avoir un K_m faible).
- Doit être non immunogène ou avoir une faible immunogénicité.
- Avoir une activité enzymatique maximale à pH physiologique.

C'est sur cette dernière optique qu'est basé essentiellement l'objectif de ce travail, celui de la comparaison de l'activité de trois L-glutaminases isolées de souches différentes d'actinomycètes, genre *Streptomyces*.

Chapitre III

Partie expérimentale

III-1- Matériel

III-1-1- Matériel biologique

Souches bactériennes d'actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces* d'eau douce, il s'agit des souches : CA 28, CA30 et CA36.

III-1-1-1- Collecte, isolement et identification

La collecte, l'isolement et l'identification des *Streptomyces* ont été réalisés par l'équipe LABAB (Laboratoire de Biochimie Analytique et de biotechnologies) de l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou en 2015.

Les échantillons d'eau douce ont été recueillis dans les localités de Tikjda (w. Bouira) pour la souche CA28 et de Mekla (Tizi Ouzou) pour les souches CA30 et CA36 .

L'isolement a été effectué sur milieu ISP2, Bennet et Amidon –caséine, additionnés d'acides nalidixiques à 10 µg /ml.

L'identification des souches a été confirmée par la méthode macromorphologique et micro morphologique.

Les souches ont été conservées dans des cryotubes à – 20°C dans du glycérol.

III-1-2-Appareillage

- 1- Incubateur. (Venticell MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Germany).
- 2- Spectrophotomètre visible.(OPTIZEN 322OUV,KOREA) .
- 3- Agitateur magnétique à plaque chauffante. (Stuart.P , SB161 , PRC).
- 4- pH-mètre électronique à précision. (OHAUS, starter 2100, USA) .
- 5- Balance électronique de précision.(OHAUS, PCR).
- 6- Autoclave.(Wise Clave Wisd, KOREA).
- 7- Hotte Cruma.(670, EU).
- 8- Bec Bunsen.
- 9- Micropipettes.

III- 2- Méthodes

III-2-1- Tests préliminaires de la production de L-glutaminase

Les tests préliminaires de la production de L-glutaminase sont réalisés sur milieu MGA (Minimal Glutamine Agar medium) à base de L-glutamine comme seule source de carbone (voir composition en annexe3) selon la méthode semi quantitative décrite par Gulati(1997) modifiée (Gulati 1997).

III-2-1-1- Ensemencement sur gélose MGA

Chacune des suspensions de spores des souches CA28, CA30 et CA36 a été ensemencée sur deux boîtes de gélose MGA contenant du rouge phénol.

Un témoin négatif représenté par une boîte non ensemencée est réalisé pour chacune d'entre elles.

Toutes les boîtes sont incubées à une température de 28°C pendant 8 jours.

III-2-1-2-Ensemencement sur bouillon MGA

La production de L-glutaminase est réalisée sur milieu MGA liquide.

Les souches ont été inoculées dans des erlenmeyers de 100ml contenant chacun 50 ml du milieu de culture. Chacune des suspensions de spores des souches CA28, CA30 et CA36 a été ensemencée dans trois erlenmeyers dont deux contenant du bouillon MGA sans rouge phénol pour la lecture spectrophotométrique, et un avec rouge phénol pour la lecture qualitative des virages colorés au rose prouvant l'activité enzymatique.

Un témoin négatif représenté par un erlenmeyer contenant du bouillon MGA avec rouge phénol non ensemencé est réalisé pour chacune d'entre elles.

III-2-2- Détermination de la localisation de la L- glutaminase et de son activité enzymatique

La détermination de la localisation de la L- glutaminase est une expérience proposée par Monsieur CHERGUI dont les travaux sont en cours de réalisation.

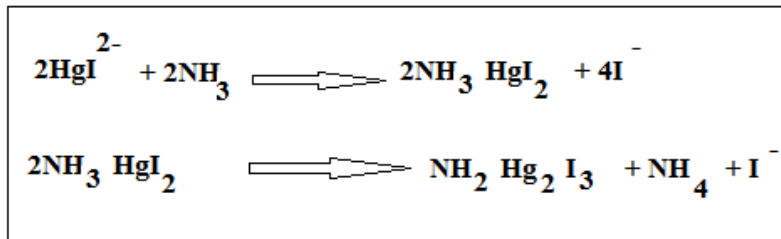
Elle est réalisée par le dosage du taux de NH_4^+ des surnagants des différentes cultures bactériennes dans des conditions expérimentales différentes.

L'activité enzymatique de la L-glutaminase est déterminée par l'estimation de la quantité de Produit NH_3 libéré suite à l'hydrolyse du substrat (la glutamine) par unité de temps en utilisant le réactif de Nessler.(Imada 1973)

III-2-2-1- Dosage de NH_4^+ des surnagants des différentes cultures bactériennes

Le dosage de NH_4^+ libéré par l'action de la L-glutaminase a été réalisé par la méthode modifiée de Imada et *al.*, 1973 utilisant le réactif de Nessler. (Imada 1973)

Principe: Le réactif de Nessler (Iodo-mercure de Potassium alcalin) en présence d'ammoniaque est décomposé avec formation d'iodure de dimercuriammonium $\text{NH}_2 \text{Hg}_2 \text{I}_3$, un complexe orangé qui permet le dosage colorimétrique des ions NH_4^+ selon la réaction:



Le réactif de Nessler signe la présence de NH_4^+ avec une excellente détectabilité.

Le dosage de NH_4^+ des surnageant des différentes cultures bactériennes est réalisé selon les étapes suivantes :

III-2-2-1-1- Préparation du blanc et des témoins négatifs (Selon la proposition de M. CHERGUI dont les travaux sont en cours de réalisation).

Sont préparés :

- Le blanc. Il permet l'étalonnage du spectrophotomètre.
- Témoin, propres à chaque surnageant issu d'une culture bactérienne. Ils permettent de démontrer la localisation de l'enzyme, intracellulaire (donc absente du surnageant) ou extracellulaire (donc présente dans le surnageant).

a). Préparation du blanc

- Verser dans un tube à essai 200µl de milieu MGA dilué au $1/5^e$ (à la place du surnageant).
- Ajouter 500µl de substrat (Glutamine 0.04M Tris).

b). Préparation des témoins négatifs

- Verser dans 3 tubes à essai notés TCA28, TCA30 et TCA36 200µl de surnageant dilué au $1/5^e$ issu des cultures bactériennes des souches CA28, CA30 et CA36 respectivement.
- Ajouter 500µl de tampon Tris HCl (0.5M, pH 7.2).

III-2-1-1-2- Dosage de l'activité L-glutaminase dans les surnageants des cultures

- Verser dans trois tubes notés CA28, CA30, et CA36 200µl de surnageant des cultures bactériennes des différentes souches CA28, CA30 et CA36 respectivement dilué au $1/5^e$.
- Ajouter 500µl de substrat (Glutamine 0.04M dans Tris 0,5M à pH7).

