



## *Dédicace*

A mes chers parents, pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières,

A mes chères sœurs, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères, pour leur appui et leur encouragement,

A tous mes amis pour leur soutien, leur aide et leurs encouragements

Merci d'être toujours là pour moi.

## *Remerciements*

Je voudrais dans un premier temps remercier spécialement feu Mme ZAIDI-YAHIAOUI Rachida (Professeur à l'Université de Bejaia), que Dieu ait son âme et l'accueille en son vaste paradis, qui fut la première à me faire découvrir le domaine de la recherche et qui a guidé mes premiers pas dans ce domaine en tant que Directrice de thèse de 2013 à 2017.

Je tiens à remercier mon Co-Directeur de thèse Dr. MOSTEFAOUI Toufik Amayas (MCA à la Faculté des Sciences Exactes, U. Bejaia), qui a co-diriger ce travail de thèse depuis le début, pour sa confiance et ses orientations.

Mes remerciements s'adressent à Mme BENDALI Farida (Professeur à l'université de Bejaia), ma directrice de thèse, qui a pris en charge cette thèse depuis 2017-2018, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à finaliser la thèse. Je ne saurais vous remercier assez pour tous les efforts fournis durant la rédaction de cette thèse.

Je désire aussi remercier les professeurs M. BENALLAOUA Said et M. KECHA Mouloud, les directeurs du laboratoire de Microbiologie Appliquée (U. Bejaia) et tout le personnel de ce laboratoire, qui ont mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de mes travaux.

Un remerciement particulier aux membres du laboratoire Physico- Chimie des Matériaux et Catalyse (Faculté des Sciences Exactes) et j'en cite les professeurs M. BELABBAS Imad et M. BENMERRAD Belkacem et toute l'équipe qui m'ont aidé à élargir mon axe de travail et mes connaissances en me faisant découvrir le monde des nanoparticules.

Je remercie Monsieur Bart DE SPIEGELEER, directeur du laboratoire de Recherche DrugQuaR (U. de Gand, Belgique) qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et m'a enseigné rigueur et précision. Je remercie également Mlle Han YAO pour son suivi et sa patience à répondre à mes innombrables questions.

Je tiens aussi à remercier M. AZARKAN Mohamed, Directeur de l'Unité de Recherche de Chimie des Protéines (Faculté des Médecine, Université Libre de Bruxelles, Belgique), qui m'a accueilli au sein de l'unité. C'est grâce à lui que j'ai pu concilier avec bonheur recherches théorique et appliquée pendant cette thèse.

Je suis très honorée de remercier les membres de jury. Mme Pr. BEDJOU Fatiha (FSNV, U. Bejaia) pour avoir accepté de présider le jury, Mrs. Pr. HOUALI Karim (U. Tizi

## *Remerciements*

Ouzou), Pr. OUHENIA Salim (FSE, U. Bejaia) et Dr. AKSAS Ali (FSNV, U. Bejaia) qui ont bien voulu examiner ce travail de thèse. Vos remarques et suggestions ne feront que rehausser la qualité de ce travail.

J'aimerais exprimer ma gratitude à toutes les personnes, trop nombreuses pour les citer, qui ont pris de leur temps pour discuter de mon sujet. Chacun de ces échanges m'a aidé à faire avancer mon travail.

**Merci à tous**

## Liste des abréviations

**AHA** : Aspartic  $\beta$ -hydroxamate Acid

**Anti-EGFR**: Anti-Epithelial Growth Factor

**Asn**: Asparagine

**BRC**: Bromophénol Réducteur concentré

**CFBP** : Collection Française des Bactéries Phytopathogènes

**ChT** : Chymotrypsine

**DBC** : Développement Bromophénol concentrée (

**DRX**: Diffraction aux Rayons X

**DoE** : Design of Experiment

*E. Escherichia*

**ECA**: *E. coli* Asparaginase

*Er*: *Erwinia*

**ERA**: *Erwinia* Asparaginase

**FAO/OMS**: Food and Agriculture Organization/ Organisation Mondiale de la Santé

**FPLC**: Fast Protein Liquid Chromatography

**FT-IR**: Fourier Transform Infra Red

**GDH** : Glutamate Déshydrogénase

**Gdn HCl**: Guanidine Chlorhydrate

**IDC**: Iode Développement concentrée

**JECFA**: Joint Expert Committee on Food Additives

**IM**: Intramusculaire

**IPO**: International Plant Organization

**L-Asnase** : L-Asparaginase

**LP**: Levure peptone

**LLA** : Leucémie lymphoblastique aigue

**MTTC**: Microbial Type Culture Collection

**MWCO** : Molecular Weight Cut Off

**NCPPB** : National Collection of Phytopathogenic Bacteria

**NCYC:** National Catholic Youth Conference

**NPs :** Nanoparticules

**PBD:** Plackett-Burman Design

**PAB:** Para-aminobenzoate

**PEG:** Poly (Ethylène Glycol)

**PET:** Poly- (Ethylène Téréphthalate)

**RP-HPLC:** Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography

**rpm:** rotation par minute

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis

**SPE-DRS :** Solid Phase Extraction-Diffuse-Reflexion Spectroscopy

**SRC:** Solution du réactif d'argent concentré

**SWNT :** Single-Walled Carbon Nanotubes

**SU:** Sous-Unité

**TEMED:** N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine

**UCB:** Union Chimiaue Belge

**UFC :** Unité Formant Colonie

**UV-VIS :** Ultraviolet-Visible

<b>Figure 1.</b> Utilisation de nanoparticules dans les objets du quotidien .....	p7
<b>Figure 2.</b> Structure cristalline du dimère intime de l'asparaginase ECAII .....	p19
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique d'un monomère de L-asparaginase d' <i>Erwinia</i> .....	p20
<b>Figure 4.</b> Illustration schématique du mécanisme de réaction de la L-asparaginase .....	p21
<b>Figure 5.</b> Schéma de l'activité glutaminasique de l'asparaginase d' <i>E. coli</i> .....	p22
<b>Figure 6.</b> Formation du polyacrylamide à partir d'acrylamide .....	p28
<b>Figure 7.</b> Mécanisme réactionnel du dosage enzymatique couplé .....	p29
<b>Figure 8.</b> Interaction du réactif de Nessler avec l'ammoniac .....	p29
<b>Figure 9.</b> Mécanisme de la formation du bleu d'indophénol .....	p31
<b>Figure 10.</b> Mécanisme de réaction du kit Glutamate Déshydrogénase .....	p31
<b>Figure 11.</b> Mécanisme de réaction du procédé Indooxine .....	p32
<b>Figure 12.</b> Réaction de l'indophénol .....	P45
<b>Figure 13.</b> Résultats de l'affinement des Nps de ZnO par la méthode de Ritveded.....	p50
<b>Figure 14.</b> Résultats de l'affinement des Nps de TiO <sub>2</sub> par la méthode de Ritveded.....	P51
<b>Figure 15.</b> Diagramme de l'intensité de l'émission des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> en fonction de la moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur .....	p52
<b>Figure 16.</b> Diagramme de l'intensité de l'émission des nanoparticules de ZnO en fonction de la moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur .....	p52
<b>Figure 17.</b> Température optimale de croissance bactérienne et de production de L asparaginase .....	p53
<b>Figure 18.</b> pH optimal de la croissance bactérienne et de production de la L-asparaginase ...	p54
<b>Figure 19.</b> Activité de la L-asparaginase en culture agitée et en culture sans agitation .....	p55
<b>Figure 20.</b> Effet de la concentration de la L-asparagine sur la production de la L-asparaginase .....	p56
<b>Figure 21.</b> Chromatogramme obtenu par « Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en présence de la L-asparagine.....	p58

- Figure 22.** Chromatogramme obtenu par « Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en absence de la L-asparagine.....p58
- Figure 23.** Superposition des chromatogrammes obtenus par « Q-Sepharose Fast Flow Hi-Trap » de l'extrait bactérien issus de cultures réalisées en présence et en absence de la L-asparagine ..... p59
- Figure 24.** Chromatogramme obtenu par « FPLC-Superdex 75 PG » du pool III récupéré après chromatographie « Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en absence de la L-asparagine ..... p60
- Figure 25.** Chromatogramme obtenu par « FPLC-Superdex 75 PG » du pool III récupéré après chromatographie « Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en présence de la L-asparagine .....p60
- Figure 26.** Superposition des chromatogrammes obtenus par « FPLC-Superdex 75 pg » obtenus en présence et en absence de la L-asparagine dans le milieu de culture..... p61
- Figure 27.** Profil SDS-PAGE des pics obtenus après chromatographie « Q-Sepharose Fast Flow » des pools issus de la chromatographie « Hi-Trap et FPLC-Superdex 75 PG..... p62
- Figure 28.** Récapitulatif des courbes d'ajustement après transformation exponentielle ..... p68
- Figure 29.** Diagramme de probabilité normale des résidus ..... p69
- Figure 30.** Récapitulatif des courbes d'ajustement après transformation exponentielle .....p70
- Figure 31.** Analyse des coefficients de régression .....p71
- Figure 32.** Tracés de contour (contour plots) avec absorbance en réponse .....p72
- Figure 33.** Activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de différentes concentrations de nanoparticules de ZnO..... p73
- Figure 34.** Activité antibactérienne à l'égard de *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* CIP 81-3 de différentes concentrations de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ..... p74
- Figure 35.** Activité antibactérienne à l'égard de *Dickeya solani* de différentes concentrations de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ..... p74

**Figure 36.** Activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de différentes concentrations des nanoparticules de ZnO..... p75

## Liste des figures des annexes

### Annexe I

**Figure 1.** Courbe d'étalonnage du sulfate d'ammonium utilisée pour déterminer l'activité enzymatique par la méthode de Nessler.

### Annexe II

**Figure 1.** Courbe d'étalonnage avec la Sérum Albumine Bovine (BSA) pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

### Annexe III

**Figure 1.** Courbe linéaire standard de l'ammoniaque.

### Annexe VI

**Figure 1.** Surface spécifique des nanoparticules de ZnO.

**Figure 1.** Surface spécifique des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>.

### Annexe VII

**Figure 1.** Gel d'électrophorèse coloré à l'Argent après purification des échantillons par la chromatographie Acta prime Fast- flow.

**Figure 2.** Gel d'électrophorèse coloré à l'Argent après purification des échantillons par la chromatographie Superdex 75pg.

<b>Tableau I.</b> Exemples d'utilisation des nanotechnologies .....	p4
<b>Tableau II.</b> Exemples d'activités anthropiques et concentrations en nanoparticules.....	p5
<b>Tableau III.</b> Organismes vivants producteurs de la L-asparaginase.....	p15
<b>Tableau IV.</b> Caractéristiques de quelques L-asparaginases microbiennes.....	p16
<b>Tableau V.</b> Caractéristiques des L-asparaginases de certaines espèces du genre <i>Erwinia</i> .....	p26
<b>Tableau VI.</b> Traitement du gel d'électrophorèse .....	p40
<b>Tableau VII.</b> Conditions de fonctionnement de l'électrophorèse.....	p40
<b>Tableau VIII.</b> Echantillons et réactifs utilisés.....	p44
<b>Tableau IX.</b> Facteurs et intervalles de l'optimisation.....	p45
<b>Tableau X.</b> Le modèle de Plackett-Burman (PBD).....	p47
<b>Tableau XI.</b> Expériences d'optimisation de la méthode de Berthelot.....	p48
<b>Tableau XII.</b> Résultats de la caractérisation des nanoparticules.....	p51
<b>Tableau XIII.</b> Résumé des étapes de purification de la L-asparaginase à partir de <i>Dickeya solani</i> .....	p57
<b>Tableau XIV.</b> Spécificité de la L-asparaginase vis-à-vis de la L-asparagine versus la L-glutamine .....	p64
<b>Tableau XV.</b> Activité de la L-asparaginase en présence de nanoparticules de ZnO.....	p64
<b>Tableau XVI.</b> Activité de la L-asparaginase en présence de nanoparticules de TiO <sub>2</sub> .....	p64
<b>Tableau XVII.</b> Effet de la surface des nanoparticules sur l'activité spécifique de la L-asparaginase .....	p65
<b>Tableau XVIII.</b> Données de l'activité L-asparaginase.....	p67
<b>Tableau XIX.</b> Valeurs de référence et expérimentales des indicateurs de performance du modèle avant et après la suppression de la valeur aberrante.....	p68
<b>Tableau XX.</b> La valeur du coefficient dans l'intervalle de confiance (95%) de l'équation mathématique.....	p71

**Tableau XXI** Activité antibactérienne de différentes concentrations de nanoparticules (R pour Résistant aux nanoparticules) ..... p76

**Tableau XXII** Résistance et sensibilité des espèces bactériennes étudiées aux nanoparticules de ZnO et TiO<sub>2</sub> comparées à celles d'Argent (R pour résistant, S pour sensible) .....p78

### **Liste des tableaux des annexes**

#### **Annexe I**

**Tableau I.** Conditions de la caractérisation des nanoparticules par la méthode BET

**Tableau II.** Valeurs utilisées pour le tracé de la courbe d'étalonnage du sulfate d'ammonium

#### **Annexe III**

**Tableau I.** Concentrations de la solution d'étalonnage de la courbe de sulfate d'ammonium

#### **Annexe V**

**Tableau I.** Conditions d'utilisation de l'optimisation DoE CCF 14+3

**Tableau II.** Résultats des différents paramètres de l'ajustement des erreurs

**Tableau III.** Les coefficients d'erreurs trouvées dans l'analyse DoE

#### **Annexe VII**

**Tableau I.** Distribution des différentes fractions électrophorétiques issues de la chromatographie ACTA Prime Fast- flow sur le gel

**Tableau II.** Distribution des différentes fractions électrophorétiques issues de la chromatographie Superdex 75 pg sur le gel.

<b>IntroductionTiO<sub>2</sub></b> .....	<b>1</b>
<b>Partie 1 : Synthèse bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>I. Généralités sur les nanoparticules</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1 Définition</b> .....	<b>4</b>
<b>I.2 Sources des NPs</b> .....	<b>4</b>
I.2.1 Nanoparticules naturelles.....	4
I.2.2 Nanoparticules anthropiques.....	4
<b>I.2.3 Les nano-objets intentionnellement produits</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3 Toxicité et enjeux</b> .....	<b>7</b>
<b>I.3.1 Toxicité</b> .....	<b>7</b>
<b>I.3.2 Enjeux</b> .....	<b>8</b>
<b>I.4 Application en Biologie</b> .....	<b>9</b>
<b>I.4.1 Effet photo-thermique sélectif pour la thérapie du cancer</b> .....	<b>9</b>
<b>I.4.2 Effets antimicrobiens</b> .....	<b>10</b>
<b>I.4.3 Effet spécifique des nanoparticules sur les protéines (enzymes)</b> .....	<b>11</b>
<b>II. Considérations générales sur la L-asparaginase</b> .....	<b>13</b>
II.1 Importance des L-asparaginases d' <i>E. coli</i> et d' <i>Erwinia</i> sp.....	17
<b>II.2 Structure et mécanisme d'action</b> .....	<b>18</b>
<b>II.2.1. Caractères structuraux communs des asparaginases</b> .....	<b>17</b>
<b>II.2.2 Mécanisme de réaction</b> .....	<b>19</b>
<b>II.3 Toxicité</b> .....	<b>21</b>
<b>III. Asparaginases d'<i>Erwinia</i></b> .....	<b>24</b>
<b>III.1 Description des <i>Erwinia</i> pectinolytiques</b> .....	<b>24</b>
<b>III.2 Production d'enzymes</b> .....	<b>25</b>
<b>III.2.1 Caractéristiques de la L-asparaginase du genre <i>Erwinia</i></b> .....	<b>26</b>
III.2.2 Séquence génétique de l'asparaginase d' <i>Erwinia</i> .....	26
<b>III.2.3 Propriétés thérapeutiques</b> .....	<b>26</b>
<b>III.2.4 Activité enzymatique de la L-asparaginase sans et avec les Nanoparticules</b> .....	<b>28</b>

<b>Partie 2 : Partie pratique.....</b>	<b>33</b>
I. Matériel et méthodes.....	33
<b>I.1 Synthèse des nanoparticules de ZnO.....</b>	<b>33</b>
<b>I.2 Nanoparticules de TiO<sub>2</sub>.....</b>	<b>33</b>
<b>I.3 Caractérisation des nanoparticules.....</b>	<b>33</b>
<b>I.3.1 Préparation des échantillons.....</b>	<b>34</b>
<b>I.3.2 Analyse de surface spécifique (méthode BET).....</b>	<b>34</b>
<b>I.4 Extraction, purification et caractérisation de la L-asparaginase de <i>Dickeya solani</i>...35</b>	<b>35</b>
<b>I.4.1 Souches utilisées et conditions de culture.....</b>	<b>35</b>
<b>I.4.2 Préparation de la culture bactérienne.....</b>	<b>36</b>
<b>I.4.3 Mesure de l'activité de la L-asparaginase.....</b>	<b>36</b>
<b>I.4.4 Optimisation de la croissance bactérienne et de la production de la L-asparaginase .....</b>	<b>37</b>
<b>I.4.5 Purification de la L-asparaginase.....</b>	<b>38</b>
<b>I.4.6 Spécificité de la L-asparaginase vis-à-vis de la L-asparagine et de la L-glutamine. 41</b>	<b>41</b>
<b>I.4.7 Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....</b>	<b>41</b>
<b>I.5 Optimisation de l'activité de la L-asparaginase par la méthode de Berthelot.....</b>	<b>42</b>
<b>I.5.1 Calcul de l'activité enzymatique par la méthode de Berthelot.....</b>	<b>42</b>
<b>I.5.2 Optimisation de la méthode de Berthelot.....</b>	<b>45</b>
<b>I.6 Activité antibactérienne des nanoparticules.....</b>	<b>48</b>
<b>I.6.1 Préparation des solutions de nanoparticules.....</b>	<b>48</b>
<b>I.6.2 Préparation des souches bactériennes cibles.....</b>	<b>48</b>
<b>I.6.3 Culture bactérienne.....</b>	<b>49</b>
<b>I.6.4 Test de l'activité antibactérienne.....</b>	<b>49</b>
<b>II. Résultats et discussion.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1 Synthèse et caractérisation des nanoparticules.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1.1 Résultats de la DRX.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1.2 Résultats de la BET.....</b>	<b>51</b>
<b>II.2 Résultats de la purification de la L-asparaginase.....</b>	<b>53</b>
<b>II.2.1 Optimisation de la croissance et de la production de la L-asparaginase.....</b>	<b>53</b>

<b>II.2.2 Purification de la L-asparaginase.....</b>	<b>56</b>
<b>II.2.3 Évaluation de la spécificité de la L-asparaginase vis-à-vis de la L-asparagine par rapport à la L-glutamine.....</b>	<b>63</b>
<b>II.3 Résultats de l'activité L-asparaginasique des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO.....</b>	<b>64</b>
<b>II.3.1 Effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO sur l'activité de la L-asparaginase....</b>	<b>64</b>
<b>II.3.2 Comparaison de l'activité spécifique de la L-asparaginase en présence de nanoparticules de ZnO et de TiO<sub>2</sub>.....</b>	<b>65</b>
<b>II. 4 Résultats de l'optimisation de l'activité de la L-asparaginase par la méthode de Berthelot.....</b>	<b>67</b>
<b>II. 4.1 Résultats de l'activité de la L-asparaginase.....</b>	<b>67</b>
<b>II. 4.2 Analyse de régression.....</b>	<b>67</b>
<b>II. 5 Activité antibactérienne des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO.....</b>	<b>73</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>83</b>

## Introduction

La nanotechnologie est très florissante ces dernières années (Agrawal et Kango, 2019). En effet, les matériaux nanostructurés attirent énormément l'attention en raison de leur potentiel de réalisation de processus spécifiques et de leur sélectivité, notamment dans les applications biologiques et pharmaceutiques (Losasso et *al.*, 2014). Les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) et d'oxyde de zinc (ZnO), d'un diamètre de moins de 100 nm, sont devenues une nouvelle génération de matériaux avancés en raison de leurs propriétés optiques nouvelles et intéressantes, diélectriques et photo-catalytiques (Alivisatos et *al.*, 1996). Le TiO<sub>2</sub> est un matériau photo-catalytique qui joue un rôle dans la dépollution de l'environnement en raison de sa non-toxicité, de sa super-hydrophobie photo-induite et de son effet antibuée (Kato et Kudo, 2002; Haghi et *al.*, 2012). De même, le ZnO est non toxique et biocompatible, relativement simple à synthétiser à de faibles coûts et est physiquement et chimiquement stable (Habba, 2107).

Les travaux de recherche les plus récents se focalisent sur les effets des nanoparticules sur les activités biologiques. Dans le présent travail, nous nous intéressons dans un premier temps, à l'extraction d'une L-asparaginase bactérienne et l'évaluation de l'effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et ZnO sur son activité. La L-asparaginase est largement répandue dans la nature, elle est présente non seulement dans les organes des animaux (Prista et Kyridio, 2001), mais aussi dans certaines plantes (Borek et Jaskolski, 2001) et chez les champignons et bactéries (Michalska et *al.*, 2006). Les bactéries pectinolytiques (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) représentent une source potentielle de nombreuses enzymes extracellulaires. A côté, des pectinases, elles sont capables de produire d'autres enzymes d'intérêts tels que la L-asparaginase dotée de propriétés thérapeutiques intéressantes. Le potentiel thérapeutique de cette enzyme est bien établi, car elle a démontré son efficacité de guérison chez la plupart des patients souffrant de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA). Elle a également été employée dans le traitement du lymphosarcome et dans de nombreuses autres expériences cliniques concernant le traitement des tumeurs en combinaison avec la chimiothérapie (Sonyamby et *al.*, 2011). Par ailleurs, des travaux récents ont également montré l'efficacité de cette enzyme dans la réduction de l'acrylamide, produit cancérigène se retrouvant dans divers aliments (Anese et *al.*, 2011). On distingue deux formes de L-asparaginase: La L-asparaginase I, une enzyme constitutive intracellulaire, et la L-asparaginase II, une enzyme extracellulaire qui est sécrétée en réponse à un épuisement d'azote. Les deux enzymes sont biochimiquement et génétiquement distinctes.

## Introduction

La L-asparaginase II est largement distribuée dans les cellules procaryotes et eucaryotes et a été intensivement étudiée durant ces dernières cinq décennies (Magdy et *al.*, 2008). Même si cette enzyme est potentiellement produite par de nombreux organismes, son application reste limitée en raison des effets secondaires induits lors des essais cliniques. Ainsi, la découverte de nouvelles L-asparaginases, sérologiquement différentes, mais ayant un même effet thérapeutique est souhaitée. Les microorganismes représentent une bonne source de nouvelles enzymes et présentent un grand intérêt lié à la possibilité d'en obtenir de grandes quantités. La biotechnologie offre de nombreuses perspectives pour une valorisation du potentiel enzymatique de diverses souches bactériennes pour répondre à la demande croissante en ces molécules. A ce jour, parmi toutes les asparaginases produites par les bactéries, seules les L-asparaginases d'*Escherichia coli* (EcAII) et d'*Erwinia chrysanthemi* (ErA) sont appliquées d'un point de vue clinique (Aghaiypour et *al.*, 2001; Kanda et Minshull, 2020).

Ces deux enzymes sont très utilisées en clinique mais l'activité de la glutaminase qui accompagne l'activité de l'asparaginase est responsable de l'apparition d'effets secondaires graves, principalement la coagulopathie, l'hépatite, une neurotoxicité et d'autres pathologies (Imada et *al.*, 1973). A ce jour, les préparations commerciales de la L-asparaginase ont de graves effets secondaires donnant un mauvais profil pharmacologique de cet agent chimiothérapeutique. Il est en effet nécessaire d'utiliser à la fois une dose élevée et des administrations répétées avant d'obtenir l'effet protecteur. Ainsi, il existe un besoin urgent de fabriquer des préparations de L-asparaginase présentant une efficacité, une sécurité et des propriétés cliniques améliorées (Agrawal et Kango, 2019). L'asparaginase d'*Erwinia carotovora* montre une activité diminuée de la glutaminase et de ce fait on pense qu'elle a moins d'effets secondaires lors du traitement de la LLO (Supria et *al.*, 2010). Suivant cette idée, la première partie de ce travail s'est concentrée sur l'étude de l'activité glutaminase de la L-asparaginase purifiée à partir de *Dickeya solani* pour vérifier son éventuelle faible activité, ce qui serait très intéressant pour ses applications cliniques.

Afin d'optimiser les traitements et d'avoir des thérapies ciblées, l'utilisation des nanoparticules est une voie très prometteuse. Quoique l'utilisation des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et ZnO pour la vectorisation des enzymes soit une application récente, ces dernières ont longtemps été utilisées en cosmétique (écrans solaires) (Alivisatos et *al.*, 1996), les nanoparticules sont utilisées également dans la délivrance des médicaments, dans l'imagerie médicale, dans l'oncologie à savoir la délivrance ciblée des molécules thérapeutiques à visée anti-cancéreuses (Guitou, 2014).

## *Introduction*

On a rapporté que le ZnO et le bio-conjugué de la L-asparaginase ainsi que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ont une cytotoxicité contre la lignée cellulaire MCF-7 et des lignées cellulaires cancéreuses respectivement. Ceci suggère que la cytotoxicité des nanoparticules, associée à l'activité de la L-asparaginase pourrait fournir un effet létal synergique contre les cellules cancéreuses (Agrawal et Kango, 2019). Pour explorer cette hypothèse, une étude de l'effet de la L-asparaginase extraite de *Dickeya solani* associée aux nanoparticules de ZnO ou de TiO<sub>2</sub> a fait l'objet de la deuxième partie de ce travail de thèse.

La troisième partie de ce travail s'est intéressée au pouvoir antibactérien des nanoparticules de ZnO et de TiO<sub>2</sub>. En effet, les propriétés antimicrobiennes des nanomatériaux, y compris les nanoparticules métalliques, peuvent être attribuées à différents mécanismes tels que la génération d'espèces réactives de l'oxygène, l'inactivation des enzymes cellulaires et des acides nucléiques, entraînant la formation de pores dans la membrane cellulaire microbienne. Parmi les nanoparticules métalliques, celles à base de TiO<sub>2</sub> sont connues pour être rentables, stables et sans danger pour l'Homme et l'environnement (Ahmad et Sardar, 2013). L'effet antibactérien est testé contre des souches à Gram positif (*S. aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*) de référence.

Enfin les résultats obtenus et les principales conclusions auxquelles nous avons aboutis ainsi que les perspectives qui se sont dégagées seront présentés.

## I. Généralités sur les nanoparticules

### I.1 Définition

Une nanoparticule est définie comme étant une particule dont la dimension est inférieure à 100 nm, le préfix nano est utilisé pour désigner un milliardième (Chuto et *al.*, 2010). Ces nanoparticules sont produites dans le cadre des nanotechnologies dont les champs d'application sont multiples et en plein essor. Elles sont utilisées dans plusieurs secteurs (tableau I), par exemple le secteur de la santé (vectorisation des médicaments, imagerie de diagnostic,...), le secteur de la cosmétique ou elles entrent dans la composition des crèmes solaires comme des filtres des ultraviolets (Rossano, 2014), le secteur de la biotechnologie, comme des supports dans l'immobilisation des protéines (CLD Youta, 2012).

**Tableau I.** Exemples d'utilisation des nanotechnologies (CLD Youta, 2012).

Secteurs d'activités	Exemples d'application
<b>Automobile et aéronautique</b>	Peinture, additifs pour carburant et pneumatique, matériaux renforcés et légers
<b>Electronique et communication</b>	Processeurs miniaturisés, cellules solaires, ordinateurs, jeux électroniques, écrans plats
<b>Chimie et matériaux</b>	Pigment, poudre céramique, catalyseurs multifonctionnels, textiles et revêtements antibactériens
<b>Pharmaceutique, biomédical et biotechnologie</b>	Vectorisation, vaccins, implants, appareils de diagnostic, purification des biomolécules
<b>Environnement</b>	Purification de l'eau, recyclage, pesticides et dépollution

### I.2 Sources des NPs

On distingue des sources naturelles et des sources liées à l'activité humaine (Moehlmann et *al.*, 2002).

**I.2.1 Les nanoparticules naturelles :** sont toutes les particules issues des activités terrigènes (érosion), des activités volcaniques, des feux de forêt, des activités marines (aérosols de sel) et des composés organiques (transformations gaz/particules).

**I.2.2 Les nanoparticules anthropiques :** sont le résultat des activités humaines. Elles sont issues plus particulièrement des secteurs de l'automobile, l'agriculture et de l'industrie (combustion, aérosols...).

## Partie 1 : Synthèse bibliographique

Il existe une forte variabilité spatio-temporelle de la concentration en particules fines dans l'air. Néanmoins, on peut donner quelques ordres de grandeur de concentrations en fonction de l'environnement. On compte (Moehlmann et *al.*, 2002) :

- entre 50 000 et 10 000 particules/cm<sup>3</sup> en ville,
- moins de 1 000 particules/cm<sup>3</sup> dans un environnement rural en l'absence de toute activité (mouvement de voiture, bruit des gens.....)
- jusqu'à plusieurs millions de particules/cm<sup>3</sup> dans des sites industriels.

Le tableau II présente, pour différentes situations, les concentrations en particules fines.

**Tableau II.** Exemples d'activités anthropiques et concentrations en nanoparticules (Moehlmann et *al.*, 2002).

Procédés	Concentration totale dans la gamme de mesure 14-673 nm en particules/cm <sup>3</sup>	Dimension à la concentration maximale en nm
Extérieur, bureaux	10 000	/
Fonderie de Silicium	100 000	280-520
Broyage de métal	130 000	17-170
Soudage	400 000	36-64
Découpage au plasma	500 000	120-180
Boulangerie	640 000	32-109
Terrain d'aéroport	700 000	≤45
Brasage fort	54 000 à 3 500 000	33-126
Soudure autogène	100 000 à 40 000 000	40-60

/ : Non évalué

### I.2.3 Les nano-objets intentionnellement produits

On peut conférer des propriétés nouvelles à des polymères, des métaux, des céramiques, des poudres ou encore des huiles en incorporant des nano-objets à leur composition. Il est, par exemple, possible de modifier des paramètres tels que (CLD Youta, 2012) :

- **La résistance mécanique, thermique, la corrosion et l'abrasion des matériaux :**  
Les premières applications ont été les raquettes de tennis en carbone nano-structuré.
- **La conductivité thermique ou électrique des polymères :** Actuellement, on compte de plus en plus de composants en plastique difficile à peindre pour des problèmes

électrostatiques. En chargeant ces plastiques avec des nano-objets tels que le carbone, il est possible de les rendre conducteurs, ce qui permet d'économiser de la peinture.

La technologie LED est une abréviation de « Light Emitting Diode » qui représente un composant électronique. Il a la particularité de diffuser de la lumière à partir du moment où il est alimenté par un courant électrique qui offre des durées de vie extrêmement élevées, mais nécessite l'emploi de matériaux capables de transférer l'énergie thermique des LED vers l'air environnant. Ces matériaux sont fabriqués à l'aide de nano-objets incorporés à un support en plastique.

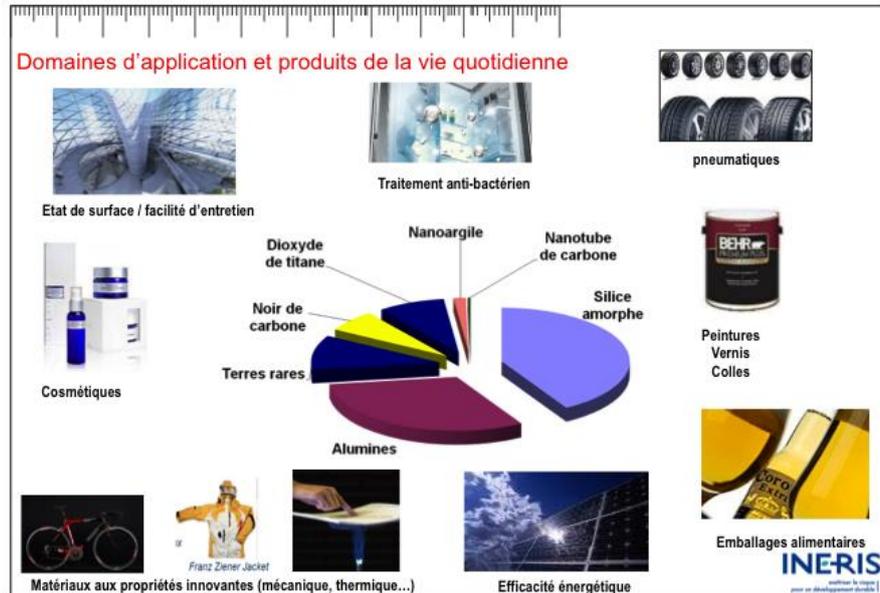
- **Les propriétés de surface des matériaux :** On peut citer comme exemple les lunettes à verres autonettoyants. Ils bénéficient d'une capacité catalytique forte, qui permet, en présence d'UV, de dégrader de manière significative les éléments organiques fixés sur eux. Cette propriété peut aussi être un avantage afin de réaliser des bâtiments blancs dont la façade ne se dégrade pas au gré des intempéries. On évite ainsi les ravalements de façade, ce qui permet de faire des économies sur la vie du bâtiment.

L'utilisation de nano-objets permet encore (CLD Youta, 2012):

- De réaliser des économies dans le domaine du transport. On peut fabriquer des véhicules plus légers, moins émissifs, résistants, avec des consommables performants et économes.
- D'augmenter les performances énergétiques. L'ajout de nano-objets dans les carburants augmente l'efficacité énergétique globale de la combustion. Les batteries conçues avec des nano-structurations permettent d'échanger plus rapidement une grande quantité d'électrons. Les nano-objets interviennent aussi pour créer du photovoltaïque amplifié.
- D'améliorer les moyens de protection. Il existe aujourd'hui des emballages intelligents biocides. Cette propriété est notamment utilisée à l'intérieur de certains réfrigérateurs. Ils possèdent des surfaces traitées avec du nano-argent qui leur confère un pouvoir antibactérien.
- D'élaborer de nouveaux produits pharmaceutiques. Des innovations sont aussi réalisées dans le domaine pharmaceutique comme la vectorisation des médicaments. On est maintenant capable d'encapsuler un médicament, un vecteur thérapeutique ou un vecteur diagnostique, pour qu'il se fixe sur un organe précis du corps humain et libère,

par exemple, une toxine. Cela ouvre, en outre, la voie à une chimiothérapie ciblée. Néanmoins, il faut rester vigilant car ces vecteurs peuvent générer une certaine toxicité.

La figure 1 regroupe quelques applications des nanoparticules au quotidien.



**Figure 1.** Utilisation de nanoparticules dans les objets du quotidien

(<http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/risques-nanoparticules-Frejafon.xml>)

## I.3 Toxicité et enjeux

### I.3.1 Toxicité

Les nanoparticules possèdent une réactivité accrue et leurs propriétés physico-chimiques sont potentiellement très différentes de celles des grosses particules. Face au développement rapide dans le domaine des nanotechnologies et malgré des bénéfices potentiels conséquents dans ce domaine, des inquiétudes sont émises quant à l'éventuelle toxicité humaine et environnementale des nanoparticules. Leur biodégradabilité, ou encore leurs effets secondaires à long terme ont suscité des questionnements. Les raisons de cette inquiétude scientifique sont basées sur la méconnaissance des interactions existantes entre les nanoparticules et les systèmes biologiques (Rossano, 2014). Des effets comme la génération de stress oxydant, effet pro-inflammatoire, effet prothrombotique, possibilité d'apparition de fibrose et d'emphysèmes pulmonaires ou de dommages à l'ADN ont été associés aux nanoparticules (Tran et *al.*, 2006). Ajoutés à ça, les tests classiques de toxicité ne permettent

pas de répondre aux questions spécifiquement liées à l'aspect « nano ». Par exemple, la taille, la stabilité en suspension ou la chimie de surface sont des paramètres habituellement non pris en compte mais qui, dans ce contexte, revêtent une importance cruciale. Bien que les gouvernements et les associations de protection du consommateur commencent également à être sensibilisés à ce problème, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune législation, ni protocole de toxicité spécifiques à l'utilisation des nanoparticules. Ceci s'explique par le fait que les interactions observées, dans les études existantes, semblent être explicables au cas par cas suivant le type de nanoparticules et le système biologique étudiés et le test employé. Elles sont souvent difficilement comparables entre elles et de ce fait parfois même contradictoires. Il est donc impossible de conclure de manière générale sur les risques réels liés à leur utilisation (Guitou, 2014).

Pour cela, des mesures de prévention passent avant tout par une limitation de l'exposition. Comme il n'existe, à l'heure actuelle, aucune valeur limite professionnelle d'exposition spécifique aux nanoparticules, cela complique la mise en œuvre de mesures de prévention. Cependant, il est nécessaire d'adopter une attitude prudente, de façon à limiter au maximum l'exposition à ces particules (Tejral *et al.*, 2009).

### **I.3.2 Enjeux**

Tout d'abord, il s'agit d'identifier les principales sources de nanoparticules. On a pu mettre en évidence que la combustion (chauffage bois et diesel) et l'agriculture sont les principales sources. Les chercheurs se sont aussi intéressés aux mécanismes de transformation gaz/particules, issus de composés organiques, car ils contribuent à environ 35% du total de particules présentes dans l'atmosphère (Chuto *et al.*, 2010). Des actions sont engagées comme l'interdiction du chauffage au bois dans certaines villes ou encore des actions relatives aux véhicules : la pastille verte, les interdictions de rouler, les péages et les incitations sur le mode de transport collectif, hybride... Ces mesures tentent de réduire les contributions liées à la combustion (Tran *et al.*, 2006). On s'est aperçu que mesurer une masse de particules par mètre cube n'est pas adapté à l'échelle nanométrique. Dans une pièce on compte plusieurs milliers de particules par centimètre cube, mais seules quelques-unes vont réellement contribuer de manière significative à la masse : les plus grosses. Elles sont en faible nombre, mais elles sont les plus lourdes. Il existe donc une incompatibilité d'usage des techniques actuelles de surveillance d'hygiène professionnelle ou de l'environnement avec cette mesure de masse. D'autre part les dangers peuvent être liés à la masse, la forme ou la surface spécifique des

nano-objets. Actuellement, il n'existe pas de métrologie prenant en compte tous ces paramètres (Senarathna et al., 2017). La législation impose à toutes les entreprises utilisant ou intégrant des nanoparticules de déclarer une sorte de carte d'identité des nanoparticules utilisées ou manufacturées reposant sur huit critères dont la taille, la masse, la surface, la chimie, etc. (Tejral et al., 2009).

