

MINISTRE 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 :

Melle .BOUDEHANE Asma
Melle. MEZIOUD Rosa

Thème

*Caractérisation physico-chimique d'enzymes bactériennes d'intérêt
industriels et thérapeutiques.*

Soutenu le : 01/07/2017

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M.REMINI H.</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M.CHERGUI A.</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M KADRI N.</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2016/2017

Table des matières

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique.....	4
Chapitre I : Les enzymes bactériennes : des outils biologiques pour l'industrie	4
I. 1. Des enzymes présentant des caractéristiques spéciales pour des applications biotechnologique.....	5
I. 1.1. Les protéases	5
I. 1.1.1. Source bactérienne des protéases.....	5
I. 1.2. Les kératinases.....	5
I. 1.2.1. Source bactérienne des kératinases.....	6
I. 1.3. Les amylases.....	6
I. 1.3.1. Source bactérienne des amylases.....	6
I. 1.4. Les xylanases.....	7
I. 1.4.1. Source bactérienne des xylanases.....	7
I. 1.5. Les enzymes ligninolytiques.....	7
I. 1.5.1. Laccase.....	7
I. 1.5.2. Lignine peroxydase.....	8
I. 1.5.3. Peroxydase à manganèse (MnP).....	8
I. 1.5.4. Source bactérienne des enzymes ligninolytiques.....	8
I. 1.6. Les cellulases	8
I. Source bactérienne des cellulases.....	9
I. 1.7. Autres enzymes bactériennes	9
Chapitre II: Les amidohydrolases: Glutaminase et Arginine deiminase.....	12
II. 1. La glutaminase.....	12
II. 1.1. Définition.....	12
II. 1.2. Source et origine de L-glutaminase.....	12
II. 1.3. Structure de L-glutaminase.....	13
II. 1.4. Classification de L'enzyme L-glutaminase.....	14
II. 1.5. Applications de la L-glutaminase.....	14
II. 1.5.1. Applications thérapeutiques.....	14

a) La glutaminase dans la leucémie aigue lymphocytaire (ALL).....	14
b) Mécanisme d'action	15
c) La glutaminase dans le VIH.....	15
II. 1.5.2. Applications de la glutaminase dans l'industrie alimentaire.....	15
II. 1.5.3. Applications analytiques.....	15
a) La l-glutaminase comme biocapteur.....	15
b) Fabrication de produits chimiques fins.....	16
II. 2. L'arginine deiminase.....	16
II. 2.1. Définition.....	16
II. 2.2. Source et origine.....	16
II. 2.3. Structure.....	17
II. 2.4. Domaine d'application.....	17
II. 2.4.1. Activité anti-tumoral.....	17
Partie expérimentale.....	19
Matériel et méthodes.....	19
I. 1. Matériel.....	19
I. 1.1. Matériel biologiques.....	19
I. 1.2. Appareillage.....	19
I. 2. Méthodes.....	19
I. 2.1. Dosage sur milieu solide par la méthode de diffusion des puits	19
I. 2.2. Dosage de l'activité enzymatique de la l-glutaminase et la l-arginine deiminase sur milieu liquide.....	20
I. 2.3. Maximisation de l'activité enzymatique de la l-glutaminase et la l-arginine deiminase	21
I. 2.4. Test de sensibilité aux enzymes protéolytiques.....	22
Résultat et discussion.....	24
II. 1. Dosage sur milieu solide par la méthode de diffusion des puits.....	24
II. 2. Dosage de l'activité enzymatique de la l-glutaminase et l-arginine deiminase sur milieu liquide.....	27

II. 3. Maximisation de l'activité enzymatique de la l-glutaminase et l-arginine deiminase.....	29
II. 4. Test de sensibilité aux enzymes protéolytiques.....	36
Conclusion.....	41

Références bibliographiques

Annexes

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a guidé sur le droit chemin et nous donner le courage, la force et la patience d'achever ce travail qui a été réalisé au Laboratoire de Biochimie et a la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la terre, Université de Bouira.

En premier lieu nous tenons à exprimer toute reconnaissance et respect a M.CHERGUI A. non seulement pour nous avoir encadrées tout le long de ce travail avec enthousiasme et dynamisme mais aussi pour ses précieux conseils scientifiques, critiques constructives, ses encouragements et son parfait sens de la responsabilité.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury : le président M.REMINI H. Et l'examineur M.KADRI N. pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de l'examiner et d'enrichir le débat par leurs propositions.

Nos remerciements s'étendent également aux enseignants de la spécialité Biochimie de l'université de Bouira qui nous ont énormément aidés et en particulier Mme.BENSMAIL S. pour son aide et sa gentillesse.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'encontre de tous nos collègues de promotion.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire : nos amis pour leurs conseils, nos proches pour leur soutien.

Dédicace

A mes chers parents

Rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et bien être, afin que je puisse poursuivre mes études et réaliser mes objectifs.

Mon plus vif espoir est de vous voir à mes cotés le plus long possible. Je vous dois tout, veuillez trouver dans ce modeste travail, le témoignage de mes profonds sentiments.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive

A mon cher frère KHALED et ma petite sœur chérie RIHAM

Vous m'avez toujours soutenue dans le pire et dans le bon et de ma profonde tendresse que je vous souhaite une vie plein de bonheur et que dieu vous protège et vous garde.

A la mémoire de mon GRAND-PERE et ma GRANDE MERE

J'aurais tant aimé que vous soyez présents, que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde

A tous les membres de ma famille petits et grands

Je vous exprime à travers ce modeste travail mes sentiments d'amour et d'affection et exceptionnellement à ma chère cousine RYMA je vous remercie énormément pour votre fraternité si sincère.

A mes amies d'éternité ROSA, KAOUTHAR et CHAHINAZ

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et ma sincère gratitude.

A tous mes collègues de promotion

En particulier ceux qui ont toujours a mes cotés LYZA, LATIFA, TIZIRI et AHLEM

*Une spéciale dédicace a cette personne qui compte
Énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup
D'amour, tendresse et de respect*

A toi OUSSAMA

A tous mes amies

A tous ceux que j'aime.

ASMA

Dédicace

A mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous vos sacrifices depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte, Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

*A mon grand cher frère **MADJID**, qui m'est le père, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

*A mon frère **YACINE**, son épouse **KARIMA** et leur petite fille **RAHAF**, pour leur appui et leur encouragement durant toutes mes études.*

*A mes sœurs adorables **KARIMA**, **DJEJIGA**, **DJAMILA** et **MALIKA** pour leurs encouragements permanents, leur soutien moral, tendresse et amour.*

*A mes adorables nièces et neveux **ASMA**, **GHILAS**, **TILILI**, **RABIAA**, **FARJ ALLAH**, **SOFIANE**, **BOUAZIZ** que j'aime énormément, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.*

*A mes amies de toujours **ASMA**, **NASSIMA**, **AATIKA**, **LATIFA**, **KAOUTHAR** et **CHAHINAZ**, En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

A mes beaux parents que j'aime tellement et leur famille petits et grands.

*Une spéciale dédicace a mon mari **MOHAMMED***

*Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal
Que dieu te garde pour moi et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour fidèle.*

A tous ceux qui me sont chers.

ROSA

RESUME

La présente étude a porté sur une caractérisation biochimique de la glutaminase et de l'arginine deiminase dont l'intérêt est proprement industriel et thérapeutique car elles sont reconnues comme ayant une activité anti tumorale puissante avec des applications dans différents domaines industriels, ces enzymes sont largement distribuées dans des micro-organismes comprenant les levures, les champignons et particulièrement les bactéries, ce travail est basé sur la recherche de l'activité enzymatique des deux enzymes ; dans différents extraits bactériens de souche d'actinomycètes préalablement identifiées ; par certaines méthodes notamment le dosage qualitatif et quantitatif sur milieu MGA et MGA modifié dans lequel ont été caractérisées comme des enzymes extracellulaires avec des activités maximales de 19,643 UI et 15,904 UI dans l'extrait O8F pour l'arginine deiminase et la glutaminase respectivement ainsi que dans le dosage sur milieu liquide par Nesslerization dans lequel ont donné des coloration intenses prouvant leurs localisation extracellulaire avec des activités maximales de 0,0298 UI et de 0,0162 UI pour la glutaminase et l'arginine deiminase respectivement dans l'extrait I2. Les conditions d'activité des enzymes ont été étudiées tel que l'effet du pH et de température pour lesquels l'activité maximale de la glutaminase a été observée a 80°C et a pH 7,0 et a 4°C et a pH 5,0 pour l'arginine deiminase.

Au final la caractérisation a été complétée par le test de sensibilité aux enzymes protéolytiques (Trypsine et Pepsine) dans lequel la glutaminase a été apparue plus résistante a leurs effets sur les chaines d'acides aminés Lys-Arg par apport a l'arginine deiminase qui a été moins résistante.

Mots clés : Glutaminase, Arginine deiminase, Actinomycètes, milieu MGA, Nesslerization, Enzymes protéolytiques.

Abstract

The present study focused on a biochemical characterization of glutaminase and arginine deiminase, which are of a purely industrial and therapeutic interest because they are recognized as having powerful anti-tumor activity with applications in different industrial domains, these enzymes have largely to distribute in microorganisms comprising yeasts, fungi and especially bacteria, the work is based on the enzymatic activity of the two enzymes; in different bacterial extracts of actinomycetes strain previously identified; By certain methods in particular the qualitative and quantitative assay on MGA medium and MGA modified medium in which have been characterized as extracellular enzymes with maximum activities of 19,643 IU and 15,904 IU in the O8F extract for arginine deiminase and glutaminase respectively as well as in the assay on liquid medium by Nesslerization gave intense staining confirming their extracellular localization with maximal activities of 0.0298 IU and 0.0162 IU for glutaminase and arginine deiminase respectively in the I2 extract. Enzymes were optimized by studying the effect of pH and temperature at which the maximum activity of glutaminase was observed at 80 ° C and at pH 7.0 so that it is heat-resistant, at 4 ° C and at pH 5.0 for arginine deiminase.

Finally, the characterization was completed by the sensitivity test to proteolytic enzymes (Trypsin and Pepsin), in which the glutaminase was found to be more resistant to their effects on the Lys-Arg amino acid chains than to arginine deiminase which was less resistant.

Key words: Glutaminase, Arginine deiminase, Actinomycetes, MGA medium, Nesslerization, Proteolytic enzymes.

Liste des abréviations

AD: Arginine Deiminase

AT: Amidinotransferase

ASS: Argininosuccinate Synthétase

AL : Argininosuccinate Lyase

ALL: Leucémie Lymphoblastique Aigue

AE : Activité Enzymatique

ADS modifié: Asparagine Dextrose Salt Agar Modifié

DDAH: Dimethylargininase

HCC: Carcinome Hépatocellulaire

IUBMB: International Union of Biochemistry and Molecular Biology

MIR : Remplacement Isomorphe Multiple

MGA : Minimal Glutamine Agar

MnP : Peroxydase dépendant du Manganèse

PG: Protéine Glutaminase

Qsp : Quantité suffisante pour

RTA : Reverse Transcriptase Activity

TCA : Acide Trichloroacétique

UI : Unité International

VIH: Virus de l'immunodéficience Humaine

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau montrant un aperçu de certaines enzymes microbiennes présentant des caractéristiques particulières d'importance industrielle	9
Tableau II: valeurs des diamètres des zones de Glutaminase et Arginine deiminase.....	25
Tableau III : Résumé des résultats des activités enzymatiques pour les différents extraits bactériens pour l'enzyme L-glutaminase.....	26
Tableau IV : Résumé des résultats des activités enzymatiques pour les différents extraits bactériens pour l'enzyme L-arginine deiminase.....	26
Tableau V : Effet du pH 5 sur l'activité enzymatique de la glutaminase.....	29
Tableau VI: Effet du pH 7 sur l'activité de la glutaminase	29
Tableau VII : Effet du pH 3 sur l'activité de la glutaminase	29
Tableau VIII : Effet du pH 5 sur l'activité enzymatique de l'arginine deiminase.....	30
Tableau IX: Effet du pH 7 sur l'activité enzymatique de l'arginine deiminase.....	30
Tableau X : Effet du pH 3 sur l'activité enzymatique de l'arginine deiminase	31
Tableau XI: L'activité enzymatique de la glutaminase à 50 °C	32
Tableau XII: L'activité enzymatique de la glutaminase à 27 °C	32
Tableau XIII : L'activité enzymatique de la glutaminase à 4°C.....	33
Tableau XIV : L'activité enzymatique de la glutaminase à 80 °C.....	33
Tableau XV: L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 50°C	34
Tableau XVI : L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 27 °C	34
Tableau XVII: L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 4 °C	34
Tableau XVIII: L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 80 °C	34
Tableau XIX: Sensibilité de la glutaminase a la pepsine	39
Tableau XX: Sensibilité de la glutaminase a la trypsine	39

Tableau XXI: Sensibilité de l'arginine deiminase a la pepsine	39
Tableau XXII: Sensibilité de l'arginine deiminase a la trypsine	40

Liste des figures

Figure 01 : Les domaines d'applications des enzymes	4
Figure 02: L'hydrolyse enzymatique de la L-glutamine par la L-glutaminase	12
Figure 03: La structure globale d'une molécule de PG mature.....	13
Figure 04 : L'hydrolyse enzymatique de la l-arginine par l'arginine deiminase.....	16
Figure 05 : La structure globale de l'enzyme arginine deiminase de l'espèce <i>Mycoplasma arginini</i>	17
Figure 06 : Schéma résumant le test de sensibilité aux protéases, réalisé par la méthode de diffusion des puits.....	23
Figure 07: Activité de la L-arginine deiminase dans les extraits bactériens I2 et 14 sur milieu MGA modifié	24
Figure 08: Activité de la L-arginine deiminase dans les extraits bactériens 5 et O8F sur milieu MGA modifié.....	24
Figure 09: Activité de la L-glutaminase dans les extraits bactériens I2 et 14 sur milieu MGA.....	25
Figure 10 : Activité de la L-glutaminase dans les extraits bactériens 5 et O8F sur milieu MGA	25
Figure 11 : L'effet du pH sur l'enzyme L-glutaminase.....	30
Figure 12 : L'effet du pH sur l'enzyme L-arginine deiminase.....	31
Figure 13 : L'effet de Température sur l'enzyme L-glutaminase.....	33
Figure 14 : L'effet de température sur l'enzyme L-arginine deiminase	35

Figure 15 : Activité de la L-glutaminase dans l'extrait 5 en présence de la trypsine et de la pepsine.....	36
Figure 16 : L'activité enzymatique de la glutaminase dans l'extrait I2 seul et en présence de la trypsine.....	36
Figure 17 : Activité de la L-glutaminase dans l'extrait 14 en présence de la trypsine... ..	37
Figure 18 : Activité de la L-glutaminase dans l'extrait 14 en présence de la pepsine	37
Figure 19 : Activité de la L-glutaminase dans l'extrait I2 en présence de la pepsine.....	37
Figure 20 : Activité de l'arginine deiminase dans l'extrait 5 en présence de la pepsine et de la trypsine.....	38
Figure 21 : Activité de la L-arginine deiminase dans l'extrait I2 en présence de la trypsine.....	38
Figure 22 : Activité de la L-arginine deiminase dans l'extrait 14 en présence de la trypsine.....	38
Figure 23 : Activité de L-arginine deiminase dans l'extrait I2 et 14 en présence de la pepsine.....	39

Liste des annexes

Annexe 1 : La localisation des enzymes L-glutaminase et L-arginine deiminase en fonction de l'intensité des colorations.

Annexe 02 : Composition des réactifs.

Annexe 03 : Listes du matériel et réactifs utilisés.

Annexe 04 : Composition des milieux de culture utilisés.

Annexe 05 : Calcul des activités enzymatiques de la glutaminase et de l'arginine deiminase sur milieu solide et liquide.

Synthèse bibliographique

Introduction générale

La vie dépend d'une série bien-orchestrée de réactions chimiques basées sur des catalyseurs que nous appelons maintenant des enzymes, pour accélérer considérablement les taux de ces réactions chimiques. La puissance catalytique des enzymes facilite les processus vitaux dans pratiquement toutes les formes de vie des virus aux humains (Copeland, 2004).

En effet, certains organismes, à l'aide d'enzymes, peuvent dégrader des composés se trouvant dans leur environnement, et ce caractère peut être utilisé par certaines industries dans différents domaines.