Tous les tubes, témoins et surnageant, subiront simultanément le traitement suivant :

- Incuber 30 minutes à 37°C ou 20 mn au bain marie.
- Ajouter 0.5 ml de HCl (1N) pour arrêter la réaction.

- Prélever de chaque tube 200µl à transvaser vers un autre tube.
- Ajouter 1 ml d'eau distillée.
- Agiter.
- Ajouter à chaque tube 200µl du réactif de Nessler.
- Laisser reposer à l'abri de la lumière 10 minutes.
- Lire les absorbances au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm contre le blanc.

III-2-3- Dosage des protéines totales (Bradford, 1976)

Le dosage des protéines des surnagants des différentes cultures bactériennes sur bouillon MGA est réalisé selon la méthode de Bradford (1976) utilisant la BSA.

Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique permettant de déterminer la concentration en protéine d'une solution.

Principe: La méthode est basée sur l'interaction entre les protéines et le bleu de Coomassie G-250 (BBC). En milieu acido-basique, ce colorant s'adsorbe sur les protéines ce qui induit un déplacement de son pic d'absorption maximale qui passe du rouge (464 nm, forme cationique) au bleu (595nm, forme anionique). (Walker 2002), (Bradford 1976).

III-2-3-1- Réalisation de la courbe étalon

Une courbe étalon est réalisée avec une gamme étalon préparée à partir d'une solution mère de Sérum Albumine Bovine BSA à (0.1mg/l) selon les étapes suivantes :

- Préparer 6 tubes numérotés de 1 à 6 contenant des quantités croissantes de la solution mère de BSA selon les quantités : 0 (le blanc n° 1), 20, 40, 60, 80 et 100µl.
- Ajuster à un volume final de 100µl à l'eau distillée.
- Ajouter 4ml du réactif de Bradford.
- Homogénéiser et laisser reposer pendant 10 à 15 minutes à l'abri de la lumière.
- Mesurer les absorbances à 595nm contre le blanc.
- Tracer la courbe étalon sur Excel.
- Afficher l'équation de la droite de tendance.

L'équation de la droite de tendance permet de déduire les concentrations protéiques des extraits enzymatiques.

III-2-3-2- Dosage des protéines totales des extraits enzymatiques brutes actifs

Le dosage des extraits enzymatiques est réalisé sur les surnageant selon les étapes suivantes:

- Préparer 3 tubes notés CA28, CA30 et CA36.
- Verser dans chacun 100 µl de surnageant des différentes cultures bactériennes.

- Continuer avec un traitement similaire aux tubes de la gamme étalon: ajout de 4ml du réactif de Bradford, homogénéisation, repos pendant 10 à 15 minutes à l'obscurité, puis mesure des absorbances à 595nm.

Chapitre IV

Résultats

et

discussion

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus et leur interprétation.

IV-1- Tests préliminaires de la production de L -glutaminase

IV-1-1- Lecture des ensemencements sur gélose et bouillon MGA

Les figures 6 et 7 montrent les résultats de la culture des souches CA28, CA30 et CA36 sur milieu MGA solide et liquide.

La mise en évidence qualitative de la production de L-glutaminase a été identifiée par le virage coloré de la gélose et du bouillon MGA au rose, preuve de l'alcalinisation du milieu suite à la dégradation de L-glutamine et de production de NH₃. **Figures 6 et 7.**

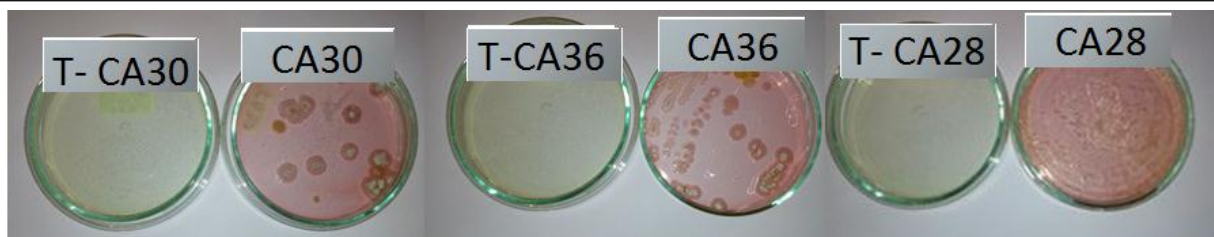


Figure 6: Photos montrant la mise en évidence qualitative de la production de L-glutaminase sur gélose MGA : Les boîtes montrent un virage coloré du milieu MGA vers le rose. La boîte témoin montre la couleur orange originelle du milieu.

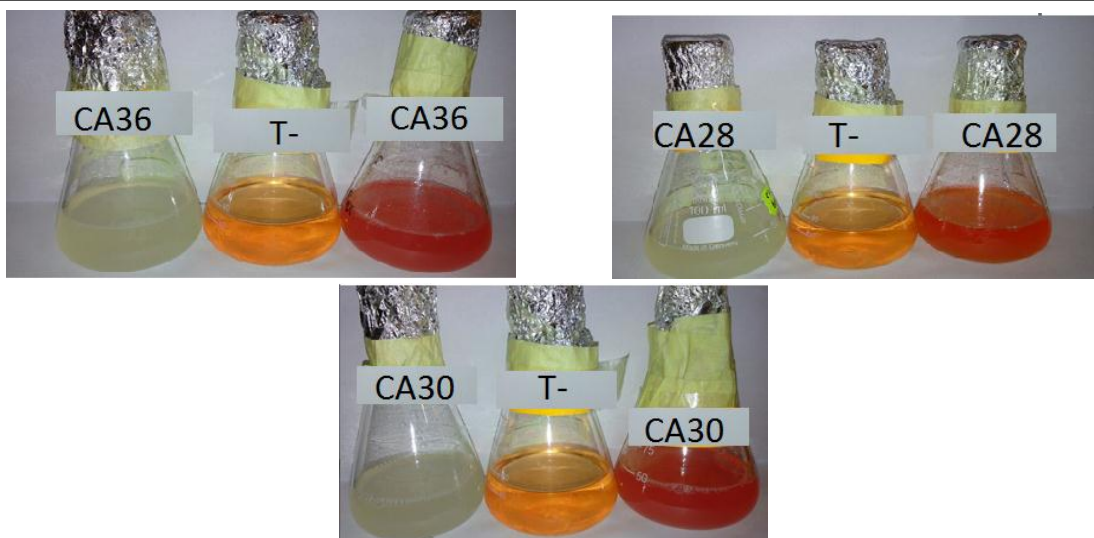


Figure 7: Photos montrant la mise en évidence qualitative de la production de L-glutaminase sur bouillon MGA : Le changement de couleur du milieu MGA au rose par rapport au témoin (orange) témoigne d'une basification du milieu.

