

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA –BEJAIA-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique



MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue d'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème

Production de l'asparaginase par deux souches
bactériennes *Pectobacterium c. ssp carovotorum*
et *Dickeya sp*

Membres de Jury

Président : Mr Zaidi F. (MCA, UAMB)

Présenté par : M^{elle} Allouache Selma

Promotrice : M^{me} Zaidi-Yahiaoui R. (PROF, UAMB)

Examinatrice : M^{me} Bedjou F. (MCA, UAMB)

Examinatrice : M^{me} Boucherba N. (MCB, UAMB)

2011/2012

Remerciements

En premier lieu, je remercie Dieu le tout puissant pour son aide et de nous avoir donné volonté, courage et patience.

Je tiens à remercier Mr Zaidi de m'avoir recueilli dans son laboratoire, de m'avoir consacré son temps et de me faire l'honneur de présider et d'honorer ma soutenance par sa présence.

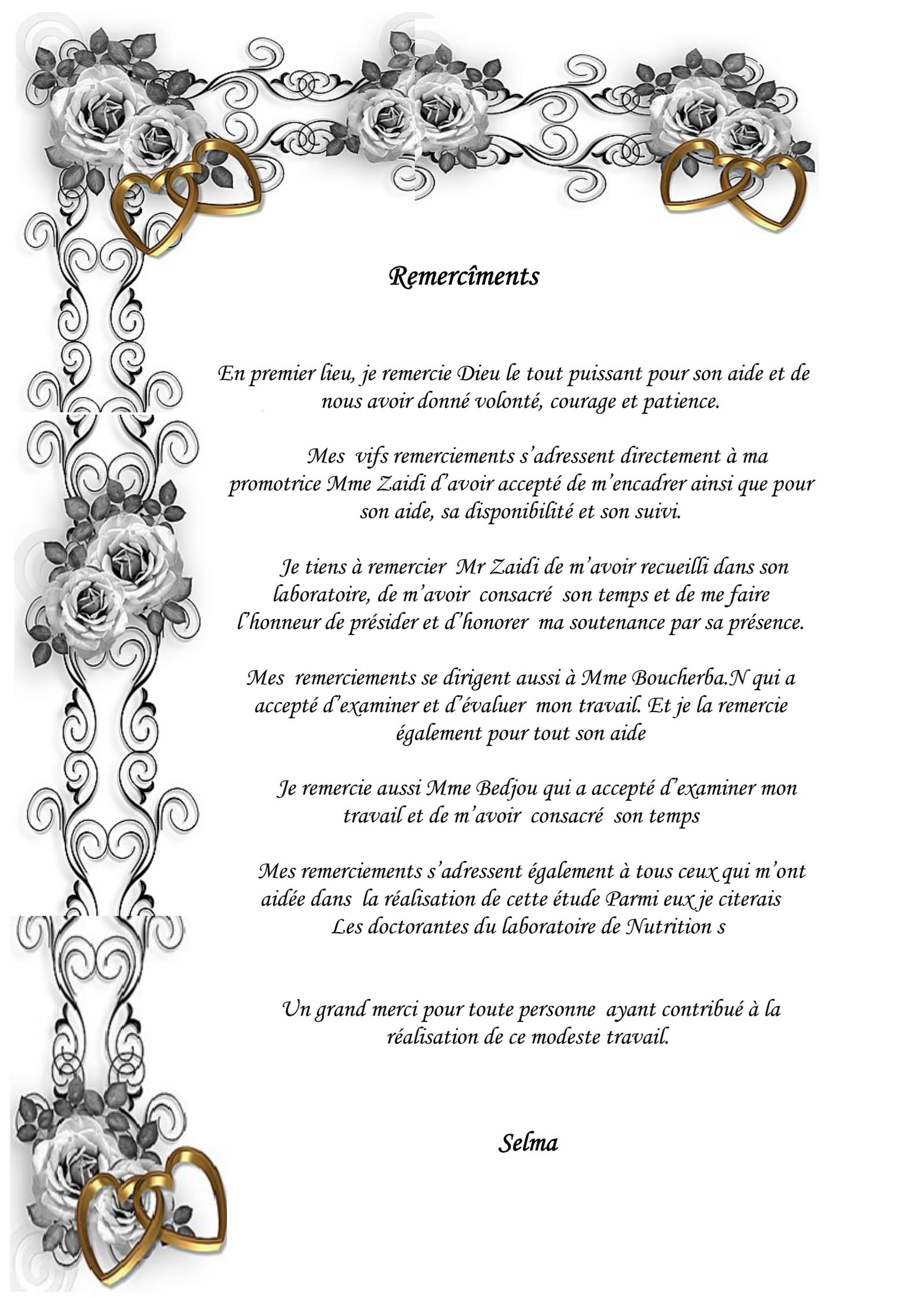
Mes remerciements se dirigent aussi à Mme Boucherba.N qui a accepté d'examiner et d'évaluer mon travail. Et je la remercie également pour tout son aide

Je remercie aussi Mme Bedjou qui a accepté d'examiner mon travail et de m'avoir consacré son temps

Mes vifs remerciements s'adressent directement à ma promotrice Mme Zaidi d'avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour son aide, sa disponibilité et son suivi.

*Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de cette étude Parmi eux je citerais
Les doctorantes du laboratoire de Nutrition*

Belra



Remercîments

En premier lieu, je remercie Dieu le tout puissant pour son aide et de nous avoir donné volonté, courage et patience.

Mes vifs remerciements s'adressent directement à ma promotrice Mme Zaidi d'avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour son aide, sa disponibilité et son suivi.

Je tiens à remercier Mr Zaidi de m'avoir recueilli dans son laboratoire, de m'avoir consacré son temps et de me faire l'honneur de présider et d'honorer ma soutenance par sa présence.