À l'heure actuelle, on connaît près de 4 000 enzymes, et parmi celles-ci, environ 200 types d'origine microbienne sont utilisés commercialement. Cependant, seulement une vingtaine d'enzymes sont produites sur une échelle véritablement industrielle. La demande mondiale d'enzymes est satisfaite par environ 12 grands producteurs et 400 petits fournisseurs. Près de 75% des enzymes totales sont produites par trois sociétés enzymatiques de premier plan: Novozymes Danemark, Dupont aux Etats-Unis et Roche en Suisse. Le marché est très concurrentiel, à de faibles marges bénéficiaires et est technologiquement intensif (Li et al., 2012).

Ces entreprises rivalisent principalement sur la base de la qualité des produits, la performance, l'utilisation des droits de propriété intellectuelle et la capacité d'innover. Les plus grands consommateurs d'enzymes industrielles sont l'Amérique du Nord et l'Europe, bien que la chine, le japon et l'inde connaissent une augmentation rapide de la demande d'enzymes, ce qui reflète la taille et la force des économies de ces pays (Adrio and Demain, 2014).

Le marché des enzymes globales est actuellement dominé par les hydrolases, en particulier les protéases, ainsi que les amylases, les cellulases et les lipases fournies soit sous forme de concentrés liquides, soit sous forme de poudres ou de granules libérant l'enzyme soluble lors de la dissolution (Robinson, 2015).

En outre, les industries utilisent des microorganismes qui produisent des enzymes conformément à leurs objectifs commerciaux et en particulier les bactéries qui constituent des modèles uniques pour des recherches sur la stabilisation des biomolécules lorsqu'elles sont soumises à des conditions extrêmes, elles offrent une multitude d'applications réelles ou potentielles dans divers domaines de la biotechnologie, plusieurs d'entre eux produisent des composés non seulement d'intérêt industriel, mais ils possèdent également des propriétés

physiologiques utiles qui ont la faculté de faciliter leur exploitation à des fins thérapeutiques (EDDISON, 2013).

Le problème majeur associé à l'application des enzymes dans les procédés industriels est le coût. La production d'enzymes à grande échelle est un procédé à forte intensité capital et l'application d'enzymes dans différents procédés de fabrication influence indirectement le coût du produit fini (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Une grande partie du cout annuel d'exploitation d'une enzyme est attribué aux matériels et à l'installation. Cependant, 28% du cout d'exploitation est imputé aux matières premières (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Il est toujours possible d'en produire des enzymes avec des cellules animales ou végétales mais les techniques utilisées sont longues, difficiles, fastidieuses et variables durant l'année. En effet, la culture de cellules animales est très complexe et elle ne se fait généralement qu'en petites quantités. Les cellules animales sont longues à faire croître et les conditions de cultures sont très coûteuses. Pour ce qui est des cellules végétales, il est possible d'en produire en grandes quantités à l'aide de cultures maraîchères mais comme la majorité des pays du monde ont des saisons assez variables, les changements de température ne permettent pas une production stable durant toute l'année. C'est pourquoi la recherche sur la production d'enzymes s'effectue surtout au niveau des microorganismes, dont leurs besoins sont faciles à combler et l'extraction des enzymes se fait plus facilement (Chenel, 2005).

La plupart des enzymes utilisées par l'industrie sont dérivées de sources bactériennes qui offrent de nombreux avantages techniques par rapport à la culture de tissus animales, comme la facilité de la manipulation génétique et le coût de production plus faible. La plupart des bactéries productrices d'enzymes sont à Gram-positif comme *Bacillus* sp. Et ils produisent une grande quantité d'enzymes industrielles importantes (Chenel, 2005).

En raison de cette grande importance biotechnologique occupée par les enzymes bactériennes au niveau mondiale que nous avons exploité dans le présent travail l'objectif de caractériser quelques enzymes bactériennes d'intérêt industriel et thérapeutique.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés dans notre démarche expérimentale sur des protocoles simplement réalisables dans le but d'avoir le maximum de données concernant l'enzyme Glutaminase et Arginine Déiminase a partir d'extraits enzymatiques brutes issus de cultures bactériennes connues comme productrices d'enzymes industrielles.

Ainsi, autour de cet objectif général s'articulent les points suivants:

Introduction générale

- Mise en évidence qualitative et quantitative des activités enzymatiques :
Glutaminase, Arginine Déiminase.
- Maximisation de l'activité enzymatique dans différentes conditions physico-chimiques de pH et Température.

Chapitre I

Les enzymes bactériennes : des outils biologiques pour l'industrie

Les enzymes microbiennes sont préférées par rapport aux sources végétales et animales en raison de leur production économique, de leur consistance, de la facilité de leur modification, et leur optimisation. Ils sont relativement plus stables que les enzymes issus de végétaux ou d'animaux. De plus, ils offrent une plus grande diversité d'activités catalytiques, et la plupart des enzymes utilisées actuellement dans l'industrie sont d'origine microbienne (Barredo, 2005).

Environ 200 enzymes sont commercialisées dans le marché. Parmi ces enzymes, 130 sont utilisées dans des procédés industriels, dont moins de 30 représentent plus de 90 %. Il existe un grand nombre d'enzymes spécifiques qui jouent un rôle important dans les processus physiologiques (digestion, conduction nerveuse, synthèse d'hormones, etc.), ainsi que dans plusieurs processus industriels à savoir ; l'industrie agroalimentaire : jus, lait, paille, plats cuisinés..., l'industrie pharmaceutique (antibiotiques, vitamines ...), les industries de nettoyage (traitement d'eau, détergents, lessives) (Gassara, 2012).

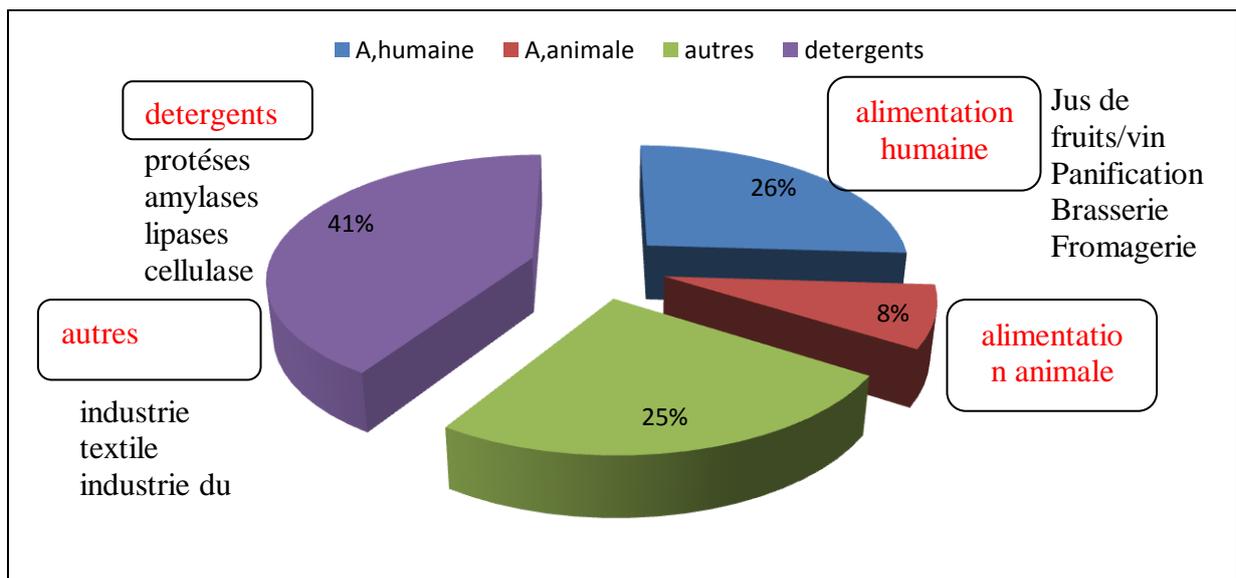


Figure 01 : Les domaines d'applications des enzymes (Gassara, 2012)

Les enzymes bactériennes sont les plus utilisées du fait que les bactéries peuvent croître plus rapidement que les espèces fongiques et ont donc un potentiel dans les applications industrielles (Gopinath et al., 2015).

I. 1. Des enzymes présentant des caractéristiques spéciales pour des applications biotechnologiques

Pour leur intérêt et leur applications industrielles et commerciales, des caractéristiques particulières des enzymes, sont exploitées notamment: La nature thermophile, la stabilité de l'activité enzymatique à une gamme variée de température et de pH, et d'autres conditions de réaction rudes (Nigam, 2013).

I. 1.1. Les protéases

Parmi les enzymes hydrolytiques, un groupe d'enzymes les plus importantes et les plus étudiées, les protéases microbiennes. Elles appartiennent à la classe d'hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique (Hadjer and Hayet, 2015).

Les protéases microbiennes peuvent être des protéases acides, neutres ou alcalines, en fonction de leur pH optimal pour l'activité et les sites actifs, dont les protéases alcalines sont stables dans un pH alcalin et possèdent un résidu de sérine sur le site actif. Parmi les diverses protéases, les sérine-protéases alcalines ont les applications les plus grandes et les plus étendues dans l'industrie (Vijayalakshmi et al., 2011).

I. 1.1.1. Source bactérienne des protéases

Les protéases peuvent être produites par les bactéries, les moisissures et les levures et celles d'origine bactériennes sont essentiellement de la subtilase, produite par *Bacillus Subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résistante à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Hadjer and Hayet, 2015).

Les bactéries psychotropes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *P.putida* produisent des métallo-protéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages (Wassila, 2006).

I. 1.2. Les kératinases

Les kératinases [EC3.4.21 / 24 / 99.11] sont des protéases Capables de dégrader la scléroprotéine kératine. Elles sont fabriquées uniquement en présence d'un substrat contenant de la kératine. Elles attaquent principalement sur les liaisons disulfure (-S-S-) du substrat de kératine (Sahni et al., 2015).

Ces enzymes sont très prometteuses du point de vue biotechnologique, puisqu'elles pouvaient être appliquées pour traiter les déchets contenant de la kératine

provenant des industries de la plume et de la volaille et pour améliorer la valeur nutritive des farines de plumes (Selvam, 2012).

I. 1.2.1. Source bactérienne des kératinases

Les souches bactériennes isolées connues pour dégrader la kératine ou produire la kératinase sont principalement composées de *Bacillus* ; incluant *B. subtilis* et *B. licheniformis*, bien que d'autres bactéries, y compris *Lysobacter* à gram-positif, *Kocuria*, et *Microbacterium*. Par ailleurs, un certain nombre de bactéries Gram négatif comme *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter* et *Nesterenkonia* a peut également dégrader la kératine (Gopinath et al., 2015).

En plus, quelques espèces thermophiles et extremophiles appartenant aux genres *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus* et *Nesternokia* ont également été décrites comme des producteurs de kératinase. En outre, les actinomycètes du genre streptomycètes, à savoir *S.fradiae*, *S.pactum*, *S.albidoflavus*, *Sthermoviolaceus* SD8 et *S.graminofaciens*, et le genre de thermoactinomycètes, à savoir *T.candidus*, sont communément décrit comme dégradeurs de la kératine avec une capacité d'agir sur une grande variété de substrats, y compris la kératine des cheveux, de la laine et des plumes (Selmane and Billel, 2014).

I.1.3. Les Amylases

L' α -amylase (E.C.3.2.1.1) est une enzyme hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1, 4-glycosidiques internes dans l'amidon pour donner des produits tels que le glucose et le maltose. C'est un métallo enzyme à calcium (Sundarram and Murthy, 2014).

I.1.3.1. Sources bactérienne des amylases

L' α -amylase peut être produite par différentes espèces de microorganismes, mais pour des applications commerciales, l' α -amylase provient principalement du genre *Bacillus*. Les α -amylases produites à partir de *Bacillus licheniformis*, de *Bacillus stearothermophilus* et de *Bacillus amyloliquefaciens* trouvent une application potentielle dans un certain nombre de procédés industriels tels que dans les industries de l'alimentation, de la fermentation, du textile et du papier. Les enzymes amylase des espèces *Bacillus* présentent un intérêt particulier pour les procédés biotechnologiques à grande échelle en raison de leur thermostabilité remarquable et parce que des systèmes d'expression efficaces sont disponibles pour ces enzymes (Souza, 2010).

I.1.4. Les Xylanases

Les xylanases appartiennent essentiellement au groupe d'enzymes hydrolase, précisément aux glycosides hydrolases, La classification par glycoside hydrolase ou par famille de glycoside hydrolase a placé la xylanase dans deux familles GH10 et GH11 dont les enzymes végétales, fongiques et bactériennes comprennent la famille GH10 (Chakdar et al., 2016).

La fonction principale de ces enzymes est d'hydrolyser l'hémicellulose, un type de fibre contenue dans la paroi des cellules végétales. Au cours de ces réactions d'hydrolyse, un des composants des hémicelluloses, la β -1,4-Xylane, s'hydrolyse en xylose, un ose simple (Cook, 1998).

I.1.4.1. Sources bactérienne des xylanases

Une recherche de micro-organismes produisant des niveaux élevés d'une activité de xylanase à un pH alcalin et à une température élevée conduit à l'isolement de plusieurs souches bactériennes comme : *Bacillus spp*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Rhodothermus marinus*, *Micrococcus sp*, *Streptomyces roseiscleroticus*. La bactérie anaérobie stricte thermophile *Caldocellum saccharolyticum* possède des xylanases avec des activités optimales à des valeurs de pH 5,5 et 6,0 et à une température de 70 ° C. Mathrani et Ahring (1992) ont remarqués que la xylanase de *Dictyoglomus sp* dispose d'un optimum d'activité à une température de 90°C et à Ph 5.5 (Subramaniyan and Prema, 2000).

La xylanase a de multiples applications biotechnologiques pour diverses industries, mais la majeure application de ces enzymes, est confinée dans les pâtes et papiers, les combustibles, l'alimentation et dans les industries boulangères et à un moindre étendue dans les produits chimiques, la brasserie et le vin, les aliments pour animaux, les textiles et le blanchiment (Kapilan and Arasaratnam, 2017).

I.1.5. Les Enzymes ligninolytiques

La nature extrêmement complexe de la lignine exige un éventail d'enzymes oxydatives pour sa dégradation complète. La lignine peroxydase, la peroxydase à manganèse et la laccase sont les principales enzymes dégradant de la lignine (Niladevi, 2009).

I.1.5.1. Laccase

Les laccases (EC 1.10.3.2) (Witayakran, 2008) également connues sous le nom de benzènediol oxygène oxydoréductase ou p-diphénol oxydase appartiennent à la classe des oxydoréductases. Les laccases bactériennes sont industriellement importantes, elles sont appliquées dans divers processus comme la désintoxication des effluents industriels, principalement des industries du papier et de la pâte, du textile et de la pétrochimie, un agent

nettoyant pour certains systèmes de purification d'eau et un catalyseur pour la fabrication de médicaments anticancéreux (Muthukumarasamy and Murugan, 2014).

I.1.5.2. Lignine peroxydase

(LiP EC 1.11.1.14) une enzyme découverte en 1983 qui a été utilisée pour dégrader la lignine. Cette enzyme est utile dans le traitement des effluents industriels colorés, d'autres xénobiotiques comme elle ont un potentiel de bioremediation pour la décoloration des effluents (Sasikumar et al., 2014).

I.1.5.3. Peroxydase à manganèse (MnP)

(EC 1.11.1.13) sa fonction naturelle est la dégradation du complexe Lignine fournissant une résistance et une rigidité à toutes les plantes supérieures (Chai, 2008).

I.1.5.4. Source bactériennes des enzymes ligninolytiques

La dégradation de la lignine est réalisée par trois groupes de bactéries : les actinomycètes, les α -protéobactéries et les γ -protéobactéries.

Streptomyces viridosporus, les espèces d'actinomycètes, et *Thermobifida fusca* exposent une activité lignine peroxydase. En revanche, *Azospirillum lipoferum*, *Thermus thermophilus*, *Marinomonas mediterranea*, *Bacillus subtilis* et *Streptomyces cyaneus* ont montré une activité laccase, dont ce type d'enzymes présentait une résistance aux pH et aux températures élevées (Plácido and Capareda, 2015).

L'activité peroxydase à manganèse a été détectée aussi dans l'actinobactérium *S.psammiticus* (Niladevi, 2009).