Les tests préliminaires réalisés pour la mise en évidence qualitative de la production de L-glutaminase montrent un virage de la couleur du bouillon MGA au rose, le même aspect a été mis en évidence autour des colonies sur milieu solide comparativement aux témoins. Cette réaction positive ou changement de couleur indiquant une alcalinisation du milieu révèle la présence d'une L-glutaminase (Balgurunathan 2010).

Ces résultats concordent avec les résultats de diverses études :

- La production de L-glutaminase par *Penicillium expansum* KGSS08 considéré comme une souche potentielle de production de cette enzyme a été révélée par des zones de diamètre très élevé de couleur rose autour des colonies (Sunil 2010).
- *Streptomyces canarius* a été caractérisé comme producteur de L-glutaminase par la formation d'une zone rose autour des colonies sur milieu MGA (Fifi 2015).
- *Streptomyces sp* est dépisté comme producteur de L-glutaminase sur milieu MGA par virage coloré du milieu au rose (Savitha 2016).

Mais déjà, la croissance sur milieu MGA où la seule source de carbone est la glutamine pour des bactéries chimio-organotrophes telles que les *Streptomyces* est une preuve indéniable de la production de L-glutaminase par les souches CA28, CA30 et CA36.

Et comme la production cellulaire d'une enzyme dépend de sa nature génétique et que chaque enzyme est codée par un gène (Beadle. G. et Tatum E. (prix Nobel 1958), on peut conclure que les souches CA28, CA30 et CA36 sont génétiquement apte à produire la L-glutaminase.

Mais, la mise en évidence de la production de L-glutaminase par virage coloré du milieu ne montre pas si l'enzyme est intra ou extracellulaire, car, même si l'enzyme produite est intracellulaire, le NH₃ libéré suite à la dégradation de la L-glutamine est toxique pour la cellule et sera excrété, d'où l'alcalinisation et le virage coloré du milieu MGA.

Il est donc nécessaire de déterminer la localisation de cette enzyme.

IV-2- Localisation de l'activité L-glutaminase

Réellement, il est difficile de prouver la localisation de l'enzyme, mais cette étape la détermine avec une forte probabilité selon la localisation de l'activité.

IV-2-1-Détermination de la concentration molaire de NH_4^+ dans les surnageants.

Après la mesure des absorbances des surnageants des différentes souches bactériennes, leur concentrations molaires en NH_4^+ est réalisée grâce à l'équation de la droite d'étalonnage tracée préalablement (Annexe 4).

Le tableau I exprime les densités optiques et les concentrations molaires en NH_4^+ obtenues et la figure 8 leur expression graphique.

Remarque: Les surnageants utilisés pour la lecture spectroscopique sont dilués au $1/5^{\text{e}}$. Retrouver leur concentration réelle implique la multiplication des valeurs des concentrations obtenues par l'équation de la droite par le facteur de dilution qui est de 5.

Tableau I : Concentration en NH_4^+ des surnageants.

Tube	Blanc	TCA28	CA28	TCA30	CA30	TCA36	CA36
DO	0,000	0,000	0,478	0,000	0,464	0,000	0,213
Concentration molaire NH_4^+ (mmol/l)	0,000	0,000	2,33	0,000	2,25	0,000	1,45

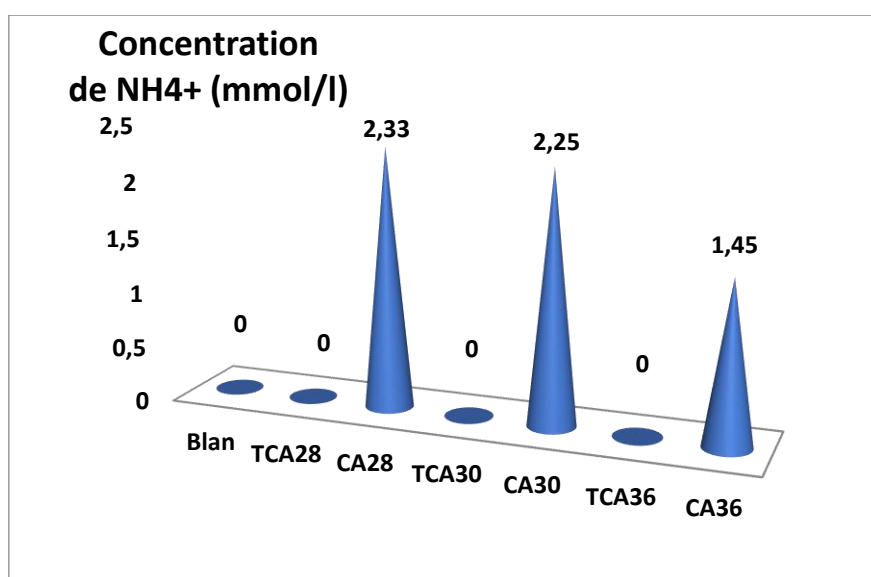
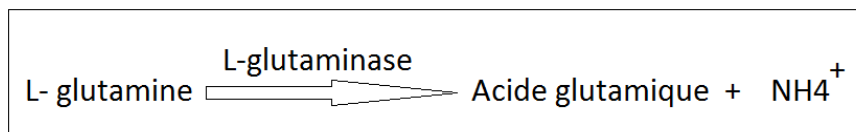


Figure 8 : Représentation graphique de la concentration des surnageants en NH_4^+ .

La comparaison de la concentration en NH_4^+ des témoins incubés en absence du substrat (incubés avec du Tris) par rapport aux surnageants incubés avec le substrat (Gln 0.04M dans Tris 0,5M pH7) montre que pour les trois cultures bactériennes, la concentration molaire en NH_4^+ est plus élevée dans les surnageants des cultures bactériennes CA28, CA30 et CA36 par rapport à leur témoins respectifs. Cela démontre la présence d'une activité enzymatique dans les surnageants qui convertit le substrat représenté par la glutamine en produit, le NH_4^+ selon l'équation :



Les enzymes produites par les trois souches de *Streptomyces CA28, CA30 et CA36* sont présentes dans les surnageants et sont donc extracellulaires (Avec une forte probabilité).

Ces conclusions concordent avec les données de la littérature car les actinomycètes dont les *Streptomyces* sont des sources d'enzymes privilégiées en raison de leur production d'enzymes extracellulaires dont la L-glutaminase (Sunil 2014).

Les souches CA28, CA30 et CA 36 seraient donc potentiellement intéressantes pour une production de L-glutaminase à l'échelle industrielle.

Remarque : la présence de L-glutaminase extracellulaire n'exclut pas la présence de L-glutaminase intracellulaire ou même membranaire, comme chez *Mycobacterium tuberculosis*, un actinomycète non filamenteux.

IV-3- Mesure des activités enzymatiques des L-glutaminase

L'activité enzymatique est la mesure de la quantité de substrat disparu ou la quantité de produit formé par unité de temps.