Mes remerciements se dirigent aussi à Mme Boucherba.N qui a accepté d'examiner et d'évaluer mon travail. Et je la remercie également pour tout son aide

Je remercie aussi Mme Bedjou qui a accepté d'examiner mon travail et de m'avoir consacré son temps

*Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de cette étude Parmi eux je citerais
Les doctorantes du laboratoire de Nutrition s*

Un grand merci pour toute personne ayant contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Selma

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1.Historique.....3

I.2. Considération générale sur l'asparaginase.....4

I.2.1. Source.....4

I.2.2. Importance de l'asparaginase.....4

I.2.3 La structure cristalline de l'asparaginase.....6

I.2.3.1. Caractères structuraux communs des asparaginases.....6

I.2.3.2. Le dimère intime.....6

I.2.3.3. Structure d'un monomère de l'asparaginase d'Erwinia.....8

I.2.4. Mécanisme d'action9

I.2.4.1. Hydrolyse de l'asparaginase.....9

I.2.4.2. L'activité glutaminasique.....9

I.3. Les différentes sources et formes de L-asparaginase10

I.3.1. L-Asparaginase issue d'*Escherichia coli*.....10

I.3.2. Autres type d'Asparaginase issue d'*E. coli*11

I.3.3. L-Asparaginase produites par les *Erwinia*12

I.3.3.1. Description des *Erwinia pectinolytiques*12

I.3.3.2. Production d'enzymes	12
I.3.3.3. Séquence génétique de l'asparaginase d' <i>Erwinia</i>	13
I.4. Propriétés thérapeutiques	13
I.4.1. Effet de l'asparaginase sur la Leucémie lymphoblastique aigue	14
I.4.2. Protection de certains aliments contre l'acrylamide	15
I.5. Effet indésirables et toxicité	16
I.5.1. L'hypersensibilité	16
I.5.2. Perturbation hépatique	17
I.5.3. Troubles de l'hémostase	18
I.5.4. Neurotoxicité	18
I.5.5. Toxicité gastro-intestinale	18

Chapitre II : Etude Expérimentale

II.1 Matériel et méthodes

II.1.1. Matériel biologique.	19
II.1.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	19
II. 1.3. Etapes de production de l'asparaginase.....	19
II.1.3.1. Préparation du bouillon nutritif et culture bactérienne.....	19
II.1.3. 2. Filtration	20
II.1.3.3. Précipitation par le sulfate d'ammonium	20
II.1.3.4 Solubilisation	22
II.1.3.4. Dialyse	23

II.1.4. Révélation de l'activité de l'asparaginase	24
II.1.5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford, 1976	25
II.1.6. Analyses des protéines par SDS-PAGE.....	25
II.1.6.1. Préparation des gels d'électrophorèse.....	26
II.1.6.2. Migration électrophorétique	26
II.1.6.3. Révélation	27

II.2. Résultats

II.2.1. Obtention de colonies bactériennes.....	28
II.2.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium à différentes saturations.....	29
II.2.3. Dialyse	30
II.2.4. Mise en évidence de l'activité asparaginase	30
II.2.5. Teneur en protéines des extraits avant et après dialyse	31
II.2.6. Estimation du poids moléculaire de l'asparaginase par SDS-PAGE	33

II.3. Discussion générale

II.3. Discussion générale.....	34
---------------------------------------	-----------

Conclusion	36
-------------------------	-----------

Glossaire

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ASAT : Aspartate Amino Transférase

ALAT : Alanine Amino Transférase

AT III: Antithrombine III

ufc: Unité formant colonie

CFBP : Collection Française des Bactéries Phytopathogènes

ECA: *E. Coli* Asparaginase

ERA: *Erwinia* Asparaginase

FAO: Food and Agriculture Organization

JECFA: FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

IM: Intramusculaire

IV : Intraveineuse

KB : Le milieu King B

LP: Levure peptone

LLA : Leucémie lymphoblastique aigue

MTTC: Microbial Type Culture Collection

MWCO : Molecular weight cut off

NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria

NCYC: National Catholic Youth Conference

OMS : Organisation mondiale de la santé

Pcc: *Pectobacterium carotovorum ssp carotovorum*

rpm: rotation par minute

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis

SU: Sous-unité

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

m/v : Masse par volume

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Numéro de page
1	La structure tétramérique de l'asparaginase II	6
2	Structure cristalline du dimère intimes de la ECAII	7
3	Représentation schématique d'un monomère de l'asparaginase d' <i>Erwinia</i>	8
4	Illustration schématique du mécanisme de réaction de L-Asparaginase	9
5	Schéma de l'activité glutaminasique de l'asparaginase d' <i>E. Coli</i>	10
6	Mécanisme d'action de l'asparaginase dans la cellule cancéreuse	14
7	Formation du polyacrylamide à partir d'acrylamide	15
8	Schéma du principe de la dialyse	23
9	Les colonies de <i>Dickeya sp</i>	28
10	Les colonies des <i>pectobacterium</i>	28
11	Précipité obtenu après saturations de la solution protéique au sulfate d'ammonium	30
12	Réaction du réactif de Nessler avec l'ammoniac	31
13	Résultat du dosage des protéines par la méthode de Bradford	32
14	Eléctrophorégramme de l'asparaginase des deux souches bactériennes	33

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Numéro de page
I	Souches microbiennes productrices de l'asparaginase	5
II	Masse en gramme du sulfate d'ammonium à ajouter dans les différentes saturations.	21
III	Précipitation de la solution protéique produite par <i>Dickeya</i> sp	29
IV	Précipitation de la solution protéique provenant de <i>P. c</i> ssp. <i>carovotorum</i> 8822.	29
V	Résultat de la réaction avec le réactif de Nessler avant précipitation et après dialyse.	31

Introduction

L'asparaginase est largement répandue dans la nature, elle est présente non seulement dans les organes des animaux (**Prista & Kyridio, 2001**), mais aussi dans certaines plantes (**Borek & Jaskolski, 2001**) et aussi chez les champignons et bactéries (**Michalska et al., 2006**).

Les bactéries pectinolytiques (*Pectobacterium* et *Dickeya* sp), 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 propriété thérapeutique.

Le potentiel thérapeutique de l'asparaginase est bien établi, car il a induit la guérison de la plupart des patients souffrant de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA). Il a été également employé pour le traitement du lymphosarcome et dans beaucoup d'autres expériences cliniques concernant le traitement des tumeurs en combinaison avec la chimiothérapie (**Sonyamby et al., 2011**). Par ailleurs, des travaux récents ont montré également l'efficacité de cette enzyme dans la réduction de l'acrylamide, produit cancérigène qui se trouve dans beaucoup d'aliment (**Anese et al., 2011**).

Il y a deux formes d'asparaginase: L-asparaginase I, une enzyme constitutive intracellulaire, et L-asparaginase II, une enzyme extracellulaire qui est sécrétée en réponse à un épuisement d'azote. Les deux enzymes sont biochimiquement et génétiquement distincts. La L-asparaginase II est largement distribuée dans les cellules procaryotes et eucaryotes et a été intensivement étudiés 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-asparaginase sérologiquement différentes, mais ayant un même effet thérapeutique est souhaitée.

L'intérêt d'utiliser les enzymes microbiennes, est la possibilité d'obtenir une quantité non négligeable du matériel utilisable à partir de cette source. La biotechnologie offre de nombreuses perspectives pour une valorisation du potentiel enzymatiques des diverses souches bactériennes pour répondre aux demandes croissantes de ce produit.