I.1.6. Les Cellulases

Les cellulases bactériennes sont classées dans le groupe EC 3.2.1.4, selon la nomenclature enzymatique IUBMB. La cellulase (4- β -D-glucane 4-glucanohydrolase) catalyse l'endohydrolyse des liaisons β -1,4-D-glucosidiques dans la cellulose, la lichénine et les β -d-glucanes de céréales (Menendez et al., 2015).

Elles contribuent à 8% des demandes mondiales d'enzymes industrielles elles sont utilisées beaucoup plus dans l'industrie textile pour le biopolishing des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie de ménage pour améliorer la douceur et la luminosité du tissu. En outre, dans l'amélioration de la qualité nutritionnelle et la digestibilité animale, dans la transformation du jus de fruit et dans la cuisson et le désencrage du papier (Sadhu and Maiti, 2013).

I.1.6.1. Source bactériennes des cellulases

Un certain nombre de genre bactériens produisent la cellulase incluant : *Bacillus*, *Acidothermus*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, *Clostridium* ; dont les deux espèces *C.thermocellum* et *C.acetobutylium*, *Rhodothermus* et l'espèce *R.marinus*, ainsi que certains genres bactériens aérobies telles que *Cytophaga*, *Cellumonas* et *Cellovibrio* qui ont la capacité de dégrader la cellulose en culture pure (Imran et al., 2016).

I.1.7. Autres enzymes bactériennes

Des enzymes bactériennes autres que celles décrites ci-dessus ont une énorme importance au niveau industriel tel que les lipases qui ont émergé en tant qu'enzymes clés dans des biotechnologies, en raison de leurs propriétés, qui trouvent leur utilisation dans un large éventail d'applications industrielles, telles que la technologie alimentaire, détergent, l'industrie chimique et les sciences biomédicales (Gupta et al., 2004).

Les pectinases aussi sont dotées de puissantes applications biotechnologiques dans l'industrie de fabrication de jus de fruits (Prathyusha and Suneetha, 2011).

Certaines enzymes sont spécifiquement requises dans l'industrie pharmaceutique pour les kits de diagnostic et les analyses (Nigam, 2013).

Tableau I : Tableau montrant un aperçu de certaines enzymes microbiennes présentant des caractéristiques particulières d'importance industrielle (Nigam, 2013) (Bribiesca, 2013)

(Plácido and Capareda, 2015) (Priyadarshinee et al., 2016) (Menendez et al., 2015) (BOUKAA, 2015)

Enzyme	Germe producteur	Application
LES PROTEASES	<i>Bacillus</i> ; <i>Pseudomonas</i> ; <i>Clostridium</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i>	- Poudres de lavage - Détergents - Tannerie - Industrie alimentaire - Traitement du cuir - Médicaments - Biologie moléculaire - Synthèse peptidique

<p>LES AMYLASES</p>	<p><i>Bacillus</i> sp. <i>Geobacillus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Industrie de l'amidon (pour la liquéfaction) - Papier, industrie alimentaire - Industrie pharmaceutique (Aide digestive) - Industrie textile; Industrie de la boulangerie
<p>LES XYLANASES</p>	<p><i>Thermoactinomyces, thalophilus;</i> <i>Bacillus</i> sp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - additif dans l'alimentation de la volaille et amélioration de la digestibilité, extraction de l'amidon, des huiles de café et de légumes - Traitement des eaux usées <ul style="list-style-type: none"> - L'obtention de protéines cellulaires, des carburants et des produits chimiques - L'obtention de l'éthanol à partir xylitol et la biomasse lignocellulosique pour une utilisation comme combustible <p>La clarification des jus de fruits</p>

<p>LES LIGNINASES</p>	<p>Les α-protéobactéries et les γ-protéobactéries</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Déléignification de la biomasse de la pâte à papier ; - La détoxification des effluents industriels
<p>LES CELLULASES</p>	<p><i>Acetivibrio cellulolyticus</i> <i>Bacillus</i> spp, <i>Cellulomonas</i> spp, <i>Clostridium</i> spp, <i>Erwinia chrysanthemi</i>, <i>Thermobispora bispara</i>, <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Streptomyces</i> spp., <i>Thermonospora</i> spp <i>Thermobifida fusca</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Décoloration et Dégradation des teintures textiles - Industrie agroalimentaire - Biocarburants - Application médicales - Applications agricoles
<p>LES LIPASES</p>	<p><i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i> <i>Staphylococcus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Agro-alimentaire - Détergents - Tannerie - Bioremediation

Chapitre II

Les amidohydrolases : Glutaminase et Arginine deiminase

Les microbes ont servi et continuent de servir comme une des plus grandes sources d'enzymes (Adrio and Demain, 2014), parmi ces enzymes microbiens la L-glutaminase connue pour son utilisation comme enzyme provenant de diverses sources qui diffèrent grandement en ce qui concerne leurs propriétés telles que l'activité anticancéreuse, l'immunogénicité, la cytotoxicité, l'activité aux conditions physiologiques, la spécificité du substrat, la température, le pH et la tolérance aux sels. Il existe une recherche incessante de la L-glutaminase avec des propriétés convenable pour son usage en tant que anti leucémique et / ou agent favorisant la saveur qui joue un rôle important dans le métabolisme azoté des cellules procaryotes et eucaryotes (Prabhu and Chandrasekaran, 1999).

II. 1. La glutaminase

II. 1.1. Définition

L-Glutaminase (L-glutamine amidohydrolase EC 3.5.1.2) est une enzyme hydrolytique, qui désamine la L-glutamine en acide L-glutamique et ammoniac (Sajitha et al., 2013).

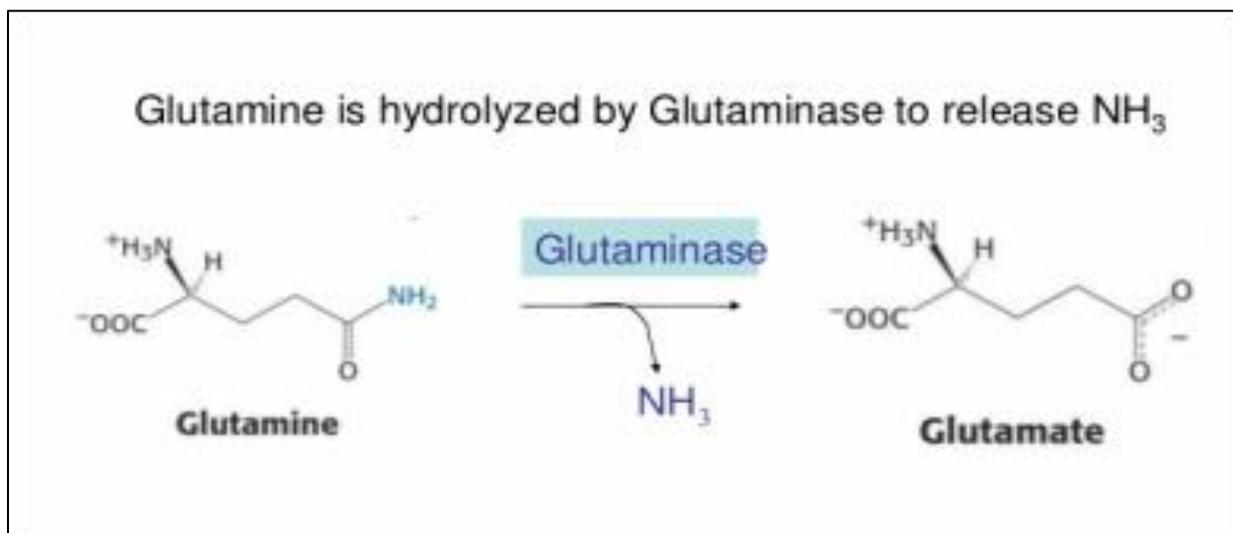


Figure 02: L'hydrolyse enzymatique de la L-glutamine par la L-glutaminase (White et al., 1959)

II. 1.2. Sources et origine de L-glutaminase

La L-Glutaminase joue un rôle majeur dans le métabolisme azoté des procaryotes et des eucaryotes. Il se trouve largement distribué dans les plantes, les tissus animaux et les micro-organismes, y compris les bactéries, les levures et les champignons qui ont le potentiel pour la production industrielle de cette enzyme (Unissa et al., 2014), cette enzyme est

produite par un grand nombre de bactérie incluant les espèces *Achromobacter sp*, *Aerobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Agrobacterium tumefaciens*, certaines espèces du genre *Pseudomonas* et du genre *Bacillus* (Nandakumar et al., 2003).

II. 1.3. Structure de la L-glutaminase

L'enzyme glutaminase est un polypeptide unique monomère avec un poids moléculaire de 19,860 Da synthétisé sous forme de préproenzyme, contenant un polypeptide signal de 21 acides aminés, une pro-région de 114 acides aminés et une séquence pour l'enzyme mature (Kumeta et al., 2010).

La protéine glutaminase possède une structure cristalline dans ces formes matures et pro formes qui ont été affinées respectivement à une résolution de 1,15 et 1,73 Å.

La structure globale de l'enzyme mature à une faible homologie avec le domaine de noyau de la transglutaminase-2 humaine, La triade catalytique (Cys-His-Asp) commune aux transglutaminases et aux cystéines protéases est située dans le fond de la poche du site actif (Hashizume et al., 2011).

La structure globale de la protéine glutaminase est composé de quatre brins antiparallèles de feuilletts β (S6-S9), avec quatre hélices α (H3-H6) et deux brins antiparallèles de feuilletts β (S10-S11) qui entourent les feuilletts centraux. Comme montré dans la figure 03 ci-dessous.

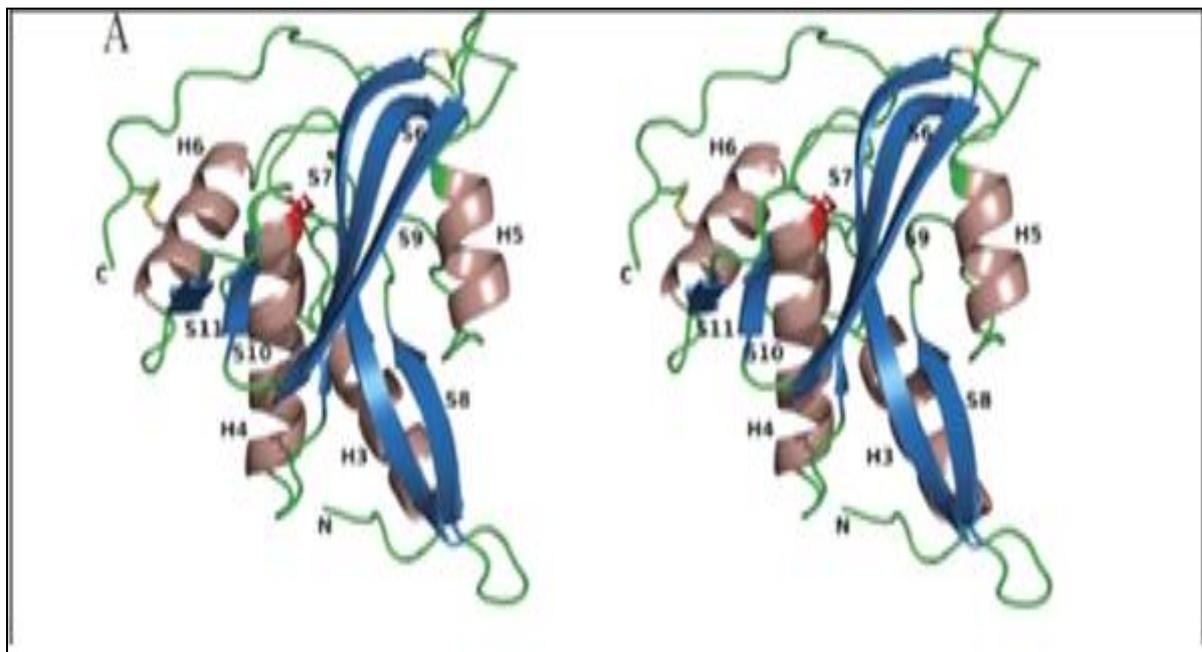


Figure 03: La structure globale d'une molécule de PG (Hashizume et al., 2011)

II. 1.4. Classification de l'enzyme L-glutaminase

La famille de l'amidohydrolase qui catalyse la désamination de la glutamine contient deux types. Le premier type comprend la glutaminase, qui est très spécifique de la glutamine et catalyse l'hydrolyse de la glutamine en acide glutamique. Le second type contient l'enzyme qui est moins spécifique et catalyse l'hydrolyse de la glutamine en acide glutamique et l'asparagine en acide aspartique avec une efficacité similaire (Nandakumar et al., 2003).

Beaucoup de bactéries ont deux isozymes. Ce modèle est basé sur des glutaminases connues sélectionnées et leurs homologues au sein des procaryotes, à l'exclusion des homologues hautement dérivés (longue-branche) et structurellement variés, de manière à réaliser des tâches conservatrices. Cette enzyme agit sur des liaisons carbone-azote autres que les liaisons peptidiques, spécifiquement dans les amides linéaires. Le nom systématique de cette classe d'enzymes est la protéine L-glutamine amidohydrolase, les autres noms d'usage courant comprennent la peptidoglutaminase II, glutaminyle-peptide glutaminase, destabilase et peptidylglutaminase II (Divya Teja et al., 2014).

II. 1.5. Applications de la L-glutaminase

Les L-glutaminases microbiennes ont trouvé plusieurs applications puissantes dans divers secteurs industriels au cours des dernières années. L'enzyme, bien qu'initialement identifiée comme un médicament anticancéreux puissant avec des applications possibles dans la thérapie enzymatique, la L-glutaminase a été utilisée dans l'industrie alimentaire pour l'amélioration de la saveur. Les applications récentes de l'enzyme incluent son utilisation comme des biocapteurs et dans la fabrication de produits chimiques spécialisés par des transformations enzymatiques. Les applications importantes sont discutées ci-dessous dans les catégories: applications thérapeutiques, applications dans l'industrie alimentaire, applications analytiques et fabrication de produits chimiques fins (Unissa et al., 2014).

II. 1.5.1. Applications thérapeutiques

L'enzyme L-glutaminase est actuellement utilisée dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (ALL) et Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Kiruthika and Saraswathy, 2013).

a) La Glutaminase dans la leucémie aiguë lymphocytaire (ALL)

Sous la marque Elspar, l'asparaginase d'E. Coli a été utilisé pour le traitement de la leucémie anti-lymphocytaire depuis plus de 20 ans. Un intérêt parallèle pour la L-

glutaminase a été augmenté à partir des démonstrations que l'enzyme, la L-glutaminase, présente également une activité anti-leucémique (Sarada, 2013).

b) Mécanisme d'action

Contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales montrent une dépendance énorme sur l'apport exogène de L-glutamine comme substrat de croissance, car elles ne démontrent pas la L-glutamine synthétase. La poursuite du défi des cellules tumorales sur leurs survies peut être bloquée par l'action de la L-glutaminase (EC 3. 5. 1. 2) (Nathiya et al., 2012) car la L-glutamine sanguine sert de précurseurs métaboliques pour la synthèse de nucléotides et de protéines des cellules tumorales. En conséquence, la L-glutaminase provoque la mort sélective en bloquant la voie d'énergie pour leur prolifération (El-Sayed, 2009) donc certaines cellules cancéreuses meurent rapidement si elles sont privées de glutamine (Altman et al., 2016).

c) La glutaminase dans le VIH

La l-glutaminase a été utilisée comme agent antirétroviral efficace dans le traitement du SIDA/VIH car elle abaisse les taux de L-glutamine à la fois dans le sérum et les tissus pendant des périodes prolongées, ce qui entraîne une réduction Substantielle de l'activité sérique transcriptase inverse (RTA) du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec des avantages améliorés à long terme de survie (UmaMaheswari et al., 2016).

II. 1.5.2. Application de la glutaminase dans l'industrie alimentaire

L'une des principales utilisations des Glutaminase est dans l'industrie alimentaire où ils sont utilisés comme agents améliorant la saveur. La L- glutaminase est généralement considérée comme enzyme qui contrôle le goût délicieux des aliments fermentés tels que les sauces de soja (Chitanand and Shete, 2012).

L'enzyme a reçu une attention significative dans l'industrie alimentaire en raison de son potentiel en tant qu'agent modulant l'arôme, car elle augmente la teneur en acide glutamique de l'aliment conférant un goût savoureux. Ce goût unique appelé umami, suscité par la viande, le poisson et les stocks de légumes, a été confirmé comme le cinquième goût de base à côté de Sucré, acide, salé et amer (Fayyad et al., 2008).