Elle peut s'exprimer avec deux types d'unités :

- 1- En UI (Unité Internationale) correspondant à la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une micromole de substrat par ml par minute.
- 2- En katal (kat), 1kat correspondant à 1 mole de substrat traitée par seconde.

L'activité enzymatique de la L-glutaminase est déterminée par l'estimation de la quantité du produit NH_3 libéré suite à l'hydrolyse du substrat la glutamine par unité de temps. La libération de NH_4^+ pendant la catalyse a été mesurée en utilisant le réactif de Nessler (Imada 1973).

Une unité internationale de L-glutaminase a été définie comme la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'ammoniaque dans des conditions optimales (Sabu, 2000) .

Le surnagent des différentes cultures bactériennes a été utilisé comme extrait enzymatique (Singh 2013).

On mesure l'activité enzymatique dans les surnageants selon la formule :

$$\text{Nombre de moles de Produit } (\mu\text{mol}) \text{ par ml/ volume (ml) } \times \text{ temps (mn)}$$

Sachant que :

- 1- Temps d'incubation = 30 mn.
- 2- Température : 37°C
- 3- pH 7,2
- 4- Volume utilisé 200 μ l = 0,2ml.

Les valeurs des activités enzymatiques des différents surnageants sont données par le tableau II et la figure 9 leur représentation graphique.

Surnagent de la souche	CA28	CA30	CA36
Concentration molaire NH_4^+ ($\mu\text{mol/ml}$) des	2,33	2,25	1,45
Activité enzymatique UI/ml	0,39	0,37	0,24

Tableau II : Activités enzymatiques dans les différents surnageants.

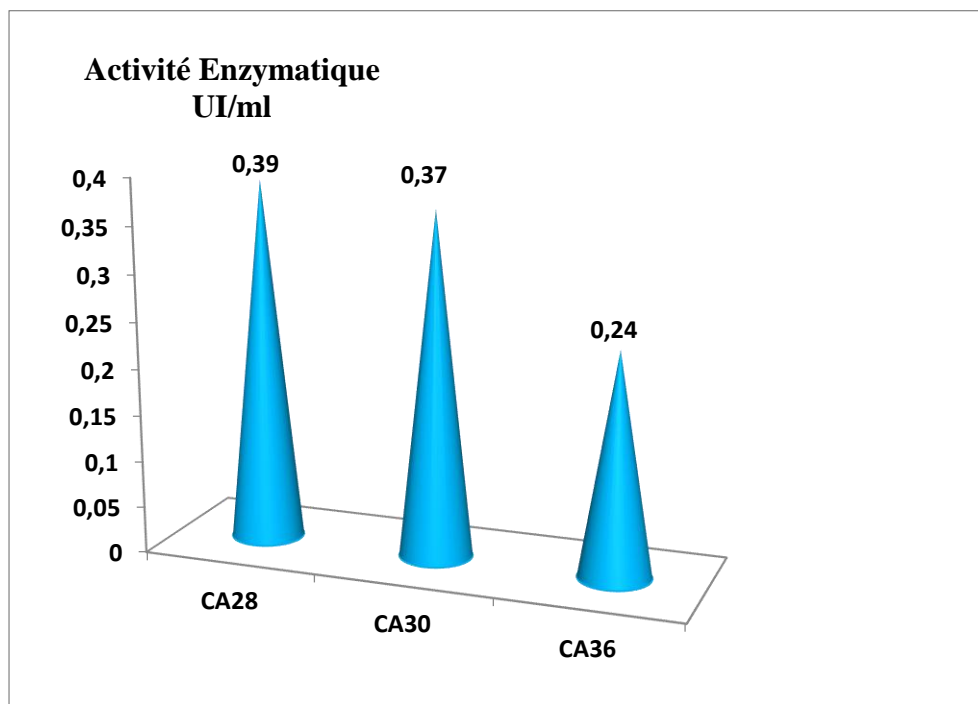


Figure 9 : Représentation graphique des activités enzymatiques des surnageants.

Les trois souches bactériennes CA28, CA30 et CA36 ont exprimé des activités enzymatiques allant de 0.24 UI/ml à 0.39 UI/ml.

La plus grande activité enzymatique a été enregistrée par la L-glutaminase du surnageant CA28 et est de 0.39 UI/ml, suivie de près par celle du surnageant CA30 égale à 0.37 UI/ml, puis par celle de la L-glutaminase de CA36 avec une activité enzymatique de 0.24 UI/ml, moins que les précédentes.

La comparaison des activités enzymatiques enregistrées avec des activités enzymatiques de L-glutaminases issues de *Streptomyces* d'autres travaux de recherche sur la L-glutaminase montre ce qui suit : Les activités enzymatiques des L-glutaminases de CA28, CA30 et CA36 avoisinent l'activité maximale de L-glutaminase de *Streptomyces avermitilis* de 0.74 μ mole/ml (soit 12.61 μ g/ml) avant optimisation et sur milieu MGA où la glutamine est la seule source de carbone et d'azote (l'activité ayant été mesurée par μ g ammoniacque produit par 1 ml de milieu) (Abdallah 2013), mais s'écartent de la valeur de l'activité L-glutaminase produite par *Streptomyces Variabilis ASU319* dans les mêmes conditions avant optimisation de 10.58 μ mol/ml soit 180 μ g/ml des résultats obtenus par Balagurunathan *et al* (2010).

Les valeurs des activités enzymatiques des L-glutaminases issues des souches CA28, CA30 et CA36 sont donc faibles.

IV- 4- Dosage de la protéine totale

La mesure de la quantité de protéine totale dans les surnageants des cultures bactériennes a été réalisée par la mesure des absorbances des surnageants des différentes souches bactériennes, puis la détermination de leurs concentrations molaires en protéine grâce à l'équation de la droite d'étalonnage tracée préalablement.

Le tableau III exprime les densités optiques et les concentrations en protéines obtenues et la figure 10 une comparaison graphique des concentrations en protéines.

Tableau III: Concentration en protéine totale des surnageants.

Souche bactérienne	CA28	CA30	CA36
DO du surnageant	0.118	0.076	0.068
Concentration en protéine (mg/ml)	0,017	0,010	0,009

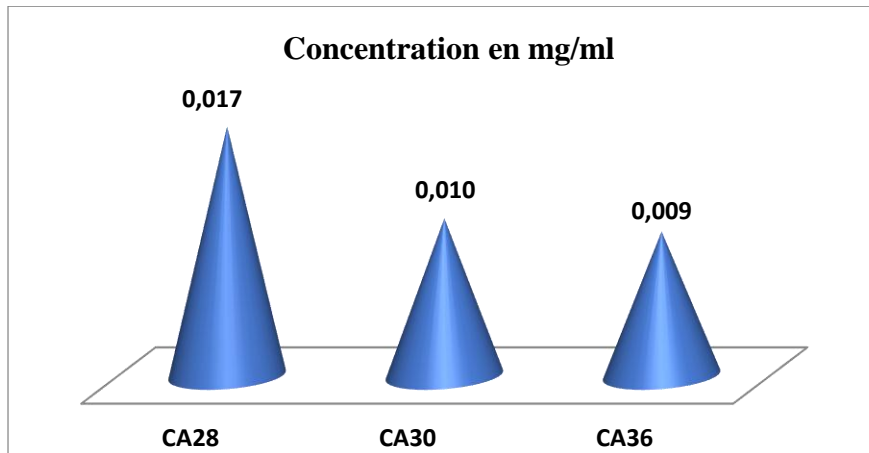


Figure 10 : Représentation graphique des concentrations en protéine des surnageants.