### I.4 Application en Biologie

#### I.4.1 Effet photo-thermique sélectif pour la thérapie du cancer

L'absorption lumineuse à la fréquence de résonance de plasmon est rapidement convertie en chaleur qui se transmet au milieu environnant. Cette propriété peut être utilisée pour traiter des cancers, le principe étant que l'élévation de température transmise par les nanoparticules détruit les cellules avec lesquelles elles interagissent. Comme par exemple, les nanoparticules d'or fonctionnalisées par des anticorps anti-EGFR (Inhibiteurs des voies de transduction de signal : anti-*Epithelial Growth Factor Receptor*) ciblent des agents pathogènes.

Le problème est que les irradiations dans le visible ne permettent pas de traverser le milieu biologique et d'atteindre des tissus profonds donc d'être efficaces *in vivo* (Shen et al., 2012). En revanche, la profondeur de pénétration est de plusieurs centimètres pour des longueurs d'onde de 650-900 nm. Comme indiqué précédemment, en jouant sur la structure des nanoparticules d'or (cœur de silice-coquille d'or) ou sur leur forme (nano-bâtonnets), il est possible d'obtenir la résonance de plasmon dans le proche infrarouge et d'ouvrir ainsi la perspective de développement d'un nouvel outil thérapeutique. Par exemple, des nano-bâtonnets ayant un rapport d'aspect de 5.6 (rapport longueur sur diamètre) absorbent à 950 nm ; des particules sphériques ayant un cœur de silice de 60 nm de diamètre et une coquille d'or de 5 nm d'épaisseur, absorbent à 1000 nm. L'injection de nanoparticules cœur-coquille (55 nm de silice et coquille d'or de 10 nm, ce qui correspond à une résonance de plasmon à 800 nm) dans la tumeur mammaire d'une souris, suivie d'une irradiation laser à 820 nm à faible dose de 4 W/cm<sup>2</sup> pendant 4 à 6 minutes permet une élévation de température de 37 ± 7°C et la destruction locale des tissus cancéreux. A noter qu'en l'absence de nanoparticules d'or, la dose d'infrarouge nécessaire pour détruire ces cellules est 10 à 25 fois plus élevée (Hirsch et al., 2003).

### I.4.2 Effets antimicrobiens

Ces dernières années, une stratégie largement répandue pour prévenir la contamination microbienne, dans le domaine médical, a consisté à tuer les microorganismes (espèces pathogènes ou opportunistes) entrant directement en contact avec la surface réceptrice ou s'approchant d'elle. Cette stratégie consiste à ajouter des antibiotiques par imprégnation dans une matrice, fixation par interactions ioniques ou par liaisons covalentes, ou adsorption sur la surface. A titre d'illustration, des surfaces d'acier ont été recouvertes d'un dépôt d'acide polylactique biodégradable, dans lequel était incorporé un antibiotique, gentamicine et/ou teicoplanine (Pal et *al.*, 2007).

Toutefois, l'émergence de phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques a rapidement incité les chercheurs à se tourner vers d'autres solutions. Ainsi, Fu et *al.* (2018) ont montré l'efficacité antiadhésive et l'activité biocide, *in vitro* sur *E. coli*, de surfaces de poly- (éthylène téréphthalate) (PET) recouvertes par des couches alternées de chitosane et d'héparine par physisorption. Par ailleurs, des tests menés *in vivo* chez des rats infectés par *Staphylococcus aureus* ont montré une réduction de l'infection bactérienne en présence d'implants en élastomère de silicone recouverts d'un dépôt sol-gel relargant du monoxyde d'azote (Gibbins et Werner, 2005).

Les nanoparticules peuvent présenter une efficacité antimicrobienne qui leur est propre en fonction de leur taille et de leur forme. Ainsi, Morones et *al.* (2005) ont observé que seules les nanoparticules d'argent dont le diamètre est compris entre 1 et 10 nm interagissent avec différentes bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* et *Salmonella Typhi*) en inhibant la multiplication cellulaire (concentration minimale inhibitrice : CMI = 75 µg/ml). Une étude récente de Pal et *al.* (2007) sur *E. coli* a également démontré le rôle joué par la forme : les nanoparticules en forme de pyramides triangulaires, dont la base est un plan cristallin 111} de densité atomique élevée, présentent l'activité antibactérienne la plus élevée par rapport à leurs homologues sphériques ou sous forme de bâtonnets (Pal et *al.*, 2007). Leur mécanisme d'action est favorisé par leur interaction avec la paroi du microorganisme puis la pénétration dans la cellule rendue possible par « évitement » des mécanismes de défense observés dans le cas de particules de taille plus importante, et enfin par leur interaction avec les constituants cellulaires (ADN, protéines, enzymes). Selon Kim et *al.* (2007), l'action biocide des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres générés à la surface et qui endommagent la membrane lipidique des cellules.

Enfin, l'existence d'une interaction directe entre les nanoparticules d'argent et l'ADN génomique chez *E. coli* a été mise en évidence récemment par Wang et al. (2018). Dans cette même étude, les chercheurs ont constaté une augmentation d'un facteur 3 de la fréquence de mutations du génome d'*E. coli* en présence de nanoparticules d'argent de 30-50 nm de diamètre (*i.e.* la fréquence de mutations passe de  $1,08 \cdot 10^{-6}$  pour l'échantillon contrôle à  $3,14 \cdot 10^{-6}$  dans l'échantillon test). De plus, cette étude a montré que les ions  $Ag^+$ , issus de la dissolution d' $AgNO_3$ , provoquent également une augmentation de la fréquence de mutations d'un facteur de 2,5.

### I.4.3 Effet spécifique des nanoparticules sur les protéines (enzymes)

La régulation de l'activité protéique joue un rôle important dans la modulation des processus cellulaires tels que la transduction du signal, la réplication de l'ADN et le métabolisme (Kimball et al., 1004). Le dysfonctionnement des protéines est à l'origine de maladies et troubles chez l'Homme (Duncan et al., 1987; De Benedetti et al., 1991), et notre capacité à réguler les fonctions enzymatiques et les interactions protéines-protéines constitue une stratégie prometteuse pour la thérapie. Les nanoparticules présentent certains avantages par rapport aux petites molécules organiques. Premièrement, elles ont de grandes surfaces spécifiques pour une liaison adéquate aux protéines et pour des interactions biologiques (De Louise, 2012). Deuxièmement, elles peuvent entrer facilement dans les cellules (Kurtz-Chalot, 2014), contrairement à certaines petites molécules et molécules biologiques. Troisièmement, il y a eu des progrès considérables dans la synthèse des nanoparticules avec des dimensions, des géométries et des propriétés de surface bien contrôlées (Armand, 2011), pour compléter la complexité structurelle des protéines (Kurtz-Chalot, 2014). Les développements récents dans les nanomatériaux offrent une nouvelle voie pour contrôler le comportement des protéines par des interactions de surface (Agrawal et Kango 2019).

Au cours des dernières années, des nanoparticules avec différentes dimensions, composition et modification de surface ont été étudiées pour comprendre leurs interactions avec les protéines. L'interaction hydrophobe, l'accumulation de  $\pi$ - $\pi$  et l'interaction électrostatique ont été attribuées comme étant des mécanismes majeurs des interactions nanoparticules-protéines (Arias, 2001; Agrawal et Kango 2019). Ces mécanismes coexistent souvent.

## *Partie 1 : Synthèse bibliographique*

Les recherches récentes sur les interactions nanoparticules-protéines visent à souligner l'importance de ces interactions dans les systèmes biologiques, qui peuvent causer des problèmes de nano-toxicité, et le potentiel de tels événements de reconnaissance moléculaire dans des applications biomédicales telles que le diagnostic et le traitement de certaines maladies. Les applications du diagnostic à la délivrance de médicaments exigent que les enzymes conservent leurs structures et activités autochtones. Les conjugués de SWNT (single-walled carbon nanotubes), traités à l'acide, avec trois enzymes fonctionnellement indépendantes, la peroxydase de raifort, la subtilisine Carlsberg et les lysozymes du blanc d'œuf de poule se sont avérés solubles dans des solutions aqueuses. La cinétique enzymatique a révélé que ces enzymes conservaient une fraction élevée de leurs structures et activités indigènes. Les conjugués SWNT-enzyme étaient également plus stables dans le chlorhydrate de guanidine (GdnHCl) et à des températures élevées par rapport à leurs homologues en solution. Ces études démontrent la stabilité accrue des préparations d'enzymes SWNT par rapport aux enzymes libres en solution. De tels conjugués, enzymes-nanotubes hydrosolubles peuvent être utiles dans une large gamme d'applications (Moussaoui, 2018).

Deux enzymes, l' $\alpha$ -chymotrypsine (ChT) et la peroxydase de soja, ont été adsorbées sur les nanotubes de carbone à paroi unique. La ChT n'a retenu que 1% de son activité native alors que la peroxydase de soja a conservé 30% de son activité (Moussaoui, 2018). La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR) a révélé qu'une perturbation structurelle secondaire substantielle s'est produite après la liaison de la ChT aux SWNT (Feng et Peijun, 2011). Ce phénomène a été causé par l'interaction hydrophobe entre les SWNT et les protéines. La peroxydase de soja possédait une poche hydrophobe liée aux SWNT quittant le site actif exposé au solvant pour lier le substrat. La dénaturation de ChT était responsable de la faible activité.

Si la surface des nanomatériaux est modifiée avec des polymères hydrophiles tels que des fragments de poly (éthylène glycol) PEG oligomères, les interactions des nanoparticules - protéines peuvent être atténuées (Moussaoui, 2018).

Parmi les enzymes sur lesquelles les nanoparticules ont été appliquées, nous avons la L-asparaginase.

## II. Considérations générales sur la L-asparaginase

En 1904, Lang fut le premier à détecter une activité asparaginasique dans les tissus bovins. Par la suite, Fürth et Friedmann ont confirmé ces résultats en 1910 et ont suggéré que l'activité asparaginasique est présente dans tous les tissus animaux (Kidd, 1953). Les expériences de Clementi (1922) rapportées par Michalska et Jaskolski (2006) ont conclu que l'enzyme est active dans pratiquement tous les tissus des herbivores, seulement dans le foie des animaux omnivores, et elle est absente dans les organes des animaux carnivores, les amphibiens et les reptiles.

En 1953, Kidd décrit une activité dans le sérum du cochon d'Inde qui a permis la régression d'un lymphome transplanté chez une souris et des rats. Un peu plus tard, en 1961, Broome découvre que cette activité anti-lymphome du sérum de cochon d'Inde est due à la L-asparaginase. Plus tard, Campbell, Mashburn et Wriston montrèrent que la L-asparaginase issue d'*E. coli* est dotée d'un même potentiel anti-tumoral que celle isolée du sérum de cochon d'Inde décrite par Campbell et Mashburn (1969). Après cette découverte, qui a permis une production massive et facile de la protéine, les études cliniques ont pu commencer. En 1966, un premier traitement à base d'une asparaginase purifiée du sérum de cochon d'Inde a été administré à un enfant de huit ans atteint de la leucémie lymphoblastique aigue (LLA). Une réponse clinique courte, mais définie, a été observée (Oza et al., 2011).

Par la suite, les études cliniques de phases I et II se sont concentrées sur la L-asparaginase issue d'*E. coli*. Les taux de réponses chez les enfants et adultes atteints de LLA, en rechute, ont varié de 30 à 65%, mais la durée de rémission était courte en moyenne. Les taux de réponses et la tolérance à l'enzyme étaient plus élevés chez les enfants, c'est pourquoi les études postérieures ont surtout été réalisées chez les enfants. A la fin des années 60, la L-asparaginase a été incorporée aux protocoles de traitement des rechutes de LLA, après avoir observé l'efficacité et la sûreté de l'enzyme chez ces malades (Kotzia et Labrou, 2007).

En plus d'*E. coli* (Derst et al., 1994), de nombreux autres microorganismes sont capables de produire l'asparaginase : *Candida utilis* (Kil et al., 1995), *S. aureus* (Muley et al., 1998), *Enterobacter aerogenes* (Mukherjee et al., 2000), *Thermus thermophilus* (Prista et Kyridio, 2001), *Erwinia carotovora* (Aghaipour et al., 2001), *P. aeruginosa* (El Bessoumy et al., 2004) et *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia et Labrou, 2007). Les différentes espèces et sous

## *Partie 1 : Synthèse bibliographique*

espèces bactériennes, fongiques, végétales et animales capables de produire cette enzyme sont présentées dans le tableau III.

Vu les difficultés rencontrées dans l'utilisation de la L-asparaginase d'origine animale (le sérum de cobaye était l'unique source), les microorganismes ont prouvé qu'ils sont la meilleure source pour la production de cette enzyme vu la facilité de leur culture (Savitri et *al.*, 2002):

- Temps de génération court,
- Nécessité d'un petit espace,
- Production en masse et extraction facile,
- Possibilité de développement de souches par génie génétique afin de produire d'énormes quantités,
- Absence de contraintes saisonnières et géographiques,
- Diversité biochimique des microorganismes.

Tous ces paramètres facilitent la production de L-asparaginase à grande échelle (Savitri et *al.*, 2002).

## Partie 1 : Synthèse bibliographique

**Tableau III.** Organismes vivants producteurs de la L-asparaginase

Organisme vivant		Référence	
<b>Plantes</b>	- <i>Glycine max</i> (soja), - <i>Oryzasativa</i> , - <i>Lupinus</i> sp.	-Borek et Jaskolski, 2001	
	- <i>Withania somnifera</i>	-Oza et al., 2011	
<b>Animaux</b>	- Foie du cochon de Guinée	-Prista et Kyridio, 2001 ; -Mathews et Brown, 1974	
	- Reins et intestins du bœuf et du cheval	-El-Sayed et al., 2001	
	- Rein et foie de la poule	- Ohnuma et al., 1967 ; - EL-Sayed et al., 2011	
	- Rongeurs	-Old et al., 1963	
<b>Microorganismes</b>	<b>Champignons</b>	- <i>Aspergillus niger</i> - <i>Aspergillus tamari</i>	
	<b>Levures</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<b>Bactéries</b>	<i>E. coli</i>	- Cedar et Schwartz, 1968 ; - Roberts et al., 1968
		<i>Pectobacterium carotovorum</i> MTCC 1428	-Kumar et al., 2009
		Actinomycètes marines	- Basha et al., 2009
		<i>Streptomyces gulbengensis</i>	-Amenas et al., 2009
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Peterson et Ciegler, 1969 ; - El-Bessoumy et al., 2003
		<i>Serratia marcescens</i>	-Whelan et Wriston, 1974
		<i>Bacillus</i>	-Peterson et Ciegler, 1969
		<i>Xanthomonas</i>	
		<i>Photobacterium</i>	
		<i>Streptomyces griseus</i>	-Dejong et al., 1972
		<i>Proteus vulgaris</i>	-Tosa et al., 1971
		<i>Vibrio</i>	-Kafkewitz et Goodman, 1974
<i>Erwinia</i> sp.		-Maladkar et al., 1993; - Moola et al., 1994 ; - Aghaipour et al., 2001	

Les caractéristiques de quelques L-asparaginases microbiennes sont données dans le tableau IV.

## Partie 1 : Synthèse bibliographique

**Tableau IV.** Caractéristiques de quelques L-asparaginases microbiennes : Le  $K_m$  correspond à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale  $V_{max}$ .

Micro-organisme	MM(Da)	pH opt.	T° opt.	Km (mM)	Vm(UI)	Références
<i>Enterobacter cloacae</i>	36971	8,5	37-42	-	-	Nawaz et al., 1998
<i>Streptomyces tendae</i> TK-VL333	97400	7	30	-	-	Kavitha et Vijayalakshmi, 2010
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	34000	9	37	1,45	-	Manna et al., 1995
<i>P.aeruginosa</i> 50071	160000	09	37	0,147	35,7	El-Bessoumy et al., 2003
<i>Serratia marcescens</i>	171000-180000	6,8	-	0.1	-	Boyd et Phillips, 1970
<i>Vibrio succinogenes</i>	146000	7,3	-	0,478	-	Distasio et Niederman, 1976
<i>E. coli</i> W3110	40000	7,5	37	-	-	Youssef et Omair, 2008
<i>Aspergillus tereus</i>	-	4,5	35	-	-	Kalingaplar et al., 2010
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	85000	09	40	-	-	Amenas et al., 2009
<i>Fusarium tricinctum</i>	170000	8	-	0,52	-	Scheetz et al., 1971
Actinomycètes marines	-	7-8	50	24	51	Basha et al., 2009
<i>Bacillus coagulans</i>	84000	8,8 – 9,7	37	4	-	Law et al., 1971
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	Geckil et Gencer, 2004
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	80000	-	-	-	-	Mésas et al., 1989
<i>Bacillus mesentericus</i>	-	-	-	-	-	Eremonko et al., 1976
<i>Mycobacterium</i>	126000	8,5-9,2	-	0,7	-	Pastuzka et al., 1976
<i>Citrobacter freundii</i>	140000	-	-	1,7	-	Davidson et al., 1977
<i>Proteus vulgaris</i>	-	7-8	-	2,6	-	Tosa et al., 1972
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	112000	7,5	35	-	-	Naraayana et al., 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	Dunlop et al., 1979
<i>Nocardia levis</i>	-	7	30	-	-	Kavitha et Muvva, 2011
<i>Streptomyces griseus</i>	-	8,5	-	-	-	Dejong, 1971
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	-	9,5	85	5.5	33	Shahid et Chohan, 2013

<i>Cladosporium</i> sp.	121000	6,3	30	0,1	44,4	Kumar et Manonmani, 2013
-------------------------	--------	-----	----	-----	------	--------------------------

- : Non rapporté

Parmi ces asparaginases, seules celles produites par *E. coli* et les espèces appartenant au genre *Erwinia* sont bien étudiées et caractérisées.

## II.1 Importance des L-asparaginases d'*E. coli* et d'*Erwinia* sp.

Les asparaginases purifiées à partir d'*E. coli* (ECA) et d'*Erwinia chrysanthemi* (ERA) sont d'un grand intérêt thérapeutique. Elles sont utilisées comme agent anti-leucémique (Hill et al., 1967) et dans le traitement des lymphosarcomes (Borek et Jaskólski, 2001). La L-asparaginase (EC 3.5.1.1) hydrolyse la L-asparagine pour donner l'aspartate et l'ammoniac. Le substrat et le produit de la réaction enzymatique jouent des rôles importants dans de nombreux processus métaboliques, des bactéries aux mammifères. Chez les plantes, la L-asparagine est le métabolite le plus abondant pour le stockage et le transport de l'azote qui est utilisé dans la biosynthèse des protéines (Borek et Jaskólski, 2001).

*E. coli* est la première espèce bactérienne à avoir été utilisée pour produire l'asparaginase en clinique. Cette bactérie produit deux types de L-asparaginase, EC-I et EC-II, mais seule EC-II a une activité anti-tumorale. Sa masse moléculaire est de 138 à 141 Kda. Elle est composée de quatre sous-unités identiques avec un site actif sur chacune d'entre-elles. Cette forme d'enzyme est la plus couramment utilisée dans le monde. Aux Etats-Unis, la mise sur le marché et la commercialisation de cette enzyme ont été réalisées par Merck & Co. sous le nom d'Elspar® (Asselin, 1999). En France, cette forme est disponible sous le nom de Kidrolase® et est fabriquée par Aventis pharma (Wool et al., 1998).

Dans le corps humain, le L-aspartate joue un rôle important comme précurseur de l'ornithine dans le cycle de l'urée et dans les réactions de transamination qui forment l'oxaloacétate dans la voie gluconéogénique menant au glucose (Borek et Jaskólski, 2001).

De nombreuses expériences, réalisées à la fin des années 70 par Abuchowski ont montré qu'une liaison entre le polyéthylène glycol et diverses protéines animales, pouvait diminuer leur caractère immunogène. En 1979, une de ses expériences qui consistait à injecter de l'asparaginase liée au polyéthylène glycol, a montré non seulement une propriété anti-tumorale chez des souris atteintes de tumeurs, mais aussi des réactions immunogéniques

moins importantes. Il a aussi remarqué que cette forme présentait une plus grande stabilité, une demi-vie allongée et de ce fait une plus grande efficacité thérapeutique (Abuchoowski et *al.*, 1984).

La pegaspargase est la dernière forme disponible de l'enzyme. Il s'agit de l'asparaginase produite par *E. coli* sur laquelle ont été greffés, par liaison covalente, des unités de monométhoxypolyéthylène glycol de masse moléculaire de 5000 Da. C'est au milieu des années 70 qu'une équipe de chercheurs a tenté de trouver une forme alternative de l'enzyme, présentant moins de réactions immunogènes tout en gardant ses propriétés anti-tumorales (Narta et *al.*, 2007). Cette forme enzymatique est commercialisée par Rhone-Poulenc Rorer sous le nom d'Oncaspar®. Elle est préconisée pour le traitement des malades atteints de LLA qui sont hypersensibles aux deux premières formes de l'enzyme (Van et *al.*, 1977). Les premiers essais cliniques chez l'Homme ont été réalisés en 1984 (Abuchoowski et *al.*, 1984).

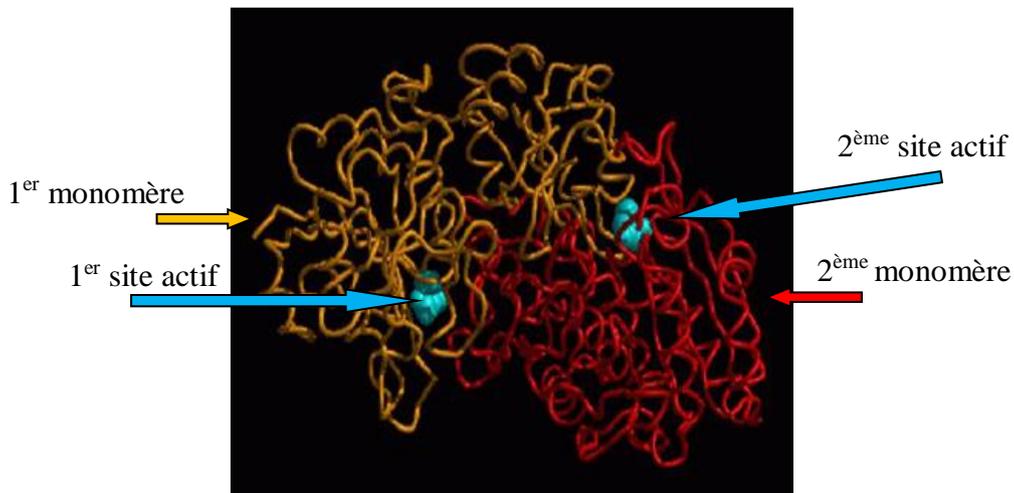
## II.2 Structure et mécanisme d'action

### II.2.1. Caractères structuraux communs des asparaginases

La structure cristalline des asparaginases produites respectivement par les deux bactéries *E. coli* et *Erwinia* : ECAII (Swain et *al.*, 1993) et ERA (Miller et *al.*, 1993) est bien déterminée. Ces deux enzymes sont actives comme homotétramères (figure 2), chacun a un monomère d'environ 330 acides aminés avec un pli en deux domaines. Les deux domaines s'inscrivent dans la classe alpha/beta, le domaine N-terminal contient un croisement inhabituel gaucher bêta-alpha-bêta semblable à celui retrouvé dans la flavodoxine (une flavoprotéine bactérienne intervenant dans les réactions d'oxydoréduction), qui forme un "berceau" pour le site actif (Palm et *al.*, 1996).

Le tétramère est constitué d'une paire de dimères, il peut être décrit comme un "dimère intime" (figure 2). Chaque "dimère intime" contient deux sites actifs, et chaque site actif contient certains résidus des deux monomères (figure 3) en dimères intimes. La structure cristalline de la ECAII contient quatre molécules de L-aspartate (le produit de l' "avant" réaction, ou le substrat de la "reverse" réaction), dans chaque site actif. Deux résidus thréonine - T12 et T89 de la ECAII - qui sont conservés dans toute la famille des L-asparaginases, et sont connus pour être essentiels pour l'activité, se trouvent à proximité de l'aspartate. Ces thréonines sont tous deux capables d'agir en tant que nucléophiles primaires. Ils sont

nécessaires à l'activité, et ni les données cinétiques, ni de structure n'ont encore été capables de montrer qui est le nucléophile primaire le plus probable (Palm et *al.*, 1996).



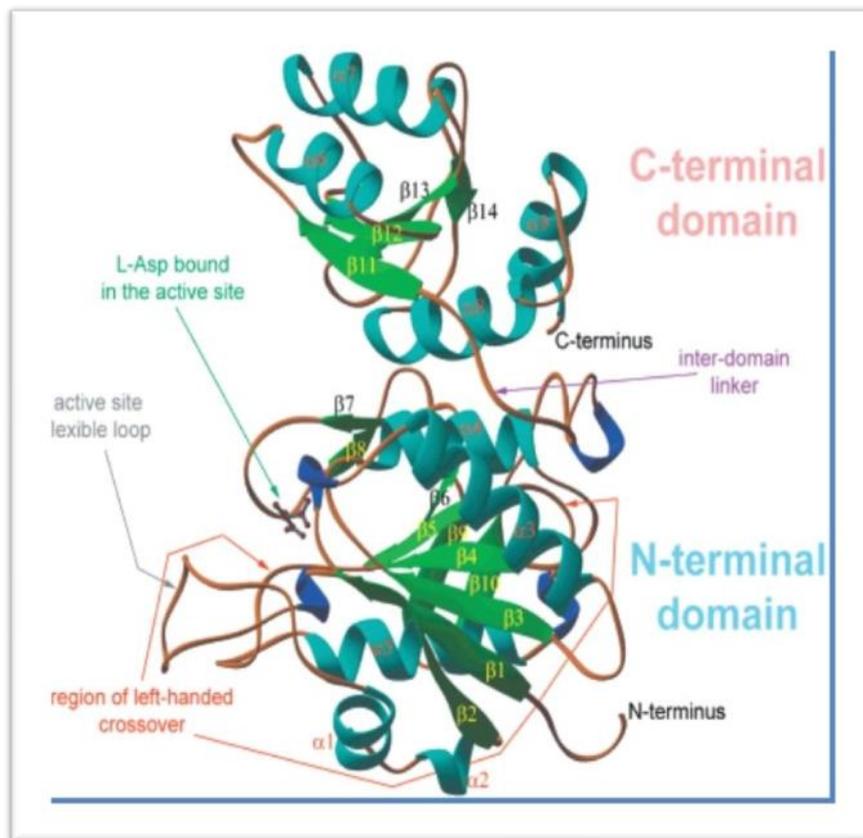
**Figure 2.** Structure cristalline du dimère intime de l'asparaginase ECAII (Swain et *al.*, 1993)

Le site actif est situé entre le domaine N-terminal d'une sous-unité et le domaine C-terminal d'une autre. Une paire de résidus de Thr (EcAII Thr12 et Thr89) est située de chaque côté du lien scissile des substrats. La formation d'un complexe de Thr12-acyl a mené à la suggestion que Thr12 et non pas la Thr89 qui est le nucléophile primaire dans la réaction de L-asparaginase. Thr12 avec Tyr25 font partie d'une boucle flexible qui se stabilise une fois attachée au substrat. L'autre partie du site actif est rigide et comporte Thr89, Asp90 et Lys162. La Glu283, de la sous-unité adjacente, joue un rôle crucial en aidant à la liaison au substrat (Prathusha, 2010).

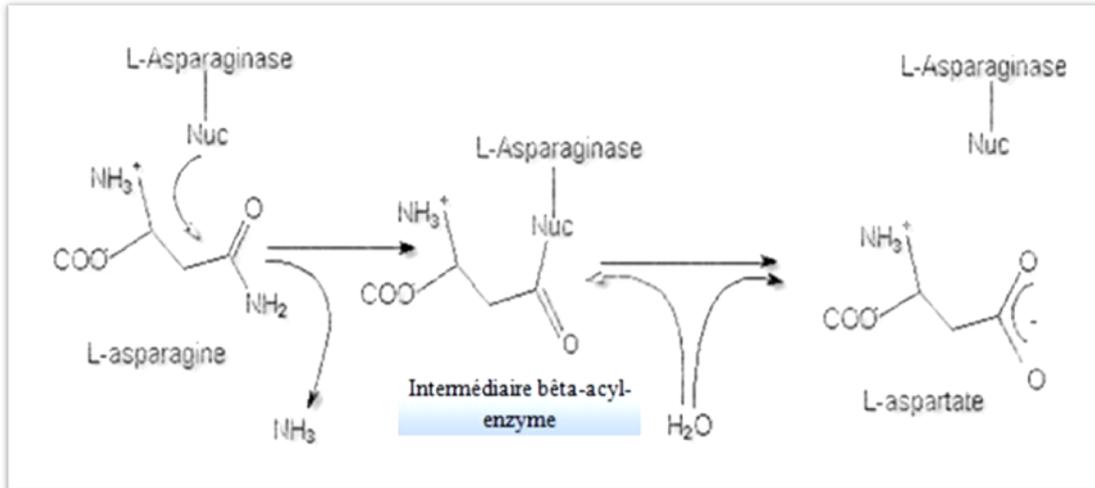
Un croisement gaucher entre le quatrième et le cinquième feuillet  $\beta$  du domaine N-terminal est observé (Miller et *al.*, 1993). On rencontre rarement ce type de motifs chez les protéines (Richardson, 1981), et si c'est le cas, il est important pour leur activité. Ce type de croisement dans la L-asparaginase fait intervenir Ala120ErA, un résidu qui joue un rôle important dans le recyclage du substrat/produit (Aghaiypour et *al.*, 2001).

### II.2.2 Mécanisme de réaction

La L-asparaginase catalyse l'hydrolyse de la L-asparagine en L-aspartate et ammoniac. Son mécanisme réactionnel précis est encore inconnu, bien que l'hydrolyse soit divisée en deux étapes (figure 4). La première étape consiste à l'attaque nucléophile de la thréonine sur le carbonyle amide du substrat pour générer un intermédiaire bêta-acyl-enzyme. Une molécule d'ammoniac est libérée. Dans la deuxième étape, l'eau attaque l'intermédiaire bêta-acyl-enzyme pour produire de la L-aspartate (Sansom et Jaskolski, 1996).



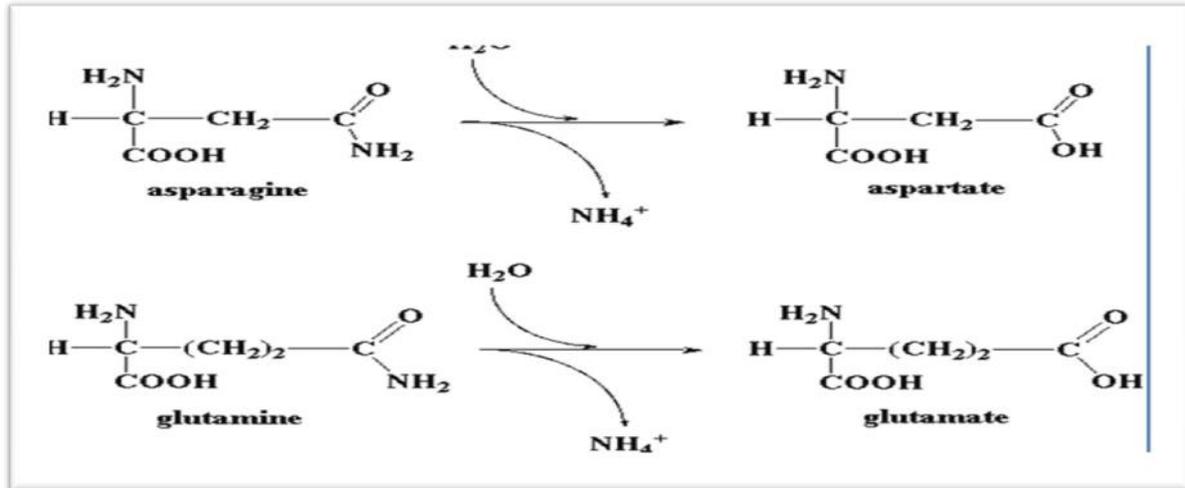
**Figure 3.** Représentation schématique d'un monomère de L-asparaginase d'*Erwinia* (Aghaiypour et *al.*, 2001)



**Figure 4.** Illustration schématique du mécanisme de réaction de la L-asparaginase (Hill et *al.*, 1967)

### II.3 Toxicité

A côté de l'activité asparaginase, une activité glutaminase (figure 5) a été retrouvée chez l'asparaginase d'*E. coli* qui pourrait être associée à des effets secondaires graves lors du traitement avec cette enzyme (Miller et *al.*, 1969). Cette enzyme est peu myélosuppressive, mais elle entraîne de nombreux effets secondaires qui peuvent aboutir à l'interruption du traitement. L'effet indésirable le plus fréquent, qui suit surtout les administrations intraveineuses, est l'hypersensibilité. Mais il existe aussi toute une variété d'effets indésirables qui découlent de l'inhibition de la synthèse protéique. Cela engendre des toxicités au niveau de nombreux organes ayant des taux élevés de synthèse protéique tels que le foie, le pancréas et les tissus hématopoïétiques. Les principaux effets secondaires sont l'anaphylaxie, la pancréatite, le diabète et les anomalies de la coagulation qui peuvent mener à une thrombose intracrânienne ou à une hémorragie (Duval et *al.*, 2002).



**Figure 5.** Schéma de l'activité glutaminasique de l'asparaginase d'*E. coli* (Miller et al., 1969).

- Réaction allergique :

Il a été établi que l'administration répétée de la L-asparaginase, par voie intraveineuse, entraîne une hypersensibilité, allant de réactions allergiques douces au choc anaphylactique, chez 53% des patients. Par conséquent, des L-asparaginases à propriétés anti-tumorales semblables mais ayant des structures antigéniques différentes sont nécessaires pour des essais cliniques (Benny et Muraleedharan, 1991).

- Perturbation hépatique

Le foie est un organe dont le rôle est très important car il participe à de nombreuses fonctions dans l'organisme. Il synthétise la plupart des protéines sanguines ; il participe aux métabolisations et aux éliminations. Lorsque le foie ne fonctionne plus correctement, de nombreux paramètres sont perturbés avec l'apparition des symptômes associés. Ces perturbations au niveau des facteurs biologiques hépatiques sont présentes chez la majorité des patients traités par l'asparaginase (Bertrand, 2003).

Les pourcentages de patients présentant des dysfonctionnements hépatiques sont variables dans la littérature. Cela s'explique certainement par les traitements associés qui sont eux aussi souvent hépatotoxiques et qui diffèrent selon les différents protocoles de traitement. Les perturbations les plus fréquentes et directement liées au dysfonctionnement hépatique sont des diminutions sériques du fibrinogène et de l'albumine, deux protéines synthétisées par le foie. L'hypo-albuminémie peut être associée à des œdèmes périphériques (Oettgen et al.,

1979). Ces diminutions sont présentes chez 20 à 30 % des patients traités par l'asparaginase. Les concentrations sériques des enzymes du foie sont aussi modifiées : Les concentrations en ASAT (Aspartate Amino Transférase) et en ALAT (Alanine Amino Transférase), reflet de la cytolysse hépatique, augmentent tout comme la bilirubinémie. Généralement, on assiste à un retour à la normale deux semaines environ après l'arrêt du traitement (Priest et *al.*, 1982).

### - Troubles de l'hémostase

L'asparaginase engendre des dysfonctionnements au niveau du foie où a lieu la synthèse des protéines qui participent au phénomène de coagulation. On observe une diminution des concentrations sériques en facteurs II, VII, IX, X et du fibrinogène qui permettent la coagulation, du plasminogène qui intervient dans la fibrinolyse, de l'antithrombine III (AT III), ainsi que celles des protéines C et S qui contribuent à l'inhibition de la coagulation. De plus, on observe une augmentation de la thrombine (Bezeaud et *al.*, 1986).

### - Neurotoxicité

La toxicité neurologique peut s'exprimer par des symptômes très variés, autant par leur intensité que par leurs caractéristiques. On peut observer une somnolence, des vertiges, des malaises, des céphalées, des confusions, une agitation, des hallucinations, des changements d'humeur, une paresthésie, une dépression et voire même un coma. Ces effets secondaires disparaissent rapidement à l'arrêt du traitement (Whitecar et *al.*, 1969; Supria et *al.*, 2010).

Cette toxicité peut être directement due au mécanisme d'action de l'asparaginase qui entraîne une augmentation de l'acide aspartique, une diminution de l'asparagine et de la L-glutamine dans le cerveau et une augmentation du taux d'ammoniac sérique produit lors de la dégradation de l'asparagine. Ces trois phénomènes sont potentiellement neurotoxiques (Priest et *al.*, 1982).

### - Toxicité gastro-intestinale

Comme pour la majorité des médicaments anticancéreux, l'asparaginase provoque des effets secondaires, qui ne sont pas spécifiques, tels que les nausées, vomissements et anorexie (Bertrand, 2003). Suivant leur origine, les différentes formes d'asparaginases n'ont pas le même degré de toxicité ni le même spectre d'activité. Ceci est dû

à leur activité glutaminasique qui contribue à augmenter leur activité anti-tumorale. L'acide glutamique issu de la dégradation de la glutamine contribue, quant à lui, à augmenter la toxicité clinique de l'asparaginase, notamment la neurotoxicité. Cette activité est mineure par rapport à l'activité L-asparaginase avec des taux maximaux d'hydrolyse entre 3 et 9% par rapport à sa première propriété (Miller et al., 1969, Kanda et Minshull, 2020).

Comme signalée plus haut, la production commerciale de L-asparaginase est portée principalement sur les deux bactéries: *E. coli* et *Erwinia*. Etant donné que les enzymes purifiées à partir de différentes espèces sont caractérisées par des propriétés physiologiques, pharmacologiques et sérologiques différentes, il serait impératif de choisir quelques bactéries productrices de L-asparaginases dotées d'une grande efficacité et de moindres complications immunologiques. De tels effets secondaires sont complètement absents avec la L-asparaginase d'*Erwinia* qui est pratiquement exempte d'activité glutaminasique et par conséquent beaucoup plus sûre dans le traitement de LLA (Supria et al., 2010). Jusqu'ici, la L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* s'est avérée efficace dans les tests cliniques en tant qu'alternative à celle d'*E. coli* (Benny et Muraleedharan, 1991).

### III. Asparaginases d'*Erwinia*

#### III.1 Description des *Erwinia pectinolytiques*

Les bactéries du genre *Erwinia* sont des bacilles à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche. Elles sont associées aux végétaux en tant que saprophytes ou pathogènes. Elles peuvent entraîner la dégradation de la structure des végétaux, des flétrissements, des dépérissements, des jaunissements ou des pourritures (Pérombelon et Kelman, 1980).