II. 1.5.3. Applications analytiques

a) La l-glutaminase comme biocapteur

L'étude de l'application de la l-glutaminase comme biocapteur a été étudiée par l'entreprise japonaise *Kikkoman Corporation* qui a utilisée un biocapteur à base de L-glutaminase pour la détermination de glutamine et de glutamate dans des formulations

pharmaceutiques. Et également utilisée dans des cultures d'hybridomes et de cellules de mammifères, pour surveiller le niveau de glutamine sans avoir besoin de mesures séparées pour l'acide glutamique (El-Ghonemy, 2015).

b) Fabrication de produits chimiques fins

La théanine est synthétisée par la théanine synthétase dans les plantes, qui est connue pour sa capacité à inhiber la stimulation par la caféine, afin d'améliorer les effets des agents anticancéreux. D'une part, des glutaminases bactériennes avec la levure de boulangerie sont utilisées pour produire la théanine. D'autre part, la l-glutaminase est utilisée dans la fabrication de γ - glutamyl alcamides par le transfert de γ -glutamyl à partir d'une molécule donneuse telle que la glutamine ou le glutathion à un accepteur de glutamyl comme l'éthylamine ou la glycyl glycine par catalyse (Habeeb, 2013).

II. 2. L'arginine deiminase

II. 2.1. Définition

L'arginine deiminase ou AD (EC 3.5.3.6) est une enzyme qui hydrolyse l'arginine de manière irréversible, elle convertit l'arginine du plasma en citrulline, un métabolite repris et reconverti en arginine par les cellules et les tissus normaux à l'exception du mélanome ou du carcinome hépatocellulaire (Zhuo et al., 2011).

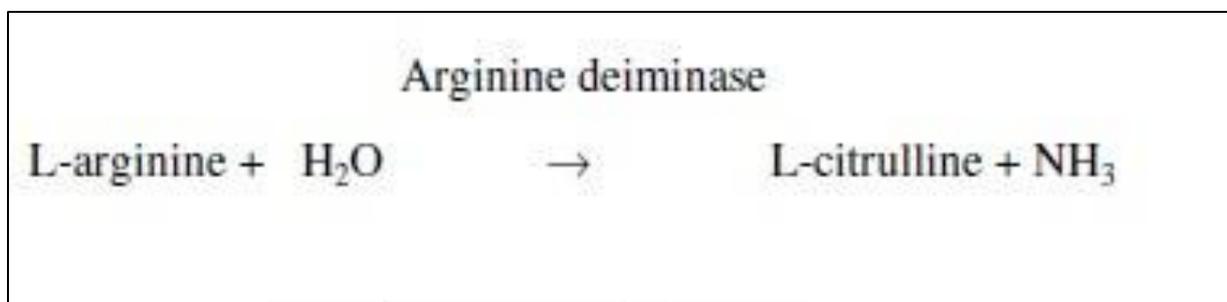


Figure 04 : L'hydrolyse enzymatique de la l-arginine par l'arginine deiminase (Alberto et al., 2012)

II. 2.2. Source et origine

L'arginine deiminase a été détectée dans différents micro-organismes incluant les bactéries lactiques (Arena and de Nadra, 2005), les espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma spp*, *Bacillus licheniformis*, *Halobacterium halobium*, *Streptococcus faecalis* (Vander Wauven et al., 1984), certaines espèces du genre *Streptococcus* (Casiano-Colón and Marquis, 1988), cette enzyme est encore présente dans des parasites tels que

Giardia intestinalis, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas fetus*, et *Hexamita inflata* (Li et al., 2008).

II. 2.3. Structure

Le poids moléculaire de l'arginine deiminase est 120,000 Da (Ni et al., 2008), La structure cristalline de l'arginine deiminase a été déterminée dans *Mycoplasma arginini* à l'aide d'un remplacement isomorphe multiple (MIR) à faible résolution (4,0 Å) suivi d'une extension de phase à 1,6 Å en utilisant une modification de la densité électronique.

Deux structures d'AD complexées avec différents intermédiaires de réaction ont été déterminées respectivement à une résolution de 2,0 Å (forme I) et 1,6 Å (forme II) ainsi l'enzyme à le même pli général (Figure 05) dans les deux structures, l'AD possède un domaine catalytique et un domaine contenant cinq hélices. Le domaine catalytique a un pli tertiaire similaire à celui de l'Amidinotransferase et Dimethylargininase, Le sous-domaine de couleur magenta représenté sur la figure ci-dessous comporte deux brins β antiparallèles supplémentaires (β 13 et β 14) qui ne sont présents que dans les AD (Das et al., 2004).

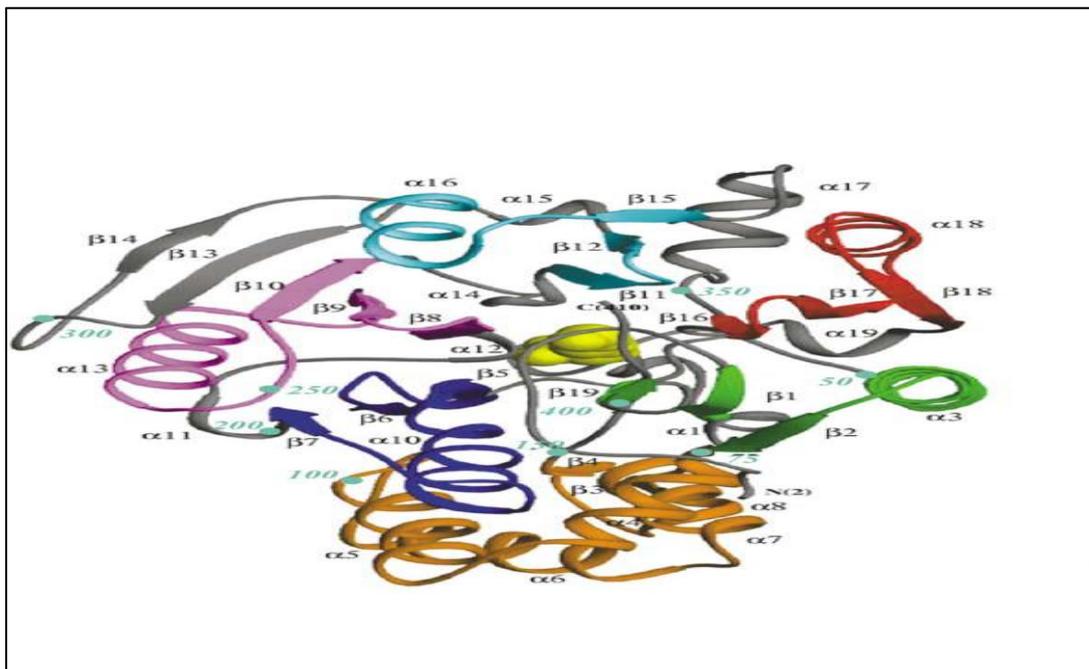


Figure 05 : la structure globale de l'enzyme arginine deiminase de l'espèce *Mycoplasma arginini* (Das et al., 2004)

II. 2.4. Domaine d'application

II. 2.4.1. Activité anti-tumoral

L'arginine est un acide aminé non essentiel Pour les adultes ; mais essentiel pour les enfants ; car il pourrait être généré à partir de citrulline via des enzymes du cycle de l'urée

argininosuccinate synthétase (ASS) et l'argininosuccinate lyase (AL) dans les cellules et les tissus normaux. Et un approvisionnement adéquat en arginine est vital pour la croissance cellulaire normale. Cependant, certaines cellules tumorales humaines ne les expriment pas et sont par conséquent auxotrophes pour l'arginine. En tant qu'enzyme de dégradation de l'arginine, l'AD a démontré qu'elle inhibait la croissance des tumeurs arginine-auxotrophiques, y compris les mélanomes et les HCC, et pour induire l'apoptose des cellules de leucémie humaine. De plus, un effet anti-angiogénique sur les cellules endothéliales a été signalé en raison de l'activité AD. Les activités antiprolifératives et anti-angiogéniques font de l'AD un agent hautement potentiel pour le cancer (Ni et al., 2008).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. 1. Matériel**I. 1.1. Matériel biologique**

Extraits bactériens issus de cultures liquides de bactéries du genre *Streptomyces* du sol sur milieux de fermentations ADS modifiés, riches en acides aminés et codifiés comme suit : I2,14,5 et O8F.

Les réactifs sont cités dans l'annexe 03.

I. 1.2. Appareillage

- Bain marie
- Agitateur magnétique à plaque chauffante
- Autoclave
- Spectrophotomètre
- Perforateur à puits
- Bec bunsen
- Balance électronique de précision
- Balance électronique
- Réfrigérateur domestique
- pH mètre électronique

I. 2. Méthodes**I. 2.1. Dosage sur milieu solide par la méthode de diffusion des puits****I. 2.1.1. Préparation du milieu MGA (MINIMALE GLUTAMINE AGAR)**

Le milieu MGA est utilisé pour l'isolement sélectif de la L- glutaminase, qui contient le substrat L-glutamine comme source de carbone et de nitrogène supplémenté avec 3ml du rouge de phénol en tant qu'indicateur colorée et 3ml d'acide Nalidixique pour inhibé la croissance des bactéries Gram négatif (RAJENDRA DUBEY, 2015).

La préparation du milieu MGA et MGA modifié consiste à l'ajout de ses composants dans 100 ml d'eau distillée pour chacun des deux substrats (L-glutamine, L-arginine) sous agitation. Notant que le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min avant ajout des substrats glutamine ou Arginine.

I. 2.1.2. La recherche de l'activité enzymatique de la L-glutaminase et la L-arginine deiminase dans les quatre extraits bactériens (protocole modifié) (S. Sridevi, 2016)

Les deux solutions d'acides aminés servant de substrats (glutamine et arginine) ont été rajoutés ; après stérilisations par microfiltration ; dans la zone stérile du bec Bunsen avec homogénéisation du milieu et le couler sur des boîtes de Pétri ; après refroidissement ; le milieu est laissé se solidifier sur paillasse, cela suivie de la réalisation de puits de 5 mm de diamètre avec un perforateur à puits dans les trois coins de chacune des boîtes Pétri dont les deux puits sont chargés de 50 μ l d'extrait enzymatique et le troisième puit est chargé de 50 μ l du témoin négatif stérile ADS modifié. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 24 heures.

- ✓ La lecture est faite par mesure de la dimension de la zone colorée formée autour des puits dans lequel l'apparition d'une zone rose correspond à un résultat positif.

I. 2.2. Dosage des activités enzymatiques de L-glutaminase et L-arginine deiminase sur milieu liquide (Imada et al., 1973)

I. 2.2.1. Préparation de la courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère de sulfate d'ammonium à une concentration de 10 μ M (μ mol/ml) différentes concentrations ont été préparées pour lesquelles un volume d'eau distillée à été ajoutée pour atteindre 1 ml pour chaque tube suivie de la prise de 100 μ l du mélange de chaque tube et après ça ajout de 200 μ l du réactif de Nessler (composition cité dans l'annexe 02) et 3000 μ l d'eau distillée, par la suite les tubes ont été laissés pendant 10 à 15 minutes et les absorbances ont été lu à 450 nm dans l'UV.

I. 2.2.2. Dosage des activités enzymatiques dans les extraits brutes actifs

a) Préparation des solutions de substrats dans un tampon

- La L- glutamine à 0,04 M dans Tris/HCl 0,5 M, pH 7,5.
- La L-arginine à 0.04 M dans Tris/HCl 0,5 M, pH 7,5.

b) Dosage des activités enzymatique (Imada et al., 1973).

L'activité L-glutaminase a été déterminée en utilisant la L-glutamine comme substrat et le produit ammoniac ; libéré pendant la catalyse ; a été observé et mesuré en utilisant le réactif de Nessler.

Méthode

La technique a été réalisée par l'introduction de 0,5 ml de la solution de chacun des deux substrats ; L-glutamine et L-arginine à 0,04 M ; en présence de 0,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de tampon tris HCl (0,05M ; pH 7,5) dans chacun des tubes et puis l'ajout de 0,5 ml de l'extrait brute à l'exception du témoin dans lequel l'ADS modifié a été rajouté, le tout a été incubé à 37°C pendant 30 minutes. Après l'incubation 0,1 ml du mélange a été prise, suivie de l'ajout de 3 ml d'eau distillée et 0,2 ml du réactif de Nessler avec attente de 10 à 15 min.

La coloration a été observée et l'absorbance a été mesurée à 450 nm en utilisant un spectrophotomètre visible dont une unité internationale de L-glutaminase ou de L-arginine déiminase a été définie comme la quantité d'enzyme qui libère un μMol d'ammoniaque dans les conditions optimales et le rendement enzymatique a été exprimé en unités internationale /ml (UI/ml).

I. 2.3. Maximisation de l'activité enzymatique

I. 2.3.1. Effet du pH

Des tampons Tris HCL à 0,05 M ont été préparés à différentes gammes de pH

- Tampon tris HCL à pH 3,0
- Tampon Tris HCL à pH 5,0
- Tampon Tris HCL à pH 7,0

Ajustement des pH des tampons préparés

En premier lieu une quantité de 3,02 g du Tris Hcl a été pesée et solubilisée dans 50 ml d'eau distillée, en second lieu le pH a été ajusté avec deux solutions HCl 1 N et NaOH à 1 N à l'aide d'un pH mètre.

Méthode (Rajendra Dubey, 2015)

Une quantité de 0,005 g de substrat a été solubilisée dans un 1 ml du tampon en question, et la valeur du pH a été ajustée au pH mètre, ensuite 0,5 ml de la solution enzymatique a été ajoutée dans chacun des tubes à essai à l'exception du blanc, 0,5 ml d'eau distillée a été ajoutée et la solution a été incubée pendant 30 minutes à 30°C, après incubation

3 ml d'eau distillée a été ajoutée pour diluer la solution. Une solution de TCA a été ajoutée pendant 10 min pour arrêter la réaction.

0.2 ml du réactif de Nessler a été ajouté avec attente de 10 à 15 min. L'absorbance a été mesurée à 450 nm en utilisant un spectrophotomètre visible puis le Graphe standard a été tracé.

I. 2.3.2. Effet de la température

La température est également un facteur important dans la stabilité des enzymes et influençant leurs activités.

Méthode (Rajendra Dubey, 2015)

Une quantité de 0.005 g de substrat a été ajoutée à 1 ml du tampon Tris HCL avec un pH maintenu à 7,2 dans chacun des tubes à essai, ensuite 0,5 ml de l'enzyme a été administré dans chacun des tubes sauf le blanc puis 0,5 ml d'eau distillé a été ajoutée pour diluer la solution. après cela chaque tube à essai est ensuite incubé pendant 30 min à différentes températures (4°C, 27°C, 50°C, 80°C). Après l'incubation une quantité de 3 ml d'eau distillée a été ajoutée pour diluer la solution.

La réaction enzymatique a été arrêtée par l'addition de la solution de TCA à 1,5 M, en outre 0,2 ml du réactif de Nessler a été ajoutée aux échantillons et la réaction a été laissée pendant 10 à 15 min.

L'absorbance a été mesurée à 450 nm en utilisant un spectrophotomètre visible puis le Graphe standard a été tracé.

I. 2.4. Test de sensibilité aux enzymes protéolytiques

La trypsine et la pepsine, deux enzymes protéolytiques qui ont été utilisées à une concentration de 1mg/ml pour tester la résistance des enzymes glutaminase et arginine deiminase car la trypsine et la pepsine ont des sites de coupures différents dont la première coupe la chaîne d'acides aminés au niveau d'un acide aminé basique (Lysine et arginine) (Florimont Jaques, 2012) et la deuxième coupe au niveau des acides aminés neutres.

I.2.4.1. Préparation des enzymes protéolytiques (Benkerroum et al., 2000)

La solution de trypsine a été préparée à l'aide d'un tampon phosphate (0,1M pH6) dans lequel 20 mg de l'enzyme trypsine a été pesée avec une balance de précision et dissoute dans 10 ml du tampon phosphate suivie d'une filtration avec un filtre de 0,22 μm et conservée à +4°C.

La solution Pepsine a été préparée à l'aide d'une solution HCl (0,02M, pH 2) dans laquelle 20 mg de l'enzyme a été pesée avec une balance de précision et dissoute dans un volume de 10 ml de la solution puis filtrée avec un filtre de 0,22 μm et conservée à +4°C.