La souche CA28 est la plus productrice de protéines à raison de 0.017 mg/ml, suivie des souches CA30 et CA36 avec 0.010 mg/ml et 0.009 mg/ml respectivement. La production de protéine suit la même cadence que les activités enzymatiques et est faible.

Les valeurs des activités enzymatiques faibles enregistrées sont donc en rapport direct avec le taux également faible de protéine obtenu dont la L-glutaminase puisque l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en enzyme.

Pourquoi ce taux faible en protéines et particulièrement en L- glutaminase ?

La production d'une enzyme dépend certes de la nature génétique du microorganisme, mais aussi des paramètres physicochimiques (pH, t°), des composants du milieu de culture, de leur concentration,...etc.

L'activité enzymatique de la L-glutaminase de *Streptomyces sp* isolé du sol est de 32.5UI/ml mais le milieu de culture contient en plus de la glutamine, du glucose comme source de carbone et du peptone (Savitha 2016).

La L-glutaminase de *Streptomyces avermitilis* a montré une activité à 28°C de 12.48 U/ml et une production de 3.79 mg/ml de protéine, et celle de *Streptomyces labedae* de 12.10 U/ml dans des milieux contenant du glucose comme source de carbone en plus de la glutamine (Nagwa 2012).

D'après la même étude , le glucose a été la source de carbone qui a montré le plus de production de L-glutaminase par *Streptomyces avermitilis* et *Streptomyces labedae* (Nagwa 2012).

Les souches de *Streptomyces CA28*, *CA30*, et *CA36* cultivées sur milieu minimum MGA où la seule source de carbone et d'azote est la glutamine ont enregistré des activités enzymatiques basses, donc une production de L-glutaminase basse.

Les souches cultivées dans des milieux où, en plus de la glutamine est ajouté le glucose comme source de carbone présentent des activités enzymatiques plus élevées, donc une production de L-glutaminase plus élevée.

Les paramètres physico-chimiques ont également un rôle très important dans la production de L-glutaminase :

Les conditions optimales (pH et T°) de production de L-glutaminase varient très étroitement selon la souche productrice (Usha-Kiranmayi, 2013).

D'après Savitha S. Desai, la production de L-glutaminase par *Streptomyces sp* isolé du sol était dépendante du pH, et une petite variation de pH changeait le taux de production. Le pH optimum était très important pour maximiser le rendement de la production de L- glutaminase et a été défini par pH7 (Savitha 2016).

Ces résultats sont confirmés par plusieurs études faisant entrer en jeu d'autres paramètres encore :

- *Serratia marcescens* (entérobactérie) montre une production maximale de L- glutaminase à pH 7.34, une température de 36 .31°C, du galactose à 40.20g/l et de la glutamine à 19.09g/l Suresh Kumer (2013).

- La production maximale de L-glutaminase par *Vibrio azureus* (Gram négatif) de 247 U/ml a lieu à pH 8, à une température de 37 °C, dans un milieu à base d'eau de mer , 2% de concentration en glutamine (Kiruthika J. 2013).

- Streptomyces sp*. SBU1 requiert pour la production de L-glutaminase un pH initial de 9,0 et une température de 30 ° C (Krishnakumar S. 2011).

- Streptomyces olivochromogenes* marine avait une production optimale à pH 7, une température de 30 °C et 3.5% de salinité pendant 5 jours sous agitation à 120 tr / min (Balgurunathan 2010).

Étions-nous au cours de la culture des souches CA28, CA30 et CA36 dans des conditions optimales de pH, de température et de composition du milieu ?

Les souches CA28, CA30 et CA36 ont été cultivé à pH initial de 7. Pendant la culture, la production de L- glutaminase et donc de NH₃ a alcalinisé le milieu de culture d'où changement de pH dans un milieu de culture fermé de 50ml de volume.

Ce changement de pH n'a-t-il pas atteint négativement la production de L-glutaminase ?

Les souches CA28, CA30 et CA36 sont intéressantes du fait de leur production extracellulaire de L-glutaminase.

L'optimisation des conditions de culture pour atteindre de hauts rendements est une étape incontournable pour décider de la potentialité d'une exploitation à grande échelle.

IV- 5- L'activité spécifique

L'activité spécifique mesure le nombre de micromoles converties par unité de masse enzymatique en mg.

$$AS = AE / C$$

Le tableau IV montre les activités spécifiques obtenues et la figure 11 leur représentation graphique comparative.

Tableau IV : Valeurs des activités spécifiques des différentes L-glutaminase.

Surnagent de	CA28	CA30	CA36
Activité enzymatique AE (U/ml)	0,39	0,37	0,24
Concentration en protéine C (mg/ml)	0,017	0,010	0,009
Activité Spécifique AS (U/mg)	22,94	37	26,66

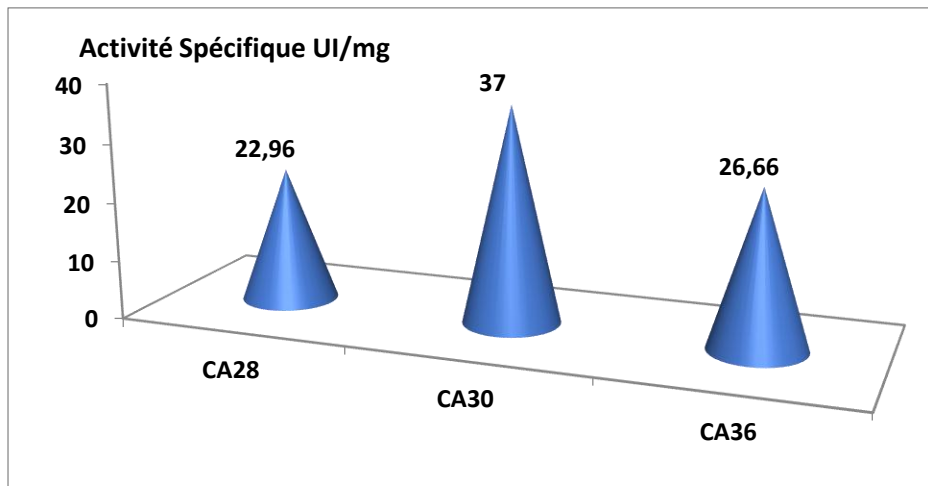


Figure 11 : Représentation graphique comparative de activités spécifiques des L-glutaminase issues des souches CA28, CA30 et CA36.