Les *Erwinia pectinolytiques* étaient autrefois divisées en deux espèces appelées *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*. En raison des changements dans la nomenclature, dus à une évolution taxonomique de ces bactéries, *Er. carotovora* est devenue *Pectobacterium carotovorum* et *Er. chrysanthemi* est renommée *Pectobacterium chrysanthemi* (Lelliotte et Dickey, 1984).

Les travaux menés par Samson et al. (2005) ont permis de transférer *Pectobacterium chrysanthemi* à *Dickeya* sp. Par ailleurs, *P. carotovorum* comporte 5 sous espèces parmi

lesquelles deux sont particulièrement inféodées à la pomme de terre. Il s'agit de *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* et *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum*.

### **III.2 Production d'enzymes**

A côté des enzymes pectinolytiques produites par *Erwinia* qui jouent un rôle important dans la pathogénicité, d'autres enzymes d'un certain intérêt thérapeutique sont produites par quelques souches; il s'agit d'asparaginases. C'est la deuxième forme d'asparaginase qui a été extraite à partir d'*Erwinia chrysanthemi* après celle obtenue à partir d'*E. coli*. Les espèces du genre *Erwinia* produisent de plus grandes quantités de L-asparaginase avec des caractéristiques plus intéressantes que celle d'*E. coli*, parmi celles-ci *Erwinia aroideae* (Peterson et Ciegler, 1969a), *Er. atroseptica* et *Er. carotovora* (Peterson et Ciegler, 1969b ; Cammack et al., 1971).

En 1968, Wade fût le premier à montrer que l'activité anti-tumorale de l'asparaginase d'*Erwinia* est équivalente à celle de l'asparaginase d'*E. coli*. Ce n'est qu'en 1970 que l'asparaginase d'*Erwinia* fût utilisée pour la première fois en alternative de la forme native. Sa masse moléculaire est de 138 000 Da (Bread et al., 1970). Elle est disponible aux Etats-Unis sous le nom de L-asparaginase d'*Erwinia* d'« Ogden BioServices » pharmaceutique référentiel. Ce produit est commercialisé au Canada et en Europe sous le nom d'Erwinase® qui a été mis sur le marché par « Speywood Pharmaceuticals Ltd. ». Erwinase® a été commercialisé pour traiter les malades présentant des allergies aux asparaginases issues d'*E. coli* ou lorsque l'efficacité de celle-ci est réduite. Ainsi on peut disposer d'une forme d'enzyme présentant une toxicité moins importante (Wade et al., 1968). Beaucoup d'autres bactéries sont capables de produire des asparaginases mais leurs applications en clinique restent limitées.

### III.2.1 Caractéristiques de la L-asparaginase du genre *Erwinia*

Le tableau V montre les caractéristiques de la L-asparaginase chez quelques espèces appartenant au genre *Erwinia*.

**Tableau V.** Caractéristiques des L-asparaginases de certaines espèces du genre *Erwinia*

Espèce	MM (kDa)	pH	T (°C)	Km (M)	Vmax (μmol)	Référence
<i>Er. carotovora</i>	135	8,0–10,0	40	10 <sup>-5</sup>	0,9	-Kammack et al., 1971 ; -Howard et Carpenter, 1971 ; - Kumar et al., 2011
<i>Er. aeroidea</i>	-	7,5	-	3 x10 <sup>-3</sup>	-	- Peterson et Cliegler, 1969
<i>Er. chrysanthemi</i>	128	8,5	-	-	-	-Gilbert et al., 1985

- : Non rapporté

### III.2.2 Séquence génétique de l'asparaginase d'*Erwinia*

Le gène de la L-asparaginase d'*Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125 a été cloné et séquencé. L'ordre déduit prévoit une protéine de 327 résidus d'acides aminés précédée par un peptide signal de 21 résidus. L'utilisation de l'asparaginase en chimiothérapie chez des enfants atteints de LLA a augmenté l'intérêt pour la caractérisation et la production de cette enzyme. Lee et Alen (1986) ont rapporté que la L-asparaginase purifiée à partir de la souche NCPPB 1125 (autrefois classée comme *Er. carotovora*) est indistinguishable, par plusieurs critères biochimiques, de l'asparaginase NCPPB 1066 de l'espèce *Er.chrysanthemi* obtenue par l'Etablissement de Recherche Microbiologique, Salisbury, en Angleterre. En accord avec cette étude, une comparaison de la séquence en acides aminés de l'asparaginase de la souche NCPPB 1125 avec la séquence de l'asparaginase de la souche NCPPB1066 indique seulement quatre substitutions d'acides d'aminés conservateurs (Ile/Leu 156 ; Arg/Lys 178 ; Leu/Met 267 et Met/Ile 274) (David et al., 1988).

### III.2.3 Propriétés thérapeutiques

A l'instar des autres L-asparaginases, celle d'*Erwinia* sp. est connue comme un agent chimiothérapeutique principalement chez les enfants atteints de certains cancers (LLO et lymphosarcome). L'utilisation de la L-asparaginase d'*Erwinia* dans le traitement du cancer a

été décrite par de nombreux auteurs (Stecher et *al.*, 1999; Borek et Jaskólski, 2001; Konecna et *al.*, 2004; Sanches et *al.*, 2007; Baskar et Renganathan, 2009).

### ➤ **Effet sur la LLO**

Les cellules néoplasiques n'ont pas la capacité de synthétiser l'asparagine dont elles ont besoin pour pouvoir fabriquer les protéines asparagine-dépendantes, tandis que les cellules normales le peuvent grâce à l'asparagine- synthétase (El-Sayed et *al.*, 2011). La sélectivité de cet agent anticancéreux est basée sur le fait que des cellules normales sont privées de cette activité enzymatique. Les cellules cancéreuses ne peuvent pas obtenir ainsi l'acide aminé non essentiel : l'asparagine des sources extracellulaires, ceci affecte leurs protéines, la synthèse d'ADN et d'ARN menant à l'apoptose cellulaire (Sanjay et *al.*, 2010). Ceci provoque l'arrêt de la division cellulaire au niveau de la phase G<sub>1</sub>.

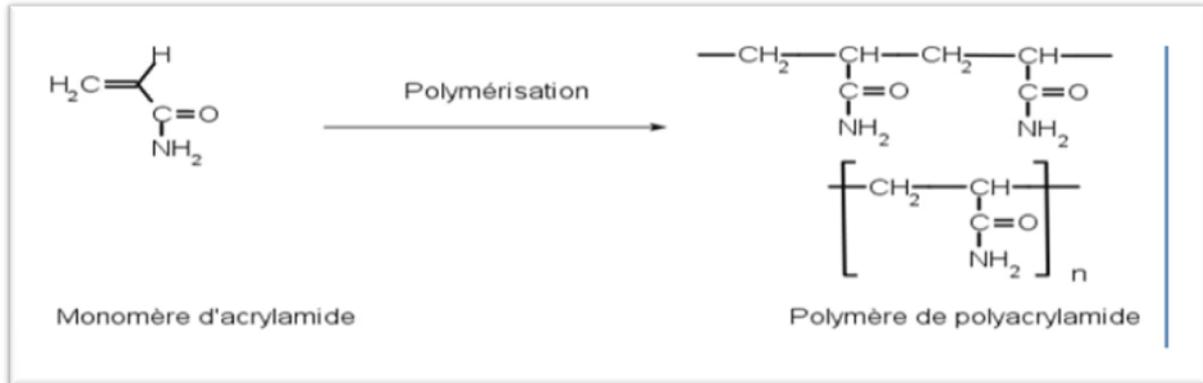
En catalysant l'hydrolyse de l'asparagine en acide aspartique et ammoniacque, l'asparaginase entraîne la destruction des cellules incapables de synthétiser elles-mêmes l'asparagine (cellules leucémiques). Il semble que les cellules saines soient également sensibles à l'action de l'asparaginase, il y aurait inhibition de la synthèse de certaines protéines, tels que l'albumine, l'insuline et les facteurs de la coagulation (Avramis et Panosyan, 2005).

### ➤ **Protection de certains aliments contre l'acrylamide**

L'acrylamide est un produit chimique intermédiaire dans la synthèse des polyacrylamides (figure 6), polymères de synthèse principalement utilisés comme additifs pour le traitement de l'eau. Comme ces polymères augmentent la viscosité de l'eau, ils sont utilisés dans les processus de forage et de fabrication de mortiers. Au laboratoire, on le retrouve sous forme de poudre et de gels. Il peut également être contenu dans des emballages alimentaires. C'est l'acrylamide (composé chimique de base ou monomère) qui est un produit toxique. Une fois polymérisé sous forme de polyacrylamides, on a affaire à des composés chimiques non toxiques, sauf s'ils contiennent des monomères résiduels (Anese et *al.*, 2011).

Il a été clairement démontré que l'acrylamide induit le cancer chez les animaux de laboratoire et qu'en grandes concentrations, il est toxique pour le système nerveux des animaux et de l'Homme. Les pommes de terre en frites et les croustilles sont les aliments qui renferment les concentrations les plus élevées d'acrylamide. Ce composé cancérigène est

également présent, mais en moindre quantité, dans les céréales, les pâtisseries, les biscuits, le pain, les produits à base de café et de cacao (Pedreschi et *al.*, 2008). Le comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA : *Joint Experts comity of Food additives*) a déterminé que l'exposition des aliments à l'acrylamide constitue une préoccupation majeure pour la santé humaine (Anese et *al.*, 2011).



**Figure 6.** Formation du polyacrylamide à partir d'acrylamide (Anonyme, 2006)

Beaucoup de moyens ont été identifiés pour réduire les niveaux d'acrylamide dans les aliments, qui sont pertinents pour les stratégies agronomiques et technologiques. Parmi ceux-ci les prétraitements par l'asparaginase (Anese et *al.*, 2011). L'asparagine est un précurseur de l'acrylamide. La réaction entre l'asparagine et les sucres réducteurs, tous deux présents naturellement dans certains aliments, peut conduire à la formation de l'acrylamide à une température excédent 120°C. L'hydrolyse de l'asparagine avant l'étape à laquelle l'aliment est soumis à la chaleur réduit avec efficacité la formation d'acrylamide. On souligne aussi que l'utilisation de l'asparaginase dans les aliments est permise aux États-Unis, en Australie, en Nouvelle Zélande et au Danemark (Pedreschi et *al.*, 2008).

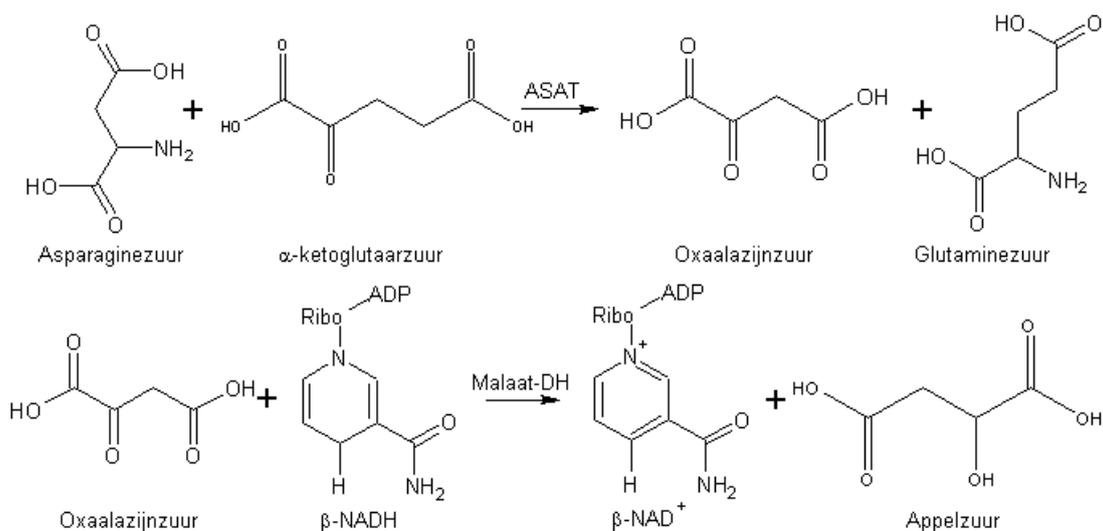
#### III.2.4 Activité enzymatique de la L-asparaginase

L'activité enzymatique est la conversion du substrat (en mole) et la formation du produit (en mole) par unité de temps (secondes) par l'enzyme dans des conditions bien définies de pH, de température et de concentration du substrat. Pour déterminer l'activité enzymatique de L-asparaginase, il existe plusieurs méthodes disponibles. Ces procédés peuvent être divisés en fonction de l'analyte à déterminer quantitativement, la diminution du substrat asparagine de l'augmentation des produits d'acide aspartique ou de l'ammoniac.

➤ **Dosage de l'acide aspartique**

Une analyse de l'acide aspartique (également applicable au substrat asparagine, afin de déterminer l'épuisement) peut se produire dans un certain nombre de façons. Le plus couramment utilisé est une RP-HPLC couplée à un détecteur. Le détecteur peut être un appareil de mesure de fluorescence après dérivatisation (Boos *et al.*, 1996 ; Nath *et al.*, 2008), détecteur UV après dérivatisation de quantification (Avramis *et al.*, 2007) ou la quantification (Tuncel *et al.*, 2010).

Une autre technique afin de quantifier l'acide aspartique est un dosage enzymatique couplé. L'acide aspartique, résultant de la désamination catalysée par l'asparaginase, réagit avec l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique en présence d'une aspartate- aminotransferase (ASAT), ainsi l'oxaloacetyl qui en résulte réagit avec le  $\beta$ -NADH qui est oxydé ( $\beta$ -NAD<sup>+</sup>) en présence d'une malate- déshydrogénase (figure 7). L'oxydation du NADH provoque une diminution de l'absorbance à 340 nm, qui est facilement mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Vrooman *et al.*, 2010).



**Figure 7.** Mécanisme réactionnel du dosage enzymatique couplé (Vrooman *et al.*, 2010).

Une autre méthode non-sélective et qui est disponible, est la conductimétrie. Cette méthode est basée sur une augmentation de la conductivité due à la production d'ammoniac et de l'acide aspartique (Drainas *et al.*, 1985; Stecher *et al.*, 1999).

➤ **Dosage de l'ammoniac**

La méthode de Nessler : utilise le réactif de Nessler, qui est un mélange de  $K_2HgI_4$  et une solution de KOH ou de NaOH (Demuthkaya *et al.*, 2006). Le réactif de Nessler interagit avec l'ammoniac tel que montré sur la figure 8 (Leonard, 1963) :

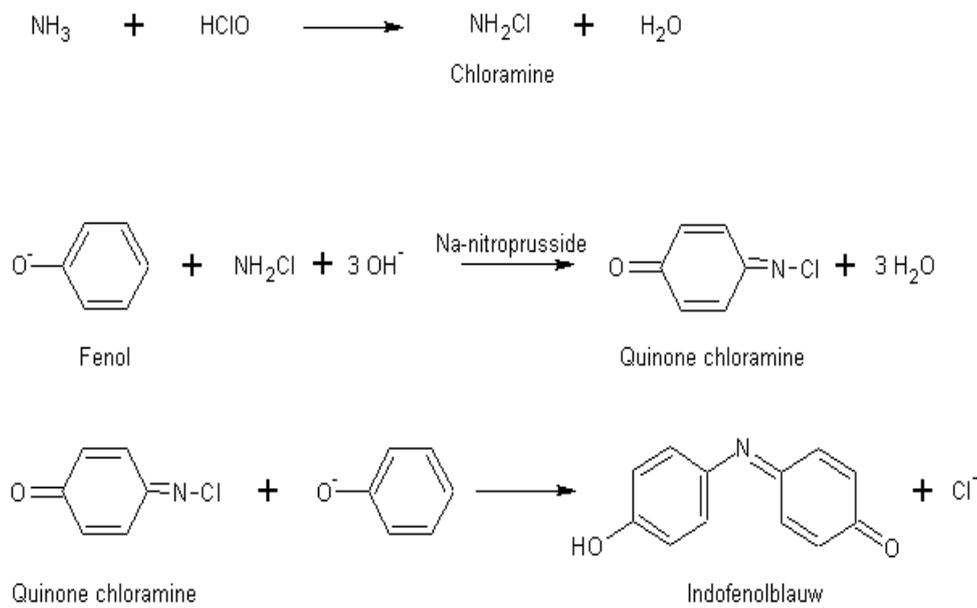


**Figure 8.** Interaction du réactif de Nessler avec l'ammoniac (Leonard, 1963)

L'absorbance est mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible à 485 nm (Demuthkaya et *al.*, 2006 ; Moorthy et *al.*, 2010). La méthode de Nessler a une plage d'application de 0,5 à 12 µg/ml.

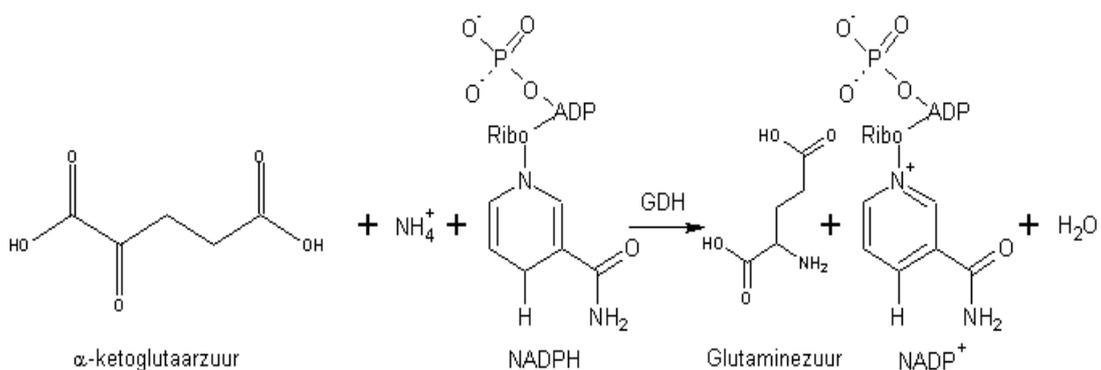
**La méthode de Berthelot :** L'ammoniac formé réagit avec l'hypochlorite (HClO) et de la chloramine est formée de ce fait. Cette chloramine réagit avec le Na-nitroprussiane et le phénol pour donner de la quinone chloramine, qui réagit en outre dans des conditions basiques avec du phénol pour produire en fin de compte le bleu d'indophénol (figure 9). La quantité d'indophénol qui est produite est directement proportionnelle à la quantité d'ammoniac qui est libéré et qui a été retiré du substrat. La quantification de l'indophénol est effectuée par spectrophotométrie à 675 nm (Moliner-Martinez et *al.*, 2005). Une augmentation de la couleur bleue est différenciée entre 0 et 20 µg/ml (Lau et *al.*, 2004).

La méthode de Berthelot a également de nombreuses variantes, qui sont principalement destinées à améliorer le traitement des échantillons de sérum/plasma. L'une des plus récentes variations des mesures de plasma est l'utilisation d'une SPE (extraction en phase solide), couplé à une DRS (spectroscopie de réflexion diffuse). La limite de détection dans la SPE-DRS est de 10 µg/l (Moliner-Martinez et *al.*, 2005). Une autre méthode est l'utilisation d'un capteur en phase solide non-réversible (bandes de capteur). La réaction à ces bandes à usage unique est beaucoup plus rapide (en 3 minutes au lieu de 20 minutes). La gamme dans cette méthode est de 0,5 à 10 µg/ml (Lau et *al.*, 2004). Encore une autre variante est une extraction de micelles à médiation. L'avantage de cette méthode est qu'elle est plus rapide. La précision est plus élevée. La limite de détection ici est de 1 ng/ml (Afkhami et *al.*, 2008). La méthode de Berthelot a l'avantage d'être moins sensible aux interférences par rapport à la méthode de Nessler.



**Figure 9.** Mécanisme de la formation du bleu d'indophénol (Moliner-Martinez et al., 2005).

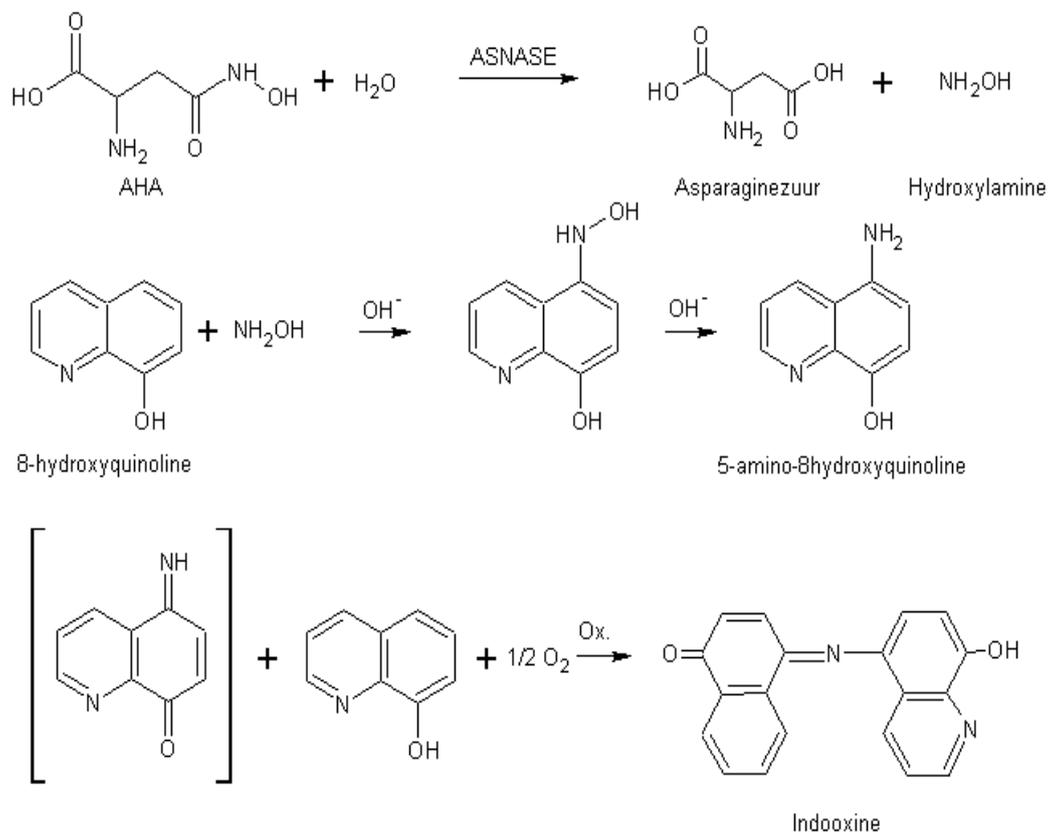
➤ **Kits enzymatiques:** Il existe également des kits de dosage de l'ammoniac. Des Kits faisant usage de l'enzyme GDH (glutamate- déshydrogénase) permettent de déterminer la concentration de l'ammoniac par une réaction NADPH-dépendante (figure 10). La conversion de NADPH en NADP<sup>+</sup> est mesurée quantitativement par la diminution de l'absorbance à 340 nm. Avec ces kits GDH, on peut déterminer des concentrations dans la plage de 0,2 à 15 µg/ml (Anonyme, SD).



**Figure 10.** Mécanisme de réaction du kit Glutamate Déshydrogénase (Afkhami et al., 2008).

- **La méthode Indooxine :** Cette méthode est basée sur la réaction de l'hydroxylamine, obtenue à partir de l'AHA asparagine modifié (acide  $\beta$ -hydroxamate d'aspartique), avec la 8-hydroxyquinoléine (Wehner et al., 1992). L'intensité de couleur verte de l'Indooxine

coloré qui est formée en fin de réaction (figure 11) se prête particulièrement à une détermination spectrophotométrique à 710 nm (Lanvers et *al.*, 2002).



**Figure 11.** Mécanisme de réaction du procédé Indoxine (Lanvers et *al.*, 2002).

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée (Faculté SNV, U. Bejaia) en collaboration avec le laboratoire « DruQuaR group » de l'université de Gand (Belgique).

### **I.1 Synthèse des nanoparticules de ZnO**

De l'aérogel de ZnO nanosérisé a été synthétisé en dissolvant 16,0 g d'acétate de zinc di-hydraté ( $\text{Zn} [\text{CH}_3\text{COO}]_2, 2\text{H}_2\text{O}$ ), Sigma-Aldrich, Allemagne) dans 112,0 mL d'éthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Sigma-Aldrich, Allemagne) à 95%. Le mélange a été maintenu sous agitation magnétique continue à température ambiante pendant 20 minutes. Pour faciliter la dissolution complète de l'acétate de zinc dans l'éthanol, quelques gouttes de monoéthanolamine (MEA, Sigma-Aldrich, Allemagne) ont été ajoutées à la solution (Boudjouan et *al.*, 2015). La solution homogène et transparente obtenue a été placée dans un réacteur Parr 4848 (Sigma-Aldrich, Allemagne) de type autoclave de capacité d'un litre pour le séchage dans des conditions supercritiques d'éthanol (243°C, 63 bars). Pour atteindre la température et la pression critiques avec l'autoclave utilisé, un volume de 267,0 mL d'éthanol a été ajouté à la solution préparée. Après refroidissement à température ambiante, une poudre blanche a été obtenue. Une partie de cette poudre a été recuite à 500°C pendant 2 heures (Djouadi et *al.*, 2014).

### **I.2 Nanoparticules de TiO<sub>2</sub>**

Des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> commerciales PS25 ont été utilisées dans nos expériences. Elles sont vendues sous la marque commerciale AEROXIDE® TiO<sub>2</sub> P 90articles (Evonik Industries, Japon). Elles sont un mélange de phases ; 80% d'anatase et 20% de rutile. La distribution de la taille est autour 15 nm de diamètre.

### **I.3 Caractérisation des nanoparticules**

La taille de la nanoparticule a été estimée par la technique de diffraction à rayons X (XRD). La surface spécifique d'une poudre est estimée à partir de la quantité d'azote adsorbée en relation avec sa pression à la température d'ébullition de l'azote liquide et sous une pression atmosphérique normale. Les informations sont interprétées selon la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET).

**I.3.1 Préparation des échantillons**

Trois tubes test vides (avec leurs bouchons) ont été placés dans l'appareil de conditionnement d'échantillons (Micromeritics FlowPrep 060, France), sous un flux de gaz et laissés sécher sous un flux d'azote pendant 1 heure ou jusqu'à un poids constant. Les tubes ont été retirés du four et laissés refroidir durant 5 minutes. Un tube test a été utilisé pour l'analyse et les deux autres pour calibrer la pression de saturation  $P_0$ .

- Au moyen d'une balance analytique (précision de 0,1 mg), un tube test vide avec son support et son bouchon a été pesé et la masse ( $m_T$ ) a été soigneusement notée (g).
- A l'aide d'une spatule, une quantité suffisante de poudre a été ajoutée dans le tube test (la surface totale devrait être comprise entre 5 et 10  $m^2$ ). Ce dernier contenant la poudre avec son support et son bouchon a été pesé (précision de 0,1 mg) et la masse ( $m_P$ ) a été soigneusement notée (g).
- Le tube test avec son bouchon (posé sur le tube) a été placé sur le stand de conditionnement d'échantillons avec un flux de gaz pour une durée de 1h30, puis retiré du four et laissé refroidir 5 minutes. Par la suite, il a été placé sur son support et pesé (précision de 0,1 mg) et la masse ( $m_C$ ) a été soigneusement notée (g).

La masse de poudre à insérer dans le système de mesure peut être calculée à partir de la formule :  $m_P = m_C - m_T$  (g).

**I.3.2 Analyse de surface spécifique (méthode BET)**

Lorsque l'échantillon est entrain de sécher et d'être dégazé dans le stand de conditionnement d'échantillons, les deux autres tubes test ont été placés sur l'installation afin de procéder à la mesure de la pression de saturation  $P_0$ . Le Dewar a été remplis avec de l'azote et placé sur la plateforme au dessous des deux tubes test. Le bouton blanc du clavier (2<sup>ème</sup> fonction) a été actionné puis le bouton "P0/." et enfin "Enter". La calibration prend environ 10 à 15 minutes. La  $P_0$  est automatiquement enregistrée. Le tube test à droite a été remplacé sur l'instrument (Gemini 2375 de Micromeritics) par le tube test contenant l'échantillon. Le niveau d'azote dans le Dewar a été contrôlé et si nécessaire de l'azote a été ajouté. Les détails de la méthode sont représentés en annexe Ile dossier dans lequel a été enregistrée la mesure a été ouvert. L'échantillon a été nommé « Powder-Lot n°-BET-Experiment n°-Operator.txt », puis l'enregistrement a été validé. Lorsque la mesure a été

terminée, le menu “Transfert” a été ouvert, la touche “Capturer le texte” a été sélectionnée, puis “Arrêter”. Une fois la mesure terminée et enregistrée, la poudre a été retirée du tube test, le tube a été lavé à l’eau en utilisant un bain ultrasons, rincé à l’éthanol et séché à 60°C dans le four.

Les conditions de mesure sont données dans le tableau I (Annexe I).

## **I.4 Extraction, purification et caractérisation de la L-asparaginase de *Dickeya solani***

### **I.4.1 Souches utilisées et conditions de culture**

Dans ce travail, nous avons utilisé trois souches de *Dickeya solani*. Avant de commencer la culture des souches, une décongélation progressive de -80°C à -20°C a été nécessaire, suivie d’une revivification. Une culture bactérienne en boîte a été réalisée sur du milieu King B (pH=6,5) contenant (par litre): 20,0 g de peptone (Institut Pasteur d’Algérie, Alger), 1,145 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Allemagne), 1,5 g de Mg (Sigma- Aldrich, Allemagne), 15,0 g d’agar (Merck, Allemagne) et 15 mL de glycérol (Sigma-Aldrich, Allemagne), puis incubée à 26°C/24 h. Après la période d’incubation, une colonie bactérienne a été inoculée sur des tubes inclinés renfermant du milieu LPA (Levure, Peptone, Agar) contenant (par litre) : 3,0 g d’extrait de levures (Merck, Allemagne), 5,0 g de peptone (Institut Pasteur d’Algérie, Alger) et 15,0 g d’agar (Merck, Allemagne). Ces tubes ont été conservés à température ambiante et peuvent être utilisés pendant une période ne dépassant pas six mois.

Les souches de *Dickeya solani* utilisées dans ce travail ont été isolées à partir de la pomme de terre en 2007 aux pays bas. *D. solani* IPO 2222, LMG 25993, NCPPB 4479 et font partie des collections hollandaise (IPO: Plant Research International, 6708 PB Wageningen Netherlands); belge (BCCM/LMG: Belgian Coordinated Collection of Microorganisms/Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (UGent) K.L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Belgium) et anglaise (NCPPB: The National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, National Agri-Food Innovation Campus, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, United Kingdom), considérée comme une souche de référence.

Des bouillons nutritifs ont été inoculés à partir du milieu LPA et incubés pendant 12 h à 26°C. Ces cultures ont été utilisées pour inoculer le milieu King B qui a été incubé à 26°C/24 h.

### I.4.2 Préparation de la culture bactérienne

La production de la L-asparaginase a été réalisée selon le protocole décrit par Kamble et *al.* (2006), avec quelques modifications. Les souches ont été cultivées dans un bouillon nutritif (Hi media Mv 088) contenant (par litre) : 3,0 g d'extrait de viande, 5,0 g de NaCl (Sigma- Aldrich) et 5,0 g de peptone (Institut Pasteur d'Algérie). La stérilisation a été effectuée à 121°C/15 min. Une colonie bactérienne a été transférée aseptiquement dans 100,0 mL de bouillon nutritif. Le milieu a été incubé à 26°C pendant 7 jours. Le pH du milieu de culture a été suivi quotidiennement, avec un pH mètre, et régulièrement ajusté à 6,9 avec du NaOH 0,1 M. Un autre milieu a été préparé avec la même composition mais en ajoutant le substrat de L-asparaginase (L-asparagine à 3,0 g/L). Après une période d'incubation de 7 jours et une croissance optimale des bactéries, le milieu de culture a été filtré en utilisant du papier Whatman n°1 pour éliminer les impuretés. Le filtrat a ensuite été soumis à une ultracentrifugation (40 000 g/20 min, 4°C) pour éliminer la biomasse bactérienne. Le surnageant constitue l'extrait brut soluble contenant la L-asparaginase.

### I.4.3 Mesure de l'activité de la L-asparaginase avec et sans nanoparticules

La L-asparaginase catalyse l'hydrolyse de la L-asparagine en acide L-aspartique et en ammoniac. Ce dernier réagit avec le réactif de Nessler pour donner un produit chromogène. Le mélange d'essai enzymatique consistait en 900 µL de L-asparagine (100 mM, Sigma Aldrich, Allemagne) préparé dans du tampon Tris-HCl (1M, pH 8,6) et 100 µL d'extrait bactérien brut. Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C/30 min et 100 µL d'acide trichloroacétique (TCA, Sigma-Aldrich, Allemagne) à 15 % ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange réactionnel a été centrifugé à 10 000 g/5 min pour éliminer la matière insoluble et l'ammoniac libéré a été quantifié par colorimétrie après addition de 100 µL de réactif de Nessler (Sigma-Aldrich, Allemagne) à un échantillon contenant 100 µL de surnageant et 800 µL d'eau distillée. Le mélange obtenu a été agité par tourbillonnement et incubé à température ambiante pendant 10 minutes, suivi de mesures d'absorbance à 425 nm contre une solution témoin (mélange réactionnel mais sans substrat), en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible modèle Cary 50 (Australie), équipé d'un PC. La quantité d'ammoniac produite a été déterminée en utilisant du sulfate d'ammonium (Sigma-Aldrich, Allemagne) comme standard d'étalonnage (Annexe II). Une unité d'activité enzymatique (UI) a été définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 micromole d'ammoniac par minute à

37°C. L'activité spécifique est exprimée en unités par milligramme de protéine (Kumar et *al.*, 2009). Le même protocole a été suivi pour mesurer l'activité enzymatique en présence de nanoparticules de ZnO et de TiO<sub>2</sub>, ces dernières ont été également ajoutées au témoin.

Des masses de 1 mg de nanoparticule de TiO<sub>2</sub> et de ZnO sont dissoutes dans 30 mL d'eau distillée. Les mélanges homogènes sont utilisés afin d'estimer les effets des nanoparticules sur la L-asparaginase. Les valeurs utilisées pour la préparation des solutions des nanoparticules sont celles qui nous ont permis d'avoir des mélanges homogènes. Différentes concentrations ont été étudiées afin d'estimer la concentration optimale qui permet une meilleure activité sur l'enzyme présente sur l'extrait brut. Le résultat de cette étude nous ont poussé à utiliser la solution mère, en effet celle-ci présente la meilleure activité.

P.S c'est très difficile de dissoudre les nanoparticules car ils sont très légers en volume mais très grands en surface (plusieurs essais ont été effectués avant d'avoir une solution limpide).

Les valeurs utilisées pour le tracé de la courbe d'étalonnage du sulfate d'ammonium sont présentées dans le tableau II (Annexe I) et la courbe de référence du sulfate d'ammonium utilisée pour le calcul de l'activité enzymatique par la méthode de Nessler est présentée dans la figure 1 (Annexe I).

#### **I.4.4 Optimisation de la croissance bactérienne et de la production de la L-asparaginase**

##### **➤ Détermination de la température optimale**

Des flacons [capacité (C) : 250 mL, volume utile (VU): 100 mL] contenant un bouillon nutritif (pH 6,9) ont étéensemencés dans les conditions indiquées ci-dessus (paragraphe I.4.2). La température optimale a été déterminée à la fois pour la croissance bactérienne par mesure des absorbances à 600 nm et la production de la L-asparaginase par l'évaluation de son activité en utilisant la L-asparagine comme substrat (Madda et Pharm, 2009) en suivant le protocole décrit en paragraphe I.4.3. Les températures testées varient entre 20 et 45°C.

##### **➤ Détermination du pH optimal**

A partir d'une pré-culture de 24 h (absorbance à 600 nm entre 0,6 et 0,8) dans du bouillon nutritif (pH 6,9), des flacons (C: 250 ml, VU: 100 mL) contenant le même milieu à

des pH compris entre 5,5 et 9,0 (avec des pas de 0,5), ont été ensemencés et incubés pendant 7 jours, sous agitation continue (120 tr/min), à la température de croissance optimale préalablement déterminée. Le pH optimal pour la croissance bactérienne a été suivi par des mesures d'absorbances à 600 nm tandis que l'activité de la L-asparaginase a été déterminée en utilisant la L-asparagine comme substrat (Madda et Pharm, 2009) en suivant le protocole décrit en paragraphe I.4.3.

➤ **Effet de l'agitation**

L'effet de l'agitation sur la croissance et la production de L-asparaginase a été étudié en effectuant des cultures agitées (120 tr/min) et sans agitation à la température de croissance et au pH optimaux déterminés pendant 7 jours (Madda et Pharm, 2009).

➤ **Effet de la concentration du substrat (L-asparagine) sur la production de L-asparaginase**

Différentes concentrations de L-asparagine allant de 0 à 6 g/L (avec des pas de 0,05), ont été ajoutées au bouillon nutritif (50 mL) et la production de la L-asparaginase a été évaluée en mesurant son activité (Madda et Pharm, 2009).

#### **I.4.5 Purification de la L-asparaginase**

➤ **Purification de la L-asparaginase sur colonne Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow couplée au système AKTAprime**

L'extrait brut soluble a été fractionné sur une colonne Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow (5,0 mL) couplée à un système AKTAprime à température ambiante et à 0,6 kPa. Avant de charger l'échantillon, la colonne a été pré-équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8,0 (5 volumes de colonne). La colonne a été lavée avec le même tampon (10 volumes de colonne) jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm atteigne sa ligne de base. Les protéines liées ont été éluées avec un gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8,0 (20 volumes de colonne) à un débit de 1 mL / min et des fractions de 3,5 ml ont été recueillies. Toutes les solutions ont été dégazées et filtrées (Filtre Millipak® de 0,22 µm) avant utilisation.

Les fractions chromatographiques résultantes ont été analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions montrant l'activité L-asparaginase (Annexe II) ont été rassemblées, avant d'être concentrées jusqu'au volume souhaité (40 mL), par ultrafiltration

(système Amicon, membrane coupée : 3,0 kDa) et/ou diafiltration (concentrateur 5 000 MWCO Vivaspin 15R).