Parmi toutes les asparaginases produites par les bactéries, seule l'asparaginase d'*Escherichia coli* (EcAII) et d'*Erwinia chrysanthemi* (ErA) est appliquée d'un point de vue clinique (Aghaiypour et al, 2001).

La synthèse bibliographique va englober des généralités sur l'asparaginase à savoir : sa structure cristalline, son mécanisme d'action, les différentes formes de l'enzyme, ses effets thérapeutiques ainsi ses effets indésirables.

Dans cette étude on s'intéressera aux *Erwinia* pectinolytique en raison de leur disponibilité au sein du laboratoire de Nutrition-alimentation. L'objectif de cette étude est de rechercher si les souches ont la capacité de synthétiser et de produire l'asparaginase. Pour cela une mise au point méthodologique s'impose. Elle consiste en une mise en culture de la bactérie dans un milieu producteur de cette enzyme suivie de sa purification. Deux souches ont fait l'objet de cette étude ; il s'agit de *Pectobacterium carovotorum* 88.22 et *Dickeya sp* 3739.

I.1. Historique

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. Les expériences de **Clementi (1922)** rapportées par **Michalska & 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 du sérum de 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 antilymphome du sérum de cochon d'Inde est due à la L-asparaginase. Plutard, Campbell, Mashburn et Wriston montrent que la L-asparaginase issue de la bactérie *Escherichia coli* est dotée d'un même potentiel antitumoral que pour celle isolée du sérum de cochon d'inde cité par **Campbell & 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 d'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 (**Dolowy et al., 1966**).

Par la suite, les études cliniques de phase I et II se sont concentrées sur la L-asparaginase issue de *E. Coli*. Les taux de réponses chez les enfants et adultes atteints de LLA et 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, 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 (**Imada et al., 1973**).

I.2. Considération générales sur l'asparaginase

I.2.1. Source

La demande croissante en plus grandes quantités de l'enzyme pour des études cliniques a favorisé la recherche de nouvelles L-asparaginases à partir de divers organismes tels que les micro-organismes : mycobactéries, levures, plantes et plasma de quelques vertébrés (**Prathusha, 2010**).

En plus de *E. coli* (**Derst et al ., 1994**), de nombreux autres microorganismes sont capables de produire l'asparaginase : *Erwinia carotovora* (**Aghaipour et al ., 2001**), *Erwinia chrysanthemi* (**Kotzia & Labrou, 2007**) *Enterobacter aerogenes* (**Mukherjee et al ., 2000**), *Pseudomonas aeruginosa* (**El Bessoumy et al ., 2004**), *Candida utilis* (**Kil et al ., 1995**), *Staphylococcus aureus* (**Muley et al ., 1998**), *Thermus thermophilus* (**Prista & Kyridio, 2001**). Les différentes espèces et sous espèces bactériennes et fongiques capables de produire cette enzyme sont présentées dans le **tableau I**.

I.2.2. Importance de l'asparaginase

Les asparaginases isolées à partir d'*Escherichia coli* (ECA) et d'*Erwinia chrysanthemi* (ERA) sont d'un grand intérêt thérapeutique. Elles sont utilisées comme agent antileucémique (**Hill et al ., 1967**) et dans le traitement des lymphosarcomes (**Borek & Jaskólski, 2001**).

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 organismes, des bactéries aux mammifères. Chez les plantes, L-asparagine est le métabolite le plus abondant pour le stockage et le transport de l'azote qui est utilisé dans la biosynthèse de protéines (**Borek & Jaskólski, 2001**).

Dans le corps humain, 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 & Jaskólski, 2001**).

Tableau I: Microorganismes producteurs de l'asparaginase

Microorganismes	Références
<i>Penicillium camemberti</i>	(Dox, 1909) cité par (Imada <i>et al.</i> , 1973)
<i>Aspergillus niger</i>	(Bach, 1928; Schmalfluss & Mothes, 1930) cité par (Imada <i>et al.</i> , 1973)
<i>Brucella abortu</i>	(Altenbern & Housewright, 1954)
<i>E. coli</i>	(Howard & James., 1968)
<i>Erwinia carotovora</i>	(Aghaiypour <i>et al.</i> , 2001)
<i>Erwinia carotovora</i> NCYC 1526	(Georgia <i>et al.</i> , 2005)
<i>Enterobacter aerogenes</i> MTCC 2823	(Baskaret <i>et al.</i> , 2011)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	(Juan <i>et al.</i> , 1990)
<i>Candida utilis</i>	(Kil <i>et al.</i> , 1995)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Muley <i>et al.</i> , 1998)
<i>Thermus thermophilus</i>	(Prista & Kyridio., 2001)
<i>Pisum sativum</i>	(Siechiechowcicz & Ireland., 1989).
<i>Thermus aquaticus</i> ,	(Curran <i>et al.</i> , 1985)
<i>Vibrio succinogenes</i>	(David <i>et al.</i> , 1974)
<i>Citrobacter freundii</i>	(Davidson <i>et al.</i> , 1977)
<i>Streptomyces griseus</i>	(Dejong., 1972)
<i>Erwinia aroideae</i> NRRL B-138,	(Liu and Zajic., 1972)
<i>Proteus vulgaris</i>	(Tosa <i>et al.</i> , 1971)
<i>Zymomonas mobilis</i>	(Pinheiro <i>et al.</i> , 2001)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(Golden <i>et al.</i> , 1985)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 50071	(El-Bessoumy <i>et al.</i> , 2004)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	(Baskar & Renganathan, 2009)
<i>Streptomyces tendae</i> TK-VL_333	(Naturforsch, 2010)
<i>Aspergillus sp.</i> VS-26	(Sreenivasulu <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacillus cereus</i> MNTG-7	(Sunitha <i>et al.</i> , 2010)
<i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB 1125	(David <i>et al.</i> , 1988)
<i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB1066	(Harry <i>et al.</i> , 1986)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	(Baskar & Renganathan, 2009)
<i>Streptomyces tendae</i> TK-VL_333	(Kavitha & Vijayalakshmi, 2010)
<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i> MB-10	(Raha <i>et al.</i> , 1990)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-405	(Manna <i>et al.</i> , 1995)
<i>Erwinia aroideae</i> NRRL B-138	(Liu et Zajic, 1972)

I.2.3. Structure tridimensionnelle

I.2.3.1. Caractères structuraux communs des asparaginases

La structure cristalline de l'asparaginase des deux bactéries ECAII (Swain *et al.* , 1993) et ERA (Miller *et al.* , 1993) est bien déterminée. Ces deux enzymes sont actives comme homotétramères (figure1), 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, qui forme un "berceau" pour le site actif (Palm *et al.* , 1996).