La L-glutaminase issue de la souche CA30 présente l'activité spécifique la plus élevée avec 37 UI/mg, suivie de la L-glutaminase issue de la souche CA28 avec une activité spécifique de 22,96 UI/mg et enfin la L-glutaminase issue de la souche CA36 avec une activité spécifique de 26,66 UI/mg.

Et comme en général, l'activité spécifique augmente au cours de la purification, ces enzymes seraient un candidat potentiel pour une étude plus poussée.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Cette étude a été réalisée en vue de comparer l'activité enzymatique de trois L-glutaminase produites par trois souches de *Streptomyces* d'eau douce.

On a mis en premier lieu en évidence la capacité des souches choisies à produire l'enzyme L-glucosidase. Puis, on a recherché la localisation de l'enzyme par la recherche de l'activité enzymatique dans les surnagents, et enfin, calculé l'activité enzymatique des différentes enzymes.

Les activités enzymatiques enregistrées vont de 0,24 UI/ml à 0,39UI/ml.

La L- glutaminase issue de la souche CA28 est celle qui a montrée l'activité enzymatique la plus élevée de 0,39 UI/ml suivie de près par l'activité enzymatique de la glutaminase issue de la souche CA30 avec une activité de 0,37 UI/ml. La L- glutaminase ayant enregistrée l'activité la plus basse est celle de la souche CA 36 avec 0,24 UI/ml. La comparaison des valeurs obtenues avec celles des activités enzymatiques enregistrées dans des travaux similaires ont montré qu'elles sont faibles. Cela est en rapport étroit avec la faible production de protéines dont la L-glutaminase, production en relation également avec les paramètres physicochimiques du milieu de culture, sa composition, la concentration des différents composants ,

Le but final de l'étude des L-glutaminases est de voir leur action sur des cellules néoplasiques. La détermination de l'intérêt des L-glutaminases des souches CA28 , CA30 et CA36 en thérapie enzymatique anticancéreuse doit passer par l'optimisation, la purification puis l'essai sur des cellules néoplasiques, à pH physiologique, étapes obligatoires qui décideront de leur potentialité.

Références

Bibliographiques.

Abdallah Nagwa Ahmed , S.K AMER, M.K.Habeeb, (2013). Production purification and characterization of L-glutaminase enzyme from *Streptomyces avermitilis*. Afr J Microbiol

Al-Zarban, S. S., Al-Musallam, A.A., Abbas,I., Stackebrandt,E.,Kioppenstedt,R.M. (2002). *Saccharomonospora halophila* sp.nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. Int J Sys Env Microbiol, 52: 555-558.

Alauzet, C. (2009). Taxonomie des bactéries anaérobies: de la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes.Thèse doc: université Nancy. Pp: 348.

Alexander, M. (1977).Introduction to soil Microbiology.Krieger Publishing Company, Malabar: 467-468.

Amanullah A, Jüsten P., Davies A., Paul GC., Nienow AW., Thomas CR.(2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. Biochem Eng J. Jun 1;5(2):109-114.

Balagurunathan ,M.Radhakrishnan, S.T and al (2010). L glutaminase producing actinomycetes from marine sediments selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain . Aust J Basic appliSCivol.

Belgoudi, J. (1999). Poly (Ethylene Glycol)-Bovine Serum Albumin Hydrogel as a Matrix for Enzyme Immobilization.In Vitro Biochemical Characterization. Journal of Bioactive and Compatible Polymers January vol. 14 no. 1 31-53.

BenAmeur , M. (2006). Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97strain. ProcessBiochemistry,41(7),1506–1513.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein-dye binding.Annals of Biochemistry, 72:248-254.

Brian, J. A., Zachazy,E.Stine ., Chi, V. Dang (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy.Nature Reviews Cancer 16, 619–634.

Cairns, R. A, Harris, I, McCracken, S., and Mak, T.W. (2011). Cancer cell metabolism. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 76, 299–311.

Cardaci, S.; Rizza, S.; Filomeni, G.; Bernardini, R.; Bertocchi, F.; Mattei, M.; Paci, M.; Rotilio, G.; Ciriolo, M.R. (2012). Glutamine deprivation enhances antitumor activity of 3-bromopyruvate through the stabilization of monocarboxylate transporter-1. Cancer Res. 72, 4526–4536.

Chun J., Bae K.S., Moon E.Y., Jung S.O., Lee H.K. and Kim S.J. (2000). *Nocardiosis kunsanensis* sp.nov., a moderately halophilic actinomycete isolate from a saltern. Int.J.Sys.Ev.Microbiol., 50.1909- 1913.

- 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.
- Dang, C. (2010). Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen. *Cell Cycle*. (19):3884-6.
- Davis, F. (2002). The origin of peganology. *Adv Drug Deliv Rev* 54 (4), 457-458.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19345–19350.
- De Zio, D., Cianfanelli, V., and Cecconi, F. (2013). New insights into the link between DNA damage and apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 559–571.
- Dgigal D. (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp: 157.
- Djaballah, C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 73 p.
- Elshafei AM, Hassan MM, Ali NH, et al. (2014). Purification, kinetic properties and antitumor activity of L-glutaminase from *Penicillium brevicompactum* NRC829. *British Micro Res J.* 4:97–115.
- Fuchs, B.C.; Bode, B.P. (2006). Stressing out over survival: Glutamine as an apoptotic modulator. *J. Surg. Res.* 131, 26–40.
- Fumarola, C., La Monica, S., Guidotti, G.G., 2005. Amino acid signaling through the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: Role of glutamine and of cell shrinkage. *J. Cell. Physiol.* 204, 155–165.
- Gao, P., Tchernyshyov, I, Tsung-Cheng C., and al (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762-765.
- Ghanem, N.B., Sabry, S.A, El-Sherif, Z.M., Abu El-Elal, G.A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol*, 46(3): 105–111.
- Gonzalez Herrera, K.N.; Lee, J.; Haigis, M.C. (2015). Intersections between mitochondrial sirtuin signaling and tumor cell metabolism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2015, 50, 242–255.
- Goodfellow, M., Williams S.T., (1983). Ecology of actinomycetes. *Annuals Review of Microbiology* (37): 189-216.

Gorrini, C., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947.

Gottlieb, D. (1973). General consideration and implication of the Actinomycetales. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Edited by G.Sykes and F.A.Skinner. Academic Press, London, New York.

Gross, M.I.; Demo, S.D.; Dennison, J.B.; Chen, L.; Chernov-Rogan, T.; Goyal, B.; Janes, J.R.; Laidig, G.J.; Lewis, E.R.; Li, J.; et al. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 13, 890–901.

Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Handy, D.E., and Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1323–1367.

Imada A., Igarasi S., Nakahama K. and Isono M., (1973). Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.*, 76: 85-99.

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*. *J Bacteriol* , 185 (4): 1455–1458.

Kitouni, M., B and al (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Med Mycol*, 15 (1):45-51.

Kovacević, Z., (1971). The pathway of glutamine and glutamate oxidation in isolated mitochondria from mammalian cells. *Biochem. J.* 125, 757–763.

Krause, U., Bertrand, L., Maisin, L., Rosa, M., Hue, L., (2002). Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 269, 3742–3750.

Kung, H.-N., Marks, J.R., Chi, J.-T., (2011). Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS Genet.*

Kyoko, K., Hroakin, AnY an al (2004). Glutaminase, its gene and a method of producing it. U.S.Patent.Pat.No.6830905B2.

Lakshmipathy D. T., K., K (2009). A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* sp. isolated from Saltpan environment. *Am J Infect Dis.* 5 (3): 207-213.

Lamari L., 2006. Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

- Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* 4, 113-121.
- Larpent J. J., (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens, ed : Tec et Doc, pp 280.
- Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Zhang, H., Zimmerman, L.J., Liebler, D.C., Slebos, R.J.C., Lorkiewicz, P.K., Higashi, R.M., Fan, T.W.M., Dang, C.V., (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* 15, 110–121.
- Le Minor, L., Veron, M. (1989). *Bactériologie médicale*. 2ème édition. Médecine. Sciences Flammarion.
- Lechevalier, H. A., Lechevalier, M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: *The prokaryotes*, Vol. 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), Springer – Verlag, Berlin. p. 1915–1922.
- Levine, A.J., Puzio-Kuter, A.M., (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340–1344.
- Li, F., Wang, Y and al (2005). Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis . *Mol. Cell. Biol.* 25, 6225–6234.
- Lian Chen, Hengmin Cui. (2015). Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *Int.J.Mol.Sci.* 16, 22830-22855.
- Lise Willems, (2012). Implication de la glutamine dans l'activation de m TORC1 dans les leucémies aiguës myéloïdes et inhibition ciblée. Thèse Doctorat. Université René Descartes.
- Loucif, K. (2010). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaires de molécules bioactives. P22.
- Iyer P, Singhal, R.S (2008). Production of glutaminase (E.C.3.2.1.5) from *Zygosaccharomyces rouxii*: Statistical optimization using response surface methodology. *Bioresour Technol* 99:4300-4307.
- Mariat, F., Sebald M. (1990). Les actinomycètes. Dans : *Bactériologie médicale*. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- Matés, J.M.; Segura, J.A.; Alonso, F.J.; Márquez, J. (2006) Pathways from glutamine to apoptosis. *Front. Biosci.* 11, 3164–3180.
- Mazzio, E.A., Boukli, N., Rivera, N., Soliman, K.F.A., (2012). Pericellular pH homeostasis is a primary function of the Warburg effect: inversion of metabolic systems to control lactate steady state in tumor cells. *Cancer Sci.* 103, 422–432.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V.E., MacKeigan, J.P., Porter, J.A., Wang, Y.K., Cantley, L.C., Finan, P.M., Murphy, L.O., (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521–534.

Okada, T., Tanaka, K., Nakatani, F., Sakimura, R., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Nakamura, T., Oda, Y., Tsuneyoshi, M., and Iwamoto, Y. (2006) Involvement of P-glycoprotein and MRP1 in resistance to cyclic tetrapeptide subfamily of histone deacetylase inhibitors in the drug-resistant osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells *International journal of Cancer* . 118, 90.

Olano C, Méndez C, Salas JA. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis (2009). *Nat Prod Rep*. 26:628–660.

Owens DE, Peppas NA. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 307(1): 93-102.

PAOLA CORAZAO-ROZAS. (2014).Thèse doctorat. Exploitation du métabolisme mitochondrial oxydatif dans l'eradication du mélanome métastatique. Université de lille 2 droit et santé.

prescott, l., harley,j.p., klein d.a. (1995). microbiologie tomme II. De Boeck, Bruxelles.PP 506-517.

Qing, G.; Li, B.; Vu, A.; Skuli, N.; Walton, Z.E.; Liu, X.; Mayes, P.A.; Wise, D.R.; Thompson, C.B.; Maris, J.M. ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. (2012).*Cancer Cell* , 22, 631–644.

Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I. V, Treberg, J.R., Ackrell, B. A, and Brand, M.D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem*. 287, 27255–27264.

Rahamat U. , M. Sudhakar, A. and al., (2014). A Review on biochemical and therapeutic aspects of glutaminase . *Unissa et al, IJPSR*, 2014; Vol. 5(11): 4617-4634.

Rangaswani G., Bagyaraj D.J. Bagyaraj D.G. (2004). *Agricultural Microbiology PHI*:New Delhi.Pp:440.

Rhee K.H., Choi K.H., Kim C.J. and Kim C.H. (2001) Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-335 producing antibiotic substance inhibitory to VRE (vancomycin-resistant enterococci). *J. Micribiol. Biotechnol*, 11: 469–74. Sabu, A., Keerthi TR and al (2000). "L-glutaminase production by marine *Beauveria* sp. under solid fermentation." *Process Biochemi*. 35:705–705.

SARADA, K.V. (2013). Production and applications of L- glutaminase using fermentation technology. *Asia Pacific Journal of Research*, volume I, Issue: VIII.

Shim, H., Dolde,C and al (1997). c-MYC transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth..*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 6658–6663.

Solanki R. Khanna M. Lal R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol* ; 48: 410- 431.

Song, J., Su, H., Zhou, Y.-Y., and Guo, L.-L. (2014). Cyclooxygenase-2 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 59, 436–445.

SAFFROY Sophie.,(2006). Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. *thèse doctorat*. INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE.

Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., and LLeonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.* 12, 376–390.

Speirs AS, Wade HE. 1979. Bacterial glutaminase in treatment of acute leukaemia. *Br. Med. J.* 1:1317–1319

Stolnik SE, Dunn, M.C. Garnett, M.C. Davies, A.G.A. Coombes, D.C. Taylor, M.P. Irving, S.C. Purkiss, T.F. Tadros, S.S. Davis and L. Illum. (1994) Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm. Res.* 11: 1800–08.

Strohecker , A. M., Guo, J.Y and al (2013). Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors.. *Cancer Discov.* 3, 1272–12

Thadikamala S, Reddy SP (2011) Modeling the effect of glutamine, aeration and agitation regimes on production of L- glutaminase in stirred tank reactor using *Bacillus subtilis* RSP-glu. *International Journal of Industrial Biotechnology*: 27-33.

Van de Sande, W. W. (2013). Global burden of human mycetoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(11) : e2550. .

Walker, J. M. (2002). *The protein protocols handbook*. 2eme édition Humana Press (USA), P. 1146.