➤ **Purification supplémentaire de la L-asparaginase par filtration sur gel FPLC-Superdex 75 pg couplé au système AKTAprime**

Pour améliorer encore la pureté et l'homogénéité de la L-asparaginase, les fractions riches en L-asparaginase éluées de la colonne Hi-Trap Q-Sépharose Fast Flow ont été regroupées et soumises à une FPLC-Superdex 75 pg sur un système AKTAprime. La colonne (Hiload 16/600) a été équilibrée et éluee avec un tampon Tris-HCl (50 mM à pH 7,4) contenant du NaCl (150 mM). Les conditions de fonctionnement ont été de 1,0 mL/min, 3,0 ml/fraction et 0,6 kPa. Toutes les solutions ont été dégazées et filtrées (Filtre Millipak® de 0,22 µm) avant utilisation.

➤ **Vérification de la pureté de la L-asparaginase et estimation de son PM par SDS-PAGE**

L'électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium-Dodecyle-Sulphate-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis*) a été réalisée sur des gels préfabriqués (ExcelGel, 245x110x0, 5 mm, gradient 8-18%) en utilisant le kit Multiphore II d'Amersham Biosciences (Belgique) sous les conditions : 600 V, 50 mA et 35 W à température constante ( $15,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ).

La séparation a été réalisée vers l'anode et le bleu de bromophénol (Merck, Pays-bas) a été utilisé comme colorant de suivi. La coloration a été réalisée avec des procédures de coloration à l'argent. Le lysozyme de blanc d'œuf (14,4 kDa), l'inhibiteur de la trypsine (21,5 kDa), l'anhydrase carbonique (31,0 kDa), l'ovalbumine de blanc d'œuf (45,0 kDa), la sérumalbumine bovine (66,2 kDa) et la phosphorylase b de lapin (97,4 kDa) ont été utilisés comme marqueurs de taille. Le tableau VI résume les traitements appliqués au gel de SDS-PAGE et les conditions opératoires sont indiquées dans le tableau VII.

**Tableau VI.** Traitement du gel d'électrophorèse

Etapes	Préparation de la solution	Procédures	Temps
1-Fixation	Un volume de 100 ml d'éthanol absolu a été combiné avec 25 ml d'acide acétique glacial et ajusté à 250 ml avec de l'eau bi- distillée	Le gel a été placé dans la solution de fixation et laissé sous agitation 300 rpm	1 heure (une nuit est acceptable)
2-Sensibilisation	Un volume de 25 ml du sensibilisant concentré (Sc) a été combiné avec 2,5 ml du réducteur concentré (BRC) et 75 ml d'éthanol absolu et ajusté à 250 ml avec de l'eau bi- distillée	La solution de fixation a été retirée et la solution de sensibilisation versée sur le gel	30 minutes
3-Lavage 1	Un volume de 250 ml d'eau bi- distillée a été ajouté	La solution de sensibilisation a été retirée et le gel lavé 3 fois avec un seul volume d'eau (250 ml)	3x10 minutes (Trois lavages)
4-Coloration	Un volume de 5 ml du réactif d'argent concentré (SRC) a été ajusté à 250 ml avec de l'eau bi- distillée	L'eau de lavage a été retirée et la solution de coloration versée sur le gel	30 minutes
5-Rinçage	Un volume de 250 ml d'eau bi- distillée a été ajouté	La solution de coloration a été retirée et le gel rincé avec un seul volume d'eau (250 ml)	1 minute
6-Développement	Un volume de 25 µl de la solution de développement concentrée (DBC) et 50 µl de la solution de développement concentrée (IDC) ont été ajoutés à 12,5 µl du réducteur concentré puis ajustés à 250 ml avec l'eau bi- distillée	L'eau de rinçage a été retirée et la solution de développement versée	12-30 minutes
7-Arrêt	Un volume de 12,5 ml d'acide acétique glacial a été ajusté à 250 ml avec de l'eau bi- distillée	La solution de développement a été retirée et la solution d'arrêt versée sur le gel	10 minutes
8-Lavage 2	Un volume de 250 ml d'eau bi- distillée	Le gel a été lavé dans un seul volume d'eau (250 ml)	10 minutes

**Tableau VII.** Conditions de fonctionnement de l'électrophorèse

Temps	Température °C	Voltage V	Courant mA	Puissance W
Démarrage (0h)	14,9	199	50	10
Fin (1h17min)		601	49	30

#### I.4.6 Spécificité de la L-asparaginase vis-à-vis de la L-asparagine et de la L-glutamine

La spécificité au substrat de la L-asparaginase a été évaluée en testant les deux substrats, la L-asparagine et la L-glutamine ; l'activité L-glutaminase a été déterminée en utilisant de la L-glutamine comme substrat selon Imada *et al.* (1973). Un mélange réactionnel contenant 0,5 ml de L-asparagine 0,04 M, 0,5 mL de tampon Tris HCl 0,5 M (pH 8,6), 0,5 ml d'une préparation enzymatique et de l'eau distillée (volume final= 2,0 mL) a été incubé à 37°C/30 min. La réaction a été arrêtée en ajoutant 0,5 ml d'acide trichloroacétique 1,5 M. Des tubes témoins contenant la préparation enzymatique et l'acide trichloroacétique ont été utilisés comme le blanc. A 3,7 mL d'eau distillée, 0,1 mL du mélange ci-dessus et 0,2 mL de réactif de Nessler ont été ajoutés. Après avoir maintenu le mélange à 20°C/20 min, l'absorbance à 450 nm a été mesurée avec un spectrophotomètre (UVmini-1240 Shimadzu, Japon). L'activité L-glutaminase a été testée avec la même procédure en utilisant de L-glutamine au lieu du L-asparagine.

#### I.4.7 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le choix d'une méthode de dosage des protéines dépend avant tout de la précision recherchée et de la quantité de protéines à doser, puis de la facilité de mise en œuvre et la rapidité de la réponse (Delobette *et al.*, 1991). La méthode de Bradford (Bradford, 1976) est la plus couramment utilisée pour doser les protéines en solution. Elle repose sur le principe de la fixation du bleu de Coomassie sous sa forme anionique préférentiellement aux protéines par des interactions de type électrostatique avec les groupements cationiques des protéines contenant des groupes fonctionnels basiques et/ou aromatiques. Le bleu de Coomassie est fréquemment utilisé pour la mise en évidence des protéines sur gel de polyacrylamide et permet également leur dosage en solution par spectrophotométrie.

##### ➤ Principe

C'est une méthode dont le principe est basé sur la mesure du changement de la couleur du bleu de Coomassie à 595 nm après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. En effet, le bleu de Coomassie existe sous deux formes selon son état d'ionisation, la forme libre cationique du chromophore de couleur vert foncé absorbe à un maximum de 465-470 nm et la forme liée anionique du chromophore de couleur bleue

absorbe à 595 nm. La variation de l'absorbance à 595 nm est proportionnelle à la quantité du chromophore complexé, et donc à la concentration en protéines présentes dans l'échantillon.

➤ **Dosage**

Un aliquote de 500 µL de chaque échantillon a été mélangé avec 2 ml du réactif de Bradford (AnnexeII). Le mélange vortexé a été incubé à l'obscurité pendant 5 minutes. L'absorbance a été lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Cary 50, Varian, Australia). Les concentrations en protéines ont été déterminées par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe II) tracée avec une solution de sérum albumine bovine (Sigma-Aldrich, Allemagne) et préparée dans les mêmes conditions (Annexe II).

### **I.5 Optimisation de l'activité de la L-asparaginase par la méthode de Berthelot**

Cette partie du travail a été réalisée au laboratoire « DruQuaR group » de l'Université de Gand (Belgique).

#### **I.5.1 Calcul de l'activité enzymatique par la méthode de Berthelot**

La méthode de Berthelot pourrait être utilisée pour déterminer l'activité de l'asparaginase. Cette méthode nous permet en effet de calculer le taux d'ammoniac libéré au cours de la réaction. Dans cette partie, nous avons essayé de faire une comparaison entre l'activité de la L-asparaginase (L-ASNase) des extraits bruts issus à partir de *Dickeya solani* et *Pectobacterium carotovorum*, l'extrait brut du mélange et la L-ASNase et la L-ASNase seule et ce en utilisant cette méthode.

Les échantillons et les réactifs utilisés sont rapportés dans le tableau VIII.

➤ **Préparation des solutions de l'optimisation**

- **Réactif au phénol** : Des masses de 5 g de phénol et de 25 mg de nitroprussiate de sodium ont été dissoutes dans 100 ml d'eau distillée.

- **Solution d'hypochlorite alcalin** : Une masse de 2,5 g d'hydroxyde de sodium a été dissoute dans 3 ml d'hypochlorite de sodium puis diluée à 10-15% dans 100 ml d'eau distillée.

- **Solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 M (pH 7,4):** Une masse de 2,7202 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a été ajoutée à 100 ml d'eau distillée puis, 100,0 ml de la solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 M ont été ajoutés à 157,4 ml d'hypochlorite de sodium 0,1 M.
- **Solution à 25% de TCA:** Une masse de 2,5 g de TCA a été dissoute dans 10 mL d'eau distillée.
- **Solution de L-Asn:** Des masses de 79,0 g de mg de L-Asn ont été dissoutes dans une solution de tampon phosphate 0,2 M, pH 7,4 et diluées à 25 mL avec le même tampon.

➤ **Tests d'activité pour les étalons d'ammoniaque**

- **Courbe standard**

Les solutions étalons d'ammoniaque ont été préparées de 0,1 à 1 ppm par une solution mère de chlorure d'ammonium (Tableau I, Figure 1, Annexe III) : 1,0 mL du réactif de phénol à été ajouté à 10,0 mL d'une solution d'ammoniaque. La solution a été agitée pendant 3 secondes, puis 1,0 mL d'hypochlorite alcalin a été ajouté et secoué à nouveau pendant 30 secondes. La mesure a été réalisée à 633 nm après 15 minutes de temps de réaction à une température de réaction de 37°C. Trois échantillons ont été testés :

- L'extrait brut de *Dickeya solani* (extrait brut 1) et l'extrait brut de *Pectobacterium carotovorum* ssp.88 22 (extrait brut 2).
- La L-ASNase d'*E. coli*: Paralysine L-Asnase d'*E. coli*.
- Mélange : L-ASNase + extrait brut de *Dickeya solani* et L-ASNase + extrait brut de *Pectobacterium carotovorum*.

Les échantillons et réactifs utilisés sont résumées dans le tableau **VIII**.

**Tableau VIII.** Echantillons et réactifs utilisés

Substance	Fournisseur (Pays)	Numéro de produit	Numéro de Batch
<b>Protéines</b>			
Extrait brut	-	-	-
Extrait brut+L-ASNase	-	-	-
L-ASNase	KYOMA HAKKO KIRIN (Belgique)	914S456F12	1141298
<b>Réactifs</b>			
Chlorure d'Ammonium	UCB (Belgique)	89079051	1141
Phénol	Suisse	BCBS6808V	P1037
Hypochlorite de Sodium 15% CL <sup>-</sup> actif	Sigma (Allemagne)	STBB7477V	425844
Nitroprussiate de Sodium	Sigma (Allemagne)	SZBA0970	13451
Hydroxyde de Sodium	Fluka (France)	71694-1kg	BCBM0394V
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck (Pays bas)	596470	64274
L-Asparagine (L-Asn)	Merck (paysbas)	130967	2416034
Acide trichloroacétique (TCA)	Sigma (Allemagne)	90340	33731

- : Non applicable

### ➤ Protocole

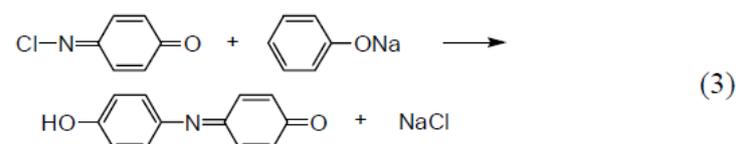
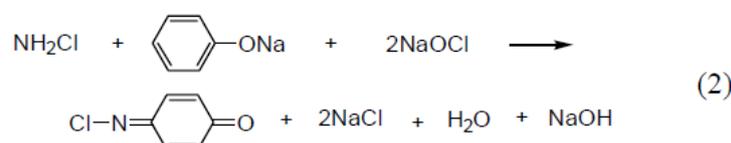
Un volume de 1,9 mL de la solution de L-Asn a été chauffé à 37°C pendant 3 minutes, 1,0 mL de la solution d'essai (extrait brut 1 ou 2, extrait brut 1 ou 2+ L-ASNase et L-ASNase seule) a été ajouté et maintenu à 37°C. Au bout de 15 minutes, 0,5 mL de TCA à 25% a été ajouté. Après cela, 0,5 mL de la solution a été prélevé et dilué à 10 mL avec de l'eau.

### ➤ Réaction de l'échantillon

Un volume de 1,0 mL du réactif colorant phénolique a été ajouté à 10,0 mL de solution échantillon. La solution a été agitée pendant 30 secondes. Ensuite, 1,0 mL d'hypochlorite alcalin a été ajouté et mélangé à nouveau pendant 30 secondes. La mesure a été effectuée à 633 nm après 15 minutes à une température de réaction de 37°C.

### I.5.2 Optimisation de la méthode de Berthelot

La méthode de Berthelot est largement utilisée pour la détermination de la concentration en ammoniac. L'évaluation de la réaction de coloration de Berthelot a montré que la séquence des réactifs est un déterminant important de la réponse chromogénique. La couleur est formée de diverses substances azotées non protéiques traitées d'abord avec de l'hypochlorite alcalin suivi d'un réactif au phénol. La séquence du réactif de phénol-hypochlorite semble renforcer la spécificité de la formation de couleur de Berthelot (Searcy et *al.*, 1965). La réaction d'indophénol peut être décrite par les équations de (1) ~ (3) illustrées sur la figure 12 (Parc Gaeum et *al.*, 2009).



**Figure 12.** Réaction de l'indophénol (Parc Gaeum et *al.*, 2009).

Cette étude vise à cribler les facteurs significatifs de la méthode de Berthelot en utilisant la stratégie de conception d'expériences (DoE).

#### ➤ Justification des facteurs

Les facteurs et les intervalles qui ont été examinés sont présentés dans le tableau IX.

**Tableau IX.** Facteurs et intervalles de l'optimisation

No.	Facteurs	Abréviation	Le point du milieu	Intervalle [75%-125%]	Unité
1	[phénol]	C phen	50	37,5-62,5	g/L
2	[Hydroxyde de sodium]	C NaOH	25	18,75-31,25	g/L
3	[Niroprussiate de sodium]	C nitro	0,4	0,3-0,5	g/L
4	[Hypochlorite de sodium]	C hypo	100-150	75-125	g/L
5	Temps de réaction	Temps	15	11,25-18,75	min
6	Température	Temp	37	27,75-46,25	°C

➤ **Paramètres influençant la méthode de Berthelot**

- **Concentration de phénol**

Les changements de concentration en phénol peuvent non seulement affecter la sensibilité à l'absorbance mais aussi le taux de développement de la couleur et sa stabilité.

- **Concentration d'hydroxyde de sodium**

Le NaOH aide à la formation de d'hypochlorite et de phénate. La stabilité de  $\text{NH}_2\text{Cl}$  est connue pour être affectée par la concentration de NaOH.

- **Concentration de nitroprussiate de sodium**

Le nitroprussiate de sodium est le catalyseur de l'étape 2 (Figure 12).

- **Concentration d'hypochlorure de sodium**

L'hypochlorure de sodium réagit à la première et à la deuxième étape (Figure 12).

- **Temps de réaction**

Le temps de réaction consiste à vérifier la stabilité du développement de la couleur et le temps de réaction écoulé.

- **Température**

La réaction est maintenue à une température fixe (Ex. 37°C).

Le modèle de Plackett-Burman (PBD) a été appliqué, 15 expériences (12 plus 3 points centraux) ont été effectuées (Tableau X). La réponse est représentée par l'absorbance à 633 nm. Le protocole expérimental de DoE peut être trouvé dans l'annexe IV.

**Tableau X.** Le modèle de Plackett-Burman (PBD)

No.	C phen	C NaOH	C nitro	C hypo	Temps	Température
1	62,5	18,75	0,5	75	11,25	27,75
2	62,5	31,25	0,3	125	11,25	27,75
3	37,5	31,25	0,5	75	18,75	27,75
4	62,5	18,75	0,5	125	11,25	46,25
5	62,5	31,25	0,3	125	18,75	27,75
6	62,5	31,25	0,5	75	18,75	46,25
7	37,5	31,25	0,5	125	11,25	46,25
8	37,5	18,75	0,5	125	18,75	27,75
9	37,5	18,75	0,3	125	18,75	46,25
10	62,5	18,75	0,3	75	18,75	46,25
11	37,5	31,25	0,3	75	11,25	46,25
12	37,5	18,75	0,3	75	11,25	27,75
13	50,0	25,00	0,4	100	15,00	37,00
14	50,0	25,00	0,4	100	15,00	37,00
15	50,0	25,00	0,4	100	15,00	37,00

Les réactifs utilisés sont indiqués dans le tableau XI.

#### - Équipement et logiciel

La pesée a été effectuée avec la balance analytique Mettler-Toledo (QR-193) et la balance Mettler Toledo (QR-227). L'absorbance a été mesurée avec le spectrophotomètre UV-Visible Ultrospec 4000 (QR-185, Pharmacia Biotech, Angleterre) et la température a été maintenue dans un incubateur de laboratoire Innova 4000 (QR-211, New Brunswick).

#### ➤ Expériences réalisées pour chaque point

La préparation des solutions est détaillée dans l'annexe IV et les détails de l'optimisation sont donnés dans l'annexe V.

Le tableau XI résume les différentes expériences réalisées au cours de l'optimisation de la méthode de Berthelot. La longueur d'onde de mesure de l'absorbance, utilisée dans les différentes expériences, a été de 633 nm.

**Tableau XI.** Expériences d'optimisation de la méthode de Berthelot

N°	Préparation de la solution	T°C	Temps (min)	
1	Un volume de 1,0 ml du réactif de phénol a été ajouté à 10,0 ml d'une solution d'ammoniaque 0,5 ppm. La solution a été agitée pendant 30 secondes. Ensuite, 1,0 ml d'une solution d'hypochlorite alcalin à été ajouté, puis agité à nouveau pendant 30 secondes supplémentaires.	28,0	11	
2		28,0	11	
3		28,0	19	
4		46,0	11	
5		28,0	19	
6		46,0	19	
7		46,0	11	
8		28,0	19	
9		46,0	19	
10		Les concentrations des réactifs dans les différentes expériences sont préparées selon le modèle de Plackett-Burman (PBD) (tableau X)	46,0	19
11			46,0	11
12			28,0	11
13,14, 15 (Point central)	37,0		15	

## I.6 Activité antibactérienne des nanoparticules

L'activité antibactérienne des nanoparticules a été testée avec la technique des puits. Des concentrations de 0,01; 0,05 ; 0,1; 0,5 ; 1 et 1,5 % (m/v) de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO ont été testées sur trois souches bactériennes pathogènes humaines qui sont connues pour leur résistance à un grand nombre d'antibiotiques : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* sp. et une souche phytopathogène de *Dickeya solani*.

### I.6.1 Préparation des solutions de nanoparticules

Des solutions de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO, dissoutes dans de l'eau physiologique, à différentes concentrations (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 et 1,5 %, m/v), ont été préparées à partir d'une solution mère à 1 mg/ml dissoute dans le même diluant. Les solutions ont été stérilisées à 121°C pendant 15 minutes à l'autoclave.

### I.6.2 Préparation des souches bactériennes cibles

Les bactéries utilisées comprennent des bactéries pathogènes pour l'Homme : à Gram positif (*S. aureus* ATCC 25923) et à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922 et *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* CIP 81-3). Toutes ces souches font partie de la collection des souches bactériennes du laboratoire de Microbiologie Appliquée (Université de Bejaia, Algérie). L'antibiogramme de ces souches a été réalisé suivant les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2015).

Parallèlement, une bactérie phytopathogène (*Dickeya solani*) a été incluse dans le test d'activité.

### I.6.3 Culture bactérienne

Les bactéries ont été cultivées dans du bouillon nutritif à 37°C/24 h (*S. aureus*, *E. coli* et *Sal. enterica*) et à 26°C/24 h (*D. solani*). Les cultures ont été diluées dans le même bouillon stérile pour obtenir des concentrations de  $10^8$  et  $10^7$  UFC/ml (*E. coli*, *S. aureus* et *Sal. enterica*) et de  $2.10^7$  UFC/ml (*D. solani*).

### I.6.4 Test de l'activité antibactérienne

Des boîtes de Petri ont été préparées en inoculant, en masse, de la gélose Mueller Hinton (MH, Sigma-Aldrich, Allemagne) avec 1 mL de cultures de 24 h des souches bactériennes standardisées à  $10^7$  UFC/ml. Des puits (diamètre 6 mm) ont été creusés dans la gélose et un volume de 100 µL de la solution de nanoparticules dissoutes a été versé dans chaque puits. Les boîtes ont été placées à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des nanoparticules puis incubées à 37°C/24 h. L'apparition de toute zone d'inhibition a été enregistrée après la période d'incubation. Le solvant de dissolution (l'eau physiologique) des nanoparticules a été inclus comme témoin négatif. Le test a été répété trois fois.

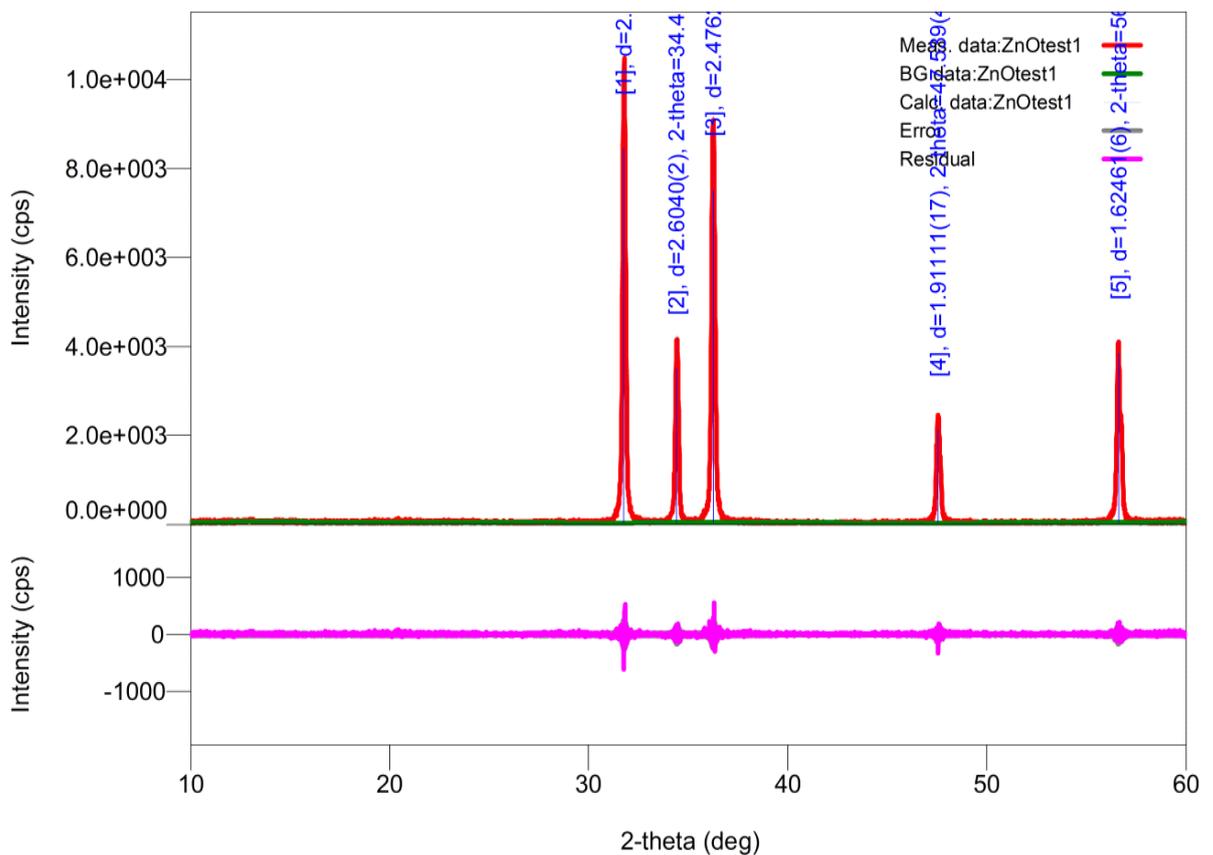
Afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), un *inoculum* de 10 µL ( $10^8$  UFC/ml) a été prélevé de chaque culture et inoculé dans une boîte de Petri dans laquelle de la gélose MH, additionnée des différentes concentrations de nanoparticules, a été préalablement coulée. Les boîtes ont été incubées à 37°C/24 h.

Pour les souches de *D. solani*, ces dernières ont été cultivées dans un bouillon nutritif à 26°C/24 h avant la réalisation du test de l'activité antibactérienne. Pour ce dernier, la suspension bactérienne a été ajustée avec du bouillon nutritif stérile à la concentration de  $4.10^6$  UFC/mL. Une microplaque de 96 puits a été préparée en remplissant les puits avec 100 µL de bouillon nutritif additionné des différentes concentrations de nanoparticules puis inoculée avec 100 µL de la suspension bactérienne afin d'obtenir une concentration de  $2.10^5$  UFC/ml (Yahiaoui et al., 2003). Le tout a été incubé à 26°C/24 h. Après agitation, la croissance de la souche a été estimée par la lecture de la densité optique (DO) dans les puits de la microplaque à 600 nm (UVmini-1240 Shimadzu, Japon). La CMI a été définie comme la plus faible concentration des nanoparticules ne montrant pas de croissance visible après une incubation de 24 h et à laquelle aucune variation de la DO n'a été notée.

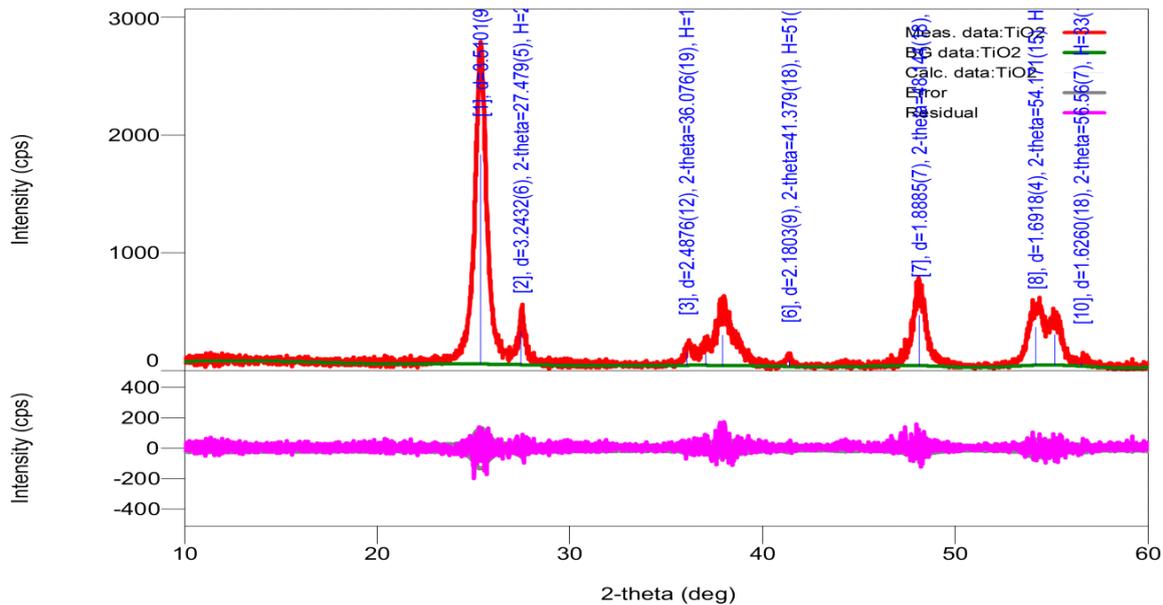
## II.1 Synthèse et caractérisation des nanoparticules

### II.1.1 Résultats de la DRX

La taille des nanoparticules (NPs) a été mesurée par la technique de diffraction aux rayons X (XRD), les conditions d'utilisation sont présentées dans le tableau III (annexe IV). Les figures 13 et 14 montrent les diagrammes de diffraction des NPs de  $\text{TiO}_2$  et de  $\text{ZnO}$  respectivement. Avec la méthode Ritveld, nous avons estimé à partir de la principale caractéristique que les NPs de  $\text{TiO}_2$  avaient un diamètre de  $13,5 \pm 1,0$  nm, ce qui est en accord avec les caractéristiques (15 nm) du fournisseur (Evonik Industries, 2015). Tandis que les NPs de  $\text{ZnO}$  avaient un diamètre moyen de  $60 \pm 10$  nm.



**Figure 13.** Résultats de l'affinement des Nps de  $\text{ZnO}$  par la méthode de Ritveld



**Figure 14.** Résultats de l'affinement des Nps de  $\text{TiO}_2$  par la méthode de Ritveld

### II.1.2 Résultats de la BET

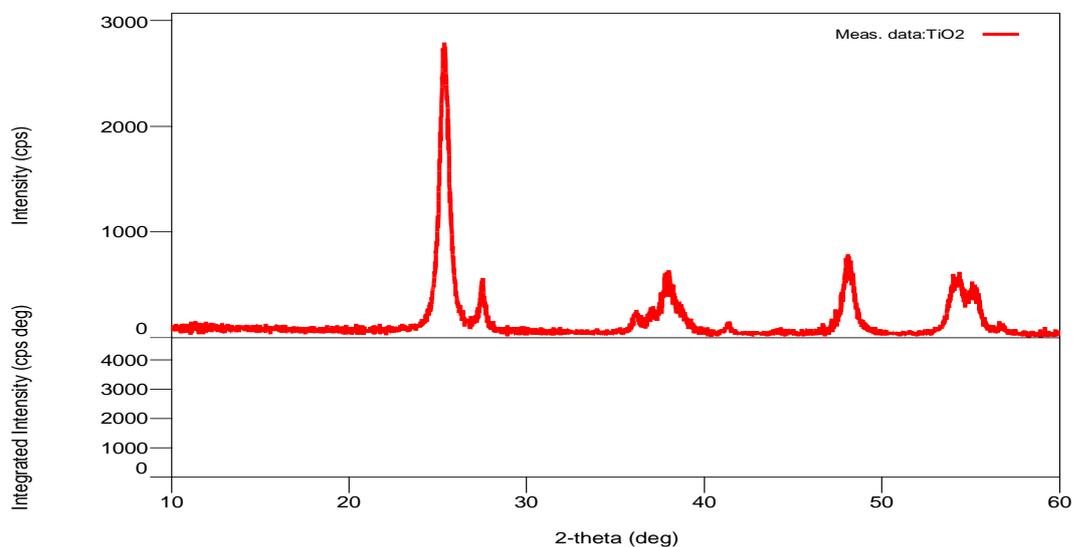
Les résultats de la caractérisation des NPs sont donnés dans le tableau XII. Les conditions de la caractérisation de la surface spécifique par la méthode BET des NPs de  $\text{TiO}_2$  et de ZnO sont donnés sur les figures 1 et 2 (Annexe VI).

**Tableau XII.** Résultats de la caractérisation des nanoparticules par la DRX

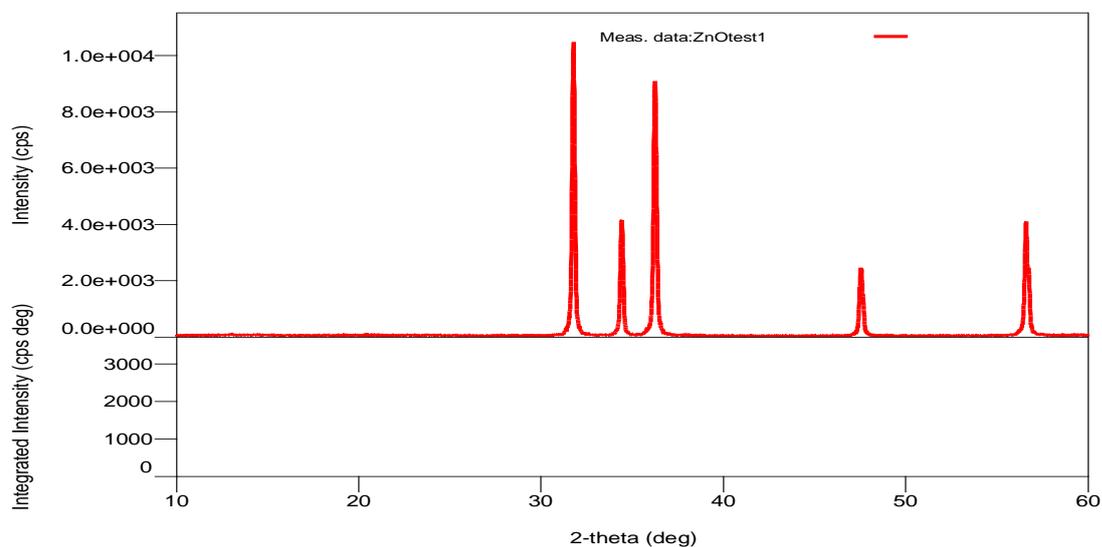
Liste de pics							
No.	2-theta(deg)	d (ang.)	Height (cps)	FWHM (deg)	Int. I (cps deg)	Int. W (deg)	Facteur d'asymétrie
1	25,354(06)	3,5101(09)	1777(109)	0,629(06)	1533(07)	0,86(06)	0,99(04)
2	27,479(05)	3,2432(06)	285(044)	0,299(19)	130(03)	0,46(08)	0,80(03)
3	36,076(19)	2,4876(12)	105(027)	0,490(05)	60(05)	0,57(19)	0,50(06)
4	37,040(07)	2,4250(05)	92(025)	1,000(03)	107(35)	1,20(07)	0,50(06)
5	37,930(03)	2,3702(17)	254(041)	1,130(03)	328(33)	1,30(03)	0,50(06)
6	41,379(18)	2,1803(09)	51(018)	0,340(05)	22(02)	0,42(19)	3,00(03)
7	48,144(18)	1,8885(07)	428(053)	0,742(15)	402(05)	0,94(13)	1,38(14)
8	54,171(15)	1,6918(04)	325(047)	0,840(05)	307(30)	0,90(02)	1,30(02)
9	55,152(17)	1,6640(05)	260(042)	0,850(10)	250(29)	1,00(03)	1,30(02)
10	56,560(07)	1,6260(18)	33(015)	1,180(18)	44(07)	1,30(08)	1,30(02)

2-threa (deg): demi-angle de déviation (moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur) ; d (ang.) : distance interréticulaire, c'est-à-dire distance entre deux plans cristallographiques ; FWHM (deg) : Full width at half maximum: Pleine largeur à moitié maximum, c'est la largeur d'une courbe spectrale mesurée entre ces points sur l'axe des y qui sont la moitié de l'amplitude maximale; Int.I (cps deg) = Intensité I, cps = coup par seconde, deg=Degrés.

Les figures 15 et 16 montrent les diagrammes de l'intensité de l'émission des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  et  $\text{ZnO}$  respectivement en fonction de la moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur.



**Figure 15.** Diagramme de l'intensité de l'émission des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  en fonction de la moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur



**Figure 16.** Diagramme de l'intensité de l'émission des nanoparticules de  $\text{ZnO}$  en fonction de la moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur

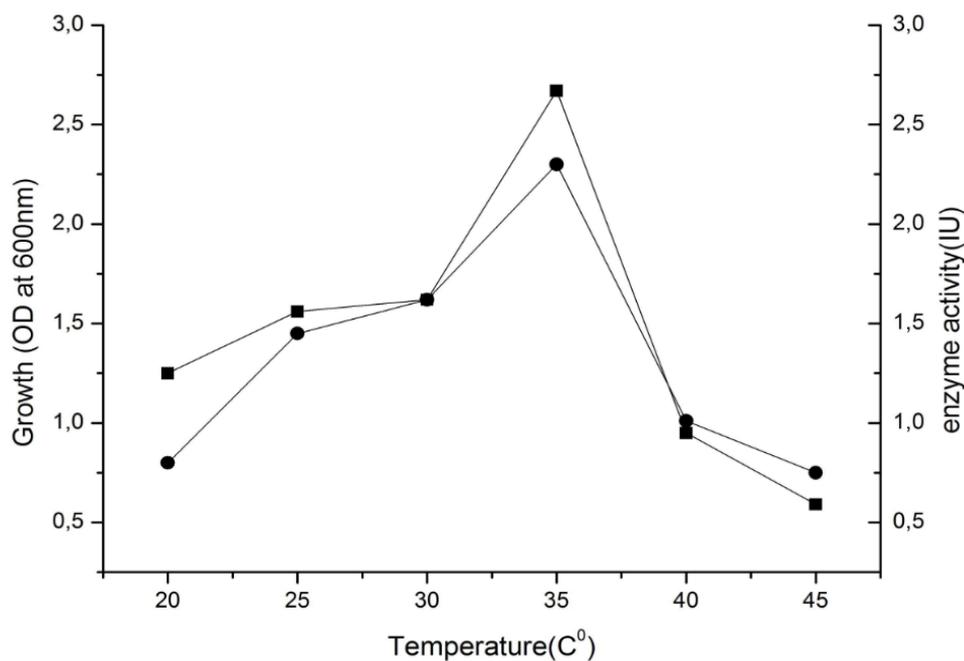
## II.2 Résultats de la purification de la L-asparaginase

### II.2.1 Optimisation de la croissance et de la production de la L-asparaginase

Les conditions de culture (pH et température) sont connues pour affecter l'expression génique et la production de métabolites. De plus, la sélection de conditions de fermentation appropriées est essentielle pour les micro-organismes, à la fois pour la croissance que pour la production d'enzymes (Davis et *al.*, 1993).

#### ➤ Détermination de la température optimale

La figure 17 montre que la production de L-asparaginase, mise en évidence par son activité enzymatique, a également été dépendante de la température et a suivi la même tendance que la courbe de croissance, avec la même température optimale à 35°C.