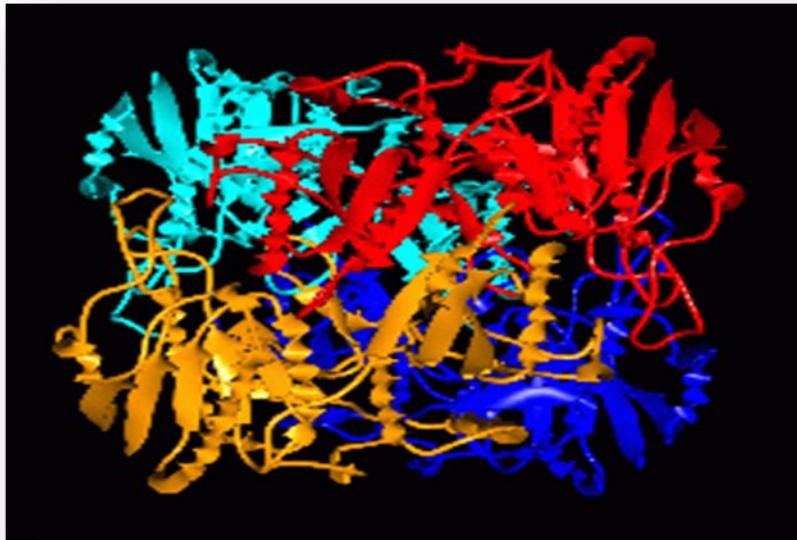


Fig.1 : Structure tétramérique de l'asparaginase II (périplasmique) d'*E. Coli*
(Wikman & Papageorgiou, 2005)

I.2.3.2. Le dimère intime

Le tétramère est constitué d'une paire de dimères, il peut être décrit comme un "dimères intime" (figure 2). Chaque "dimère intime" contient deux sites actifs, et chaque site actif contient certains résidus des deux monomères 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 de L-asparaginase, 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 primaire. Ils sont nécessaires à l'activité, et ni les données cinétiques, ni de structure n'ont encore été capable de montrer qui est le nucléophile primaire le plus probable (Palm *et al.*, 1996).

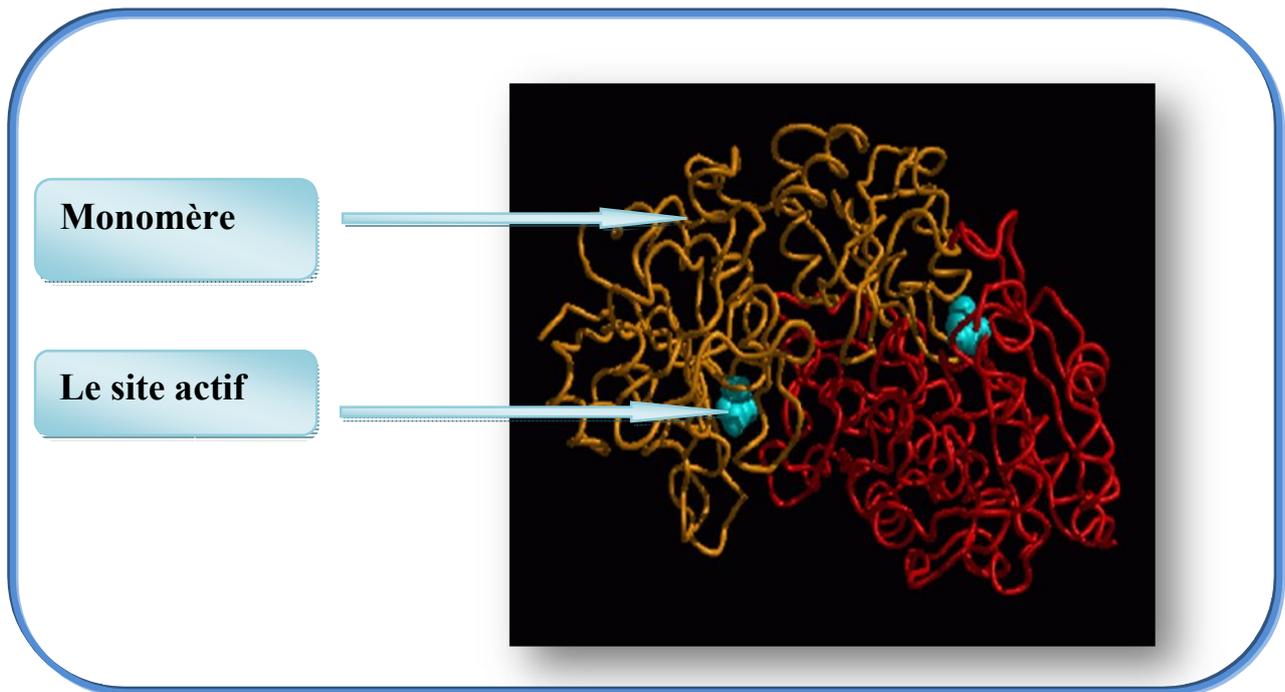


Fig. 2: Structure cristalline du dimère intime de la CEAI (Swain *et al.*, 1993)

Le site actif est situé entre le domaine de 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. Glu283 de la sous-unité adjacente, elle joue un rôle crucial en aidant à la liaison au substrat (Prathusha, 2010).

I.2.3.3. Structure d'un monomère de l'asparaginase d'*Erwinia*

Les études structurales de L - asparaginases ont mené aux descriptions détaillées de leurs dispositifs structuraux communs. Toutes les L- asparaginases II de type bactérien sont actives en homo-tétramères avec la symétrie 222 et une masse moléculaire dans la gamme de 140 à 150kDa. Chaque monomère (Figure 3) se compose d'environ 330 résidus d'acides aminés qui forment 14 feuillets β et huit hélices α , disposées dans deux domaines facilement identifiables, le plus grand domaine est le N-terminal et le plus petit domaine est le C-terminal, relié par un composant de 20 résidus.

Un croisement gaucher entre le quatrième et le cinquième feuillet β du domaine de 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 L - l'asparaginase fait intervenir Ala120ErA, un résidu qui joue un rôle important dans le recyclage du substrat/produit (Aghaiypour *et al.*, 2001).