Technique

Un mélange de 1ml de chaque extrait bactérien avec 1 ml de la solution pepsine ou trypsine a été préparée par la suite sur un milieu MGA ou MGA modifié préalablement coulé sur les boîtes et laissé refroidir, trois puits ont été réalisés par boîte. Les puits ont été chargés de 50 μl des différents éléments comme représenté dans le schéma ci-dessous, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h.

La lecture a été faite par la mesure de la dimension de la zone formée autour des puits

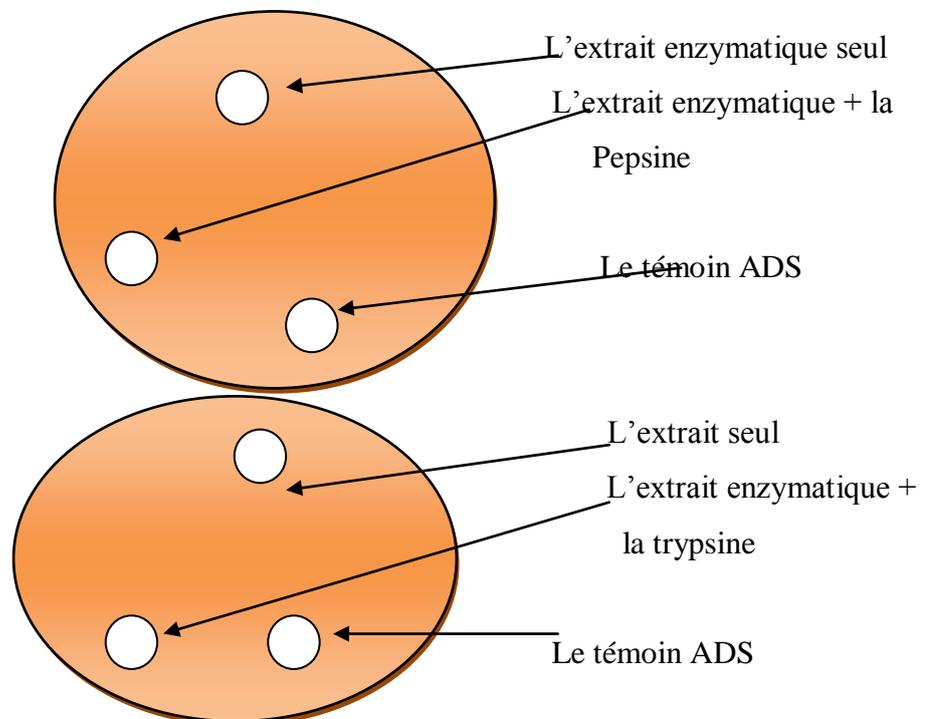


Figure 06 : Schéma résumant le test de sensibilité aux protéases, réalisé par la méthode de diffusion des puits.

Résultats et discussion

II. 1. Dosage sur milieu solide par la méthode de diffusion des puits

Après incubation pendant 24 heures à une température de 37°C les zones d'inhibition sont formées, et le diamètre de ces dernières est montré dans les figures et mentionné dans le tableau ci-dessous.

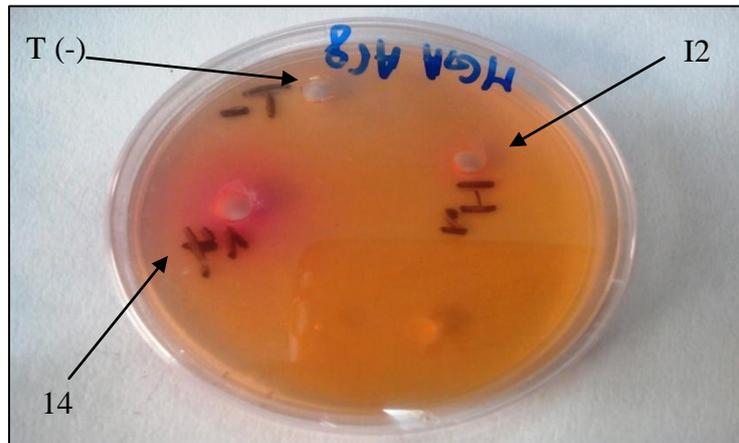


Figure 07: Activité de la L-arginine deiminase dans les extraits bactériens I2 et 14 sur milieu

MGA modifié

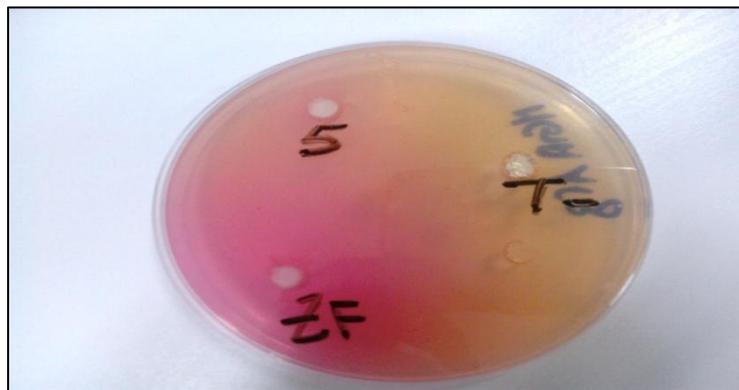


Figure 08: Activité de la L-arginine deiminase dans les extraits bactériens 5 et O8F sur milieu

MGA modifié.

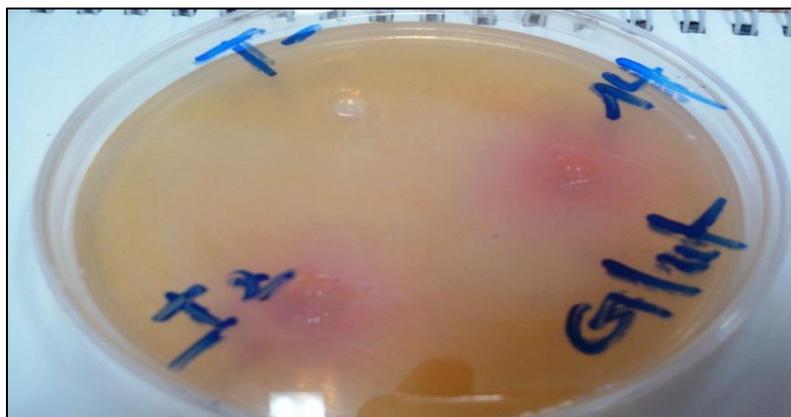


Figure 09: Activité de la L-glutaminase dans les extraits bactériens I2 et 14 sur milieu MGA

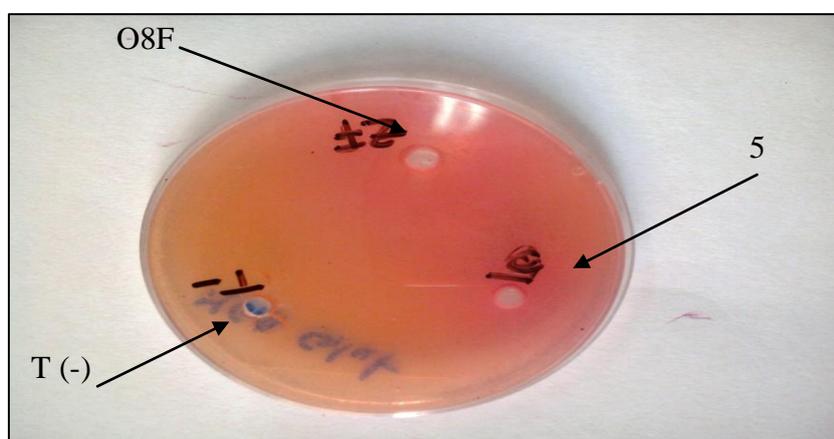


Figure 10 : Activité de la L-glutaminase dans les extraits bactériens 5 et O8F sur milieu MGA

Tableau II: valeurs des diamètres des zones de Glutaminase et Arginine deiminase.

L'extrait bactérien	Diamètre de la zone pour la L-glutaminase (cm)	Diamètre de la zone pour la L-arginine deiminase (cm)
I2	2	1,5
5	3,5	2
O8F	4,5	5
14	2,5	3

Tableau III : résumé des résultats des activités enzymatiques pour les différents extraits bactériens pour l'enzyme L-glutaminase.

L'extrait bactérien	Diamètre de la zone (cm)	La surface (cm ²)	L'activité enzymatique UI/0,05 ml	L'activité enzymatique dans 1 ml
I2	2	3,141	3,141	62,8
14	2,5	4,908	4,908	98,16
5	3,5	9,621	9,621	132,42
O8F	4,5	15,904	15,904	318,08

Tableau IV : Résumé des résultats des activités enzymatiques pour les différents extraits bactériens pour l'enzyme L-arginine deiminase.

L'extrait bactérien	Diamètre de la zone (cm)	La surface (cm ²)	L'activité enzymatique UI/0,05 ml	L'activité enzymatique dans 1 ml
I2	1,5	1,767	1,767	35,34
14	3	7,068	7,068	141,36
5	2	3,141	3,141	62,82
O8F	5	19,634	19,634	392,68

Le milieu MGA (minimale glutamine agar) utilisé pour l'étude de l'activité enzymatique est sélectif pour la L-glutaminase et la L-arginine deiminase dans lequel pour cette dernière est appelé MGA modifié en raison du changement du substrat glutamine, à chaque fois, par le substrat de l'enzyme recherchée.

L'enzyme L-arginine deiminase a exprimé une activité enzymatique dans les quatre extraits bactériens I2, 14, 5 et O8F en donnant des zones de couleur rose proportionnel à l'activité des deux enzymes et à la production d'ammoniaque qui est due également à la dégradation du substrat glutamine ou arginine par leurs enzymes respectivement (Palaniswamy, 2011), dont les diamètres respectifs sont : 2 cm, 2,5 cm, 3,5 cm et 4,5 cm, de même pour l'enzyme L-glutaminase qui exprime une activité enzymatique dans tous les extraits cités avec respectivement des diamètres de 2cm ; 2,5cm ; 3,5 cm ; 4,5 cm et des activités enzymatiques maximales de 19,634 UI et 15,904 UI au niveau de l'extrait O8F pour les deux enzymes L-arginine deiminase et L-glutaminase respectivement, par conséquent le

nombre d'unités à été déterminé et ce qui prouve que l'enzyme est extracellulaire en tenant compte qu'une unité de l'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme dans 50 ul de solution d'enzyme qui produit une zone rose de 1mm² à pH 7 et à 37 ° C pendant 24 heures.

D'une part pour le même test l'enzyme la localisation extracellulaire de L-glutaminase a été prouvée par l'expression d'une zone coloré de 1,5 cm dans une recherche de RAJENDRA DUBEY et al en 2015 (RAJENDRA DUBEY, 2015) ,d'autre part une étude de Balagurunathan et al en 2010 a montré que des actinomycètes sélectionnées ont donné des diamètres variés des zones colorées en particulier une souche P2 qui a produit un maximum de 38 mm comme diamètre de la zone autour du puit à partir de ça cet essai à été recommandé pour L-glutaminase pour tous les micro-organismes (Balagurunathan *et al.*, 2010).

Un total de 57 actinomycètes qui ont montrés une excellente activité en L-asparaginase a été aussi utilisée pour examiner la production de la L-glutaminase. Environ 51 parmi ceux-ci ont été trouvées positif pour l'activité glutaminase et seulement quatre type d'actinomycètes isolées (SAP 1287, CFS 1557, CFS 1560 et GS 1573) n'a produit aucune zone rose même après jours d'incubations (Saxena et al., 2015) .

II. 2. Dosage de l'activité enzymatique de la L-glutaminase et L-arginine deiminase sur milieu liquide

D'après l'équation de la courbe d'étalonnage et des absorbances obtenues mentionnées dans le tableau ci-dessous on déduit la concentration d'ammoniac [NH₄⁺] pour les deux enzymes L-glutaminase et L-arginine deiminase respectivement ainsi que leurs activités enzymatiques qui correspond au dosage quantitatif.

Pour la L-glutaminase

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] (μmol)	L'activité enzymatique UI (μmol/ml/min)
14	0,034	0,0186	0,00124
5	0,515	0,2829	0,01886
I2	0,816	0,4484	0,0298
O8F	0,324	0,1780	0,0118

a) Pour la L-arginine deiminase

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] μmol	L'activité enzymatique UI (μmol/ml/min)
14	0,008	0,0043	0,00028
5	0,270	0,1483	0,00988
I2	0,444	0,2439	0,0162
O8F	0,198	0,1088	0,0072

- ✓ La localisation cellulaire des enzymes L-glutaminase et L-arginine deiminase est montré dans les figures citées dans l'annexe 01.

Au premier lieu l'observation visuelle de l'intensité des colorations au niveau des différents tubes nous dirige vers l'estimation qualitative concernant la localisation cellulaire des deux enzymes L-glutaminase et L-arginine deiminase dont la couleur claire correspond à une enzyme intracellulaire et celle intense correspond à une enzyme extracellulaire, tenant compte que la couleur est due à la libération de l'ammoniac après catalyse des substrat L-glutamine et L-arginine par leurs enzymes L-glutaminase et L-arginine deiminase respectivement, d'après cela et des résultats obtenus on peut dire que la L-glutaminase et la L-arginine deiminase sont des enzymes extracellulaire au niveau de tous les extraits bactériens I2, 14, 5, O8F.

Au deuxième lieu la méthode de Nessler par rapport aux autres techniques est très simple (Sato et al., 1983) pour déterminer la quantité d'ammoniac libérer durant la catalyse enzymatique dans laquelle une unité de L-glutaminase ou L-arginine deiminase est définit comme la quantité d'enzyme qui libère 1 u mol d'ammoniac dans les conditions optimales (S. Sridevi, 2016).

Dans la présente étude l'enzyme L-glutaminase à donné plus d'activité au niveau de l'extrait I2 d'une valeur de 0,0298 UI et l'arginine deiminase a été moins présente dans les extraits bactériens par apport à la glutaminase et son maximum d'activité enzymatique a été détecté au niveau de l'extrait I2 avec 0,0162 UI.