Willems, L., Jacque, N., Jacquet, A., Neveux, N., Maciel, T.T., Lambert, M., Schmitt, A., Poulain, L., Green, A.S., Uzunov, M., et al. (2013). Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* 122, 3521–3532.

Williams D.E., Bombuwala K., Lobkovsky E., Dilip de Silva E., Karunaratne V., Allen T.M., Clardy J. and Andersen R.J. (1998) Ambewelamides A and B, antineoplastic epidithiapiperazine derivatives isolated from the lichen *Usnea* sp. *Tetrahedron Lett.* 39: 9579–9582.

Wise, D.R., Thompson, C.B.(2010) . Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 35, 427–433.

Witte, D., Ali, N., Carlson, N., Younes, M.,(2002). Overexpression of the neutral amino acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 22, 2555–2557.

Xiang, L., Xie, G., Liu, C., Zhou, J., Chen, J., Yu, S., Li, J., Pang, X., Shi, H., and Liang, H. (2013). Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2996–3005.

Yuneva , M., O., Fan,T;W.M and al (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* 15, 157–170.

Yuneva , M., Zamboni,N and al (2007). "Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* 178, 93–105.

Zhdanov, A., V; Waters, A,H and al (2014). "Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 51–62.

ANNEXES

Annexe 1 : Listes du matériel et réactifs utilisés.

1-Verrerie

- Béchers.
- Erlenmeyer 100ml, 500ml.
- Pipettes graduées
- Flacons
- Tubes à essais stériles.
- Boites en verre
- Cuvettes

2-Réactifs et colorants, autres

- Solution de sérum albumine bovine (BSA) à 0,1mg/ml.
- Rouge Phénol
- AcideNalidixique
- Réactif de Nessler
- Réactif de Bradford
- Glutamine

3-Milieus de culture

- Milieu MGA agar
- Bouillon MGA

Annexe 2: Composition du tampon Tris et de la solution mère (NH₄)₂SO₄

Tampon Tris 0.5M pH 7.2

- Tris.....60.57g
- H₂O.....1000ml
- HCl 1N

Solution mère 1M de (NH₄)₂SO₄

- (NH₄)₂SO₄.....0.132g
- H₂O.....1000ml

Annexe 3: Composition des milieux de culture utilisés

Milieu MGA Agar

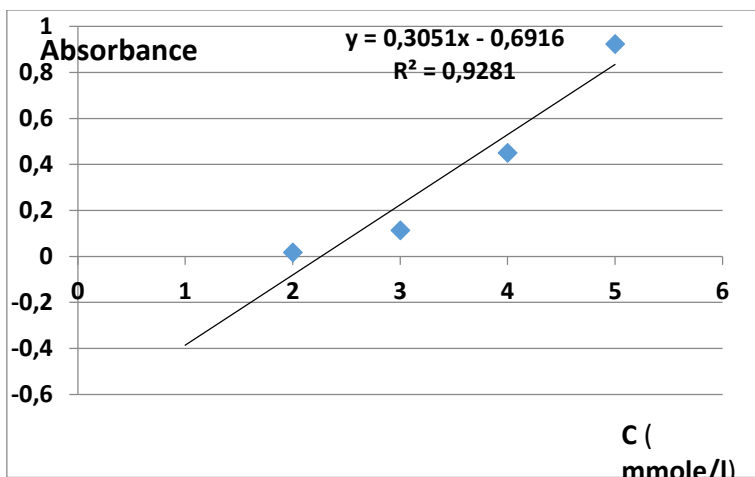
- KCL.....0.5g
- MgSO₄, 7H₂O.....0.5g
- KH₂PO₄.....1g
- FeSO₄.....0.1g

- ZnSO4.....0.1g
- NaCl.....0.5g
- Acidenalidixique10µg/ml
- Agar.....0.9%
- Rouge Phénol.....1ml/l
- Glutamine10g
- H2O1000ml

Bouillon MGA

- KCL.....0.5g
- MgSO4, 7H2O.....0.5g
- KH2PO4.....1g
- FeSO4.....0.1g
- ZnSO4.....0.1g
- NaCl.....0.5g
- Acide nalidixique 10µg/ml
- Rouge Phénol.....1ml/l
- Glutamine10g
- H2O1000ml

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de NH4⁺



Résumé

La L-glutaminase est une enzyme utilisée en thérapie enzymatique anti cancéreuse. La recherche d'une enzyme extracellulaire, avec des propriétés compatibles à une utilisation thérapeutique humaine est recherchée dans le monde entier ;

Mais une enzyme destinée à un usage thérapeutique doit satisfaire certains critères dont une activité enzymatique satisfaisante à pH physiologique.

L'objectif de cette étude a été la comparaison des activités enzymatiques de trois L- glutaminase issues de trois souches de *Streptomyces* d'eau douce sur milieu riche en glutamine.

La production de l'enzyme par les différentes souches a été mise en évidence sur milieu MGA et leur localisation extracellulaire a été déterminée par la recherche de son activité dans les surnagants.

Les activités enzymatiques obtenues sont faibles ; la L-glutaminase issue de la souche CA28 a enregistré la plus grande valeur de 0,39UI/ml suivi des L- glutaminases des souches CA30 et CA36 avec 0.37 UI/ml et 0,24 UI/ml respectivement.

Parallèlement, la production en protéine suit la même cadence et est proportionnelle aux activités enzymatiques enregistrées.

L'activité enzymatique étant proportionnelle à la concentration en enzyme, le taux faible de protéines produit dont la L- glutaminase explique les valeurs basses des activités enzymatiques enregistrées, taux en rapport avec les conditions de culture non optimisées.

Mots clés : *Streptomyces*, activité enzymatique, extracellulaire.

Summary

L-glutaminase is an enzyme used in anti-cancer enzymatic therapy. The search for an extracellular enzyme, with properties compatible with human therapeutic use, is sought throughout the world.

However, an enzyme intended for therapeutic use must satisfy certain criteria including a satisfactory enzymatic activity at physiological pH.

The objective of this study was to compare the enzymatic activities of three L-glutaminases from three strains of freshwater *Streptomyces* on a medium rich in glutamine.

The production of the enzyme by the different strains was demonstrated on MGA medium and their extracellular localization was determined by the search for its activity in the supernagants.

The enzymatic activities obtained are low; L-glutaminase from strain CA28 recorded the highest value of 0.39 IU / ml followed by L-glutaminases of strains CA30 and CA36 with 0.37 IU / ml and 0.24 IU / ml respectively.

At the same time, protein production follows the same rate and is proportional to the enzymatic activities recorded.

Since the enzymatic activity is proportional to the enzyme concentration, the low level of product

proteins in which L-glutaminase explains the low values of the enzymatic activities recorded, in relation to the non-optimized culture conditions.

Key words: Streptomyces, enzymatic activity, extracellular.