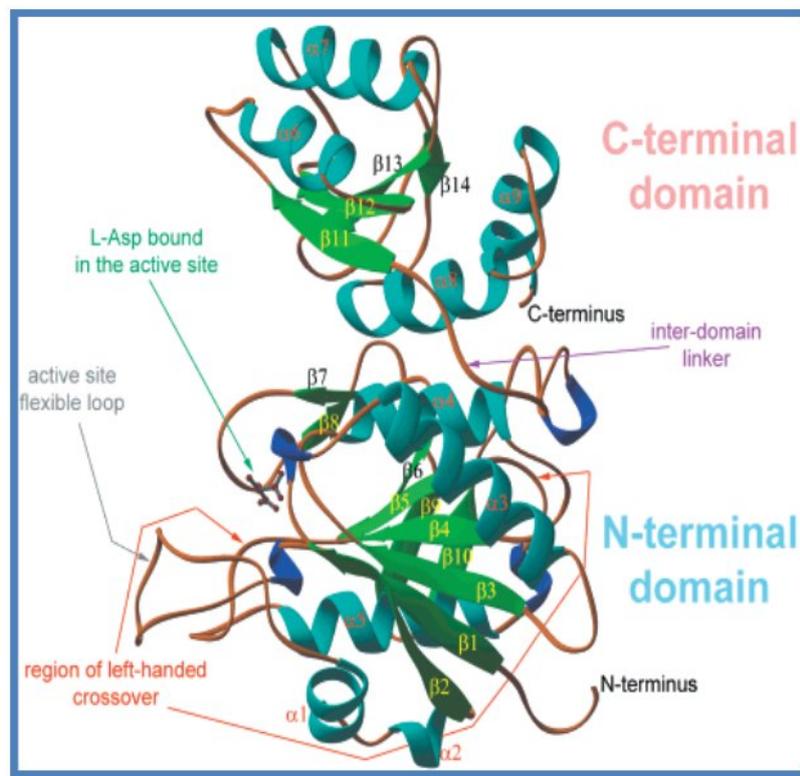


Fig.3 : Représentation schématique d'un monomère de l'asparaginase d'*Erwinia* (Aghaiypour *et al.*, 2001)

I.2.4. Mécanisme d'action

I.2.4.1. Hydrolyse de l'asparagine

L-asparaginase catalyse l'hydrolyse de la L-asparagine en L-aspartate et ammoniac. Le mécanisme d'action précis de la L-asparaginase 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 & Jaskolski, 1996**).

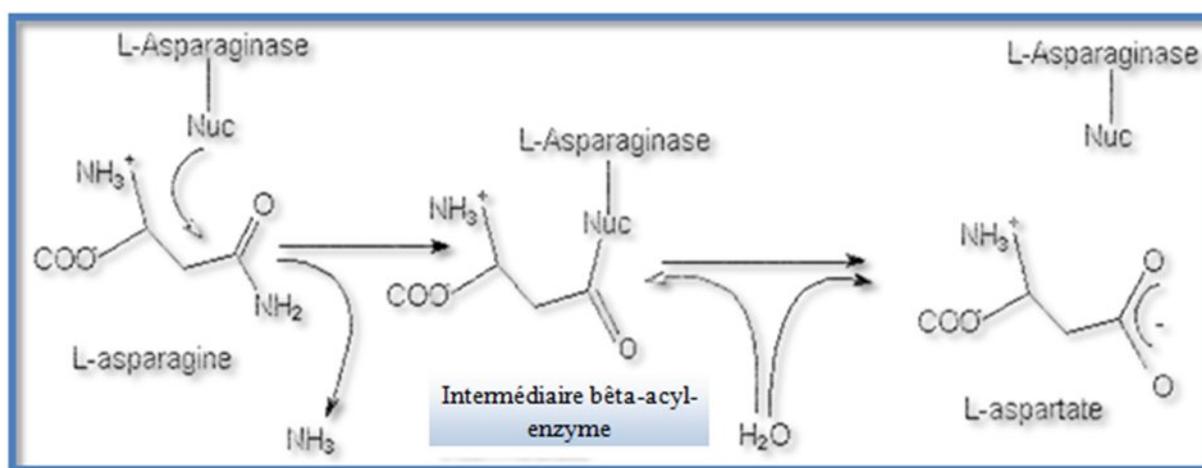


Fig. 4: Illustration schématique du mécanisme de réaction De L-asparaginase (**Hill et al ., 1967**)

I.2.4.2. Activité glutaminasique

Le traitement avec l'asparaginase d'*E.coli* peut être associé à des effets secondaires graves, qui sont soupçonnés d'être liés à leur activité glutaminasique (figure 5). Afin d'être en mesure de concevoir, à cette activité glutaminasique indésirables, et augmenter l'affinité de l'asparaginase (qui est une caractéristique de la valeur thérapeutique dans les asparaginases bactériennes), il est nécessaire de bien comprendre la structure et le mécanisme de cette enzyme (**Distasio et al ., 1982**).

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 une autre propriété de l'enzyme, variable selon la forme, qui a aussi le pouvoir d'hydrolyser la L-glutamine en acide

glutamique. Cette activité glutaminasique contribue à augmenter l'activité antitumorale de l'enzyme. 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).

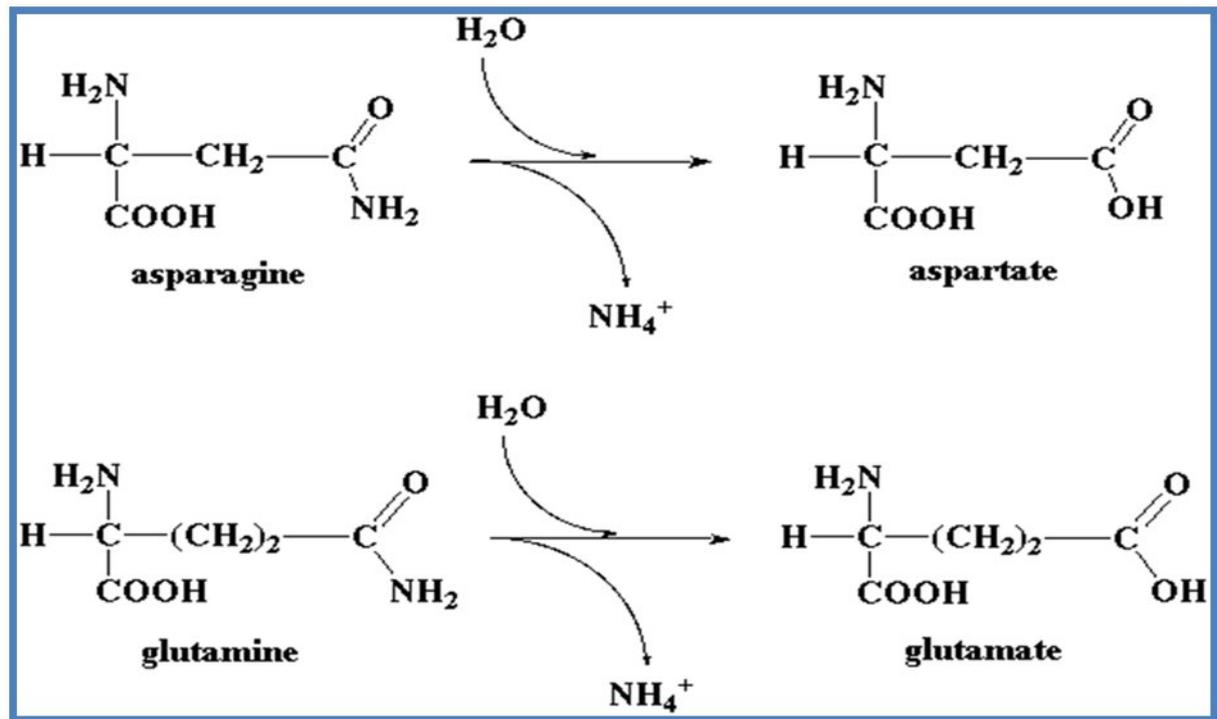


Fig.5 : Schéma de l'activité glutaminasique de l'asparaginase d'*E. coli* (Miller *et al.*, 1969).