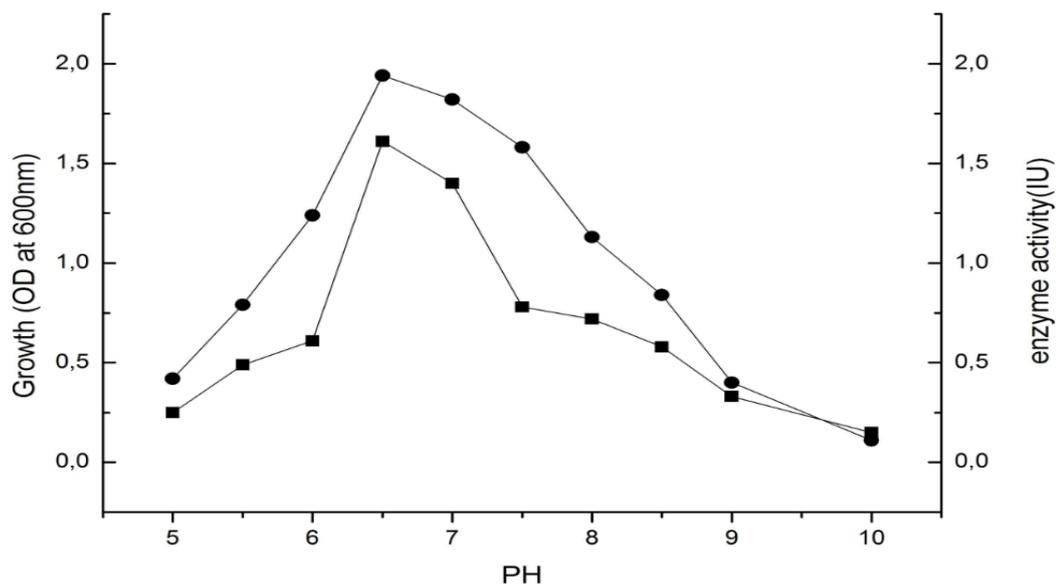
**Figure 17.** Température optimale de croissance bactérienne (●) et de production de L-asparaginase (■).

La croissance de *Dickeya solani* a augmenté avec la température pour atteindre un maximum à 35°C, puis a diminué rapidement jusqu'à 40°C. Nos données corroborent celles de Janse et Ruissen (1988) qui ont rapporté une température de croissance optimale de *Dickeya*

entre 35 et 37°C (cité par El-Bessoumy et *al.*, 2004). Une forte augmentation de la production de la L-asparaginase a été observée entre 30 et 35°C. Cela pourrait être dû au faible transport du substrat à travers la membrane cellulaire à basse température. Une diminution rapide de la production de la L-asparaginase a été observée au-delà de 35°C, ce qui peut s'expliquer par une certaine dénaturation thermique de l'enzyme (Aiba et *al.*, 1973).

#### ➤ Détermination du pH optimal

La figure 18 montre que *Dickeya solani* pousse dans une large gamme de pH (5,5 à 9,0), avec une croissance maximale à pH 6,5.

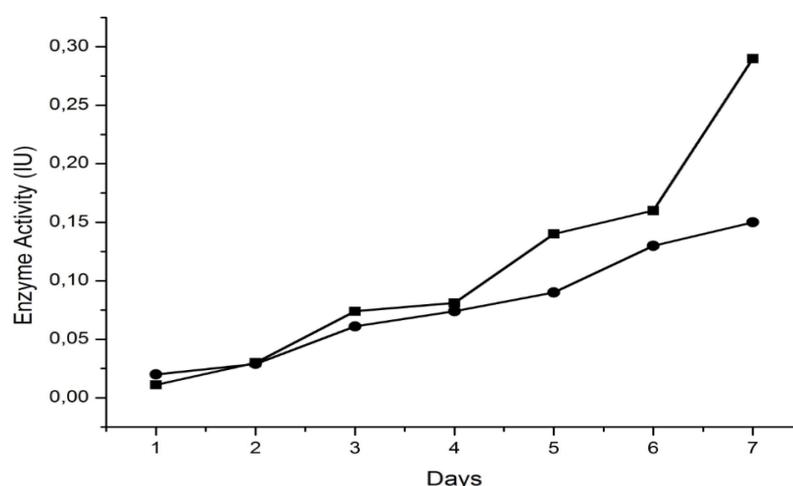


**Figure 18.** pH optimal de la croissance bactérienne (●) et de production de la L-asparaginase (■).

Les profils de croissance bactérienne et d'activité enzymatique se superposent assez bien et les deux ont été significativement affectés par le pH. En effet, on sait que le pH du milieu de culture affecte de nombreuses réactions enzymatiques, par exemple en modifiant le transport de certains nutriments et enzymes à travers la membrane cellulaire (Liang et *al.*, 2009). Bien que *Dickeya solani* pousse encore dans une large gamme de pH (5,5 à 9,0), elle montre une croissance maximale à pH 6,5. Cette observation n'est pas surprenante car les milieux de culture généralement utilisés pour la culture de *Dickeya* et pour les tests d'identification biochimique sont toujours ajustés à un pH compris entre 5,0 et 6,5 (Manna et *al.*, 1995).

➤ **Effet de l'agitation sur l'activité de la L-asparaginase**

La figure 19 montre une production maximale de la L-asparaginase (0,29 UI) lorsque la culture est soumise à une agitation constante (120 tr/min) après une période de sept jours. Pendant la même période, la production de la L-asparaginase a été réduite de moitié (0,15 UI) en l'absence d'agitation. Cela peut s'expliquer par une meilleure aération du milieu de culture et une amélioration de la disponibilité des nutriments pour les bactéries (Manna *et al.*, 1995 ; Mada et Pharm, 2009).



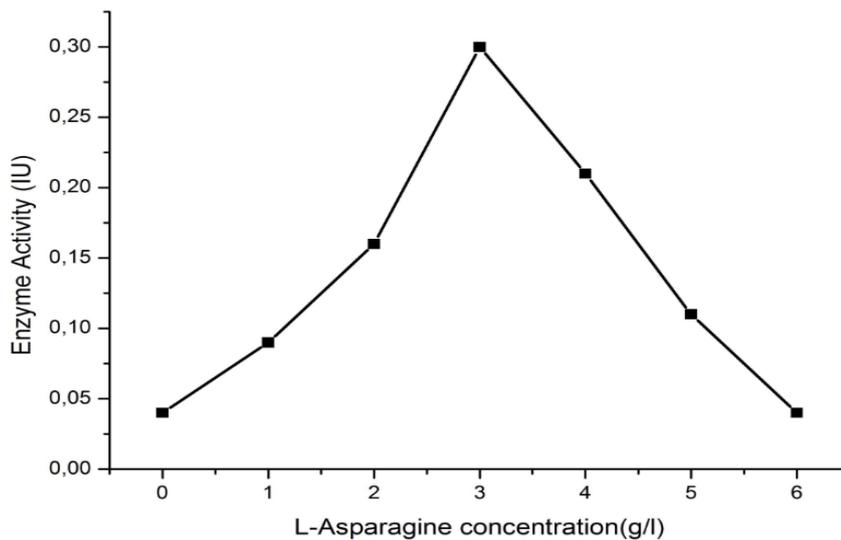
**Figure 19.** Activité de la L-asparaginase en culture agitée (■) et en culture sans agitation(●).

➤ **Effet de la L-asparagine sur la production de la L-asparaginase**

La figure 20 montre que la production de la L-asparaginase augmente avec la concentration de la L-asparagine, atteignant un maximum à 3,0 g/l (0,30 UI), puis diminue rapidement.

Le L'acide aminé asparagine est bien connu comme étant un facteur important pour induire la production de L-asparaginase (Mada et Pharm, 2009), l'activité de L-asparaginase a augmenté avec la concentration d'asparagine et a atteint un maximum (0,30 UI) à une concentration de 3 g / L d'asparagine, puis a diminué rapidement. Cette analyse cinétique de l'enzyme révèle que la L-asparaginase est induite par le L-asparagine. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Mukherjee *et al.*, 2000; Mansour, 2001; Mada et Pharm, 2009), qui confirment l'importance de la L-asparagine dans l'amélioration de la production de L-asparaginase. La diminution de la production de L-asparaginase à des

concentrations supérieures à 3 g / L de L-asparagine pour *Dickeya solani* peut s'expliquer par l'inhibition de l'acide aspartique généré lors de la catalyse de la L-asparagine (Curran et al., 1985). En accord avec nos résultats, il a été rapporté que la production de L-asparaginase par *Thermus aquaticus* est inhibée par une concentration en L-asparagine supérieure à 2,64 g / L. En outre, pour *Bacillus cereus*, la concentration optimale en L-asparagine pour la production de L-asparaginase a été de 3,303 g / L (Madda et Pharm, 2009).



**Figure 20.** Effet de la concentration de la L-asparagine sur la production de la L-asparaginase.

### II.2.2 Purification de la L-asparaginase

La purification a été réalisée à 4°C sur l'extrait brut, selon la méthode modifiée de Distasio et al. (1976). La L-asparaginase a été séparée en utilisant la filtration, la centrifugation, et purifiée par des techniques de chromatographie. L'enzyme purifiée a été utilisée pour des études de caractérisation.

Le tableau XIII résume les étapes de purification de la L-asparaginase de *Dickeya solani*. La concentration en protéines a été calculée en utilisant la méthode de Bradford (Annexe IX) avec la BSA comme protéine standard (Bradford, 1976).

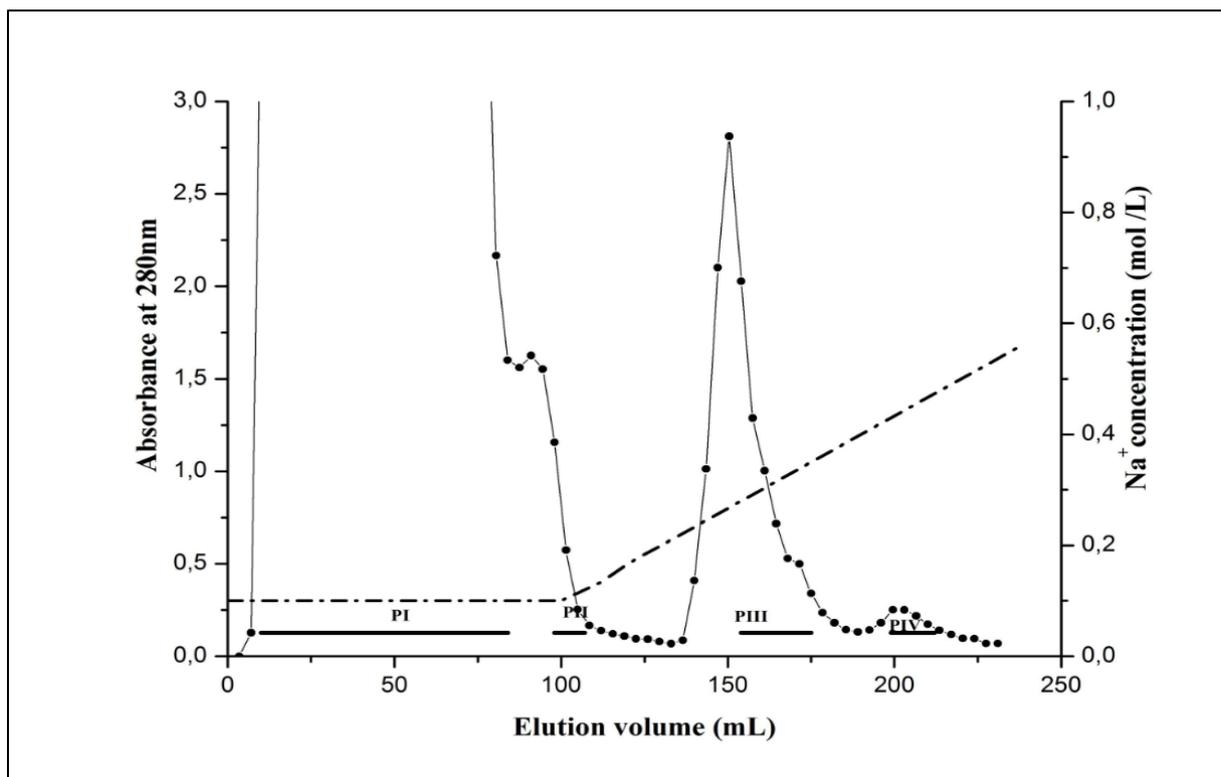
**Tableau XIII.** Résumé des étapes de purification de la L-asparaginase à partir de *Dickeya solani*.

Étapes	Volume (ml)	Protéine (mg)	Activité (UI/ml)	Activité Totale (UI)	Activité Spécifique (UI/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	<b>100</b>	<b>10,9</b>	<b>2,5</b>	<b>250</b>	<b>0,22</b>	<b>100</b>	---
Hi-TrapQ-Sepharose FF	<b>40</b>	<b>0,82</b>	<b>2,2</b>	<b>88</b>	<b>2,68</b>	<b>35,2</b>	<b>12,1</b>
FPLC-Superdex75 pg	<b>20</b>	<b>0,10</b>	<b>1,8</b>	<b>36</b>	<b>18,0</b>	<b>14,4</b>	<b>81,8</b>

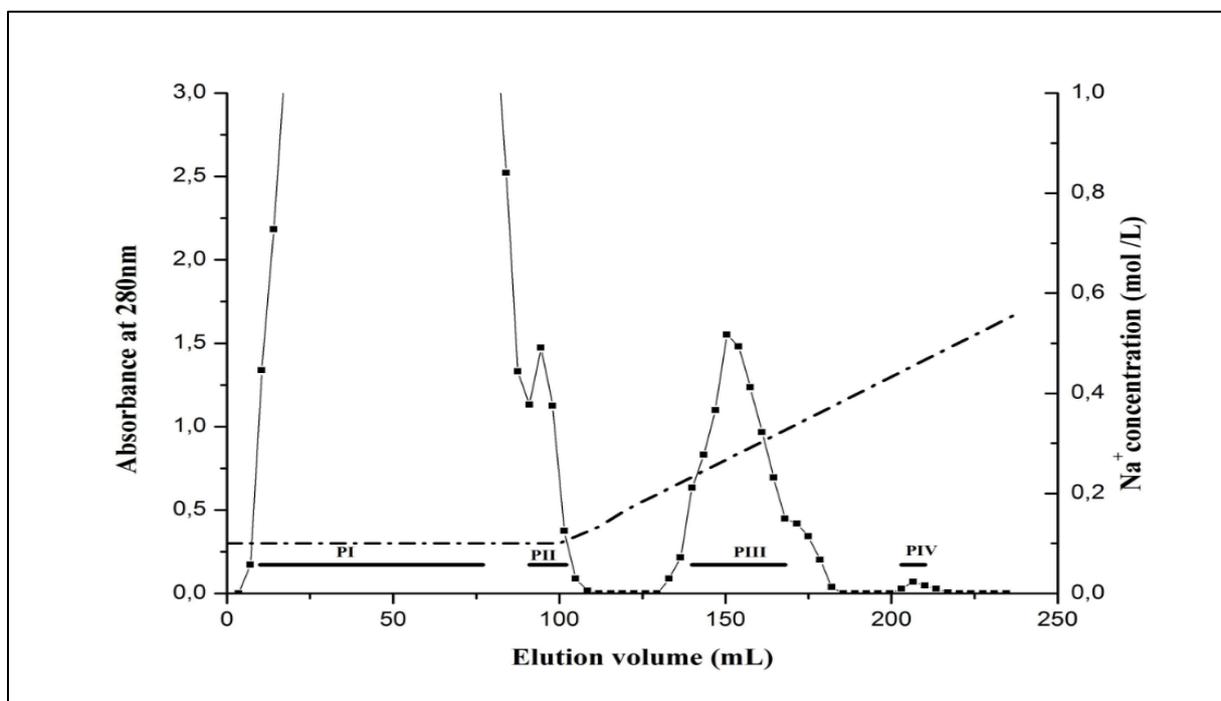
Le tableau XIII montre la diminution de la quantité totale de protéines et l'augmentation de l'activité spécifique après chaque étape de purification. La courbe d'étalonnage avec la Sérum Albumine Bovine (BSA) pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford est présentée dans la figure 6 (Annexe IX).

Les résultats nous mène à déduire que les étapes suivies ont permis d'éliminer les protéines contaminantes et d'augmenter la pureté de la protéine d'intérêt. Les travaux de Sahu *et al.* (2007), réalisés sur la L-asparaginase purifiée à partir de la souche *Actinomyces* La-29, ont permis d'obtenir un rendement de 1,9% (Swain *et al.*, 1993), tandis que nous avons obtenu un rendement largement supérieur de l'ordre de 14,4 %.

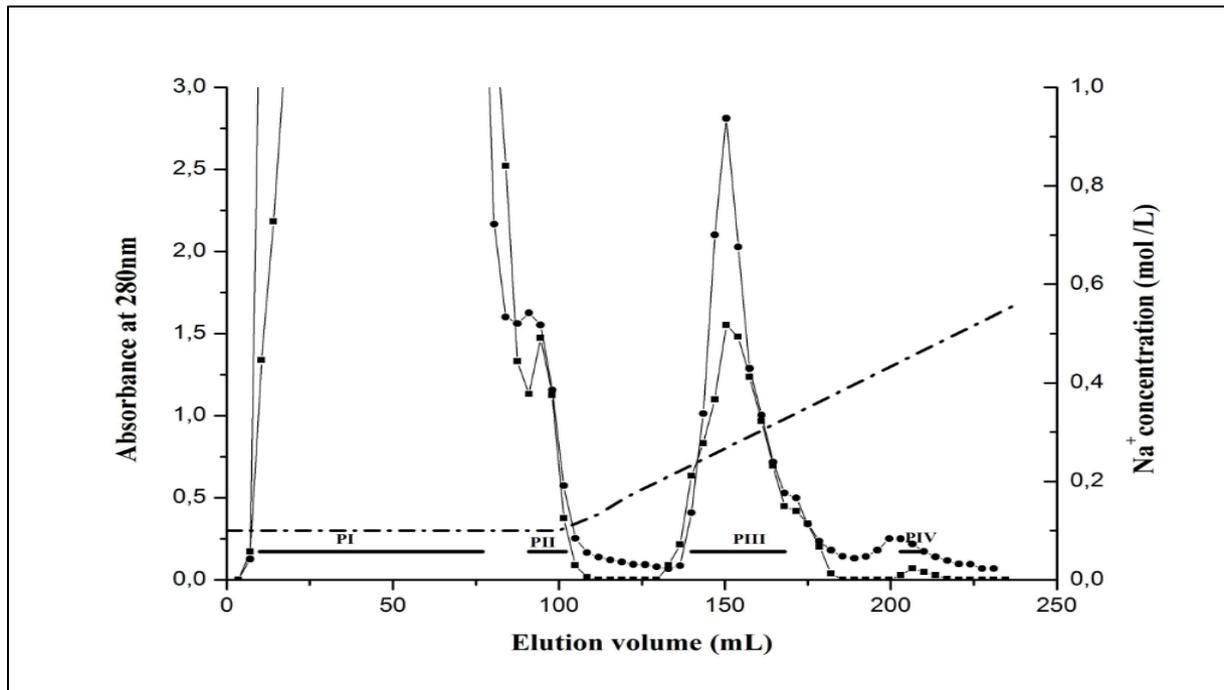
Les différents chromatogrammes obtenus sont illustrés sur les figures 21-23.



**Figure 21.** Chromatogramme obtenu par « Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en présence de la L-asparagine.

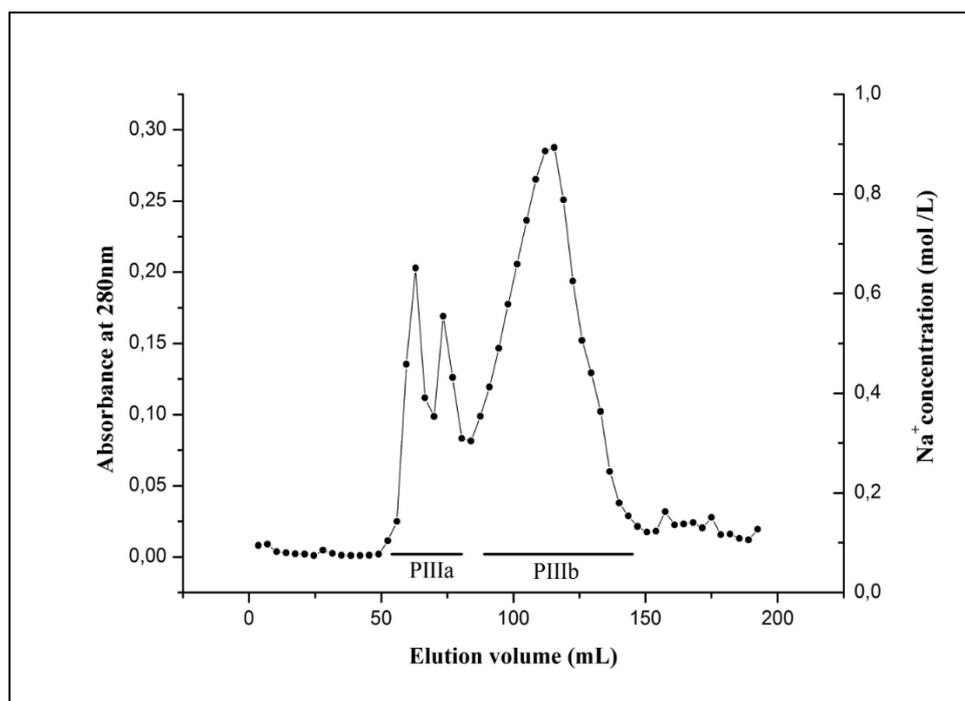


**Figure 22.** Chromatogramme obtenu par « Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en absence de la L-asparagine.

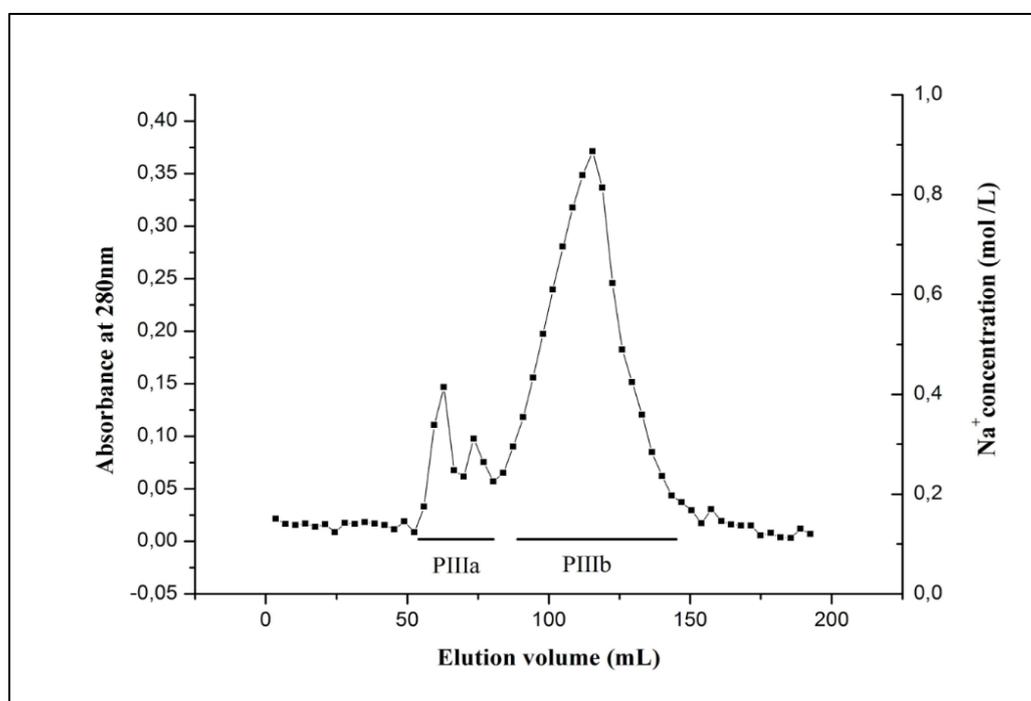


**Figure 23.** Superposition des chromatogrammes obtenus par « Q-Sepharose Fast Flow Hi-Trap » de l'extract bactérien issu de cultures réalisées en présence (●) et en absence (■) de la L-asparagine.

Comme le montrent les figures 21-23, le fractionnement de la fraction protéique soluble entière par une chromatographie « Q-Sepharose Fast Flow Hi-Trap » a fait apparaître quatre pics principaux désignés comme pool I, pool II (tous deux constituant la fraction non retenue), pool III et pool IV. Suivant les résultats de la SDS-PAGE, seul le pool III contenait des bandes de protéines de poids moléculaire apparent de 33,0 kDa pouvant correspondre à la L-asparaginase. Cette fraction a été soumise à une chromatographie d'exclusion stérique pour une purification supplémentaire de l'enzyme. Comme le montrent les figures 24-26, deux pics mineurs moins résolus et un pic majeur ont été obtenus. Lorsqu'il a été soumis à une analyse par SDS-PAGE, le pic principal (ligne 2 pool IIIa sur la figure 25) a révélé la présence d'une bande de protéines presque pure migrant avec un poids moléculaire apparent de 33 kDa (figure 27).

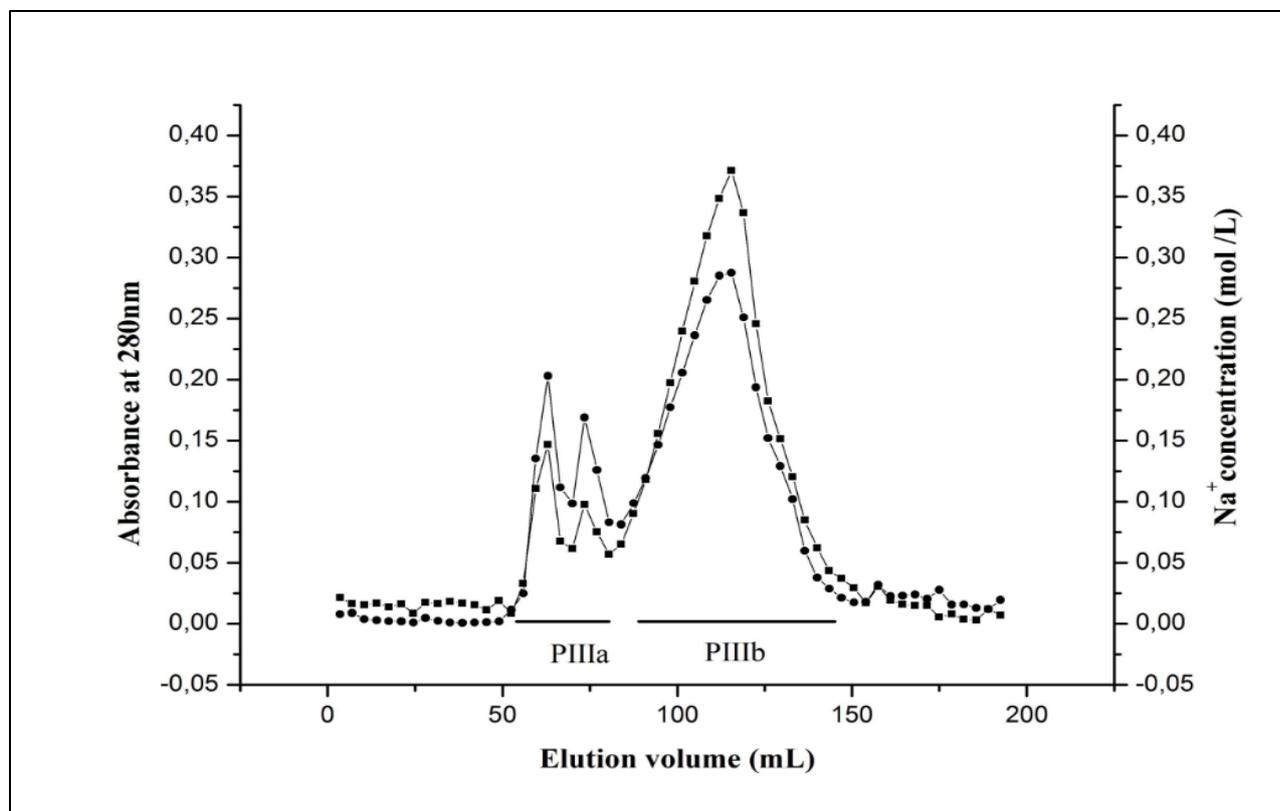


**Figure 24.** Chromatogramme obtenu par « FPLC-Superdex 75 PG » du pool III récupéré après chromatographie « Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en absence de la L-asparagine.



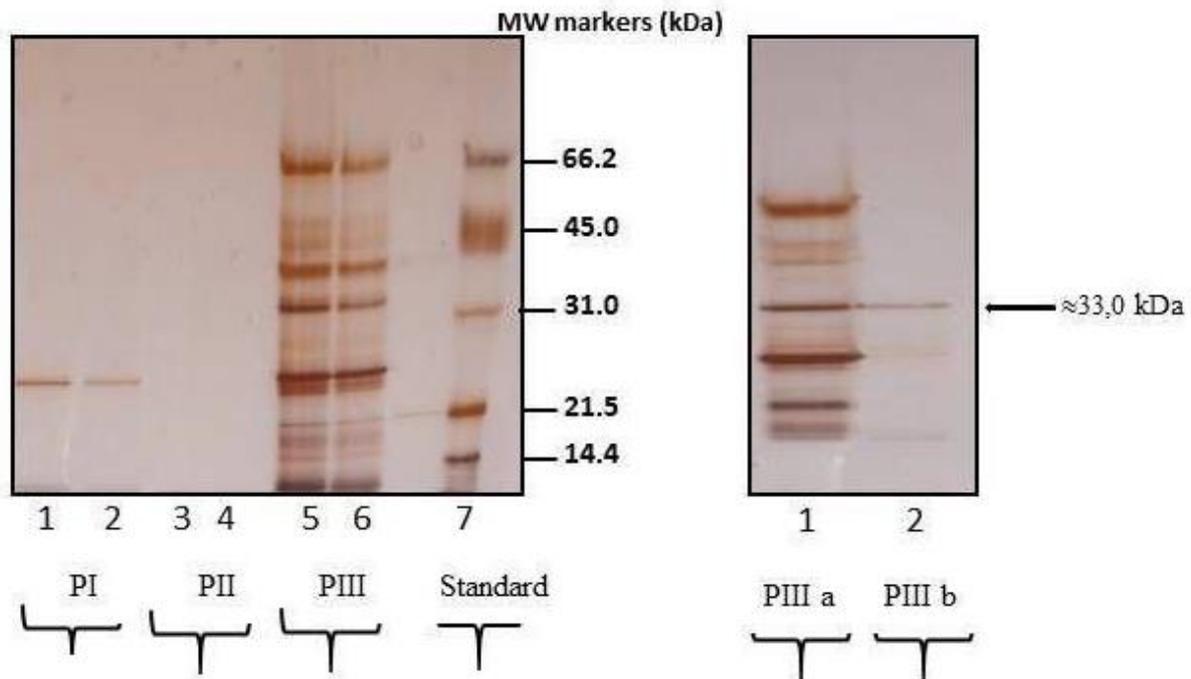
**Figure 25.** Chromatogramme obtenu par « FPLC-Superdex 75 PG » du pool III récupéré après chromatographie « Q-Sepharose Fast Flow » de l'extrait bactérien issu d'une culture réalisée en présence de la L-asparagine.

Lorsqu'ils ont été soumis à une chromatographie « FPLC-Superdex 75 pg », les pools du pic III récupérés après chromatographie « Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow » ont été séparés en deux pics, PIIIa: de la fraction 6 à la fraction 23 et PIIIb: de la fraction 24 à la fraction 36.



**Figure 26.** Superposition des chromatogrammes obtenus par « FPLC-Superdex 75 pg » obtenus en présence (■) et en absence (●) de la L-asparagine dans le milieu de culture.

Les figures 19, 21, 23 et 24 montrent que l'absorbance à 280 nm a été beaucoup plus élevée lorsque le milieu de culture bactérien contenait la L-asparagine, qui est le substrat de l'enzyme, confirmant ainsi que la présence de la L-asparagine augmente la production de la L-asparaginase.



**Figure 27.** Profil SDS-PAGE des pics obtenus après chromatographie « Q-Sepharose Fast Flow » des pools issus de la chromatographie « Hi-Trap et FPLC-Superdex 75 PG ».

Le gel d'électrophorèse sur le côté gauche correspond aux pics obtenus après chromatographie « Hi-Trap Q-Sépharose Fast Flow ». Lignes 1 et 2: pool I, lignes 3 et 4: pool II, lignes 5 et 6: pool III et ligne 7: standards de poids moléculaire. Le gel d'électrophorèse sur le côté droit correspond aux pics obtenus après chromatographie « FPLC-Superdex 75 pg » du pool III. Ligne 1: bande IIIa et ligne 2: bande IIIb.

Les détails de l'analyse électrophorétique des échantillons issus des chromatographies ACTA Prime Fast flow et Superdex 75 pg sont présentés dans les figures 1 et 2 (Annexe VII) et la distribution des échantillons sur le gel est détaillée dans les tableaux I et II (Annexe VII).

La purification de la L-asparaginase de *Dickeya solani* a été réalisée en utilisant deux chromatographies, une anionique sur piège « Hi Trap Q-Sépharose Fast Flow » et une autre d'exclusion « Surperdex 75PG ». Suite aux étapes de purification, l'activité spécifique a passé de 41 UI/mg pour l'extrait brut à 88 UI/mg pour l'extrait purifié.

La pureté de l'extrait purifié a été examinée en utilisant une SDS-PAGE, qui a révélé une seule bande protéique de 33 kDa. Le profil d'électrophorèse par SDS-PAGE de l'enzyme purifiée a été le même que celui obtenu avec la L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* (Kamble

et *al.*, 2006), *Erwinia chrysanthemi* (Gilbert et al. 1986) et de foie de volaille (El-Sayed et *al.*, 2011).

La masse moléculaire de la L-asparaginase d'*E. coli* 055: B5 a été estimée à 32,5 kDa (Pajdak et Szafran, 1977). D'autres L-asparaginases ont des poids moléculaires différents, par exemple les L-asparaginases purifiées de *Streptomyces gulbargensis* 11, *Streptomyces albidoflavus* 9, *Streptomyces* PDK223 et *Streptomyces noursei*15 présentaient des poids moléculaires de 85kDa, 112kDa, 140 kDa et 102 kDa respectivement.

Des rapports sur la production et la purification de la L-asparaginase à partir de *Pseudomonas aeruginosa* 50071 par SDS-PAGE ont révélé une chaîne peptidique d'un poids moléculaire de 160 kDa (El-Naggar et *al.*, 2016).

Des données bibliographiques indiquent que la L-asparaginase est un homotétramère, ce qui explique l'apparition d'une bande unique dans le profil électrophorétique obtenu sur gel de SDS-PAGE (Lubokowski et *al.*, 1996, Kislitsyn et *al.*, 2006). Certains auteurs ayant travaillé sur la L-asparaginase d'*Erwinia* ont rapporté que le poids moléculaire de la sous-unité de la L-asparaginase est compris entre 32,5 et 38 kDa (Cammak et *al.*, 1972) et d'autres rapportent une valeur de 34,5 kDa (Wink et *al.*, 2010). La L-asparaginase fonctionnelle d'*E. coli* et d'*Erwinia* est un homotétramère (Miller et *al.*, 1993).

### **II.2.3 Évaluation de la spécificité de la L-asparaginase vis-à-vis de la L-asparagine par rapport à la L-glutamine**

L'activité enzymatique relative de la L-asparaginase vis-à-vis de la L-asparagine par rapport à la L-glutamine est résumée dans le tableau XIV.

Comparativement au L-asparagine, l'activité enzymatique relative de la L-asparaginase de *Dickeya solani* vis-à-vis de la L-glutamine a été de  $5 \cdot 10^3$  %. La L-asparaginase purifiée a ainsi montré une haute spécificité envers son substrat naturel la L-asparagine. Ces résultats sont très intéressants et sont  $10^3$  fois inférieurs à ceux rapportés par El Naggar et *al.* (2018) pour la L-asparaginase de *Streptomyces brolllosae* NEAE-11.

**Tableau XIV.** Spécificité de la L-asparaginase vis-à-vis de la L-asparagine versus la L-glutamine

Substrat	Concentration (mM)	Activité relative (%)
<b>L-asparagine</b>	10	100
<b>L-glutamine</b>	10	0,005

### II.3 Résultats de l'activité L-asparaginasique des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO

#### II.3.1 Effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO sur l'activité de la L-asparaginase

Les résultats de l'effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO sur l'activité de la L-asparaginase sont présentés dans les tableaux XV et XVI.

**Tableau XV.** Activité de la L-asparaginase en présence de nanoparticules de ZnO

Etapes	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité (U/ml)	Activité Totale (UI)	Activité Spécifique (UI/mg)
Extrait brut	<b>100</b>	<b>10,9</b>	<b>3,83</b>	<b>383</b>	<b>81,93</b>
Hi-Trap Q-Sepharose	<b>40</b>	<b>0,82</b>	<b>2,48</b>	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>
FPLC-Superdex	<b>20</b>	<b>0,10</b>	<b>3,20</b>	<b>64,00</b>	<b>32</b>

**Tableau XVI.** Activité de la L-asparaginase en présence de nanoparticules de TiO<sub>2</sub>

Etapes	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité (U/ml)	Activité Totale (UI)	Activité Spécifique (UI/mg)
Extrait brut	<b>100</b>	<b>10,9</b>	<b>10,28</b>	<b>1028</b>	<b>221</b>
Hi-Trap Q-Sepharose	<b>40</b>	<b>0,82</b>	<b>8,85</b>	<b>354</b>	<b>354</b>
FPLC-Superdex	<b>20</b>	<b>0,10</b>	<b>10,86</b>	<b>217,2</b>	<b>108,6</b>

### II.3.2 Comparaison de l'activité spécifique de la L-asparaginase en présence de nanoparticules de ZnO et de TiO<sub>2</sub>

En raison de la petite taille extrême des nanoparticules (13.5 nm pour TiO<sub>2</sub> et 60 nm pour ZnO), la plupart de leurs atomes sont sur la surface. Il est possible de déterminer par un simple calcul quel matériau est le plus efficace pour la catalyse, ceci en séparant l'effet de taille de l'effet catalytique du matériau lui-même. Pour ce faire, nous avons calculé l'activité intrinsèque en divisant l'activité mesurée (spécifique) par la surface (carré du rayon):

$$\text{Activité intrinsèque} = \text{Activité spécifique} / r^2$$

Dans cette équation, nous avons utilisé l'activité spécifique de l'échantillon obtenu après la chromatographie sur FPLC-Superdex 75 pg. Les résultats sont donnés dans le tableau XVII.