II. 3. Maximisation de l'activité enzymatique de la L-glutaminase et L-arginine deiminase

II. 3.1. Effet du pH

Les tableaux ci-dessous résument l'effet du pH sur l'activité de la glutaminase et Arginine deiminase dans les différents extraits enzymatiques bruts a divers gamme de pH

a) L-glutaminase

Tableau V : Effet du pH 5 sur l'activité enzymatique de la glutaminase

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] μmol	L'activité enzymatique UI
I2	0,261	0,1434	0,0095
5	0,597	0,3280	0,0218
14	0,154	0,0846	0,0056

Tableau VI: Effet du pH 7 sur l'activité enzymatique de la glutaminase

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] μmol	L'activité enzymatique UI
I2	0,806	0,4429	0,0295
5	0,707	0,3885	0,0259
14	1,410	0,7748	0,0516

Tableau VII : Effet du pH 3 sur l'activité enzymatique de la glutaminase

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] μmol	L'activité enzymatique UI
I2	1,302	0,7154	0,0476
5	0,927	0,5093	0,0339
14	0,565	0,3104	0,0206

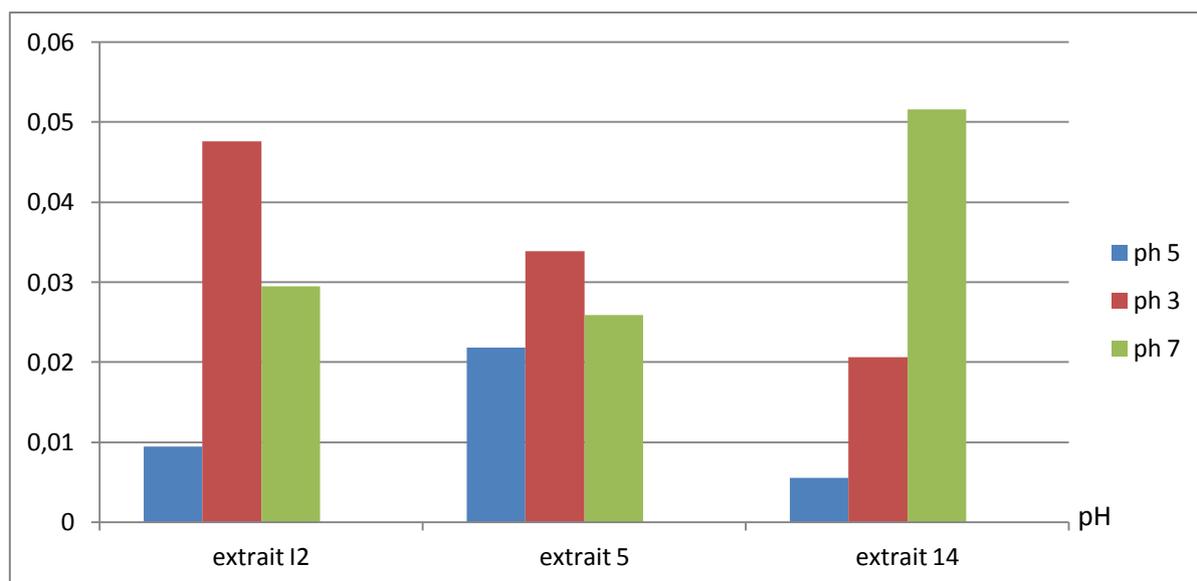


Figure 11: Un histogramme montrant l'effet du pH sur l'enzyme L-glutaminase.

b) L-arginine deiminase

Tableau VIII : Effet du pH 5 sur l'activité enzymatique de l'arginine deiminase

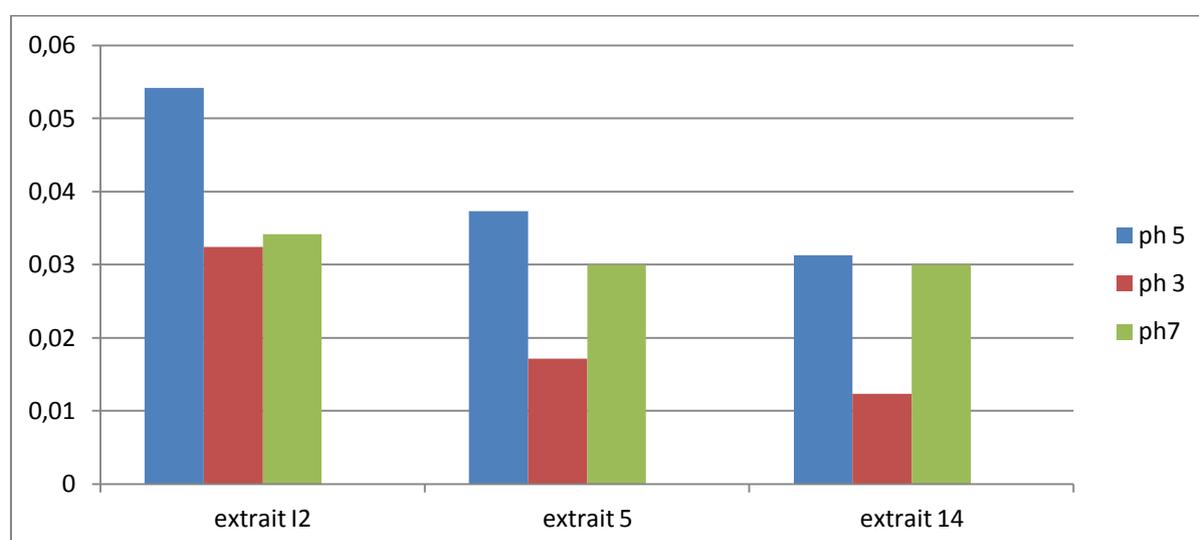
L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] μmol	L'activité enzymatique UI
I2	1,480	0,8132	0,0542
5	1,020	0,5605	0,0373
14	0,855	0,4698	0,0313

Tableau IX: Effet du pH 7 sur l'activité enzymatique de l'arginine deiminase

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] μmol	L'activité enzymatique UI
I2	0,932	0,5121	0,03414
5	0,818	0,4494	0,02996
14	0,820	0,4505	0,0300

Tableau X : Effet du pH 3 sur l'activité enzymatique de l'arginine deiminase

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
12	0,887	0,4874	0,0324
5	0,467	0,2566	0,0171
14	0,338	0,1857	0,0123

**Figure 12** : Un histogramme montrant l'effet du pH sur l'enzyme L-arginine deiminase

Le pH du milieu de croissance ou du milieu réactionnel est signalé comme influençant sur la croissance de toute souche microbienne et la formation ultérieure de produit métabolique en plus de sa sécrétion dans le cas de produits extracellulaires notamment les enzymes (Salman et al., 2014)

La L-glutaminase est l'une des amidases qui sont généralement actives et stables au pH neutre et alcalin (Elshafei *et al.*, 2014).

Dans notre étude, d'une part l'activité maximale de l'enzyme L-glutaminase a été remarquable en pH neutre (7,0) au niveau de l'extrait 14 avec une activité de 0.0516 UI, ce résultat est en coïncidence avec celui trouvé dans des espèces tels que *Pseudomonas aeruginosa* (Sarada, 2013), *Bacillus subtilis* RSP –GLU (Salman *et al.*, 2014), de même pour le résultat obtenue par Ali Mohamed Elshafei *et al* en 2013 qui a révélé que le pH optimale pour L-glutaminase est de 8,5 dans *P. brevicompactum* (Elshafei *et al.*, 2014) , d'autre part

l'enzyme L-arginine deiminase a été active dans une gamme de pH entre 3,0 et 7,0 avec une activité optimale de 0.0542 UI au niveau de l'extrait I2 à pH 5.

Dans l'année 2016 Rahamat unissa *et al* ont montré que L-arginine deiminase a une activité optimale à pH 8 et qu'elle a été active dans la gamme de pH 4 à 10 (Unissa et al., 2014), ainsi que dans l'année 2015 où une étude de révélation du pH optimal de l'activité AD a montré que l'enzyme était plus active à pH 6,8 et qu'à ce pH, son activité est égale à 83%, 88% et 86% de la moyenne activité de l'arginine deiminase (Starikova et al., 2015).

L'ammoniac généré par la dégradation de L-Arginine augmente le pH dans l'environnement, donc protège les bactéries dans des conditions élevées d'acidité (Gruening et al. 2006)

II. 3.2. Effet de la température

Les tableaux ci-dessous résument l'effet de la température sur la glutaminase et l'arginine deiminase ainsi que leurs activités maximales dans les différents extraits bruts à divers gammes de température.

a) L-glutaminase

Tableau XI: L'activité enzymatique de la glutaminase à 50 °C

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	0,008	0,0043	0,0002
5	0,593	0,3258	0,0217
14	0,523	0,2873	0,0191

Tableau XII: L'activité enzymatique de la glutaminase à 27 °C

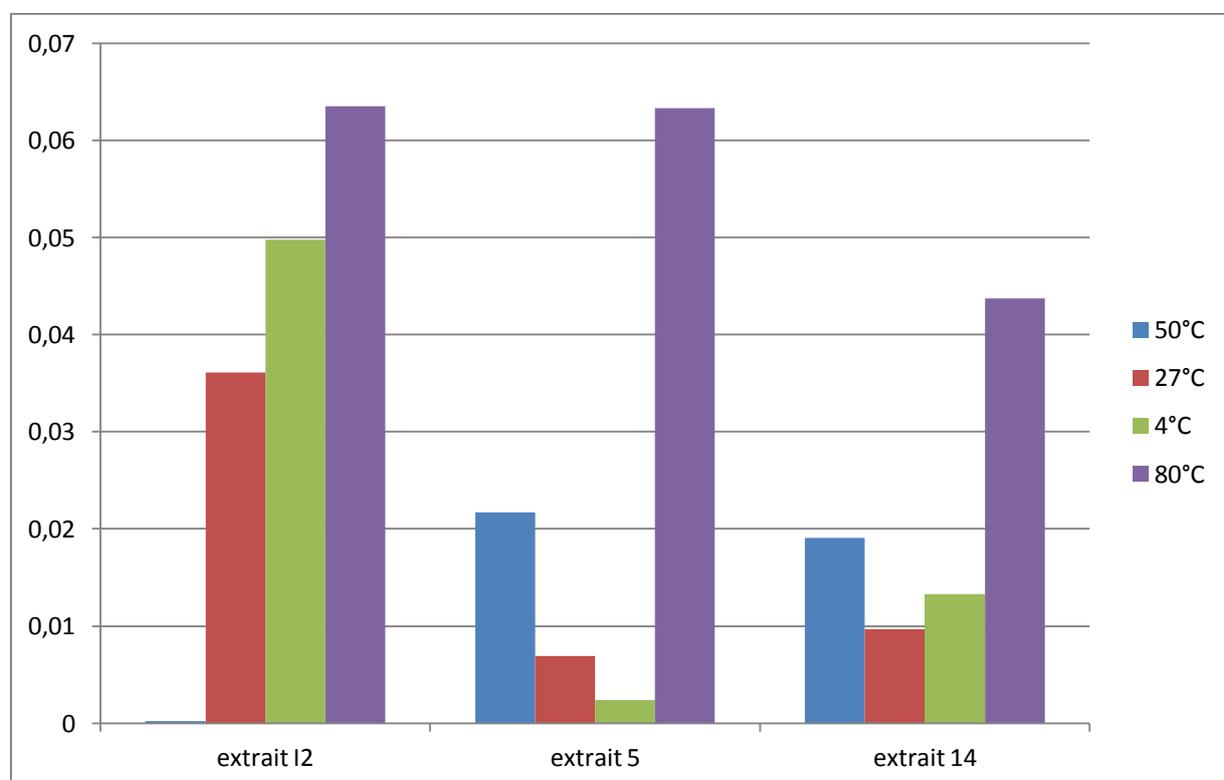
L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	0,987	0,5423	0,0361
5	0,191	0,1049	0,0069
14	0,266	0,1461	0,0097

Tableau XIII : L'activité enzymatique de la glutaminase à 4°C

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	1,360	0,7473	0,0498
5	0,068	0,0373	0,0024
14	0,365	0,2005	0,0133

Tableau XIV : L'activité enzymatique de la glutaminase à 80 °C

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	1,735	0,9534	0,0635
5	1,728	0,9495	0,0633
14	1,194	0,6561	0,0437

**Figure 13** : Un histogramme montrant l'effet de Température sur l'enzyme L-glutaminase

b) L-arginine deiminase**Tableau XV:** L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 50°C

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	1,570	0,8627	0,0575
5	1,648	0,9055	0,0603
14	1,617	0,8885	0,0592

Tableau XVI : L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 27 °C

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	0,620	0,3406	0,0227
5	0,460	0,2527	0,0168
14	1,077	0,5918	0,0394

Tableau XVII: L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 4 °C

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	1,839	1,0105	0,0673
5	1,200	0,6594	0,0439
14	0,309	0,1697	0,0113

Tableau XVIII : L'activité enzymatique de l'arginine deiminase à 80 °C

L'extrait bactérien	L'absorbance	Concentration d'ammoniaque [NH ₄ ⁺] µmol	L'activité enzymatique UI
I2	0,335	0,1840	0,0122
5	0,144	0,0791	0,0052
14	0,000	0,000	0,000

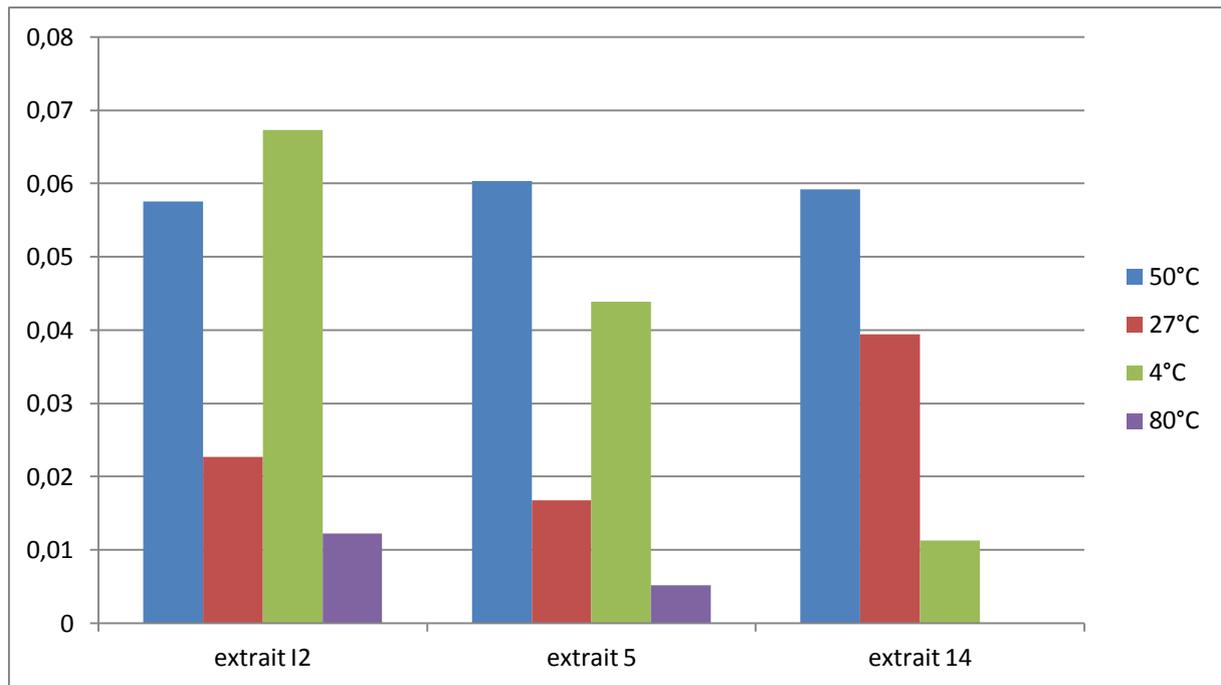


Figure 14 : Un histogramme montrant l'effet de température sur l'enzyme L-arginine deiminase

En ce qui concerne la dépendance de l'activité L-glutaminase à la température, beaucoup de L-glutaminases signalées ont une température optimale et stable d'environ 40 à 50 °C.

La L-glutaminase étudiée a été active dans la gamme de 4°C, 27°C et 80°C et avec un maximum d'activité à 80°C dans tous les extraits bactériens, d'autres résultats ont été obtenus dans des travaux de recherche en 2014 qui ont trouvés que la L-glutaminase a été active dans une gamme de 30°C à 75°C avec un optimum de 50 °C (Elshafei *et al.*, 2014).

Les résultats de l'effet de la température sur la stabilité de l'enzyme ont indiqué qu'aucune activité enzymatique significative n'a été perdue lorsqu'elle a été incubée à 80°C pendant 30 minutes ce qui a révélé la stabilité thermique de la L-glutaminase donc ça est probablement du à la nature thermophile de cette enzyme purifié produite par les souches d'actinomycètes.

L'activité enzymatique de L-arginine deiminase a été exprimée dans une gamme de 4°C à 50°C et le maximum été à température 4°C au niveau de l'extrait bactérien I2 dont la souche d'origine de laquelle a été extrais est une souche isolée de source d'eau froide de montagne.

Apparemment, la température optimale de l'AD (Arginine Deiminase) ne correspond pas nécessairement à l'environnement naturel de l'organisme dont il provient dont la température optimale pour l'arginine deiminase de *P. putida* et *Lactobacillus buchneri* a été

déterminé à 50 ° C, bien que, par exemple, les habitats naturels de *P. putida* sont des sols et de l'eau humide et ils se développent de manière optimale à 25-30°C. Aussi pour *L. lactis*, la température de croissance optimale est de 30 °C mais l'optimum d'activité de l'AD a été mesuré à 60°C (Hering et al., 2013).

Pour cela une large gamme de température optimale peut être trouvée chez Arginine Deiminase provenant de différents microorganismes et ne correspond pas aux températures dans les habitats naturels des bactéries respectives.

II. 4. Test de sensibilité des différents extraits enzymatiques bactériens aux protéases

Après incubation à 37°C pendant 24 h les zones roses sont formées dont leurs diamètres est mesuré.

a) L-glutaminase

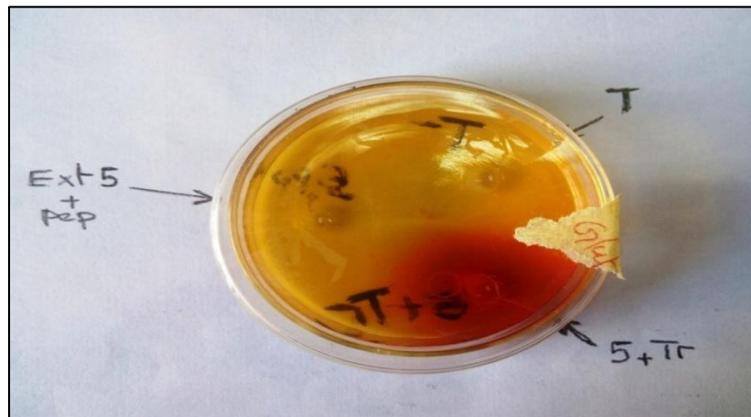


Figure 15 : activité de la L-glutaminase dans l'extrait 5 en présence de la trypsine et de la pepsine.