I.3. Les différentes sources et formes de L-asparaginase

I.3.1. L-Asparaginase issue d'*Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) est la première souche bactérienne à avoir été utilisée pour produire l'asparaginase en clinique. Cette bactérie a produit deux types de L-asparaginase, EC-I et EC-II, mais seule EC-II à une activité antitumorale. Son poids moléculaire est de 138000 à 141000 daltons. 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^o et est fabriquée par Aventis pharma (**Wool et al ., 1998**).

I.3.2. Autres types d'Asparaginases issues d'*E. coli*

La pegaspargase est la dernière forme disponible de l'enzyme. Il s'agit de l'asparaginase produite par l'*Escherichia coli* sur laquelle ont été greffés, par liaison covalente, des unités de monométhoxypolyéthylène glycol de poids moléculaire de 5000 daltons. 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 immunitaires tout en gardant ses propriétés antitumorales, rapporté par **Narta et al. (2007)**.

De nombreuses expériences ont été réalisées à la fin des années 70 par Abuchowski, rapportées **Abuchoowski et al. (1984)**, 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 antitumorale 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.

La pegaspargase est commercialisée par Rhone-Poulenc Rorer sous le nom d'Oncaspar^o. 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**)

La production commerciale de l'enzyme est portée principalement sur les deux espèces : *E.coli* et *Erwinia*. L-asparaginase d'*E.Coli* est associé aux implications immunologiques résultantes de l'activité de glutaminase. Puisque les enzymes isolés 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-asparaginase dotées d'une grande efficacité et de moindres complications immunologiques. Cependant, de tels effets secondaires sont complètement absents avec 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, L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* s'est avérée utile dans les tests cliniques en tant qu'alternative à celle d'*E. Coli* (**Benny & Muraleedharan, 1991**).

I.3.3. L-Asparaginases produites par *Erwinia*

I.3.3.1. Description des *Erwinia pectinolytiques*

Les bactéries du genre *Erwinia* sont des bacilles à coloration de Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles sont mobiles grâce à des flagelles péritriches. 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 & 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, *E. carotovora* est devenue *Pectobacterium carotovorum* et *E. chrysanthemi* est nommée *Pectobacterium chrysanthemi* (**Lelliotte & Dickey, 1984**).

Les travaux menés par **Samson et al. (2005)** ont permis de transférer *Pectobacterium chrysanthemien 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*.

I.3.3.2. 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 peuvent être produites par quelques souches d'*Erwinia* ; il s'agit de l'asparaginase.

C'est la deuxième forme d'Asparaginase qui a été extraite à partir d'*Erwinia chrysanthemi* après celle obtenue par *E. coli*.

En **1968**, **Wade** fût le premier à montrer que l'activité antitumorale de l'Asparaginase de *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. Son poids moléculaire est de 138000 daltons (**Bread et al ., 1970**). Elle est disponible aux Etats-Unis sous le nom de L-Asparaginase d'*Erwinia* de Ogden BioServices pharmaceutique

référentiel. Ce produit est commercialisé au Canada et en Europe sous le nom d'Erwinase^o qui a été mise sur le marché par Speywood Pharmaceuticals Ltd. Erwinase^o a été commercialisée 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 l'asparaginase mais leurs applications en clinique restent limitées.

I.3.3.3. Séquence génétique de l'asparaginase d'*Erwinia*

Le gène de L-asparaginase d'*Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125 a été cloné et séquencé. L'ordre déduit prévoit une protéine de 327 résidus d'acides aminés précédé par un peptide de signal de 21 résidus. L'utilisation de l'asparaginase en chimiothérapie des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aigüe a augmenté l'intérêt pour la caractérisation et la production de cette enzyme.

Lee & Alen (1986) ont rapporté que L-asparaginase purifiée à partir de la souche NCPPB 1125 (autrefois classifiée comme *E. carotovora*) est indistinguishable par plusieurs critères biochimiques de l'asparaginase NCPPB 1066 de l'espèce *Erwinia chrysanthemi* obtenue par L'Etablissement de Recherche Microbiologique, Salisbury, d'Angleterre.

En accord avec cette étude, une comparaison de la séquence en acide aminés de l'asparaginase de la souche 1125 (souligné) avec la séquence de l'asparaginase de la souche 1066 indique seulement quatre substitutions d'acides d'aminés conservateurs (**Ile/Leu 156 ; Arg. /Lys 178 ; Leu/Met 267 ; Met/Ile 274**), (**David et al ., 1988**).

I.4. Propriétés thérapeutiques

L-asparaginase est connue comme un agent chimiothérapeutique principalement chez les enfants atteints de certains cancers (leucémie lymphoblastique aiguë et lymphosarcome). L'utilisation de la L-Asparaginase dans le traitement du cancer a été décrite par de nombreux auteurs (**Stecher et al ., 1999 , Borek & Jaskólski , 2001 , Sanches et al ., 2007 , Baskar & Renganathan, 2009, Konecna et al ., 2004**).

I.4.1. Effet de l'asparaginase sur la Leucémie lymphoblastique aigue

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 cette substance anticancéreuse est basée sur le fait que des cellules normales sont privées de cette activité enzymatique (Figure 6). 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 G₁.

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 telles que l'albumine, l'insuline et les facteurs de la coagulation (Avramis & Panosyan, 2005).