**Tableau XVII.** Effet de la surface des nanoparticules sur l'activité spécifique de la L-asparaginase

UA : Unité arbitraire

Nanoparticules	TiO <sub>2</sub>	ZnO
Taille des nanoparticules (nm)	<b>14,0</b>	<b>60,0</b>
Activité (UI/ml)	<b>10,86</b>	<b>3,20</b>
Activité totale (UI)	<b>217,2</b>	<b>64,0</b>
Activité spécifique (UI/mg)	<b>108,6</b>	<b>32,0</b>
Activité intrinsèque (UA)	<b>0,550</b>	<b>0,008</b>

On sait que les nanoparticules peuvent avoir un effet activateur sur certaines enzymes. Il a été montré par exemple que les nanoparticules d'argent et d'or ont des effets activateurs sur les neurotransmetteurs dans le cas de la monoamino- oxydase et de la choline- estérase (Abdul Rudha Abbas, 2011).

D'après nos résultats, on peut conclure que les deux nanoparticules (TiO<sub>2</sub> et ZnO) augmentent l'activité de la L-asparaginase. Cependant, les nanoparticules peuvent diminuer l'activité enzymatique, comme cela a été rapporté pour la peroxydase de raifort utilisant le 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine (TMB) en tant que substrat. En effet, on a rapporté que les nanoparticules d'or et d'argent ont un effet significatif sur l'activité de cette enzyme; si l'or supprime la réaction, l'argent par contre l'amplifie (Morris et Behzad, 2014). Compte tenu de

ces résultats, il n'est pas déraisonnable de suggérer que d'autres enzymes peuvent également être affectées par les nanoparticules, et que différents types de nanoparticules, de formes et de tailles différentes, peuvent affecter les réactions enzymatiques de différentes manières. Dans ce contexte, il a été démontré que les propriétés des nanoparticules, telles que la taille, la forme, la chimie de surface et la charge, peuvent modifier la structure et la fonction des enzymes (Abdul Rudha Abbas, 2011). En outre, il a été démontré que les nanoparticules sont capables d'induire des modifications protéiques (Morris et Behzad, 2014).

Nous avons clairement démontré que les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  induisaient une augmentation de l'activité de la L-asparaginase, qui pourrait être exploitée pour améliorer l'efficacité thérapeutique de cette enzyme. L'amélioration de l'activité de la L-asparaginase est une condition indispensable pour éviter les effets secondaires qui leur sont liés (Agrawal et Kango, 2019). Ainsi, par exemple, la dose élevée et l'administration répétée de ce médicament pourraient ainsi être évitées.

Il est intéressant de noter que les nanoparticules peuvent aider à cibler les cellules cancéreuses, faisant de la combinaison d'enzymes et de nanoparticules des outils thérapeutiques prometteurs dans le domaine clinique.

Les résultats présentés ici montrent l'importance des deux propriétés physicochimiques (Température et pH et la concentration optimale de nanoparticules pour essayer d'améliorer l'activité spécifique de la L-asparaginase. Nos résultats ont également révélé que la L-asparaginase extraite des souches bactériennes de *Dickeya solani* présentait une spécificité élevée pour la L-asparagine, mettant en évidence son éventuelle utilisation potentielle comme agent thérapeutique, essentiellement en raison de l'absence d'activité L-glutaminase. Il serait donc intéressant d'évaluer ses potentialités en tant qu'agent anticancéreux et d'essayer de trouver à la fois la taille optimale des nanoparticules et la concentration efficace pour obtenir la meilleure activité spécifique.

## II. 4 Résultats de l'optimisation de l'activité de la L-asparaginase par la méthode de Berthelot

### II. 4.1 Résultats de l'activité de la L-asparaginase

La courbe d'étalonnage est présentée dans la figure 7 (annexe X) et les données de l'activité enzymatique sont détaillées dans le tableau XVIII.

**Tableau XVIII.** Données de l'activité L-asparaginase

Echantillons	Absorbance à 633 nm		Absorbance à 633 nm		Activité (UI/ml)		Masse Protéique (mg)
Echantillon 1	0,691		0,619		0,809		-
Echantillon 2	0,311		0,292		0,258		-
Echantillon 3	0,410		0,391		0,412		-
Echantillon 4	0,208		0,210		0,113		-
L-ASNase	0,153	0,174	0,158	0,163	0,029	0,049	$4 \cdot 10^{-4}$

Echantillon 1: Extrait brut de la L-Asparaginase de *Dickeya solani*

Echantillon 2: Extrait brut de la L-asparaginase de *Dickeya solani* + L-asparaginase d'*E. coli*

Echantillon 3: Extrait brut de la L-asparaginase de *Pectobacterium carotovorum* ssp. 88 22

Echantillon 4: Extrait brut de la L-asparaginase de *Pectobacterium carotovorum* ssp.88 22+ la L-asparaginase d'*E. coli*.

- : Non applicable

### II. 4.2 Analyse de régression

Trois outils de diagnostic ont été utilisés : (1) résumé de l'ajustement, (2) analyse de la variance (ANOVA) et (3) graphique des probabilités normales des résidus.

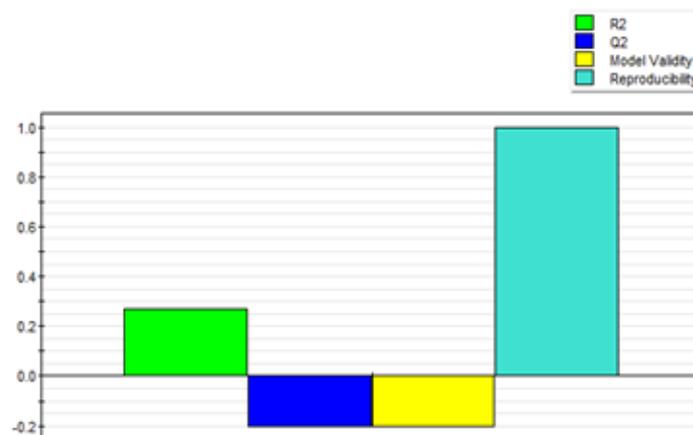
Les conditions d'utilisation de l'optimisation DoE sont présentées dans le tableau VI (Annexe XI). Les expériences utilisées pour ce modèle sont résumées dans l'annexe XI, et les paramètres choisis pour l'analyse DoE sont regroupés dans le Tableau VII (Annexe XI).

#### ➤ Résumé de l'ajustement

Le résumé du tracé d'ajustement pour le rapport pic à vallée est illustré dans la figure 28. De gauche à droite, quatre indicateurs de performance du modèle ont été observés : R<sup>2</sup>, Q<sup>2</sup>, validité et reproductibilité du modèle. R<sup>2</sup> représente la qualité de l'ajustement, qui représente le

degré d'intégration du modèle de régression dans les données brutes. Les valeurs  $R^2$  varient de 0 à 1, de pas de modèle à un modèle parfait respectivement.  $Q^2$  représente la qualité de la prédiction, qui représente le pouvoir prédictif du modèle de régression. Puisque le but ultime de la modélisation est de prédire de nouvelles données ; les valeurs  $Q^2$  varient de moins l'infini à 1. La validité du modèle renseigne si le bon type de modèle a été utilisé et est basé sur le test d'absence d'ajustement. La barre la plus à droite représente la reproductibilité. La valeur la plus élevée représente la plus petite erreur de réplique, par rapport à la variabilité observée dans l'ensemble de la conception. Le modèle est jugé bon si tous les indicateurs de performance sont conformes aux valeurs de référence (Eriksson et *al.*, 2008). Ces valeurs de référence sont présentées dans le tableau XIX avec les valeurs expérimentales des indicateurs : la reproductibilité est conforme aux valeurs de référence, contrairement à la différence,  $Q^2$  et la validité du modèle.

Les résultats des différents paramètres de l'ajustement des erreurs et les coefficients d'erreurs trouvées dans l'analyse DoE sont présentés dans les tableaux VIII et IX (Annexe XI).



**Figure 28.** Récapitulatif des courbes d'ajustement après transformation exponentielle

**Tableau XIX.** Valeurs de référence et expérimentales des indicateurs de performance du modèle avant et après la suppression de la valeur aberrante

	Valeur de Référence	Valeur Expérimentale	Valeurs expérimentales après suppression de la valeur aberrante
Difference $R^2 - Q^2$	< 0,2 – 0,3	<b>0,472</b>	0,279
$Q^2$	> 0,5	<b>-0,2</b>	0,690
Validité de modèle	> 0,25	<b>-0,2</b>	0,568
Reproductibilité	> 0,5	0,996	0,989

➤ **Analyse de la variance (ANOVA)**

Le test d'absence d'ajustement a été réalisé par analyse de la variance (ANOVA), où deux tests F ont été effectués. Le premier test consistait à examiner la signification du modèle de régression et est satisfait lorsque  $p$  ( $p$  = valeur de probabilité)  $< 0,05$ . Le deuxième test F comparait l'erreur du modèle et l'erreur de réplication. Lorsqu'une erreur de modèle suffisamment faible est obtenue, le modèle montre un bon ajustement aux données et est satisfait lorsque  $p > 0,05$ .

La valeur  $p$  pour le test de signification est de 0,795. Comme elle est supérieure à la limite de 0,05, le modèle de régression n'est pas statistiquement significatif. La valeur  $p$  pour le test d'absence d'ajustement est de 0,003. Comme cette valeur est inférieure à la limite de 0,05, la validité du modèle n'est pas conforme à la valeur de référence.

### ➤ Tracé de probabilité normale des résidus

Les courbes de probabilité normale des résidus (figure 29) sont un outil pour trouver les expériences déviantes. Les valeurs aberrantes, N2, N4, N8 et N9, ont été trouvées en dehors de  $\pm 4SD$  (Déviation standard).

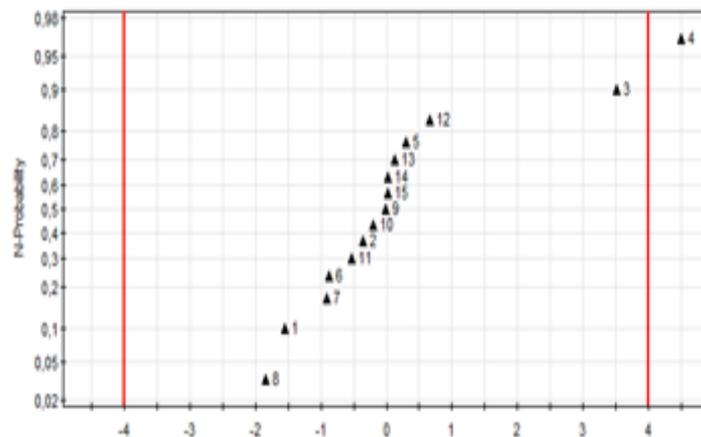


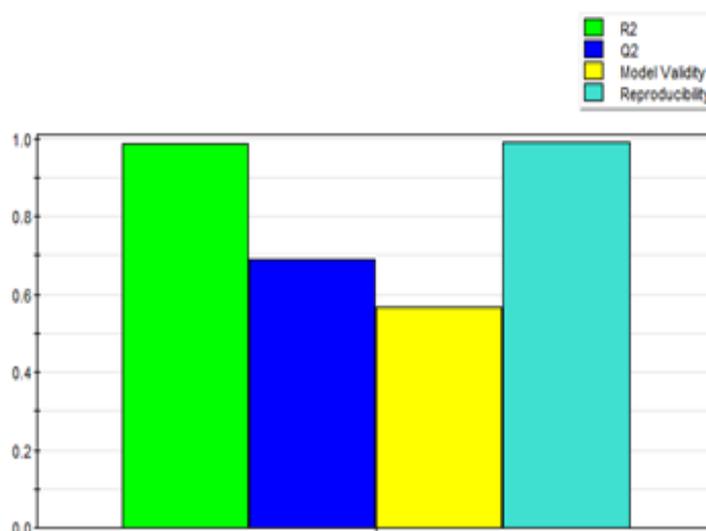
Figure 29. Diagramme de probabilité normale des résidus

### Suppression de la valeur aberrante

**Résumé de l'ajustement :** lorsque les aberrations ont été supprimées, tous les indicateurs de performance du modèle ont été devenus conformes aux valeurs de référence (figure 30 et tableau XVIII). La différence  $R^2 - Q^2$  diminue à 0,279, la valeur de  $Q^2$  passa de -0,2 à 0,690, tandis que la validité du modèle augmenta également pour être de 0,569.

**Analyse de la variance (ANOVA):** La valeur  $p$  pour le test de signification a été de 0,001. Comme elle est inférieure à la limite de 0,05, le modèle de régression a statistiquement

été significatif. La valeur  $p$  pour le test d'absence d'ajustement a été de 0,178. Comme cette valeur est supérieure à la limite de 0,05, la validité du modèle a été conforme à la valeur de référence.

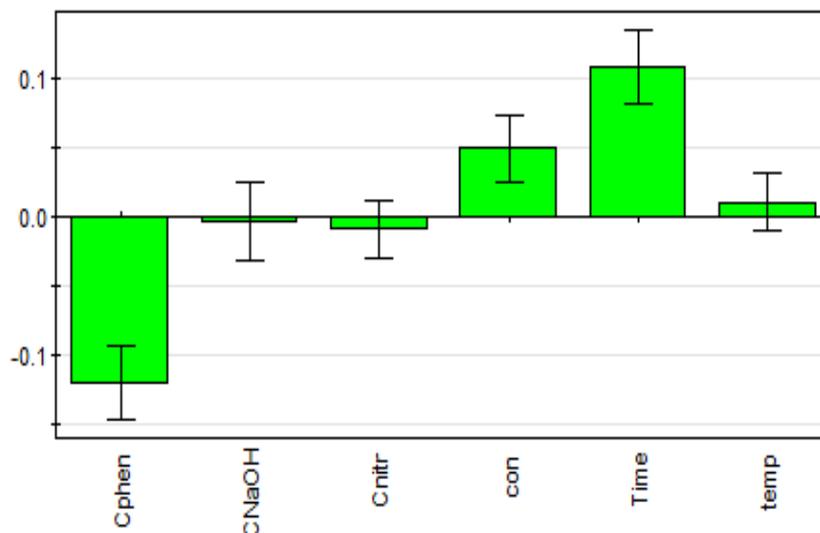


**Figure 30.** Récapitulatif des courbes d'ajustement après transformation exponentielle

#### ➤ Tracé du coefficient d'interprétation

Un diagramme de coefficients a été utilisé pour interpréter le modèle de régression (figure 31). Ce graphique représente les changements de réponse lorsque les facteurs ont été modifiés de leur niveau faible à élevé. Les lignes d'erreur sur les coefficients représentent les intervalles de confiance à 95%. Les lignes d'erreur incluant zéro indiquent des facteurs non significatifs. Les coefficients de l'équation mathématique sont indiqués dans le tableau XX.

Sur la figure 31, trois facteurs significatifs sont observés: concentration de phénol, concentration d'hypochlorure de sodium et temps de réaction. La concentration de phénol avait une influence négative sur l'absorbance. D'autre part, la concentration d'hypochlorure de sodium et le temps de réaction avaient une influence positive.



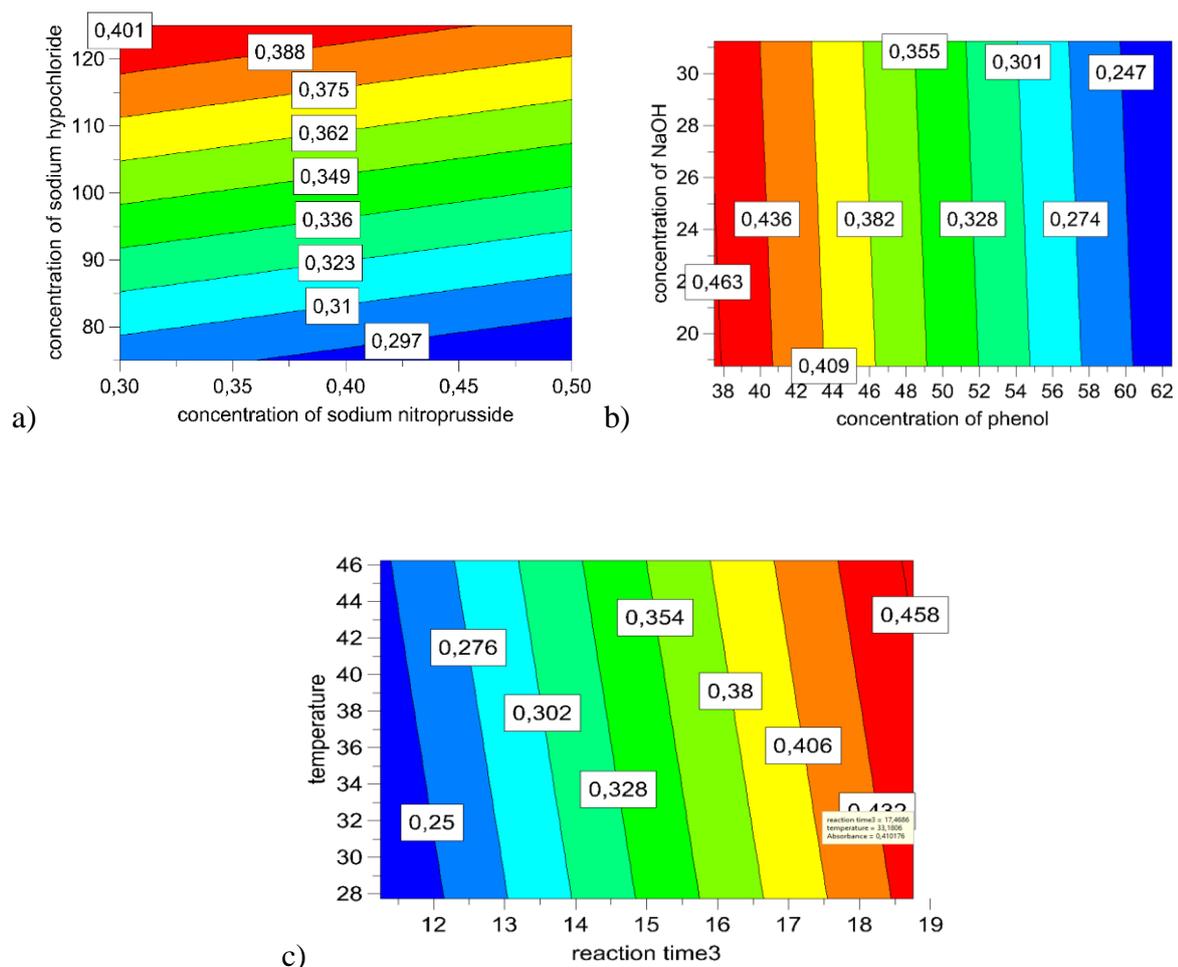
**Figure 31.** Les coefficients de régression

**Tableau XX.** Valeur du coefficient dans l'intervalle de confiance (95%) de l'équation mathématique

	Valeur du Coefficient	Intervalle de confiance (95%)	Valeur de $p$
<b>Constante</b>	0,34330	0,0203	1,2355e-006
<b>[phenol]</b>	-0,12000	0,0262	0,0002
<b>[NaOH]</b>	-0,00330	0,0287	0,7636
<b>[Nitroprussiate de Na]</b>	-0,00920	0,0203	0,2787
<b>[Hypochlorure de Na]</b>	0,05000	0,0242	0,0046
<b>Temps</b>	0,10830	0,0262	0,0003
<b>Température</b>	0,01083	0,0203	0,2129

➤ **Interprétation du modèle par les courbes de niveau de réponse**

La relation entre les six facteurs et la réponse a été clairement visualisée dans un graphique de courbes de réponse, illustré à la figure 32. Nous pouvons voir que la concentration de phénol a une influence négative sur l'absorbance, tandis que la concentration d'hypochlorure de sodium et le temps de réaction influencent positivement la réaction.



**Figure 32.** Tracés de contour (contour plots) avec absorbance en réponse: a) Concentration de phénol en abscisses et concentration en hydroxyde de sodium en ordonnées; b) Concentration de nitroprussiate de sodium en abscisses et concentration en hydroxyde de sodium en ordonnées; c) Temps de réaction en abscisses et température en ordonnées.

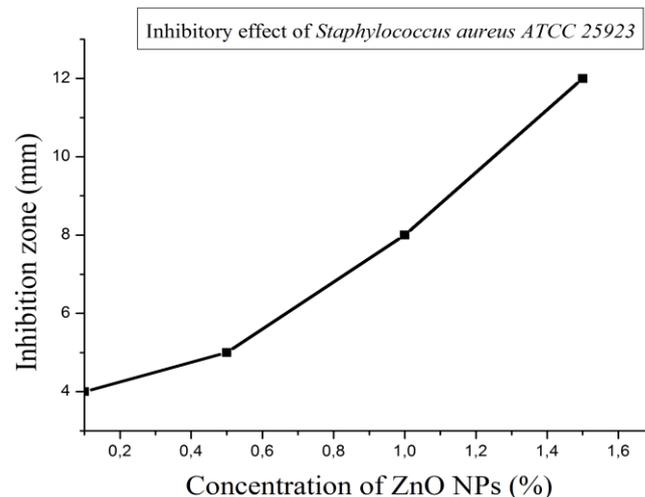
Parmi les six facteurs, trois facteurs significatifs ont été observés: la concentration de phénol, la concentration d'hypochlorure de sodium et le temps de réaction

## II. 5 Activité antibactérienne des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO

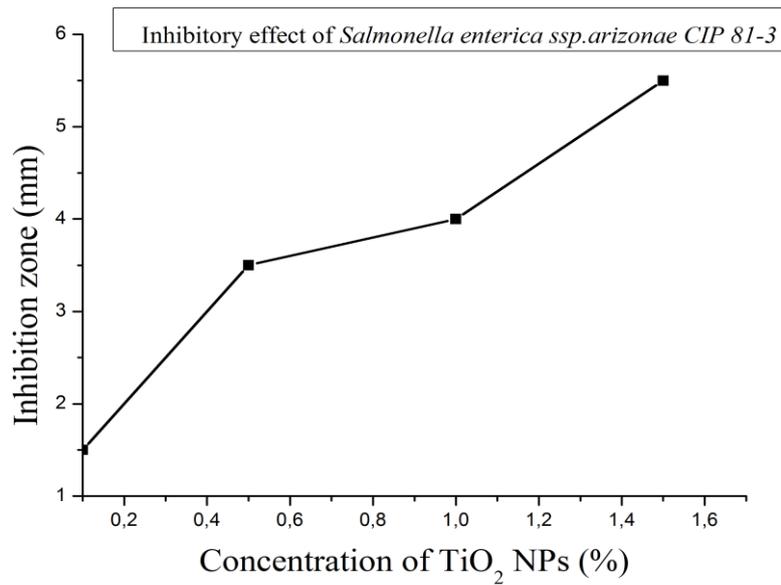
Dans la présente étude, le test de l'activité antibactérienne des nanoparticules (NPs) a été réalisé sur des souches de référence en utilisant une méthode de dilution en série (en creusant des puits dans la gélose ou en microplaque) pour obtenir la CMI. Le test antibactérien a été effectué en incluant différentes souches pathogènes humaines et appartenant à différentes espèces à Gram négatif (*E. coli* ATCC25922, *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* CIP 81-3) et à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et une souche phytopathogène (*Dickeya solani*).

*E. coli* était résistante à la fois aux NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO, alors que les autres souches ont montré une résistance à un type de NPs et une sensibilité à l'autre. Les NPs de ZnO ont démontré leur efficacité contre *S. aureus* et l'activité antibactérienne augmenta avec l'augmentation de leur concentration (figure 33). La concentration de 0,1% (m/v) des NPs a été considérée comme étant la CMI. Ceci a été démontré du fait qu'une concentration inférieure à celle-ci n'engendre aucune zone d'inhibition visible (0,01 et 0,05 %).

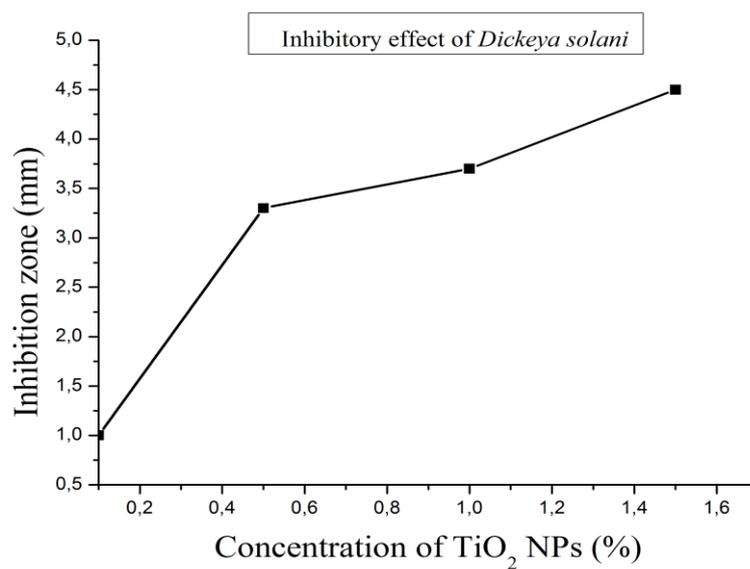
Les NPs de TiO<sub>2</sub> ont démontré leur efficacité contre *Salmonella* sp. et *Dickeya solani* et l'activité inhibitrice augmenta avec l'augmentation de la concentration en NPs (figures 34 et 35).



**Figure 33.** Activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de différentes concentrations de nanoparticules de ZnO



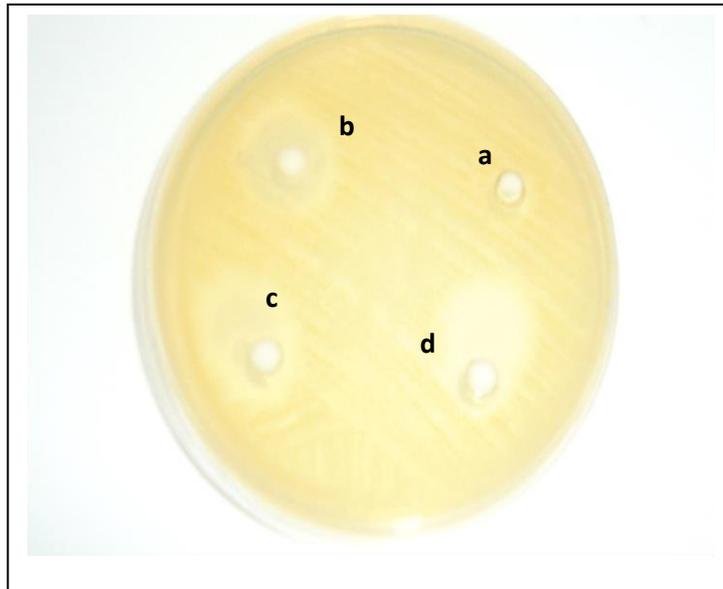
**Figure 34.** Activité antibactérienne à l'égard de *Salmonella enterica ssp. arizonae* CIP 81-3 de différentes concentrations de nanoparticules de TiO<sub>2</sub>



**Figure 35.** Activité antibactérienne à l'égard de *Dickeya solani* de différentes concentrations de nanoparticules de TiO<sub>2</sub>

La figure 36 montre un exemple de résultats obtenus avec le test des puits à l'égard de *S. aureus*.

Dans ce travail, la meilleure activité antibactérienne a été observée avec les nanoparticules de ZnO contre *S. aureus* ATCC 25923, une zone d'inhibition de 12 mm a été observée pour une concentration de 1,5% (figure 36).



**Figure 36.** Activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de différentes concentrations des nanoparticules de ZnO (**a** : 0,1% ; **b** : 0,5% ; **c** : 1% et **d** : 1,5%).

Les concentrations en dessous de 0,1% (0,01 et 0,05%) n'ont montré aucune activité antibactérienne, De ce fait on conclut que la concentration 0,1% est considérée comme la CMI.

Le tableau XXI regroupe les résultats de l'activité antibactérienne des NPs sur les 4 bactéries pathogènes.

**Tableau XXI.** Activité antibactérienne de différentes concentrations de nanoparticules (R pour Résistant aux nanoparticules)

		Zone d'inhibition des souches bactériennes (mm)			
Concentration (%)	NPs	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteric</i>	<i>D. solani</i>
0,1	ZnO	R	4,0±0,2	R	R
	TiO <sub>2</sub>	R	R	1,5 ±0,3	1,5±0,3
0,5	ZnO	R	5,0±0,2	R	R
	TiO <sub>2</sub>	R	R	3,5±0,2	3,3±0,1
1,0	ZnO	R	8,0±0,2	R	R
	TiO <sub>2</sub>	R	R	4,0±0,1	3,7±0,5
1,5	ZnO	R	12,0±0,2	R	R
	TiO <sub>2</sub>	R	R	5,0±0,1	4,5±0,2

R : Résistant

L'utilisation des antibiotiques a augmenté la durée de vie moyenne de plusieurs années (Marc et *al.*, 2008). Cependant, l'utilisation massive et parfois l'abus de ces antibiotiques ont conduit au développement de souches pathogènes multirésistantes (Cavallo et *al.*, 2004). Environ 90-95% des souches de *S. aureus* dans le monde entier sont résistantes à la pénicilline et dans les pays asiatiques, 70-80% de ces souches sont résistantes à la méthicilline (Hemaiswarya et *al.*, 2008). Le traitement antibactérien constitue un problème majeur dans le monde entier (Henriques et *al.*, 2006) qui pourrait être résolu avec les processus de chimie d'aide qui permettent la synthèse de revêtements antimicrobiens sur les surfaces avec un avantage significatif (Hajipour et *al.*, 2012).

Ces dernières années, la nanotechnologie a été florissante. Les matériaux nanostructurés attirent beaucoup d'attention en raison de leur potentiel pour la réalisation de processus spécifiques et leur sélectivité, en particulier dans les applications biologiques et pharmaceutiques (Losasso et *al.*, 2014). Les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) et d'oxyde de Zinc (ZnO), d'environ moins de 100 nm de diamètre, sont devenues une nouvelle génération de matériaux avancés en raison de leurs nouvelles et intéressantes propriétés optiques, diélectriques, et photo-catalytiques (Alivisatos et *al.*, 1996). Le TiO<sub>2</sub> est un matériau

photocatalytique et a un rôle plus utile pour l'environnement en raison de sa non-toxicité, photo super hydrophobie induite et l'effet anti-buée (Kato et Kudo, 2002 ; Haghi et *al.*, 2012).

Les propriétés antimicrobiennes des nanomatériaux, y compris des nanoparticules métalliques peuvent être attribuées à différents mécanismes tels que la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'inactivation des enzymes cellulaires et des acides nucléiques des microorganismes entraînant la formation de pores dans la membrane cellulaire microbienne. Parmi les nanoparticules métalliques, les NPs de TiO<sub>2</sub> sont connues pour être rentables, stables et sûres pour les humains et l'environnement (Ahmad et Sardar, 2013).

Selon Kim et *al.* (2007), l'action biocide des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres, générés au niveau de la surface, ce qui endommage la membrane lipidique des cellules.

Dans cette étude, l'effet antibactérien de différentes concentrations de NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO a été étudié.

En raison de l'utilisation abusive des antibiotiques, les bactéries ont développé une résistance élevée à ces molécules (Senarathna et *al.*, 2017). L'introduction de nouveaux agents antibactériens peut baisser les taux de mortalité et de morbidité, dues aux maladies infectieuses.

Il est connu que les nanomatériaux présentent des effets forts inhibiteurs vers un spectre élargi de souches bactériennes (Bois et *al.*, 2010). Selon plusieurs études, les oxydes métalliques portent une charge positive tandis que les microorganismes sont porteurs de charges négatives; ce qui provoque l'attraction électromagnétique entre les microorganismes et les oxydes métalliques qui conduit à l'oxydation et finalement à la mort des micro-organismes (Zhang et Chen, 2009). Les nanomatériaux peuvent également désactiver les enzymes cellulaires et l'ADN en coordonnant avec des groupes donneurs d'électrons, tels que: les thiols, les glucides, Amide, indoles, groupes hydroxyles et etc. Ils provoquent des pores dans les membranes cellulaires bactériennes, conduisant à une perméabilité accrue et la mort cellulaire. Les résultats présentés dans les tableaux XXI et XXII montrent que des concentrations différentes des NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO peuvent inhiber la croissance des souches de *Staphylococcus* et *Salmonella*.

Dans le milieu hospitalier, où les souches résistantes peuvent être transmises facilement et causer des infections des plaies chirurgicales et des patients brûlés; les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO peuvent être utilisées comme désinfectants appropriés. Dans l'industrie textile,

en utilisant des nanomatériaux appropriés, des tissus en coton avec des effets antibactériens sont en cours d'élaboration (Morones et *al.*, 2005).

Le mécanisme d'action des nanoparticules est favorisé par leur interaction avec la membrane des microorganismes, suivi de leur pénétration dans la cellule. Ceci est rendu possible par les mécanismes d'échappement aux défenses bactériennes que l'on observe dans le cas des particules plus grandes. Une fois dans la cellule, les nanoparticules peuvent enfin interagir avec les constituants cellulaires (ADN, protéines, enzymes) (Sondi et Salopek-Sondi, 2004). Des études antérieures ont démontré que leur effet antimicrobien est lié à leur taille et à leur forme.

**Tableau XXII.** Résistance et sensibilité des espèces bactériennes étudiées aux nanoparticules de ZnO et TiO<sub>2</sub> comparées à celles d'Argent (R pour résistant, S pour sensible)

Espèce bactérienne	ZnO	TiO <sub>2</sub>	Ag
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R (Morones et <i>al.</i> , 2005) (<10nm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S (Agnihotri et <i>al.</i> , 2014)
<i>Salmonella enterica</i>	R	S	S (Losasso et <i>al.</i> , 2014)
<i>Dickeya solani</i>	R	S	-

- : Absence de données

Une récente étude de Pal et *al.* (2007) sur *E. coli* a également démontré le rôle joué par la forme : nanoparticules sous forme de pyramides triangulaires dont la base est un plan cristallin {111} de haute densité atomique, ont le plus haut de degré de toxicité par rapport à leur forme sphérique ou en forme de tiges homologues (Zeyons, 2008). Ces résultats sont en accord avec notre travail actuel en sachant que nos NPs (TiO<sub>2</sub> et ZnO) ont des tailles caractéristiques plus élevées (13,5± 1,0 nm et 60± 10 nm respectivement).

Agnihotri et *al.* (2014) ont rapporté que l'effet bactériostatique/bactéricide des NPs d'Ag est taille et dose-dépendant telle que déterminée par la CMI et la concentration bactéricide minimale (BCM) de ces NPs sur les souches testées. *E. coli* MTCC 443 et *S. aureus* NCIM 5201 se sont révélées être les souches les plus et les moins sensibles, quel que soit la taille des NPs d'Ag, respectivement.

Dans ce travail, une concentration différente des NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO a été utilisée, et la CMI trouvée était égale à 0,1 % ce qui correspond à 100 µg/ml.

On note une similitude de nos résultats avec ceux d'Agnihotri et *al.* (2014) concernant la valeur de la CMI ( $100 \pm 25$  pg/ml) et ce malgré la différence dans la composition chimique des nanoparticules utilisées (Ag et ZnO), en tenant compte des incertitudes de mesure, on peut dire que les NPs d'Ag, ayant des dimensions comprises entre 8 et 40 nm ont des CMI comparables à celle des NPs de ZnO contre *S. aureus*. Notre travail peut suggérer que les nanoparticules sont un bon agent antimicrobien, en particulier celles à base de ZnO, et ce contre les staphylocoques et pourront remplacer les NPs d'Ag. Il est intéressant de noter que les NPs de ZnO sont plus faciles à synthétiser et économiquement plus rentables.

Les bactéries du genre *Salmonella* sont l'une des principales causes mondiales de maladies d'origine alimentaire chez l'Homme. Par conséquent, un grand intérêt existe pour réduire son impact sur la santé humaine en réduisant sa prévalence dans la chaîne alimentaire. Losasso et *al.* (2014) ont montré une immédiate réduction de la viabilité bactérienne, en fonction du temps. Dans le cas de *Salmonella* Senftenberg, une réduction maximale du nombre de cellules a été observée au bout de 4 h d'incubation en présence de 200 mg /l de NPs d'Ag; au contraire, *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Hadar ont nécessité 48 h pour avoir une inhibition avec la même concentration. Cette concentration est très élevée et pourrait être toxique par rapport à nos résultats qui ont montré qu'une concentration de seulement 100 mg/L est suffisante pour inhiber *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* CIP 81-3 en utilisant des NPs de TiO<sub>2</sub>, qui est la moitié de la concentration rapportée dans les travaux antérieurs.

Quant à *Dickeya solani*, nos résultats sont nouveaux étant donné qu'à notre connaissance aucun travail n'a précédemment été réalisé. Ces résultats pourraient prévoir l'utilisation des NPs de TiO<sub>2</sub> contre les agents phytopathogènes, en particulier les espèces du genre *Dickeya*, responsables entre autres, de la pourriture molle de la pomme de terre.

Enfin, l'ensemble de ces résultats peuvent suggérer que les NPs de ZnO pourraient être un bon agent antimicrobien, en particulier contre les staphylocoques, et pourraient remplacer les NPs d'Ag. Ces NPs pourraient être utilisées efficacement comme un nano-revêtement pour dispositifs chirurgicaux, des instruments et des pansements de cicatrisation. Ce travail a montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO ont une meilleure activité antibactérienne par rapport aux bien connues NPs d'Ag. Cela ouvre la porte à une façon économique, simple et efficace d'utiliser des NPs dans différents domaines. Ils peuvent être utilisés contre les infections nosocomiales dans les hôpitaux comme désinfectants de surface. L'application va au-delà des problèmes de santé puisque les NPs de TiO<sub>2</sub> pourraient être utilisées pour la sécurité alimentaire dans le

domaine du stockage et dans l'emballage aussi en protégeant les plantes contre l'invasion par des bactéries phytopathogènes. Cependant, d'autres travaux doivent être effectués pour évaluer la taille optimale des NPs et leur concentration efficace afin d'optimiser leur activité biologique.

## Conclusion

L'objectif de cette étude était la recherche des effets de nanoparticules sur deux activités biologiques, pour cela le travail a été divisé en deux parties. La première partie s'intéressait à l'évaluation des effets des nanoparticules sur l'activité de la L-asparaginase, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la L-asparagine en L-aspartate et en ammoniac. Un grand nombre de bactéries produit la L-asparaginase, nous nous sommes intéressés à des souches de *Dickeya solani* qui ont été démontré douées d'un potentiel de production de cette enzyme. La présence de l'enzyme a été confirmée par des mesures d'activités enzymatiques en même temps que l'analyse par SDS-PAGE. La L-asparaginase purifiée a montré une spécificité envers la L-asparagine, tout en étant inactive sur la L-glutamine. Ces données suggèrent que la L-asparaginase, extraite de *Dickeya solani*, pourrait être cliniquement plus intéressante que, par exemple, la L-asparaginase d'*E. coli* qui hydrolyse également la L-glutamine et produit le L-glutamate, un agent neurotoxique. Dans un deuxième temps, l'effet de deux types de nanoparticules, à savoir les NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO, sur son activité enzymatique a été exploré. Les résultats obtenus ont montré que l'activité enzymatique a été renforcée en présence des NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO, ce qui les rend de bons candidats pour améliorer l'activité de la L-asparaginase. En effet, les NPs de ZnO ont augmenté l'activité de L-asparaginase par un facteur de 2,5 alors que celles de TiO<sub>2</sub> l'ont augmenté par un facteur de 6,0.