Figure 16 : l'activité enzymatique de la glutaminase dans l'extrait I2 seul et en présence de la trypsine

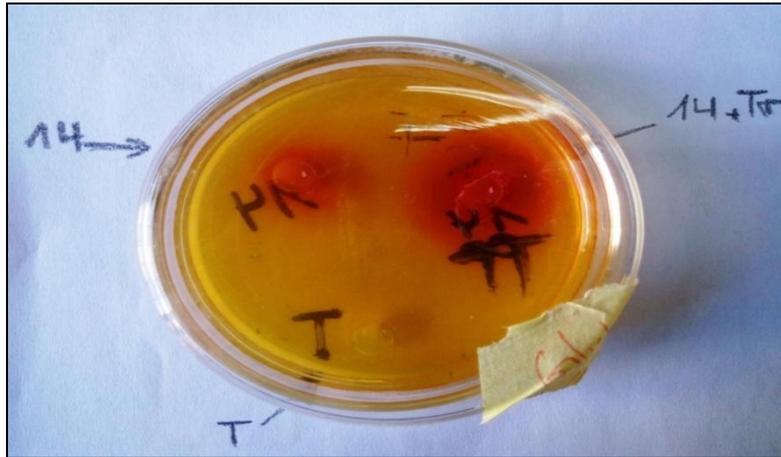


Figure 17 : activité de la L-glutaminase dans l'extrait 14 en présence de la trypsine

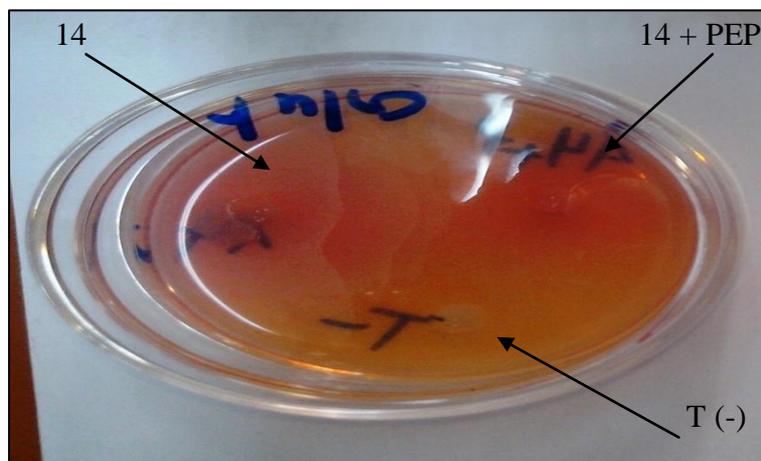


Figure 18 : activité de la L-glutaminase dans l'extrait 14 en présence de la pepsine



Figure 19 : activité de la L-glutaminase dans l'extrait I2 en présence de la pepsine

b) L-arginine deiminase



Figure 20 : activité de l'arginine deiminase dans l'extrait 5 en présence de la Pepsine et de la trypsine



Figure 21 : activité de la L-arginine deiminase dans l'extrait I2 en présence de la trypsine



Figure 22 : activité de la L-arginine deiminase dans l'extrait 14 en présence de la trypsine

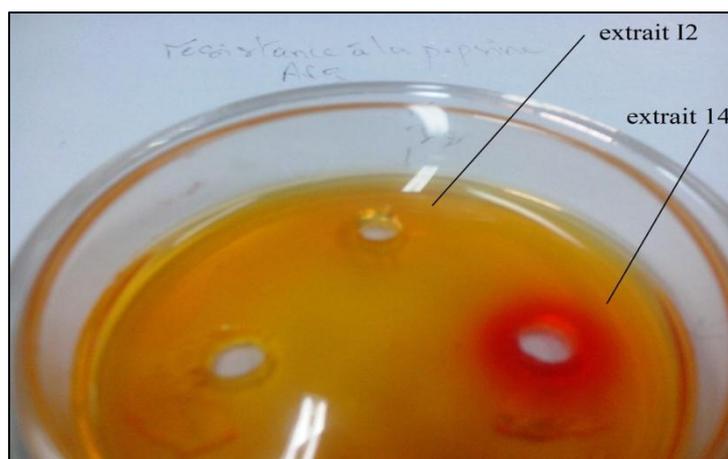


Figure 23 : activité de L-arginine deiminase dans l'extrait I2 et 14 en présence de la pepsine

Les tableaux ci-après résumant les résultats obtenus dans le test de sensibilité aux protéases :

Tableau XIX: Sensibilité de la glutaminase a la pepsine

L'extrait bactérien	Diamètre de la zone colorée (cm)
T(-)	0
I2	1,5
14	2
5	0

Tableau XX: Sensibilité de la glutaminase a la trypsine

L'extrait bactérien	Diamètre de la zone colorée (cm)
T(-)	0
I2	1.5
14	2
5	2.5

Tableau XXI: Sensibilité de l'arginine deiminase a la pepsine

L'extrait bactérien	Diamètre de la zone colorée (cm)
T(-)	0
I2	0
14	1.5
5	0

Tableau XXII: Sensibilité de l'arginine deiminase a la trypsine

L'extrait bactérien	Diamètre de la zone colorée (cm)
T(-)	0
I2	1
14	0
5	0

Comme illustré dans les images en haut (figure 19, 20,21 et 22) des zones d'inhibitions ont apparues autour des puits où 50 µl des extraits I2 et 14 ont été administrés, dont lesquels la trypsine et la pepsine ont légèrement affecté l'activité enzymatique des extraits en diminuant le diamètre de la zone d'inhibition de 2 cm à 1,5 cm pour I2 et de 2,5 à 2 pour l'extrait 14 de même pour l'extrait 5 qui a passé d'une zone de 3,5cm à 2,5 cm en présence de trypsine qui est d'un autre coté affecté totalement par la pepsine on n'exprimant aucune zone.

Ces résultats suggèrent la résistance de l'enzyme L-glutaminase aux enzymes protéolytiques ; trypsine et pepsine ; respectivement, et que ces dernières n'ont pas arrivé à couper les liaisons des chaines d'acides aminés lysine – Arginine au niveau du site actif de l'enzyme.

La sensibilité de l'enzyme Arginine deiminase est montrée dans les photos des figures 23, 24,25 et 26 dans lesquelles d'une part l'enzyme n'a exprimé de zones d'inhibitions qu'au niveau de l'extrait I2 en présence de trypsine et l'extrait 14 en présence de pepsine avec une baisse légère du diamètre de la zone colorée qui à diminuer de 1,5 cm à 1 cm pour I2 et de 3 cm à 1,5 cm pour 14,d'autre part aucune zone d'inhibition n'a été exprimé par l'extrait 5 en présence des deux protéases et par l'extrait I2 en présence pepsine et 14 en présence de trypsine.

Le résultat indique que l'arginine deiminase est très sensible aux enzymes protéolytiques et que celles-ci ont un effet sur le site actif de l'enzyme par la coupure des liaisons au niveau des acides aminés neutres.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Notre présente étude à met l'accent sur la caractérisation biochimique d'enzymes d'origine bactérienne des eaux de source de la région de TIKJDA.

Le travail a été initialisé par l'estimation qualitative et quantitative des activités enzymatiques de la glutaminase et de l'arginine deiminase dans quatre extraits bactérien brutes actif par dosage sur milieu solide par la méthode de diffusion des puits dans laquelle la glutaminase et l'arginine deiminase à exprimé des zones roses correspondant a leurs activités enzymatiques dont les maximales ont été 19,634 UI et de 15,904 UI au niveau de l'extrait bactérien O8F, a la fois la localisation cellulaire des enzymes à été identifiée comme extracellulaire en raison de l'apparition des zones colorés.

Par ailleurs, un dosage sur milieu liquide à été entamé pour l'estimation quantitative des enzymes Glutaminase et Arginine deiminase dans les extraits brutes actif, dans principalement l'intensité des colorations obtenues durant la catalyse des substrats renseigne sur la localisation cellulaire des enzymes, qui ont été très intense pour la glutaminase et également pour l'arginine deiminase ce qui fait que se sont probablement extracellulaires, et qui ont donné des activités maximales de 0,0298 UI au niveau de l'extrait I2 pour l'enzyme glutaminase et 0,0162 UI dans le même extrait pour l'arginine deiminase.

Par la suite, une maximisation des paramètres pH et température a été effectué pour la glutaminase pour laquelle son optimum pH été 7,0 avec une activité maximale de 0,0516 UI dans l'extrait 14, et pour l'arginine deiminase pour laquelle son optimum été entre 3,0 et 7,0 avec une activité maximale de 0,0542 UI au niveau de l'extrait I2, la L-glutaminase a été stable a 80 C° avec un maximum d'activité dans tous les extraits bactériens se qui prouve sa thermo résistance, contrairement l'arginine deiminase été active dans une gamme de 4°C à 50°C avec un maximum d'activité a 4°C dans l'extrait I2.

Ces résultats ont été complétés avec un test de sensibilité aux protéases (Trypsine et pepsine) d'un coté la trypsine et la pepsine ont légèrement affecté l'activité enzymatique des extraits en réduisant le diamètre de la zone d'inhibition de 2 cm à 1,5 cm pour l'extrait I2 et de 2,5 à 2 pour l'extrait 14 de même pour l'extrait 5 qui a passé d'une zone de 3,5cm à 2,5 cm en présence de trypsine qui est d'un autre coté affecté totalement par la pepsine, a ce point la glutaminase est considérée comme résistante aux protéases ,d'un autre coté l'arginine deiminase est trop sensible aux protéases en raison qu'elle n'a donner aucune zone dans l'extrait 5 et dans l'extrait I2 et 14 en présence de pepsine et de trypsine respectivement.

En guise de perspectives il est important de compléter le travail par une :

- Optimisation par variation de la durée d'incubation

Conclusion et perspectives

- Optimisation par variation de la concentration en substrat.
- Etude de l'effet des inhibiteurs, des activateurs et de la salinité sur l'activité enzymatique.
- Une SDS-PAGE pour déterminer le poids moléculaire des enzymes.

Sur la base des données obtenues dans la présente étude, on conclut que les bactéries notamment les actinomycètes sont des candidats idéaux à partir desquelles il est clairement indiqué qu'elles peuvent constituer une source importante d'enzymes d'intérêt industrielle et thérapeutique tels que la glutaminase et l'arginine deiminase.

Annexes

Annexe 1 : La localisation des enzymes L-glutaminase et L-arginine deiminase en fonction de l'intensité des colorations

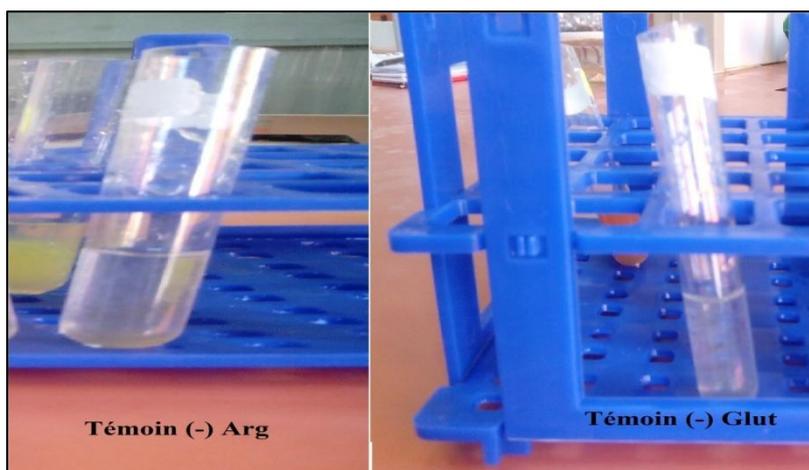
a) La glutaminase



b) L'arginine deiminase



c) Le témoin négatif de la glutaminase et de l'arginine deiminase



Annexe 02 : Composition des réactifs

Réactif de Nessler

- Iodure de potassium50 g
- Dichlorure de mercure Solution saturée
- Solution d'hydroxyde de Na 9N 400 ml

Solution d'HCL (1N)

- 8ml HCL
- 92 ml d'eau distillée pour ajuster jusqu'à 100 ml.

Solution de NaOH (1N)

- 4 g de NaOH
- 100 ml d'eau distillée

Solution de PBS (10X)

- Nacl 76,5 g.
- Na₂HPO₄7,25 g.
- KH₂PO₄ 2,1 g.
- H₂O Qsp 1 L.

Annexe 03 : Listes du matériel et réactifs utilisés.

1. Verrerie

- Fiole graduée de 250 ml.
- Flacons ECBU.
- Béchers et Erlen-Meyer.
- Eprouvette de 100 ml.
- Tubes à hémolyse stériles.
- Boîtes de pétris stériles.
- Flacon en verre de 200 ml.
- Tube à essai en verre.

2. Réactifs

- Eau distillée stérile.
- Enzymes protéolytiques (Trypsine et Pepsine)
- Rouge de phénol.
- Solution d'HCL 1N.
- Solution de NaOH 1N.
- Tris -HCL.
- L-glutamine.
- L-arginine.
- KCL
- MgSO4
- KH2PO4
- Glucose
- Acide Nalidixique.

3. Autres matériels

- Bec bunsen
- Perforateur à puits
- Pince, spatule.

Annexe 04 : Composition des milieux de culture utilisés

Milieu MGA (Minimal Glutamine Agar) en g/l

KCL0,5 g/l

$$AE \dots\dots\dots 9,621 \text{ cm}^2$$

- Pour l'extrait O8F : 1UI 1cm² } AE = 15,904 UI
- AE 15,904 cm² }

Calcul de la surface des zones colorées pour L-arginine deiminase

Le nombre d'unités est déterminé selon la loi de la surface : $S = R^2 \times \pi$ et $S = \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times \pi$

- L'extrait 14 : $\left(\frac{3}{2}\right)^2 \times 3,14 = 7,068 \text{ cm}^2$
- L'extrait I2 : $\left(\frac{1,5}{2}\right)^2 \times 3,14 = 1,767 \text{ cm}^2$
- L'extrait 5 : $\left(\frac{2}{2}\right)^2 \times 3,14 = 3,141 \text{ cm}^2$
- L'extrait O8F : $\left(\frac{5}{2}\right)^2 \times 3,14 = 19,634 \text{ cm}^2$

Calcul de l'activité enzymatique pour L-arginine deiminase dans chaque extrait bactérien

Une unité internationale de l'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme dans 1ml qui produit 1cm² de zone rose.