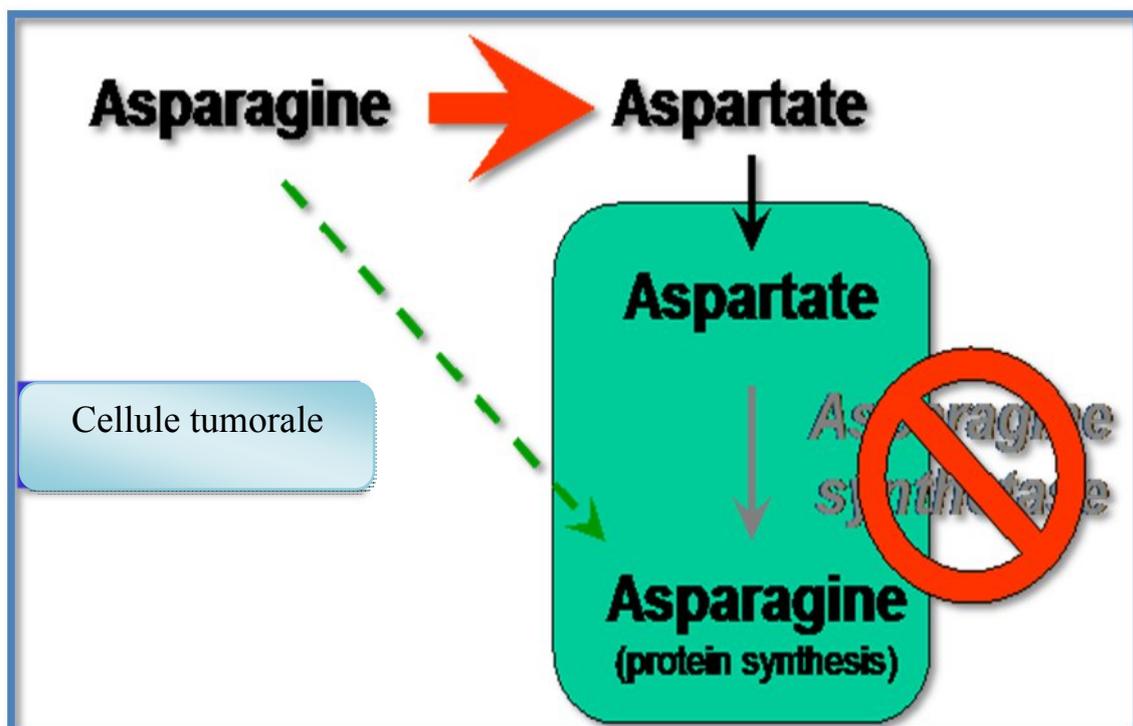


Fig.6 : Mécanisme d'action de l'asparaginase dans la cellule cancéreuse (Sanjay *et al.* , 2010).

I.4.2. Protection de certains aliments contre l'acrylamide

L'acrylamide est un produit chimique intermédiaire dans la synthèse des polyacrylamides (figure7), 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 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 à faire 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 des humains. Les pommes de terre 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).

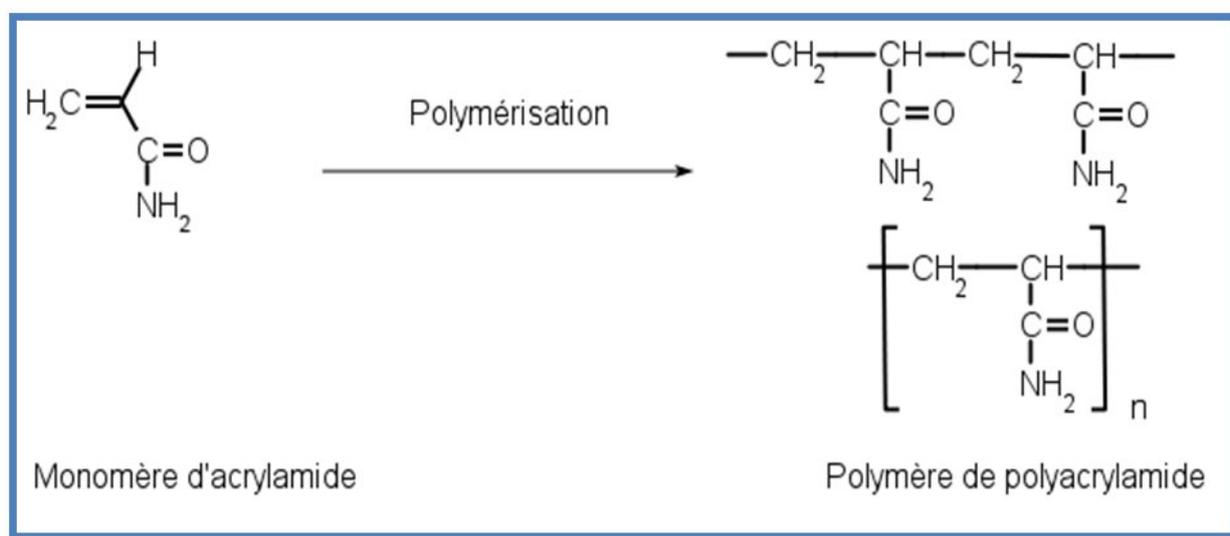


Fig. 7 : Formation du polyacrylamide à partir d'acrylamide (Anonyme, 2006)

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 celles-ci : les prétraitements par l'asparaginase (**Anese *et al.*, 2011**).

L'asparaginase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'un acide aminé, l'asparagine, en acide aspartique, et ce, en hydrolysant l'amide de l'asparagine libre. 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 excédant 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. Le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) a déterminé que l'exposition à l'acrylamide par les aliments constitue une source potentielle de préoccupations. 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**).

I.5. Effet indésirables et toxicité

L'asparaginase 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 (IV), 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**).

I.5.1. L'hypersensibilité

Il a été établi que l'administration répétée de L-asparaginase dans le sang entraîne une hypersensibilité, allant de réactions allergiques douces au choc anaphylactique, dans 5-30% des patients. Par conséquent, une L-asparaginase à propriétés antitumorales semblables

mais ayant des structures antigéniques différentes sont nécessaires pour des essais cliniques **(Benny & Muraleedharan, 1991)**.

Les réactions allergiques sont les premiers effets secondaires qui limitent l'utilisation de l'asparaginase. L'hypersensibilité clinique se développe chez 3 à 78% des malades traités avec les formes natives de l'enzyme selon le type d'injection, IM ou IV pour le pourcentage le plus élevé **(Clavell et al ., 1986)**. On a observé l'apparition de réactions allergiques sévères chez 24% en moyenne des enfants traités par l'asparaginase¹⁴.

Ces allergies sont d'intensité variable, allant d'une simple réaction localisée à une anaphylaxie empêchant toute poursuite du traitement par l'enzyme, voire même au décès. Des doses supérieures à 6000 UI/m² **(Jaffe et al ., 1971)**, des traitements répétés **(Trueworthy et al ., 1978)** et l'utilisation d'un seul agent plutôt qu'une combinaison, sont des facteurs de risque concernant l'apparition de réactions d'hypersensibilité provoquées par l'asparaginase **(Nesbit et al ., 1979)**.

I.5.2. 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)**.