L'évaluation de la réaction de coloration de Berthelot a montré que la séquence des réactifs est un déterminant important dans la réponse chromogénique. La couleur est formée de diverses substances azotées non protéiques traitées d'abord avec de l'hypochlorite alcalin suivi du réactif de phénol. La séquence réactive phénol-hypochlorite semble renforcer la spécificité de la formation de la coloration de Berthelot. La méthode de Berthelot pourrait être utilisée efficacement pour déterminer l'activité de la L-asparaginase. Les résultats de l'optimisation de la sensibilité de cette méthode ont démontré que parmi les six facteurs (la concentration du phénol, la concentration de l'Hydroxyde de Sodium, la concentration du nitroprussiate de Na, la concentration de l'hypochlorite de Na, temps et température), trois facteurs significatifs sont observés: la concentration de phénol, la concentration d'hypochlorure de sodium et le temps de réaction. La concentration de phénol a une influence négative sur l'absorbance, tandis que la concentration d'hypochlorure de sodium et le temps de réaction ont une influence positive sur celle-ci.

La deuxième partie du travail s'est focalisée sur le pouvoir antibactérien des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO. En effet, au cours du siècle dernier, la stratégie généralisée pour traiter les infections bactériennes et de tuer les micro-organismes consistait à l'utilisation des antibiotiques. Cependant, l'émergence de l'antibio-résistance a incité les chercheurs à se tourner vers des solutions alternatives. Les activités antibactériennes de certaines nanoparticules en font des candidats attractifs comme nouveaux agents contre les bactéries pathogènes.

Les effets antibactériens de différentes concentrations, allant de 0,01, jusqu'à 1,5%, de NPs de TiO<sub>2</sub> et de ZnO ont été testés à l'égard de trois souches pathogènes humaines appartenant à *E. coli*, *S. aureus* et *Salmonella enterica ssp. arizonae* respectivement et d'une souche phytopathogène de *Dickeya solani*. Sur la base de cette étude, nous avons montré que les NPs de ZnO d'un diamètre de 60±10 nm, ont une faible CMI par rapport aux NPs d'Ag, ayant un diamètre compris entre 8 et 40 nm contre *S. aureus*. De même, les NPs de TiO<sub>2</sub> avec 13,5±1 nm de diamètre ont montré une meilleure CMI contre *Salmonella* par rapport aux NPs d'Ag et inhibent également *Dickeya solani*.

### Perspectives

Quoique les résultats obtenus dans cette étude soient très intéressants et prometteurs, il ne reste qu'ils ont été obtenus avec l'enzyme semi-purifiée et il serait plus judicieux de pousser la purification de l'enzyme par chromatographie d'affinité et de réaliser sa cartographie.

Il serait également intéressant d'évaluer les potentialités de la L-asparaginase, extraite de *Dickeya solani*, en tant qu'agent anticancéreux, *in-vitro* et *in-vivo* chez l'animal, et de rechercher à la fois la taille optimale et la concentration efficace des nanoparticules pour obtenir la meilleure activité spécifique.

Des essais d'application des NPs de ZnO et de TiO<sub>2</sub> en tant qu'agents antibactériens sur les surfaces sont également envisageables pour montrer leur efficacité dans la prévention des infections nosocomiales en milieu hospitalier et des contaminations microbiennes des aliments. De même, leur activité antibactérienne à l'égard de *Dickeya solani* ouvre la perspective d'envisager des essais sur plants contre les agents phytopathogènes.

## Glossaire

**Accumulation de  $\pi$ - $\pi$**  : fait référence à des interactions attractives et non covalentes entre les cycles aromatiques, car ils contiennent des liaisons pi. Ces interactions sont importantes pour l'empilement des bases nucléiques dans les molécules d'ADN et d'ARN, le repliement des protéines, la synthèse dirigée par matrice, la science des matériaux et la reconnaissance moléculaire, bien que de nouvelles recherches suggèrent que l'empilement pi pourrait ne pas fonctionner dans certaines de ces applications. Malgré un intérêt expérimental et théorique intense, il n'existe pas de description unifiée des facteurs qui contribuent aux interactions entre les empilements.

**Aérosols de sel** : Sont l'ensemble des particules de sel en suspension dans l'air.

**Anorexie** : Correspond à une perte d'appétit, empêchant le patient de se nourrir. Si celle-ci devient chronique, elle peut devenir mortelle, par manque de nutriments dans le corps. Elle peut être un symptôme dans une maladie plus grave, comme le cancer, ou d'origine mentale. Dans ce cas, il s'agit d'un trouble psychique dans lequel le patient refuse de se nourrir pendant une très longue période.

**Antithrombine III (AT III)** : Fait partie des inhibiteurs de la coagulation. Un déficit en antithrombine prédispose aux thromboses. Son gène est *serpin1* situé sur le chromosome 1 humain.

**Bilirubinémie** : C'est le dosage de la bilirubine dans le sang. Cette substance est normalement présente dans l'organisme et provient de la dégradation de l'hémoglobine.

**Choc anaphylactique** : ou choc allergique est une réaction allergique extrêmement violente provoquant une forte perturbation de la circulation sanguine qui entraîne un état de choc avec une chute très brutale de la tension artérielle mettant en danger les organes vitaux, notamment le cœur et le cerveau.

**Découpage au plasma** : La découpe de métaux au plasma est une forme d'éclair domestiqué. Dans la nature, la gaine de l'éclair se déplace très rapidement sur une grande distance, cet arc électrique naturel ionise l'air qu'il traverse et libère jusqu'à 40 000 C et plus dans la gaine immédiate de l'éclair. Le principe de la découpe au plasma est semblable, où l'arc électrique géant de l'éclair se déplaçant sur de grandes distances, des kilomètres parfois, est cette fois fixe, de très petite taille (quelques millimètres) et ce sont les gaz qu'on y frotte qui se déplacent à une vitesse proche du son.

**Enoxacine** : C'est un antibiotique appartenant à la famille des quinolones, au groupe des fluoroquinolones. Elle agit sur la réplication de l'ADN en inhibant l'ADN-gyrase.

**Facteurs II, VII, IX, X** : Ce sont des protéines sanguines, exerçant un rôle de coagulation. Ces facteurs de coagulation sont généralement des sérines protéases (enzymes). Il y a quelques exceptions. Par exemple, le facteur VIII et le facteur V sont des glycoprotéines, et le facteur XIII est une transglutaminase. Les sérine-protéases fonctionnent en clivant d'autres protéines à des résidus spécifiques de sérine. Les facteurs de coagulation circulent sous formes de zymogènes inactifs. La cascade de coagulation est classiquement divisée en trois voies : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque activent toutes les deux la voie commune finale du facteur X, de la thrombine et de la fibrine.

**Fibrinogène** : ou « facteur I » (FI : facteur un) est un facteur de la coagulation, protéine du plasma sanguin qui se transforme en fibrine lors de la coagulation. Ce fibrinogène passera sous forme de fibrine ce qui permettra la coagulation.

**Fibrinolyse** : C'est un processus physiologique complexe de dissolution des caillots sanguins (constitués de fibrine) par la plasmine. Ce processus clôt la coagulation sanguine afin de reperméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses.

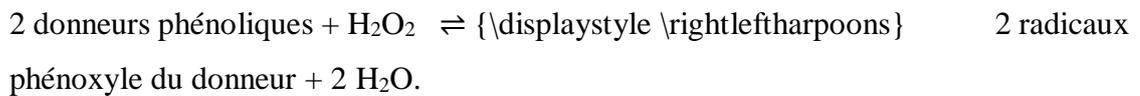
**Flavodoxine** : C'est une flavoprotéine bactérienne intervenant dans les réactions d'oxydoréduction. La structure des flavodoxines est caractérisée par un feuillet  $\beta$  à cinq brins parallèles entouré d'hélices  $\alpha$  de chaque côté du feuillet. Ces protéines ont été isolées à partir de procaryotes, de cyanobactéries et de certaines algues eucaryotes.

**Hémostase** : C'est l'ensemble des phénomènes du sang et des vaisseaux sanguins prévenant ou permettant l'arrêt de l'écoulement du sang et ainsi, contrôlant physiologiquement le retour à une circulation normale. Une séquence d'activation physiologique et moléculaire s'enclenche pour éviter l'hémorragie, en cas de brèche vasculaire, tout en localisant la formation du caillot sanguin sur son site actif (la brèche vasculaire).

**Œdème périphérique** : C'est un gonflement de vos jambes ou les mains. La cause peut être simple, comme assis trop longtemps sur un plan ou debout trop longtemps. Ou il peut impliquer une maladie sous-jacente plus grave.

**Paresthésie** : C'est une sensation anormale à la surface de la peau sans qu'il y ait pour autant de contact. Il s'agit le plus souvent d'un trouble désagréable mais qui n'est pas douloureux, également appelées "fourmillements".

**Peroxydase de raifort** : de l'anglais *horseradish peroxidase*, est une oxydoréductase qui catalyse la réaction :



Cette enzyme est très utilisée en biochimie, notamment lors de protocoles de détection de molécules lors d'immunohistochimie ou d'immuno-blot (western blot), ainsi que pour son action catalytique lors des réactions d'oxydoréduction. Il s'agit d'une hémoprotéine dont on connaît de nombreuses isoformes, variant notamment par la nature des oses qui leur sont liés, la plus étudiée étant l'isoenzyme de type C.

**Plasmon** : C'est une quasiparticule résultant de la quantification de fréquence plasma, tout comme le photon et le phonon sont des quantifications de vibrations respectivement lumineuses et mécaniques. Ainsi, les plasmons sont des oscillations collectives d'un gaz d'électrons, par exemple à des fréquences optiques.

**Protéines C et S** : La protéine C est synthétisée par le foie et est transformée en enzyme active sous l'effet de la thrombine en présence de calcium et de phospholipides. En présence de la protéine S, son cofacteur, elles agissent conjointement pour exercer une activité anticoagulante physiologique.

**Soudure autogène** : Opération de soudure, manuelle ou automatique, qui consiste à assembler directement deux pièces, soit par soudure, (au chalumeau oxyacétylénique ou à l'arc) et avec des métaux d'apport de même nature, soit par pression ou martelage, sans apport, des métaux portés à l'état pâteux.

**Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou spectroscopie** : est une technique utilisée pour obtenir le spectre d'absorption, d'émission, la photoconductivité ou la diffusion Raman dans l'infrarouge d'un échantillon solide, liquide ou gazeux.

**Subtilisine** : C'est une protéase à sérine qui catalyse l'hydrolyse des protéines avec une faible spécificité en matière de liaison peptidique. Elle agit préférentiellement à proximité d'un grand résidu d'acide aminé non chargé. Elle a été isolée à partir de *Bacillus subtilis*, d'où son nom, mais est également produite par d'autres bactéries, telles que *Bacillus amyloliquefaciens*.

## Références bibliographiques

Abbas, S. A. (2011) 'The Effects of Gold and Silver Nanoparticles on Choline Esterase and Monoamino Oxidase Enzymes Activities', *International Journal of Chemistry*, 3(4), p61-68.

Abdel-Fattah, Y. R., Olama, Z.A. (2000) 'L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs', *Prokaryotes Biochemistry*, 38, p115-122.

Abuchowski, A., Kazo, G., Verhoest, C. (1984) 'Cancer therapy with chemical modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol L-asparaginase conjugates', *Cancer. Biochem. Biophys.* 7, p175-186.

Aghaiypour, K., Wlodowes, A., Lubkowski, J. (2001) 'Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase', *Biochemistry*, 40(19), p 5655-5664.

Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S. (2014) 'Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy', *RSC Advances*, 4, p3974–3983.

Ahmad, R., Sardar, M. (2013) 'TiO<sub>2</sub> nanoparticles as an antibacterial agent against *E. coli*', *International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology*, 2(8), p3569–3574.

Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F. (1973) 'Biochemical engineering: 2nd Edition', New York Academic Press: NY Publishers, pp. 92-127.

Alapati, K., Muvva, V. (2010) 'Optimization and purification of L-asparaginase produced by *Streptomyces tendae* TK-VL\_333Z', *Naturforsch*, 65, p528–531.

Alivisatos, A. P. (1996) 'Semiconductor Clusters, Nanocrystals and Quantum Dots', *Science*, 271, p933-937. doi: 10.1126/science.271.5251.933

Altenbergn, A., Housewright, D. (1954) 'Stereospecific asparaginases in smooth *Brucella abortus* strain 19', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 49, p130-137.

Anese, M. A., Quarta, B. A., Frias, J. B. (2011) 'Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuit', *Food Chemistry*, 126, p435–440

Anonyme. (2006). <http://fr.wikipedia.org/wiki/fichier:polyacrylamidepolyacrylamide.png>.

Anonyme (2011) Biokar Diagnostics. [www.biokar-diagnostics.fr](http://www.biokar-diagnostics.fr)

## Références bibliographiques

Asselin, B. L. (1999) 'The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 457, p621-629.

Avramis, V. I., Panosyan, E.H. (2005) 'Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future', *Clinical Pharmacokinetics*, 44(4), p367-393.

Baskar, G., Renganathan, S. (2009) 'Evaluation and screening of nitrogen source for L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using latin square design research', *Journal of Mathematics and Statistics*, 1(2), p55-58.

Beard, M. E., Crowther, D., Galton, D. A., Guyer, R. J., Fairley, G. H., Kay, H. E., Knapton, P. J., Malpas, J. S., Scott, R. B. (1970) 'L-asparaginase in treatment of acute leukaemia and lymphosarcoma', *British Medical Journal*, 690, p191-195.

Benny, P. J., Muraleedharan, K. G. (1991) 'L-asparaginase activity in bacteria from sediments and mollusk', *International Journal of Maritime Sciences*, 20, p36-39.

Bertrand, T. (2003) 'L'asparaginase dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique de l'enfant', Thèse pour l'obtention du Diplôme de Docteur d'Etat en Pharmacie, Université de Nantes: France, pp. 75.

Bezeaud, A., Drouet, L., Leverger, G., Griffin, J. H., Guillin, M. C. (1986) 'Effect of L-asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia on plasma vitamin K- dependent coagulation factors and inhibitors', *Journal of Pediatrics*, 108, p698-701.

Bois, L., Chassagneux, F., Desroches, C., Battie, Y., Destouches, N., Gilon, N., Parola, S., Stéphan, O. (2010) 'Chemical growth and photochromism of silver nanoparticles into a mesoporous titania template', *Langmuir*, 26(2), p8729-8736.

Borek, D., Jaskólski, M. (2001) 'Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity', *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), p893-902.

Boudjouan, F., Chelouche, A., Touam, T., Djouadi, D., Khodja, S., Tazerout, M., Ouerdane, Y., Hadjoub, Z. (2015) 'Effects of stabilizer ratio on photoluminescence properties of sol-gel ZnO nano-structured thin films', *Journal of Luminescence*, 158, p32-37.

Bradford, M. M. (1976) 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', *Analytical Biochemistry*, 72, p284-254.

Cammak, K. A., Marlborough, D. I., Miller, D.S. (1972) 'Physical properties and submit structure of L-asparaginase isolated from *Erwinia carotovora*', *Biochemical Journal*, 126(2), p361-379.

## Références bibliographiques

Campbell, H., and Mashburn, L. (1969) 'L-asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics', *Biochemistry*, 9(37), p68-75.

Capizzi, R. L., Bertino, J. R., Skeel, R.T., Creasey, W. A., Zanes, R., Olayon, C., Peterson, R. G., Handschumacher, R. E. (1971) 'L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies' *Annals of Internal Medicine*, 74(6), p893-901.

Cavallo, J. D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., Garrabé, E. (2004) 'Bêta lactamines', *EMC-Maladies Infectieuses*, 1, p129–202.

Clavell, L. A., Gelber, R. D., Cohen, H. J., Hitchcock-Bryan, S., Cassady, J. R., Tarbell, N. J., Blattner, S. R., Tantravahi, R., Leavitt, P., Sallan, S. E. (1986) 'Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia', *New England Journal of Medicine*, 315(11), p657-63.

CA-SFM (2015). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations2015.[http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV2\\_030915.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV2_030915.pdf) (consulté le 06 May 2018).

Curran, M. P., Daniel, R. M., Guy, G. R., Morgan, H. W. (1985) 'A specific L-asparaginase from *Thermus aquaticus*', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 241, p571-576.

David, F., James, W. N., Steve, P., David, M. A. (1988) 'Sequence of L-asparaginase gene from *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125', *Nuc Ac Resrch*, 16(21).

David, K. and David, G. (1974) 'Asparaginase production by the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*', *Applied Microbiology*, 27, p206-209.

Davidson, L., Burkom, M., Ahn, S., Chang, L. C., Kitto, B. (1977). 'L-Asparagainases from *Citrobacter freundii*', *Biochemistry and Biophysics Acta*. 480, p282-294.

Davis, M.A., Kelly, J.M and Hynes, M.J. (1993) 'Fungal catabolic gene regulation: molecular genetic analysis of the theamS gene of *Aspergillus nidulans*', *Genetica*, 90(2-3), p133-145.

De Jesso, F. (1968) 'Ammonium Sulfate Concentration Conversion Nomograph for 0°', *Journal of Biology and Chemistry*, 243, p2022.

Dejong, P. J. (1972) 'L-asparaginase Production by *Streptomyces griseus*' *Applied Microbiology*, 23, p1163-1164.

Delobette, H., Friry, A., Plewniak, F., Egly, J. M. (1991) 'Dosage des protéines', *Le Techscop de Bioftr*, 41, p3-12.

Derst, C., Lubkowski, J. S., Schleper, Roehm, K. H., Wlodawer, A. (1994) 'A crystallographyc Asparaginase of *Escherishia coli*', *Journal of Biochemistry*, 85, p17-19.

## Références bibliographiques

Derst, C., Henseling, J., Rohm, K.H. (1992) 'Probing the role of threonine and serine residues of *Escherichia coli* asparaginase II by site-specific mutagenesis', *Protein Engineering*, 5(8), p785–789.

Distasio, J. A., Salazar, A. M., Nadji, M., Durden, D. L. (1982) 'Glutaminase-free asparaginase from *Vibrio succinogenese*: an anti-lymphoma enzyme lacking hepatotoxicity', *International Journal of Cancer*, 30, p343-347.

Djouadi, D., Meddouri, M., Chelouche, A. (2014) 'Structural and optical characterizations of ZnO aerogel nanopowder synthesized from zinc acetate ethanolic solution', *Optical Materials*, 37, p567-571.

Dolowy, W., Henson, D., Cornet, J., Sellin, H. (1966) 'Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase' *Cancer*. 19, p1813-1819.

Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Riolland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A. M., Vilmer, E., Otten, J., Philippe, N. (2002) 'Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial', *Blood*, 99(8), p2734-2739.

El-Bessoumy, A. A., Sarhan, M., Mansour, J. (2004) 'Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas Aeruginosa* 50071 Using Solid-state Fermentation', *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4), p387-393.

El-Bessoumy, A., Safhan, M., Mansour, J. (2004) 'Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 Using Solid state Fermentation', *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 37(4), p387-393.

El-Naggar, N. E., Deraz S. F., El-Ewasy S. M. (2018) 'Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces brolosae* NEAE-115', *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19, p51.

El-Naggar, Ne-l., Deraz, S.F, Soliman, H. M., El-Deeb, N. M, El-Ewasy, S. M. (2016) 'Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82', *Scientific Reports*, 6, p32926.

El-Sayed, E. M., El-Sayed, S. T., Shousha, W. G., Shehata, A. N, Hanafy, S. S. (2011) 'Purification, Characterization and antitumor Activity of L-asparaginase from Chicken liver', *Journal of American Science*, 7, p439-449.

Evonik Industries (2015) 'Aeroxide, Aerodisp and Aeroperl Titanium Dioxide as Photocatalyst, Technical Information 1243'

<http://www.aerosil.com/sites/lists/RE/DocumentsSI/TI-1243-Titanium-Dioxide-as-Photocatalyst-EN.pdf> (consulté le 06 May 2018).

Forther, J. D., Lyon, D. Y., Sayes, C. M., Boyd, A. M., Falkner, J. C., Hotze, E. M., Alemany, L. B., Tao, Y. J., Guo, W., Ausman, K. D., Colvin, V. L., Hughes, J. B. (2005) 'C60 in water: Nanocrystal formation and microbial response', *Environmental Science and Technology*, 39(11), p4307-4316.

Gilbert, H. J., Blazek, R., Bulman, H. M., Minton, N. P. (1986) 'Cloning and Expression of the *Erwinia chryanthemi* Asparaginase Gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*', *Journal of General Microbiology*, 131(1), p151 – 160.

Golden, K. J., Bernlohr, R. W. (1985) 'Nitrogen catabolite repression of the Lasparaginase of *Bacillus licheniformis*', *Journal of Bacteriology*, 164, p938-940.

Green, A. A., Hughes, W. L. (1955) 'Protein fractionation on the basis of solubility' *Methods in Enzymology*, 1, p67-90.

Guitou Marie-Anne. (2014) 'Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO<sub>2</sub>', Sciences pharmaceutiques (dumas-01011269).

Habba, Y.G. (2017)'Étude des nanostructures de ZnO pour leur application dans l'environnement: détection de gaz et dépollution de l'eau', Thèse de Doctorat en Sciences des Matériaux, Paris Est.

Haghi, M., Hekmatafshar, M., Janipour, M. B., Gholizadeh, S. S., Faraz, M. K., Sayyadifar, F., Ghaedi, M. (2012) 'Antibacterial effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on pathogenic strain of E coli', *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3(3), p621–624.

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi R. D., Rojo, T. (2012) 'Antibacterial properties of nanoparticles', *Trends in Biotechnology*, 30 (10), p499–511.

Harry, J., Gilbert, Richard, B., Hillary, M. S., Bulman, Negel, P., Minton, (1986) 'Cloning and Expression of the *Erwinia chrpanthemi* Asparaginase Gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*', *Journal of General Microbiology*, 132, p151–160.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., Doble, M. (2008) 'Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases', *Phytomedicine*, 15(8), p639–652.

## Références bibliographiques

Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., Correia, A. (2006) 'Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters', *Research in Microbiology*, 157(10), p938–947.

Hill, J. M., Roberts, J., Loeb, E., Khan, A., MacLellan, A and Hill, R. W. (1967) 'L-asparaginase Therapy for Leukemia and Other Malignant. Remission in human leukemia', *Journal of the American Medical Association*, 202(9), p882-888.

Hochstrasser, D. F., Patchornick, A., and Merrill, C. R. (1988) 'Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining', *Annals of Biochemistry*, 173, p412-423.

Howard, C. and Jame, H. S. (1968) 'Production of L-Asparaginase II by *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 96, p2043-2048.

Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., Isono, M. (1973) 'Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms', *Journal of General Microbiology*, 76, p85-99.

Haghi, M., Hekmatafshar, M., Janipour, M. B., Gholizadeh, S. S., Faraz, M. K., Sayyadifar, F., Ghaedi, M. (2012) 'Antibacterial effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on pathogenic strain of E coli', *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3, p621–624.

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi R. D., Rojo, T. (2012) 'Antibacterial properties of nanoparticles', *Trends in Biotechnology*, 30(10), p499–511.

Harry, J., Gilbert, Blazek, R., Hillary, M., Bulman, S., Negel, P. (1986) 'Minton. Cloning and Expression of the *Erwinia chrpanthemi* Asparaginase Gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*', *Journal of General Microbiology*, 132, p151 – 160.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., Doble, M. (2008) 'Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases', *Phytomedicine*, 15(8), p639–652.

Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J. and Correia, A. (2006) 'Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters', *Research in Microbiology*, 157(10), p938–947.

Hill, J. M., Roberts, J., Loeb, E., Khan, A., MacLellan, A., Hill, R.W. (1967) 'L-asparaginase Therapy for Leukemia and Other Malignant. Remission in human leukemia', *Journal of the American Medical Association*, 202(9), p882-888.

Hochstrasser, D. F., Patchornick, A., Merrill, C. R. (1988) 'Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining', *Annals of Biochemistry*, 173, p412-423.

## Références bibliographiques

- Howard, C. , Jame, H. S. (1968) 'Production of L-Asparaginase II by Escherichia coli', *J of Bact.* 96, p2043-2048.
- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama.K, Isono, M. (1973). 'Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms', *J of Genrl Microb.* 76, p85-99.
- Jaffe, N., Traggis, D., Das, L. (1971) 'Favorable remission induction rate with twice week doses of L-asparaginase', *Cancer Research.* 33, p1-4.
- Janse, J. D., Ruissen, M. A. (1988) 'Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands', *Phytopathology*, 78, p800-808.
- Kamble, V. P., Rao, R. S., Borkar, P. S., Khobragade, C. N., Dawane, B. S. (2006) 'Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters', *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 43(6), p391–394.
- Kanda, P., Minshull, T. (2020) 'Determination of glycation levels in *Erwinia chrysanthemi* asparaginase Drug Product by liquid chromatography – mass spectrometry', *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 145:105253.
- Kato, H., Kudo, A. (2002) 'Visible-Light-Response and Photocatalytic Activities of TiO<sub>2</sub> and SrTiO<sub>3</sub> Photocatalysts Codoped with Antimony and Chromium', *The Journal of Physical Chemistry*, 106(19), p5029–5034.
- Kebeish, R., El\_Sayed, A., Fahmy, H, Abdel-Ghany, A. (2016) 'Molecular Cloning, Biochemical Characterization, and Antitumor Properties of a Novel L\_Asparginase from *Synechococcus elongatus* PCC6803', *Biochemistry (Moscow)*, 81(10), p173-118.
- Kil, J. O., Kim, G. N., Park, I. (1995) 'Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*', *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59(7), p749-750.
- Kim J. S., Kuk, K. N., Yu, J. H., Kim, S. J., Park, H. J., Lee, S. H., Kim, Y. K., Park, Y. H., Park, C. Y., Hwang, Y. K., Lee, D. H. Jeong, M. H., Cho. (2007) 'Antimicrobial effects of silver nanoparticles', *Nanomedicine Nanotechnology Biology and Medicine*, 3, p95-101.
- Kislitsyn, Y. A., Kravchenko, O. V., Nikonov, S. V, Kuranova, I. P. (2006) 'Three dimensional structure of *Erwinia carotovora* L-Asparaginase', *Crystallography Reports*, 51, p811-816.
- Konecna, P., Klejdus, B., Hrstkova, H., (2004) 'Monitoring the asparaginase activity and asparagine level in children with acute lymphoblastic leukemia treated with different treated asparaginase preparations', *Scripta Medica.* 77(2), p55-62.

## Références bibliographiques

- Kotzia, G. A., Labrou, N. E. (2007) 'L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization', *Journal of Biotechnology*, 127, p657-669.
- Kumar, S., Pakshirajan, K., Dasu, V. V. (2009) 'Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(3), p477-486.
- Kumar, S., Dasu, V. V., Pakshirajan, K. (2010) 'Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428', *Process in Biochemistry*, 45 (2), p657-669.
- Lelliot, R. A., Dickey, R. S. (1984) 'Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers & Smith 1920, 209', In: Krieg, N.R, Holt, J.G(eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA: Williams & Wilkins Co. 1, pp. 469-476.
- Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J., Blackbure, J. W. (2009) 'Optimisation of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacteria *Anoxybacillus* sp. 527', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, p1841-1852.
- Liu, F. S., Zajic, J. E. (1973) 'Fermentation Kinetics and Continuous Process of L-Asparaginase Production, American Society for Microbiology', *American Society for Microbiology, Jan.*, p92-96
- Losasso, C., Belluco, S., Cibir, V., Zavagnin, P., Mièetia, I., Gallochio, F. (2014) 'Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars', *Frontiers in Microbiology*, 5(227), p1-9.
- Lubokowski, J., Palm, G. J., Gilliland, G. L., Derst, C., Rohm, K. H., Wlodawer, A. (1996) 'Crystal Structure and Amino Acid Sequence of *Wolnella succinogenes* L-Asparaginase', *European Journal of Biochemistry*, 241(1), p201-207.
- Madda, S., Pharm, M. (2009) 'Investigations on the bio-production, purification and characterization of medicinally important L-asparaginase enzyme using a newly isolated bacterial species', *Doctorat of philosophy In Biotechnology, Thesis submitted to research and developement cell Jawaharlal Mehru Technological University Kuratpall, Hyderabad-500085: Aandhra Pradesh*, pp79
- Manna, S., Sinha, A., Sadhukhan, R., Chakrabarty, S. L. (1995) 'Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405', *Current Microbiology*, 30(5), p291-298.

## Références bibliographiques

Mansour, J. M. S. (2001) '*Production, Purification and Characterization of Pseudomonas aeruginosa 50071 L-asparaginase using solid state Fermentation, M.Sc. Thesis*', Zagazig: The Faculty of Science Zagazig University, pp98.

Michalska K., Jaskolski M. (2006) 'Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations', *Acta Biochimica Polonica*, 53, p62.

Miller H., Slaser J., Balis M. (1969) 'Amino acid levels following L-asparaginase amidohydrolase (EC.3.5.1.1.) therapy', *Cancer Research*, 29, p183-187.

Miller, M., Rao, J. K., Wlodawer, A., Gribskov, M. R. (1993) 'A left-handed crossover involved in amidohydrolase. Crystal structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase with bound l-aspartate', *FEBS Letters*, 328, p275–279.

Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., Yacaman M. J. (2005) 'The bactericidal effect of silver nanoparticles', *Nanotechnology*, 16(10), p2346-2353.

Morris, B., Behzad, F. (2014) 'The Effects of Gold and Silver Nanoparticles on an Enzymatic Reaction between Horseradish Peroxidase and 3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidine', *Biochemistry and Pharmacology*, 3, p1-3.

Mukherjee, J., Majumadar, S., Scheper, T. (2000) 'Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*', *Applied Microbiology and Biotechnnology*. 53, p180-184.

Muley, R. G., Sarker, S., Ambedkar, S., Nail, S. R. (1988). 'Influence of alkali treated corn steep liquor containing medium on protein production by *Staphylococcus aureus*', *Folia Microbiologica*. 43, p31-34.

Narta U. K., Kanwar S. S., Azmi W. (2007) 'Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia', *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 61(3), p208-221.

Nesbit, M., Chard, R., Evans, A., Karon, M., Hammond, G. (1979) 'Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia', *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 1, p9-13.

Oettgen, H., Stephenson, P., Schwartz, M., (1979) 'Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man', *J of Can.* 25, p53-78.

Pajdak, E., Szafran, Z. (1977) 'Purification and properties of L-asparaginase EC-2 from *Escherichia coli* 055:B5', *Acta Biochimica Polonica*, 24, p53-58.

## Références bibliographiques

- Pal, S., Tak, Y. K., Song, J. M. (2007) 'Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), p1712-1720.
- Palm, G. J., Lubkowski, J., Derst, C., Schleper, S., Roehm, K. H., Wlodawer, A. (1996) 'A covalently bound catalytic in *Escherichia coli*, Crystal structure of a thr-98val mutant', *FEBS Letters*. 390, p211-216.
- Papageogiou, A. C., Posypanova, G. A., Andersson, C. S., Sokolov, N. N., Krasotkina, J. (2008) 'Structural and Functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase', *The FEBS Journal*, 275(17), p4306-4316.
- Pedreschi, F., Kaack, K., Granby, K., (2008) 'The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries', *Food Chemistry*, 109: p386–392
- Pérombelon, M. C. M. and Kelman, A. (1980) 'Ecology of Soft Rot Erwinias', *Annual Review of Phytopathology*, 18, p361-387.
- Peterson, R. E., Ciegler, A. (1969) 'L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*', *Applied Microbiology*, 18, p64-67.
- Pinheiro, I. O., Araujo, J. M., Ximenes, E. C. P. A., J. C. S. (2001) 'Production of L-asparaginase by *Zymomonas mobilis* strain CP4', *Biomaterial Diagnostics* 6, p243-244.
- Prathusha, D. (2010) '*Structural studies on enzymes of biotechnological and biomedical interest*' Turku: University of Turku, pp55
- Priest, J. R., Ramsay, N. K., Steinherz, P. G., Tubergen, D. G., Cairo, M. S., Sitarz, A. L., Bishop, A. J., White, L., Trigg, M. E., Levitt, C. J., Cich, J. A., Coccia, P. F. (1982) 'A syndrome of thrombosis and hemorrhage complicating L-asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia', *Journal of Pediatrics*, 100(6), p984-997.
- Prista, A.A and Kyridio, D.A. (2001) 'L-asparaginase of *Thermotherophilus*: purification, properties and identification of essential amino acids for catalytic activity' *Molecular and Cellular Biochemistry*, 216, p93-101.
- Rabilloud, T. (1996) 'Solubilisation of proteins for electrophoresis analysis'. *Electrophoresis*, 17, p813-829.
- Raha, S.K., Roy, S. K. Dey, Chakrabarty, S., L. (1990) 'Purification and properties of an L-asparaginase from *Cylindrocarpum obtusisporum* MB-10,' *Biochemistry International*, 21(6), p987–1000.
- Richardson, J. S. (1981). *Advances in Protein Chemistry*, New York: Academic Press, pp167-339.

## Références bibliographiques

- Sahu, M. K., Sivakumar, K., Poorani, E., Thangaradjou, and Kannan, L. (2007) 'Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes', *Journal of Environmental Biology*, 28, p645-650.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Achouak, W., Gardan, L. (2005) 'Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner et al. 1973) Hauben et al. 1998 and *Brenneri paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb.nov. comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp.nov. and *Dickeyazeae* sp. nov', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), p1415–1427.
- Sanches, M., Krauchenco, S., Polikarpov, I. (2007) 'Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases', *Current Chemistry and Biology*, 1, p75-86
- Sanjay, K., Veeranki, V. D., Kannan, P. (2010) 'Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428', *Prokaryotes Biochemistry*, 45, p223–229
- Sansom C. E., Jaskolski M. (1996) 'Structure, Dynamics and Electrostatics of the L-Asparaginase Catalytic Centre', *Implications for Reaction Mechanism Bioinform-stru.* 26, p17-21.
- Schmalfusks and Mothesk (1930) 'Über die fermentative Desamidierung durch *Aspergillus niger*', *Biochem Zeitsrvt* 221, p134-153.
- Senarathna, U. L., Fernando, S. S. N., Gunasekara, T. D. C. P., Weerasekera, M. M., Hewageegana, H. G. S. P., Arachchi, N. D. H., Siriwardena, H. D, Jayaweera, P. M (2017) 'Enhanced antibacterial activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticle surface modified with *Garcinia zeylanica* extract', *Chemistry Central Journal*, 11, p7.
- Siddalingshwara, K. G., Lingappa, K. (2011) 'Production and characterization of L-asparaginase-A Tumor Inhibitor', *International Journal of PharmTech Research*, 3(1), p314–319.
- Siechiehowicz, K. and Ireland, R. (1989) 'Isolation and properties of an asparaginase from leaves of *Pisum sativum*', *Phytochemistry*, 28, p2275.
- Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. (2004) 'Silver nanoparticles as antimicrobial agents: a case study on E. coli as a model for Gram negative bacteria', *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, p177-182.

Soniyamby, A. R., Lalitha, S., Praveesh, B. V., Priyadarshini, V. (2011) 'Isolation, Production and Antitumor Activity of Penicillium sp', *International Journal of Microbiology Research*, 2(3), p38-42.

Stecher, A. La., Morgantetti de Deus P, Polikarpov, I., Abrahão-Neto, Ja. (1999) 'Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment', *Pharma Acta Helv.* 74, p1-9.

Supria, D., Saptarshi, S. S., Lele, S. (2010) 'Application of Evolutionary Optimization Technique in Maximizing the Recovery of L-Asparaginase from *Erwinia carotovora* MTCC 1428', *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 5 (2), p97-105.

Swain, A.L., Jaskolski, M., Housset, D., Rao, J. K., Wlodawer, A. (1993) 'Crystal structure of E. coli asparaginase, an enzyme used in cancer therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), p1474-1478.

Thomas, D. A., O'Brien, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Wierda, W., Ravandi, F., Verstovsek, S., Jorgensen, J. L., Bueso-Ramos, C., Andreeff, M., Pierce, S., Garris, R., Keating, M. J., Cortes, J., Kantarjian, H. M. (2010) 'Chemo-Immunotherapy with a Modified Hyper-CVAD and Rituximab Regimen Improves Outcome in de novo Philadelphia Chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia', *Journal of Clinical Oncology*, 28(24), p3880-3889.

Tosa, T., Sano, R., Yamamoto, K., Nakamura, M., Chibata, I. (1971) 'L-asparaginase from *Proteus vulgaris*', *Applied Microbiology* 22, p387-392.

Tran, C. L., Aitken, R., Donaldson, K., Monteiro-Riviere, N. A., Oberdörster, E., Oberdörster, G., Stone, V. (2006) 'Overcoming Obstacles to Effective Research Design in Nanotoxicology, Proceedings of the Conference on April 24-25, 2006', *Taylor & Francis Group and the Journal of Nanotoxicology*, Cambridge/Massachusetts: USA.

Truworthy, R., Sutow, W., Pullen J. (1978) 'Repeated use of L-asparaginase in multidrug therapy of childhood leukemia', *Medical Pediatrics and Oncology*, 4, p91-7.

Van der Wolf, J. M., Nijhuis, E. H., Kowalewska, M. J., Saddler, G. S., Parkinson, N., Elphinstone, J. G., Pritchard, L., Toth, I. K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron, M., de Vos, P., Cleen-werck, I., Pirhonen, M., Garland, L., Hélias, V., Pothier, J. F., Pfluger, V., Duffy, B., Tsrör, L., Manulis, S. (2014) '*Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*)', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, p768-774.

## Références bibliographiques

Van Es T., Abuchowski, A., Palczuk, N., Davis F. (1977). 'Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol', *Journal of Biology and Chemistry*, 252, p78-81.

Wade H., Elsworth R., Herbert D., Keppie J., Sargeant K. (1968), 'A new L-asparaginase with antitumor activity', *Lancet*. 2, p76-77.

Warangkar S. C. , Khobragade C. N. , Dawane B. S., Bhosale R. B. (2009) 'Effect of dihydropyrimidine derivatives on kinetic parameters of *E. carotovora* L-asparaginase', *International Journal of Biotechnology*, 1, p5-13.