Dans 50 ul : 1UI \longrightarrow 1cm²/ml
 AE \longrightarrow S

- Pour l'extrait I2 : 1UI1 cm² } AE = 1,767 UI
- AE 1,767 cm² }

- Pour l'extrait 14 : 1UI 1cm² } AE = 7,068 UI
- AE 7,068 cm² }

- Pour l'extrait 5 : 1UI1cm² } AE = 3,141 UI
- AE 3,141 cm² }

- Pour l'extrait O8F : 1UI 1cm² } AE = 19,634 UI
- AE 19,634 cm² }

b) Dosage sur milieu liquide

La Glutaminase

$$\text{Extrait 14 : } x = \frac{0,034}{1,8198}$$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,0186 \mu\text{mol}$$

$$\text{AE} = \frac{0,0186}{0,5 \times 30} = 0,00124 \mu\text{mol/ml/min}$$

$$\text{Extrait 5 : } x = \frac{0,515}{1,8198}$$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,2829 \mu\text{mol}$$

$$\text{AE} = \frac{0,2829}{0,5 \times 30} = 0,01886 \mu\text{mol/ml/min}$$

$$\text{Extrait I2: } x = \frac{0,816}{1,8198}$$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,4484 \mu\text{mol}$$

$$\text{AE} = \frac{0,4484}{0,5 \times 30} = 0,0298 \mu\text{mol/ml/min}$$

$$\text{Extrait 08f : } x = \frac{0,324}{1,8198}$$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,1780 \mu\text{mol}$$

$$\text{AE} = \frac{0,1780}{0,5 \times 30} = 0,0118 \mu\text{mol/ml/min}$$

L'arginine deiminase

$$\text{Extrait 14 : } x = \frac{0,008}{1,8198}$$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,0043 \mu\text{mol}$$

$$\text{AE} = \frac{0,0043}{0,5 \times 30} = 0,00028 \mu\text{mol/ml/min}$$

$$\text{Extrait 5 : } x = \frac{0,270}{1,8198}$$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,1483 \mu\text{mol}$$

$$\text{AE} = \frac{0,1483}{0,5 \times 30} = 0,00988 \mu\text{mol/ml/min}$$

$$\text{Extrait I2: } x = \frac{0,444}{1,8198}$$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,2439 \mu\text{mol}$$

$$AE = \frac{0,2439}{0,5 \times 30} = 0,0162 \text{ } \mu\text{mol/ml/min}$$

Extrait O8F : $x = \frac{0,198}{1,8198}$

$$[\text{NH}_4^+] = 0,1088 \text{ } \mu\text{mol}$$

$$AE = \frac{0,1088}{0,5 \times 30} = 0,0072 \text{ } \mu\text{mol/ml/min}$$

Les références bibliographiques

- ABDALLAH, N. A., AMER, S. K. & HABEEB, M. K. 2012. Screening of L-Glutaminase produced by actinomycetes isolated from different soils in Egypt. *International Journal of ChemTech Research*, 4, 1451-1460.
- ADRIO, J. L. & DEMAÏN, A. L. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4, 117-139.
- ALBERTO, M. R., MANCA DE NADRA, M. C. & ARENA, M. E. 2012. Influence of phenolic compounds on the growth and arginine deiminase system in a wine lactic acid bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 167-176.
- ALTMAN, B. J., STINE, Z. E. & DANG, C. V. 2016. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16, 619-634.
- ARENA, M. E. & DE NADRA, M. C. M. 2005. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in microbiology*, 156, 858-864.
- BALAGURUNATHAN, R., RADHAKRISHNAN, M. & SOMASUNDARAM, S. 2010. L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments—selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Aust J Basic Appl Sci*, 4, 698-705.
- BARREDO, J.-L. 2005. *Microbial enzymes and biotransformations*, Springer.
- BENKERROUM, N., OUBEL, H., ZAHAR, M., DLIA, S. & FILALI-MALTOUF, A. 2000. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 960-968.
- BOUKAA, M. 2015. *Isolement des microorganismes producteurs de lipases à intérêt Biotechnologique*.
- BRIBIESCA, B. L. C. 2013. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16, 19-22.
- CASIANO-COLÓN, A. & MARQUIS, R. E. 1988. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1318-1324.
- CHAI, C. C. 2008. *Enhanced Production Of Lignin Peroxidase And Manganese Peroxidase By Phanerochaete Chrysosporium In A Submerged Culture Fermentation And Their*

- Application In Decolourisation Of Dyes TD897.[C434 2008 f rb]*. Universiti Sains Malaysia.
- CHAKDAR, H., KUMAR, M., PANDIYAN, K., SINGH, A., NANJAPPAN, K., KASHYAP, P. L. & SRIVASTAVA, A. K. 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6, 1-15.
- CHENEL, J. P. 2005. *Production d'enzymes protéolytiques par des bactéries non conventionnelles isolées de boues d'épuration municipales*. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
- CHITANAND, M. & SHETE, H. 2012. Condition optimization and production of extracellular L-glutaminase from *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3, 155e62.
- COOK, D. 1998. Curio City'. *Newsart KZN*, 2.
- COPELAND, R. A. 2004. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, John Wiley & Sons.
- DAS, K., BUTLER, G. H., KWIATKOWSKI, V., CLARK, A. D., YADAV, P. & ARNOLD, E. 2004. Crystal structures of arginine deiminase with covalent reaction intermediates: implications for catalytic mechanism. *Structure*, 12, 657-667.
- DIVYA TEJA, D., SRI DEVI, V. & HARSHA, N. 2014. Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes. *International Journal of Advanced Research*, 2, 485-491.
- EDDISON, O. M. 2013. *Distribution, isolation and characterization of bacteria with industrial potential in lake Nakuru, Kenya*. Egerton University.
- EL-GHONEMY, D. H. 2015. Microbial amidases and their industrial applications: a review. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 4, 1.
- EL-SAYED, A. S. 2009. L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid-state fermentation. *Indian Journal of Microbiology*, 49, 243-250.
- ELSHAFEI, A. M., HASSAN, M. M., ALI, N. H., ABOUZEID, M. A.-E., MAHMOUD, D. A. & ELGHONEMY, D. H. 2014. Purification, Kinetic Properties and Antitumor Activity of L-Glutaminase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829.
- FAYYAD, A., ELBASHITI, T. & ELKICHAOUI, A. 2008. *Isolation of Aspergillus oryzae and New Aroma Production for Soy Sauce*. The Islamic University-Gaza.
- GASSARA, F. 2012. *Production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide des déchets agroindustriels et leurs applications*. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.

- GOPINATH, S. C., ANBU, P., LAKSHMIPRIYA, T., TANG, T.-H., CHEN, Y., HASHIM, U., RUSLINDA, A. R. & ARSHAD, M. 2015. Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *BioMed research international*, 2015.
- GUPTA, R., GUPTA, N. & RATHI, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 763-781.
- HABEEB, M. K. 2013. arch in B. *Aim and Scope*, 775.
- HADJER, L. & HAYET, S. 2015. Production des protéases par les mycètes isolés de milieux sahariens. 1-47.
- HASHIZUME, R., MAKI, Y., MIZUTANI, K., TAKAHASHI, N., MATSUBARA, H., SUGITA, A., SATO, K., YAMAGUCHI, S. & MIKAMI, B. 2011. Crystal structures of protein glutaminase and its pro forms converted into enzyme-substrate complex. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 38691-38702.
- HERING, S., SIEG, A., KREIKEMEYER, B. & FIEDLER, T. 2013. Kinetic characterization of arginine deiminase and carbamate kinase from *Streptococcus pyogenes* M49. *Protein expression and purification*, 91, 61-68.
- IMADA, A., IGARASI, S., NAKAHAMA, K. & ISONO, M. 1973. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Microbiology*, 76, 85-99.
- IMRAN, M., ANWAR, Z., IRSHAD, M., ASAD, M. J. & ASHFAQ, H. 2016. Cellulase production from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in industry: A review. *Advances in Enzyme Research*, 4, 44.
- KAPILAN, R. & ARASARATNAM, K. 2017. Industrial Applications of Bacterial Xylanases: A Review. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 25, 79-89.
- KIRUTHIKA, J. & SARASWATHY, N. 2013. Production of L-glutaminase and its optimization from a novel marine isolate *Vibrio azureus* JK-79. *African Journal of Biotechnology*, 12, 6944.
- KUMETA, H., MIWA, N., OGURA, K., KAI, Y., MIZUKOSHI, T., SHIMBA, N., SUZUKI, E.-I. & INAGAKI, F. 2010. The NMR structure of protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*. *Journal of Biomolecular NMR*, 46, 251-255.
- LI, L., LI, Z., CHEN, D., LU, X., FENG, X., WRIGHT, E. C., SOLBERG, N. O., DUNAWAY-MARIANO, D., MARIANO, P. S. & GALKIN, A. 2008. Inactivation of microbial arginine deiminases by L-canavanine. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 1918-1931.

- LI, S., YANG, X., YANG, S., ZHU, M. & WANG, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, 1-11.
- MENENDEZ, E., GARCIA-FRAILE, P. & RIVAS, R. 2015. Biotechnological applications of bacterial cellulases.
- MUTHUKUMARASAMY, N. P. & MURUGAN, S. 2014. Production, purification and application of bacterial laccase: a review. *Biotechnology*, 13, 196.
- NANDAKUMAR, R., YOSHIMUNE, K., WAKAYAMA, M. & MORIGUCHI, M. 2003. Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23, 87-100.
- NATHIYA, K., NATH, S. S., ANGAYARKANNI, J. & PALANISWAMY, M. 2012. In vitro cytotoxicity of L-glutaminase against MCF-7 cell line. *Asian J Pharm Clinical Res*, 5, 0974-2441.
- NI, Y., SCHWANEBERG, U. & SUN, Z.-H. 2008. Arginine deiminase, a potential anti-tumor drug. *Cancer Letters*, 261, 1-11.
- NIGAM, P. S. 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3, 597-611.
- NILADEVI, K. 2009. Ligninolytic enzymes. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer.
- PALANISWAMY, M. 2011. SCREENING OF A HIGH GLUTAMINOLYTIC ENZYME PRODUCING STRAIN AND ITS EXTRACELLULAR PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION K. NATHIYA¹, SOORAJ. S. NATH¹, J. ANGAYARKANNI² AND M. PALANISWAMY¹.
- PLÁCIDO, J. & CAPAREDA, S. 2015. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 2, 23.
- PRABHU, G. N. & CHANDRASEKARAN, M. 1999. Purification and characterization of an anti-cancer enzyme produced by marine *Vibrio Costicola* under a novel solid state fermentation process. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, 363-368.
- PRATHYUSHA, K. & SUNEETHA, V. 2011. Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/juice production industry: a review. *Journal of Phytology*, 3.
- PRIYADARSHINEE, R., KUMAR, A., MANDAL, T. & DASGUPTAMANDAL, D. 2016. Unleashing the potential of ligninolytic bacterial contributions towards pulp and paper

- industry: key challenges and new insights. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 23349-23368.
- RAJENDRA DUBEY, A. P., NEHA PRITY 2015. PURIFICATION, ASSAY AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ANTI-CANCER ENZYME L-GLUTAMINASE FROM BACILLUS SUBTILIS. 4, 269-290.
- RAVINDRAN, R. & JAISWAL, A. K. 2016. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. *Bioengineering*, 3, 30.
- ROBINSON, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41.
- S. SRIDEVI, K. P., Y.S.Y.V. JAGAN MOHAN, B.V. SANDEEP 2016. Isolation and Primary Screening of L-Glutaminase from Agro-residual Wastes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 39, 147-150.
- SADHU, S. & MAITI, T. K. 2013. Cellulase Production by Bacteria: A Review.
- SAHNI, N., SAHOTA, P. P. & PHUTELA, U. G. 2015. Bacterial keratinases and their prospective applications: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4, 768-783.
- SAJITHA, N., VASUKI, S., SUJA, M., KOKILAM, G. & GOPINATH, M. 2013. Screening of L-glutaminase from Sea Weed Endophytic Fungi. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 206-209.
- SALMAN, M. I., SALIH, M. T., MOHYEADDIN, M. O. & AL-ANI, M. Q. 2014. Medium Optimization for Production of L-Glutaminase (EC 3.5. 1.2) by Burkholderia cepacia complex.
- SARADA, K. 2013. Production and applications of L-Glutaminase using fermentation technology. *Asia Pac J Res*, 1, 1.
- SASIKUMAR, V., PRIYA, V., SHANKAR, C. S. & SEKAR, D. S. 2014. Isolation and Preliminary Screening of Lignin Degrading Microbes. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 3, 291.
- SATO, F., OMURA, H. & HAYANO, K. 1983. A method for estimation of L-glutaminase activity in soils. *Soil science and plant nutrition*, 29, 295-303.
- SAXENA, A., UPADHYAY, R. & KANGO, N. 2015. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase.
- SELMANE, D. & BILLEL, Y. 2014. contribution à la valorisation de plumes de volaille comme élément de milieu de fermentation fongique. 30.

- SELVAM, K. 2012. Biochemical and molecular characterization of microbial keratinase and its remarkable applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 3.
- SOUZA, P. M. D. 2010. Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850-861.
- STARIKOVA, E. A., SOKOLOV, A. V., VLASENKO, A. Y., BUROVA, L. A., FREIDLIN, I. S. & VASILYEV, V. B. 2015. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochemistry and Cell Biology*, 94, 129-137.
- SUBRAMANIYAN, S. & PREMA, P. 2000. *Studies on production of bacterial xylanases*. Regional Research Laboratory.
- SUNDARRAM, A. & MURTHY, T. P. K. 2014. α -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 166-175.
- UMAMAHESWARI, T., HEMALATHA, T., SANKARANARAYANAN, P. & PUVANAKRISHNAN, R. 2016. Enzyme Therapy: Current Perspectives.
- UNISSA, R., SUDHAKAR, M., REDDY, A. S. K. & SRAVANTHI, K. N. 2014. A review on biochemical and therapeutic aspects of glutaminase. *International Journal of pharmaceutical sciences and research*, 5, 4617.
- VANDER WAUVEN, C., PIERARD, A., KLEY-RAYMANN, M. & HAAS, D. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *Journal of bacteriology*, 160, 928-934.
- VIJAYALAKSHMI, S., VENKAT KUMAR, S. & THANKAMANI, V. 2011. Optimization and cultural characterization of *Bacillus* RV. B2. 90 producing alkalophilic thermophilic protease. *Res. J. Biotechnol*, 6, 26-32.
- WASSILA, D. 2006. Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. 1-84.
- WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E. & STETTEN JR, D. 1959. Principles of biochemistry. *Principles of Biochemistry*.
- WITAYAKRAN, S. 2008. *Laccase in organic synthesis and its applications*, Georgia Institute of Technology.

ZHUO, W., SONG, X., ZHOU, H. & LUO, Y. 2011. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. Portland Press Limited.

RESUME

La présente étude a porté sur une caractérisation biochimique de la glutaminase et de l'arginine deiminase dont l'intérêt est proprement industriel et thérapeutique car elles sont reconnues comme ayant une activité anti tumorale puissante avec des applications dans différents domaines industriels, ces enzymes sont largement distribuées dans des micro-organismes comprenant les levures, les champignons et particulièrement les bactéries, ce travail est basé sur la recherche de l'activité enzymatique des deux enzymes ; dans différents extraits bactériens de souche d'actinomycètes préalablement identifiées ; par certaines méthodes notamment le dosage qualitatif et quantitatif sur milieu MGA et MGA modifié dans lequel ont été caractérisées comme des enzymes extracellulaires avec des activités maximales de 19,643 UI et 15,904 UI dans l'extrait O8F pour l'arginine deiminase et la glutaminase respectivement ainsi que dans le dosage sur milieu liquide par Nesslerization dans lequel ont donné des coloration intenses prouvant leurs localisation extracellulaire avec des activités maximales de 0,0298 UI et de 0,0162 UI pour la glutaminase et l'arginine deiminase respectivement dans l'extrait I2. Les conditions d'activité des enzymes ont été étudiées tel que l'effet du pH et de température pour lesquels l'activité maximale de la glutaminase a été observée a 80°C et a pH 7,0 et a 4°C et a pH 5,0 pour l'arginine deiminase.

Au final la caractérisation a été complétée par le test de sensibilité aux enzymes protéolytiques (Trypsine et Pepsine) dans lequel la glutaminase a été apparue plus résistante a leurs effets sur les chaines d'acides aminés Lys-Arg par apport a l'arginine deiminase qui a été moins résistante.

Mots clés : Glutaminase, Arginine deiminase, Actinomycètes, milieu MGA, Nesslerization, Enzymes protéolytiques.

Abstract

The present study focused on a biochemical characterization of glutaminase and arginine deiminase, which are of a purely industrial and therapeutic interest because they are recognized as having powerful anti-tumor activity with applications in different industrial domains, these enzymes have largely to distribute in microorganisms comprising yeasts, fungi and especially bacteria, the work is based on the enzymatic activity of the two enzymes; in different bacterial extracts of actinomycetes strain previously identified; By certain methods in particular the qualitative and quantitative assay on MGA medium and MGA modified medium in which have been characterized as extracellular enzymes with maximum activities of 19,643 IU and 15,904 IU in the O8F extract for arginine deiminase and glutaminase respectively as well as in the assay on liquid medium by Nesslerization gave intense staining confirming their extracellular localization with maximal activities of 0.0298 IU and 0.0162 IU for glutaminase and arginine deiminase respectively in the I2 extract. Enzymes were optimized by studying the effect of pH and temperature at which the maximum activity of glutaminase was observed at 80 ° C and at pH 7.0 so that it is heat-resistant, at 4 ° C and at pH 5.0 for arginine deiminase.

Finally, the characterization was completed by the sensitivity test to proteolytic enzymes (Trypsin and Pepsin), in which the glutaminase was found to be more resistant to their effects on the Lys-Arg amino acid chains than to arginine deiminase which was less resistant.

Key words: Glutaminase, Arginine deiminase, Actinomycetes, MGA medium, Nesslerization, Proteolytic enzymes.