Wikman, L., Papageorgiou, A. C. (2005) 'Crystallization and preliminary crystallographic analysis of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*', *Acta Crystallogr Sect F. Struct Biol Cryst Commun* . 61, p407-409.

Wilson, K., Walker, J., (1994). *Principles and techniques of practical biochemistry (4e éd)*, Cambridge University Press: Oxford.

Wink, P. L., Bogdawa, H. M., Renard, G., Chies, J. M., Basso, L. A. (2010) 'Comparison between two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II constructions: cloning, heterologous expression, purification, and kinetic characterization', *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 2, p13-19.

Woo M. H., Hak, L. J., Storm, M. C., Evans, W. E., Sandlund, J. T., Rivera, G. K., Wang, B., Pui, C. H., Relling, M. V. (1998). 'Anti-asparaginase antibodies following *E. coli* asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia', *Leukemia*, 12(10), p15-27

Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P. (2003) 'Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots', *Nature Biotechnology*, 21(1), p41-46.

Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B., Andrivon, D. (2003). Biochemical and molecular variability among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*, 52, p28-40.

Yao, H., Vancoillie, J., D'Hondt, M., Wynendaele, E., Bracke, N., De Spiegeleer, B. (2015) 'An analytical quality by design (aQbD) approach for a L-asparaginase activity method', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, p232-239.

Zeyons, O. (2008) '*Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement*'. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Zhang, H., Chen, G. (2009) 'Potent antibacterial activities of Ag/TiO<sub>2</sub> nanocomposite powders synthesized by aone-potsol-gel method', *Environmental Science and Technology*, 34(8), p2905-2910.

## *Références bibliographiques*

Whitecar, J. J., Bodey, G., Harris, J., Freireich, E. (1969) 'Current concepts: L-asparaginase', *New England Journal of Medicine*, 282, p732.

## Annexe I

## Méthode BET

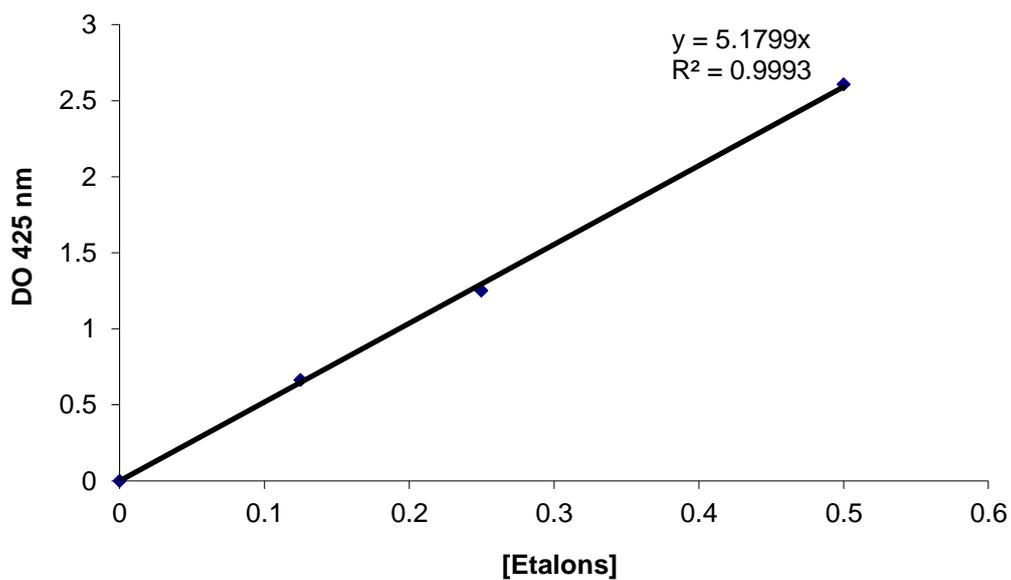
Tableau I. Conditions de la caractérisation des nanoparticules par la méthode BET

Conditions de mesure			
X-Ray	40 kV, 15 Ma	Scan speed / Duration time	4.0000 deg/min
Goniometer	MiniFlex 300/600	Step width	0.0100 deg
Attachment	Standard Sample	Scan axis	Theta/2-Theta
Filter	None	Scan range	10.0000 - 60.0000
CBO selection slit	-	Incident slit	1.250deg
Diffrected beam	Bent	Length limiting slit	10.0mm
Detector	SC-70S	Receiving slit #1	1.250deg
Scan mode	CONTINUOUS	Receiving slit #2	0.3mm

Les conditions de mesure sont les mêmes pour les nanoparticules de ZnO et de TiO<sub>2</sub>

Tableau II. Valeurs utilisées pour le tracé de la courbe d'étalonnage du sulfate d'ammonium (méthode de Nessler)

Etalons [Sulfate d'Ammonium] ppm	DO à 425 nm
0	0
0,125	0,6647
0,25	1,2521
0,5	2,6071
0,75	4,6243



**Figure 1.** Courbe d'étalonnage du sulfate d'ammonium utilisée pour déterminer l'activité enzymatique par la méthode de Nessler

## Annexe II

**Méthode de Bradford****Préparation du tampon acétate**

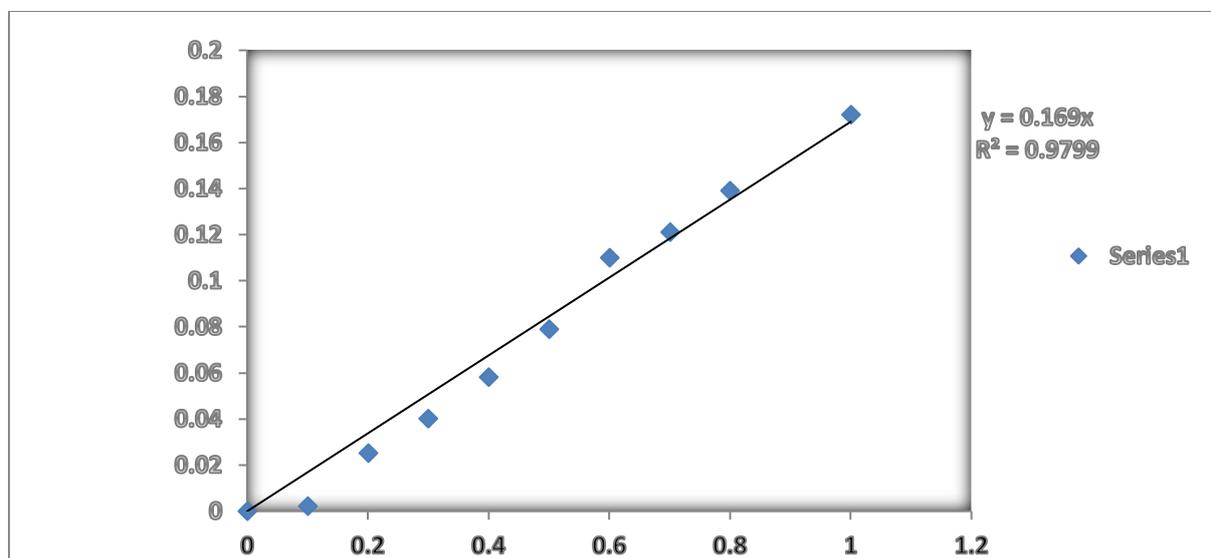
Un volume de 7,4 ml d'acide acétique a été mélangé à 17,6 ml d'acétate de sodium. Le volume a été ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à 50 ml.

**Préparation de la BSA (4 mg/ml) :**

Une masse de 0,12 g de BSA a été dissoute dans 30 ml de tampon acétate. Des dilutions ont par la suite été préparées dans le même tampon. Pour la lecture, 4 ml de réactif de Bradford ont été ajoutés à 1 ml de chaque dilution et après incubation 5 min, la lecture a été effectuée au spectrophotomètre.

**Préparation du réactif de Bradford**

Une masse de 12,5 mg de bleu de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich, Allemagne) a été solubilisée dans 6,25 ml d'éthanol absolu (Sigma-Aldrich, Allemagne). Le mélange a été vortexé puis mélangé avec 12,5 ml d'acide orthophosphorique 85% (Sigma-Aldrich, Allemagne). Le volume final a été ajusté à 500 ml avec de l'eau distillée. La solution ainsi obtenue a été filtrée avec du papier Whatman N°1, puis conservée à 4°C et à l'abri de la lumière



**Figure 1.** Courbe d'étalonnage avec la Sérum Albumine Bovine (BSA) pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

## Annexe III

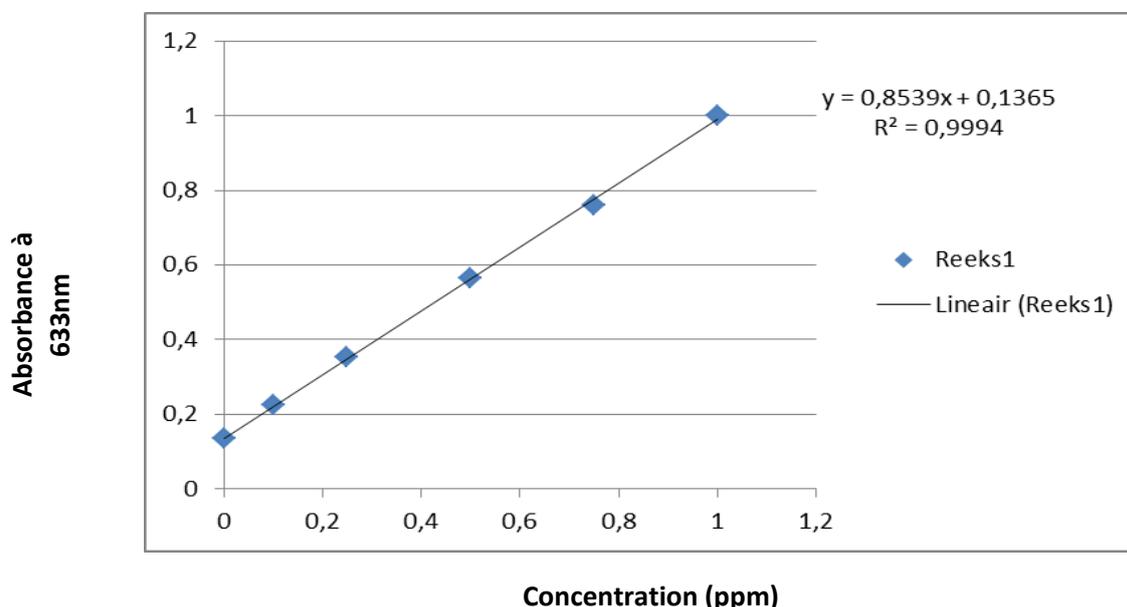
## Méthode de Berthelot

### Préparation de la solution d'ammoniaque à 1 ppm (w/v)

Une masse de 315,19 mg de chlorure d'ammonium ont été dissous dans 100 ml d'eau distillée [1000 ppm (m/v)], puis 5,0 ml de la solution à 1000 ppm (p/v) ont été pipetés dans 250,0 ml [20 ppm (m/v)], par la suite, 5,0 ml de la solution à 20 ppm (p/v) de chlorure d'ammonium ont été pipetés dans 100,00 ml d'eau distillée.

**Tableau I.** Concentrations de la solution d'étalonnage de la courbe standard de sulfate d'ammonium

Concentration de l'ammoniaque ppm w/v	Volume de la solution mère 1 ppm (ml)	Volume total (ml)
Blanc	-	-
0,10	10,0	100,00
0,25	25,0	100,00
0,50	25,0	50,00
0,75	15,0	20,00
1,00	-	-



**Figure 1.** Courbe linéaire standard de l'ammoniaque, axe y: aire de pic de l'absorbance à 633 n, axe x: concentration (0,1 ; 0,25 ; 0,5; 0,75; 1 ppm) de solution d'ammoniaque.

## **Protocole expérimental de DoE**

### **Préparation de la solution d'ammoniaque 0,5 ppm**

### **Préparation de la solution de nitroprussiate de sodium à 12,5 mg/ml**

Une masse de 125 mg de nitroprussiate de sodium est dissoute dans 10 ml d'eau distillée.

### **Expérience 1**

#### **Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 3,125g de phénol et de 1,25 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

#### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 0,9375 g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,125 ml d'hypochlorite de sodium 10 à 15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau distillée.

#### **Réaction:**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de la solution d'ammoniaque à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite, 1,0 ml d'hypochlorite alcalin a été ajouté et mélangé à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 11 min de temps de réaction à une température de réaction de 28,0°C.

### **Expérience 2**

#### **Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 3,125g de phénol et 0,75 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

#### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 1,5625g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,875 ml de d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

#### **Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite, 1,0 ml d'hypochlorite

alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 11 min de temps de réaction à une température de réaction de 28,0°C.

### **Expérience 3**

#### **Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 1,875g de phénol et 1,25 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) est dissoutes dans 50 ml d'eau.

#### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 1,5625g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,125 ml d'hypochlorite de sodium (10 à 15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

#### **Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. l'absorbance a été mesurée à 633 nm après 19 min de temps de réaction à une température de réaction de 28,0°C

### **Expérience 4**

#### **Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 3,125g de phénol et 1,25 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

#### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 0,9375g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,875 ml d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

#### **Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de 0,5 ppm solution d'ammoniaque. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 11 min de temps de réaction à une température de réaction de 46,0°C.

### **Expérience 5**

**Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 3,125g de phénol et 0,75 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) dissoutes dans 50 ml d'eau.

**Hypochlorite alcalin**

Une masse de 1,5625 g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,875 ml d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

**Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de 0,5 ppm solution d'ammoniaque. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 19 min de temps de réaction à une température de réaction de 28,0°C.

**Expérience 6**

**Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 3,125 g de phénol et 1,25 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

**Hypochlorite alcalin**

Une masse de 1,5625 g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,125 ml d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

**Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. l'absorbance a été mesurée à 633 nm après 19 min de temps de réaction à une température de réaction de 46,0°C.

**Expérience 7**

**Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 1,875g de phénol et 1,25 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

**Hypochlorite alcalin**

Une masse de 1,5625g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,875 ml d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

**Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. A a été mesurée à 633 nm après 11 min de temps de réaction à une température de réaction de 46,0°C.

**Expérience 8**

**Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 1,875g de phénol et 1,25 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) dans dissoutes 50 ml d'eau.

**Hypochlorite alcalin**

Une masse de 0,9375g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,875 ml d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

**Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 19 min de temps de réaction à une température de réaction de 28,0°C.

**Expérience 9**

**Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 1,875g de phénol et 0,75 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 0,9375g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1,875 ml d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

### **Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac (0,5 ppm). La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 19 min de temps de réaction à une température de réaction de 46,0°C.

### **Expérience 10**

#### **Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 3,125g de phénol et 0,75 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 0,9375g d'hydroxyde de sodium et un volume de 125 ml d'hypochlorite de sodium (10 à 15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

### **Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac (0,5 ppm). La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 19 min de temps de réaction à une température de réaction de 46,0°C.

### **Expérience 11**

#### **Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 1,875g de phénol et de 0,75 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 1,5625 g d'hydroxyde de sodium et un volume de 125 ml d'hypochlorite de sodium (10 à 15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

**Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 11 min de temps de réaction à une température de réaction de 46,0°C.

**Expérience 12**

**Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 1,875g de phénol et de 0,75 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

**Hypochlorite alcalin**

Une masse de 0,9375g d'hydroxyde de sodium et un volume de 125 ml d'hypochlorite de sodium (10 à 15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

**Réaction :**

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite. 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. L'absorbance a été mesurée à 633 nm après 11 min de temps de réaction à une température de réaction de 28,0°C.

**Expériences 13-14-15 Point central**

**Réactif de coloration Phénol**

Des masses de 2,5 g de phénol et d'un 1 ml de nitroprussiate de sodium (12,5 mg/ml) sont dissoutes dans 50 ml d'eau.

**Hypochlorite alcalin**

Une masse de 1,25 g d'hydroxyde de sodium et un volume de 1 ml d'hypochlorite de sodium (10 à 15%) sont mélangés dans 50 ml d'eau.

**Réaction :**

## *Annexes*

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol a été ajouté à 10,0 ml de solution d'ammoniac à 0,5 ppm. La solution est agitée pendant 30 s. Ensuite, 1,0 ml d'hypochlorite alcaline a été ajouté et on les secoue à nouveau pendant 30 s. l'absorbance a été mesurée à 633 nm au bout de 15 min de temps de réaction à une température de réaction de 37,0°C.

## Annexe V

## Détails de l'optimisation de la méthode de Berthelot (DoE)

Tableau I. Conditions d'utilisation de l'optimisation DoE CCF 14+3

Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	phenol	hypochloride	time	abs
1	N1	10	Incl	-1	-1	-1	
2	N2	7	Incl	1	-1	-1	
3	N3	17	Incl	-1	1	-1	
4	N4	14	Incl	1	1	-1	
5	N5	8	Incl	-1	-1	1	
6	N6	12	Incl	1	-1	1	
7	N7	9	Incl	-1	1	1	
8	N8	11	Incl	1	1	1	
9	N9	15	Incl	-1	0	0	
10	N10	4	Incl	1	0	0	
11	N11	2	Incl	0	-1	0	
12	N12	1	Incl	0	1	0	
13	N13	5	Incl	0	0	-1	
14	N14	6	Incl	0	0	1	
15	N15	16	Incl	0	0	0	
16	N16	13	Incl	0	0	0	
17	N17	3	Incl	0	0	0	

## Expériences utilisées pour ce modèle

**Solution de substrat:** Une masse de  $79,0 \pm 7,9$  mg de l'Asn a été dissoute dans une solution tampon phosphate pH  $7,4 \pm 0,3$  et diluée à 25 ml avec la même solution tampon. Une solution tampon de phosphate à pH  $7,4 \pm 0,3$  a été préparée en utilisant une solution de dihydrogénophosphates de potassium  $0,2 \pm 0,02$  M et une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.

**Solution d'essai (5 UI / ml):** le contenu d'un flacon (10 000 UI) a été dissous dans une solution tampon phosphate pH  $7,4 \pm 0,3$  et dilué à 2000 ml avec la même solution tampon.

**Solution d'échantillon:** 1,9 ml de solution de substrat a été chauffé à  $37,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$  pendant 3 min, 0,1 ml de solution d'essai a été ajouté et maintenu à  $37,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$ . Après 15 min, 0,5 ml de solution de TCA à 25% a été ajouté.

**Solution de l'ASNase dénaturée:** à l'exception de l'inversion de la procédure d'addition de la solution de TCA et de la solution d'essai, la solution de L-ASNases dénaturée a été préparée de la même manière que la solution d'échantillon.

### **Réactif phénol**

Des masses de 5,0 g de phénol et 25 mg de nitroprussiate de sodium sont dissoutes dans 100 ml d'eau distillée.

### **Hypochlorite alcalin**

Une masse de 2,5 g d'hydroxyde de sodium et 3 ml d'hypochlorite de sodium (10-15%) sont mélangés avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 100 ml.

### **Solution à 25% de TCA (acide trichloroacétique)**

Une masse de 2,5 g de TCA est pesée et dissoute dans 10 ml d'eau distillée.

### **Solution L-Asn**

Une masse de 79,0 mg de L-Asn a été dissoute dans une solution de tampon phosphate 0,2 M pH 7,4 et diluée dans les 25 derniers ml avec le même tampon.

Un volume de 1,0 ml de réactif colorant de phénol (50 g/l) a été ajouté à 10,0 ml (0,5 ppm) de solution d'ammoniaque, puis 1,0 ml d'hypochlorite alcalin (1,0 ml de 25 g / ml de NaOH et 3 ml de 10 g / 100 ml). Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 633 nm après un temps de réaction de 15 min à la température de réaction de  $37,0^\circ\text{C}$ .

Un volume de 1,0 ml de phénol (50 g/l) est mélangé avec 10,0 ml (0,5 ppm) de solution d'ammoniaque.

Un volume de 1,0 ml d'hypochlorite alcalin (25 g/l) est mélangé avec une solution de d'hypochlorite de sodium (30 g/100 ml).

Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 633 nm après un temps de réaction de 15 min à la température de réaction de  $37,0^\circ\text{C}$ .

**Tableau II.** Résultats des différents paramètres de l'ajustement des erreurs

Absorbance	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
<b>Total</b>	11	1,2793	0,1163			
<b>Constant</b>	1	1,15863	1,15863			
<b>Total Corrected</b>	10	0,120673	0,0120673			0,109851
<b>Regression</b>	6	0,119173	0,0198621	52,9655	<b>0,001</b>	0,140933
<b>Residual</b>	4	0,0015	0,000375001			0,0193649
<b>Lack of Fit (Model Error)</b>	2	0,00123334	0,000616669	4,62501	<b>0,178</b>	0,0248328
<b>Pure Error (Replicate Error)</b>	2	0,000266667	0,000133333			0,011547
	N = 11	Q2 =	0,690	Cond. no. =	3,05	
	DF = 4	R2 =	0,988	Y-miss =	0	
		R2 Adj. =	0,969	RSD =	0,01936	

**Tableau III.** Les coefficients d'erreurs trouvées dans l'analyse DoE

Absorbance	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
Constant	0,343333	0,00731926	1,2355e-006	0,0203216
Cphen	-0,12	0,00944913	0,000221438	0,0262351
CNaOH	-0,0033333	0,010351	0,76356	0,0287391
Cnitr	-0,00916668	0,00731926	0,27865	0,0203216
con	0,05	0,00871166	0,00456587	0,0241876
Time	0,108333	0,00944913	0,000330338	0,0262351
temp	0,0108333	0,00731926	0,212947	0,0203216
<b>N = 11</b>	Q2 =	0,690	Cond. no. =	3,05
<b>DF = 4</b>	R2 =	0,988	Y-miss =	0

	R2 Adj. =	0,969	RSD =	0,01936
			Conf. lev. =	0,95

## Annexe VI

## Résultats de la BET

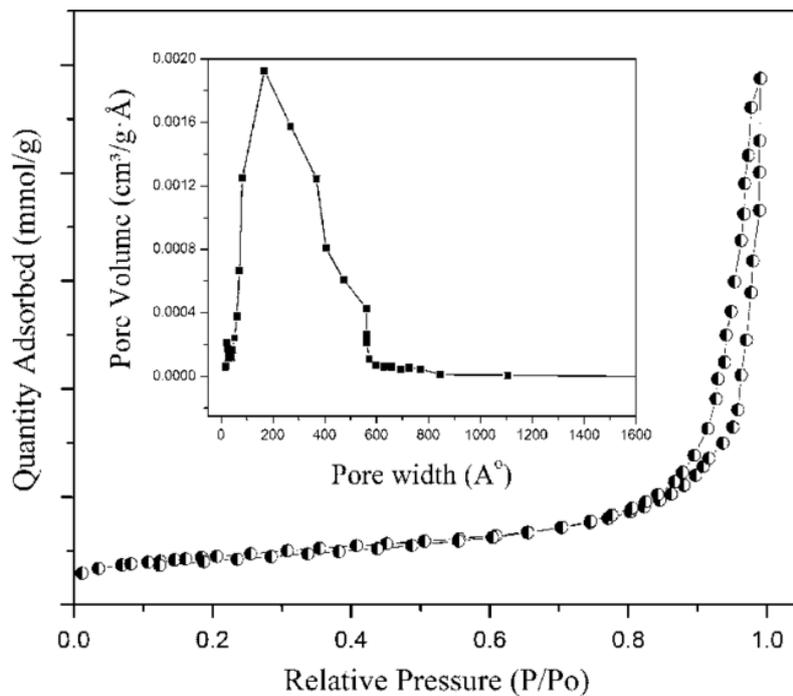
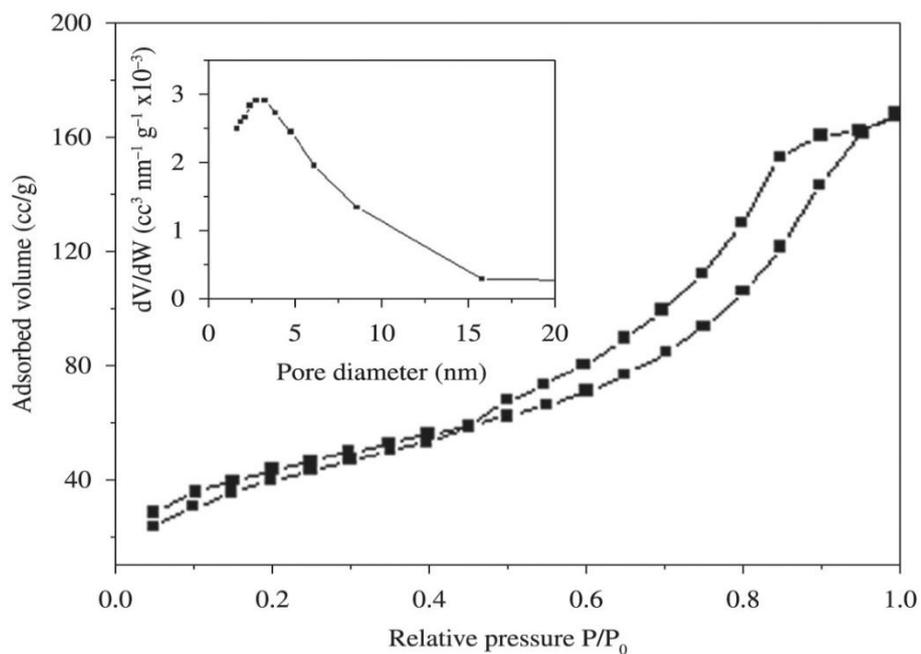
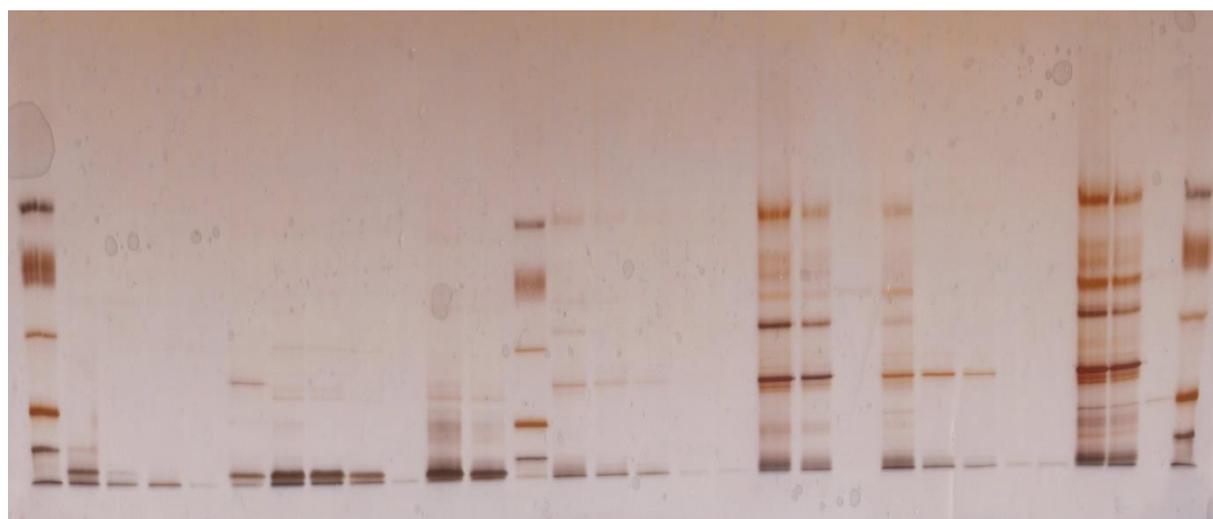


Figure 1. Surface spécifique des nanoparticules de ZnO



**Figure 2.** Surface spécifique des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>**Annexe VII****Résultats électrophorétique de la purification**

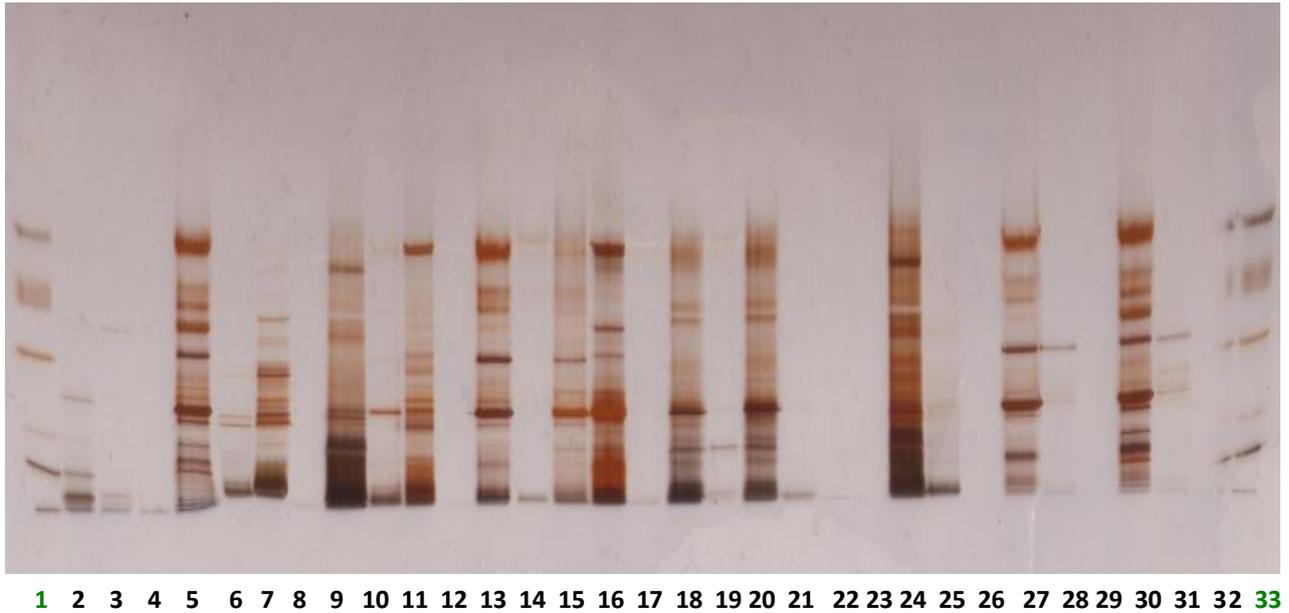
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

**Figure 1.** Gel d'électrophorèse coloré à l'Argent après purification des échantillons par la chromatographie ACTA Prime Fast flow**Tableau I.** Distribution des différentes fractions électrophorétiques issues de la chromatographie ACTA Prime fast flow sur le gel

<b>1. Std</b>	7. Extract total PCC + ASN	<b>13. Std</b>	19. PIII	25. PII
2. Extract total PCC	8. PI	14. Extrait total DS	20. PIII dilued 2x	26. PII dilued 2x
3. Pis	9. PI diluted 2x	15. PI	21. PIV	27. PIII
4. PIs dilued 2x	10. PII	16. PI diluted 2x	22. Extrait total DS + ASN	28. PIII dilued 2x
5. PIIs	11. PIII	17. PII	23. PI	29. PIV
6. PIIIs	12. PIII dilué 2x	18. PII dilué 2x	24. PI dilué 2x	<b>30. Std</b>

L'image montre le gel d'électrophorèse des différents pools obtenu après purification de la L-asparaginase sur Hi-TrapQ-Sepharose Fast Flow couplé au système AKTAprime: nous avons commencé notre travail avec deux souches bactériennes: PCC: *Pectobacterim carotovorum* ssp 88.22 et DS: *Dickeya solani*.

Std: Proteines standars, ASN: Asparagine (substrat).



**Figure 2.** Gel d'électrophorèse coloré à l'Argent après purification des échantillons par la chromatographie Superdex 75pg

**Tableau II.** Distribution des différentes fractions électrophorétiques issues de la chromatographie Superdex 75 pg sur le gel

<b>1. Std</b>	<b>10.</b> Extract total DS	<b>19.</b> PIV cc	<b>28.</b> PIIa du PIII-DS Superdex
<b>2.</b> Extract total PCC	<b>11.</b> PI cc	<b>20.</b> PI du PIII-PCC Superdex	<b>29.</b> PI Ib du PIII-DS Superdex
<b>3.</b> PIs cc	<b>12.</b> PII cc	<b>21.</b> PIIa du PIII-PCC Superdex	<b>30.</b> PI du PIII-DS+ASN Superdex
<b>4.</b> PIIs cc	<b>13.</b> PIII cc	<b>22.</b> PI Ib du PIII-PCC Superdex	<b>31.</b> PIIa du PIII-DS+ASN Superdex
<b>5.</b> PIIIs cc	<b>14.</b> PIV cc	<b>23.</b> PI Ic du PIII-PCC Superdex	<b>32.</b> PI Ib du PIII-DS+ASN Superdex
<b>6.</b> Extrait total PCC + ASN	<b>15.</b> Extrait total DS + ASN	<b>24.</b> PI du PIII-PCC+ASN Superdex	<b>33. Std</b>
<b>7.</b> PI cc	<b>16.</b> PI cc	<b>25.</b> PIIa du PIII-PCC+ASN Superdex	
<b>8.</b> PII cc	<b>17.</b> PII cc	<b>26.</b> PI Ib du PIII-PCC+ASN Superdex	
<b>9.</b> PIII cc	<b>18.</b> PIII cc	<b>27.</b> PI du PIII-DS Superdex	

L'image montre le gel d'électrophorèse des différents pools obtenus après purification de la L-asparaginase par filtration sur gel FPLC sur Superdex75 pg couplé au système AKTAprime: nous avons commencé notre travail avec deux souches bactériennes: PCC: *Pectobacterim carotovorum* ssp. 88.22 et DS: *Dickeya solani*.

Std: Protéines standards, ASN: Asparagine (substrat), cc: concentrée.



## Résumé

Ce travail se divise en deux grandes parties. La première partie s'intéresse à l'évaluation des effets des nanoparticules sur l'activité de la Lasparaginase, nous avons cherché à vérifier si les souches bactériennes de *Dickeya solani* ont été en mesure de produire cette enzyme et d'évaluer l'effet des nanoparticules. Les résultats obtenus montrent que les nanoparticules ont augmenté ZnO l'activité de L-asparaginase par un facteur de 2,5 et de 6.0 pour les TiO<sub>2</sub>. La deuxième partie du travail s'est focalisé sur le pouvoir antibactérien des nanoparticules en effet, au cours du siècle dernier, la stratégie généralisée pour prévenir la contamination microbienne et de tuer les micro-organismes consistait à ajouter des antibiotiques. Cependant, l'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques a incité les chercheurs à se tourner vers des solutions alternatives. Les effets antibactériens de différentes concentration allant de 0,1, jusqu'à 1,5% de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et ZnO sont utilisées dans trois souches bactériennes analysées *E.coli*, *Staphylococcus*. Sur la base de cette étude, nous avons montré que les nanoparticules de ZnO d'un diamètre de 60nm, ont une plus petite MIC que des nanoparticules d'argent ayant un diamètre compris entre 8 et 40 nm contre *Staphylococcus*. Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> avec 13 nm de diamètre ont montré une meilleure CIM contre *Salmonella* par rapport aux nanoparticules d'argent, et inhibent également les bactéries phytopathogènes de l'espèce *Dickeya solani*.

**Mots clés :** Nanoparticules, TiO<sub>2</sub>, ZnO, L-asparaginase, *Dickeya solani*, activité enzymatique, méthode de Berthelot, activité antibactérienne.

## Abstract

This work is divided into two main parts. The first part is concerned with the evaluation of the effects of nanoparticles on the activity of L-asparaginase, we sought to verify whether the bacterial strains of *Dickeya solani* were able to produce this enzyme and to evaluate the effect of nanoparticles. The results obtained show that the nanoparticles increased ZnO the activity of L-asparaginase by a factor of 2.5 while 6.0 for TiO<sub>2</sub>. The second part of the work focused on the antibacterial power of nanoparticles indeed, during the last century, the general strategy to prevent microbial contamination and kill microorganisms was to add antibiotics. However, the emergence of bacterial resistance to antibiotics has prompted researchers to turn to alternative solutions. The antibacterial effects of different concentrations ranging from 0.1 to 1.5% of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles are used in three bacterial strains analyzed *E.coli*, *Staphylococcus*. Based on this study, we have shown that ZnO nanoparticles with a diameter of 60nm have a smaller MIC than silver nanoparticles with a diameter between 8 and 40 nm against *Staphylococcus*. TiO<sub>2</sub> nanoparticles with 13 nm in diameter showed better MIC against *Salmonella* compared to silver nanoparticles, and inhibited phytopathogenic bacteria of the *Dickeya solani* species.

**Keywords:** Nanoparticles, TiO<sub>2</sub>, ZnO, L-asparaginase, *Dickeya solani*, enzymatic activity, Bertholt method, antibacterial activity.

## ملخص

ينقسم هذا العمل إلى قسمين رئيسيين. يتعلق الجزء الأول بتقييم آثار الجسيمات النانوية على نشاط الأسباراجيناز ، سعينا للتحقق مما إذا كانت السلالات البكتيرية من ديكيا سولاني قادرة على إنتاج هذا الإنزيم وتقييم التأثير الجسيمات النانوية. أظهرت النتائج التي تمركز الجزء الثاني من العمل. TiO<sub>2</sub> نشاط الأسباراجيناز بعامل 2.5 و 6.0 لـ ZnO الحصول عليها أن الجسيمات النانوية زادت من على القوة المضادة للبكتيريا للجسيمات النانوية بالفعل ، خلال القرن الماضي ، كانت الاستراتيجية العامة لمنع التلوث الميكروبي وقتل الكائنات الحية الدقيقة هي إضافة المضادات الحيوية. ومع ذلك ، فقد دفع ظهور المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية الباحثين إلى اللجوء إلى حلول بديلة. يتم استخدام التأثيرات المضادة للبكتيريا لتركيزات مختلفة تتراوح من 0.1 إلى 1.5% من الجسيمات النانوية استنادًا إلى هذه الدراسة ، أظهرنا أن *E.coli* و *Staphylococcus* في ثلاث سلالات بكتيرية تم تحليلها ZnO و TiO<sub>2</sub> أصغر من الجسيمات النانوية الفضية التي يتراوح قطرها بين 8 و MIC التي يبلغ قطرها 60 نانومتر لديها ZnO الجسيمات النانوية أفضل ضد السالمونيلا MIC التي يبلغ قطرها 13 نانومتر TiO<sub>2</sub> 40 نانومتر ضد المكورات العنقودية. أظهرت الجسيمات النانوية مقارنة بالجسيمات النانوية الفضية ، كما أنها تمنع البكتيريا الممرضة للنبات من أنواع ديكيا سولاني.

**الكلمات الرئيسية:** الأسباراجيناز. ديكيا سولاني النشاط الأنزيمي؛ نشاط مضاد للجراثيم. ZnO ؛ TiO<sub>2</sub> جسيمات نانوي؛