Ces 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'hypoalbuminémie 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 2 semaines environ après l'arrêt du traitement (**Priest et al ., 1982**).

I.5.3. 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**).

I.5.4. 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**).

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**).

I.5.5. 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**).

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Matériel biologique

- *Pectobacterium carotovorum* 88.22 isolées à partir des tubercules de pomme de terre de semences locales infectées qui ont été précédemment caractérisées du point de vue taxonomique (Yahiaoui-Zaidi *et al.*, 2003).
- Souche de référence *Dickeya sp* de la Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (CFBP) obtenue initialement à partir de la pomme de terre présentant les symptômes de la jambe noire.

II.1.2. Préparation de la suspension bactérienne.

Ces deux souches bactériennes initialement conservées à -80°C dans le milieu LP à 30% de glycérol, sont repiquées dans un milieu King B dont la composition est détaillé en **Annexe I**.

Une suspension bactérienne de 10^6 ufc/ml est préparée à partir d'une culture de 24h dans le milieu LP (levure Peptone). Un petit volume de cette suspension est repiqué une deuxième fois sur le milieu King B de telle manière à avoir des colonies isolées après 24h d'incubation.

II. 1.3. Etapes de production de l'asparaginase

II.1.3.1. Préparation du bouillon nutritif et culture bactérienne

La production de l'enzyme est réalisée selon le protocole décrit par **Kamble *et al.* (2006)** avec quelques modifications.

Les bactéries isolées sont cultivées dans un bouillon nutritif (**Hi media Mv 088**) stérile contenant l'extrait de viande (3.0 g), NaCl (5.0 g) et la peptone (5.0 g) dans un volume de 1000 ml d'eau distillé. La stérilisation est effectuée pendant 15 minutes à 121°C.

Une colonie bactérienne de chaque sous espèce est sélectionnée dans chaque boîte de Pétri et transférée dans 100 ml de bouillon nutritif dans des conditions aseptiques. Le milieu est incubé à 25°C pendant 7 jours. Le pH du milieu de culture est contrôlé chaque jour et ajusté régulièrement de façon à avoir toujours un pH de 6,9 correspondant au pH isoélectrique de l'asparaginase.

II.1.3.2. Filtration

Après 07 jours d'incubation et une croissance optimale des bactéries, le milieu de culture est filtré en utilisant le papier Whatman No.2 afin d'éliminer tous les débris qui peuvent se retrouver dans la solution enzymatique. Le filtrat obtenu, est récupéré et soumis à une centrifugation réfrigérée à 10.000 rpm pendant 20 min afin d'éliminer la masse bactérienne.

II.1.3.3. Précipitation par le sulfate d'ammonium :

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient (**Wilson & Walker, 1994**).

Principe

Des concentrations élevées, proches de la saturation, de sels neutres (notamment le sulfate d'ammonium ou chlorure de sodium) déshydratent les groupements hydrophiles des protéines qui deviennent insolubles et précipitent. Chaque protéine précipite dans un intervalle de concentration en sels. Ainsi, par gradient de concentration, on peut sélectivement précipiter certaines protéines. Ce type de précipitation est souvent utilisé pour la purification de certaines protéines, car il est réversible et les protéines insolubilisées à une certaine concentration en sels peuvent être solubilisées avec une solution dont la concentration est plus faible. En se basant sur ce principe, la précipitation au sulfate d'ammonium a été l'une des méthodes les plus anciennes et les plus utiles pour purifier les protéines (**De Jesso, 1968, Krifi, 2010**).

Protocole expérimental

Le surnageant récupéré après la centrifugation réfrigérée est collecté et traité par le sulfate d'ammonium à différentes saturations : 50, 60,80 et 100% (m/v).

La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter dans la solution protéique en fonction des différentes saturations est présentée dans le **tableau II**. Elle est réalisée selon le tableau de

saturation des protéines à 25° C dont les détails sont présentés dans l'annexe I (Green & Hughes, 1955). Le protocole expérimental suivi est détaillé dans le tableau III.

Tableau II : Masse en gramme du sulfate d'ammonium à ajouter dans les différentes saturations.

Les différentes saturations	La masse en g de (NH ₄) ₂ SO ₄ à ajouter
Saturation 50%	31.1g de sulfate d'ammonium
Saturation 60%	6.6g de sulfate d'ammonium
Saturation 80%	14.3g de sulfate d'ammonium
Saturation 100%	15.7g de sulfate d'ammonium

Tableau III: Mode opératoire utilisé pour les différentes saturations au sulfate d'ammonium

Pourcentage de saturation	Mode opératoire
Saturation 50%	Centrifugation réfrigérée à 4°C à 10.000 rpm pendant 30 min et récupération du surnageant
Saturation 60%	Centrifugation réfrigérée à 4° C du surnageant de la saturation (50%)à 10.000 rpm pendant 30 min
Saturation 80%	Centrifugation réfrigéré à 4°C du surnageant de la saturation (60%)à 10.000 rpm pendant 30 min
Saturation 100%	Centrifugation réfrigéré à 4° C du surnageant de la saturation (80%) à 10.000 rpm pendant 30 min

Après la dernière saturation, le surnageant et le culot sont conservés pendant 4 nuits au frais pour permettre une bonne précipitation, suivie d'une dernière centrifugation réfrigérée à 4°C et à 10.000 rpm pendant 30 min.

Ces expériences nous renseignent sur le pourcentage de saturation qui permet une bonne précipitation des protéines.

II.1.3.4. Solubilisation

La solubilisation du culot protéique obtenu a été faite selon la méthode décrite par **Rabilloud (1996)** avec quelques modifications. Elle est réalisée pendant 2 heures à 30°C dans un tampon de solubilisation tris-HCl (0.1M, pH 8.6) constitué de Tris-HCl 0.2N(50 ml), HCl 0.1N (30 ml), eau distillée (20 ml).

Les cristaux blancs observés au fond du tube sont réduits en poudre à l'aide d'une baguette en verre préalablement passée à l'alcool. 25 ml de tampon de solubilisation sont ajoutés goutte à goutte sur la poudre pour la décoller des parois du tube. L'homogénat est ensuite récupéré dans des fioles.

II.1.3.5. Dialyse

Principe

La méthode la plus utilisée pour changer la concentration en sels d'une solution protéique est la dialyse. Dans une dialyse, les protéines à concentration en sels donnée sont séparées d'une solution à concentration en sels différente par une membrane poreuse. Les pores de cette membrane peuvent avoir différentes tailles; certaines membranes ne laisseront passer que des ions alors que d'autres laisseront même passer de petites protéines (jusqu'à des poids moléculaires de 50 000 Da).

Le principe de la dialyse consiste à séparer deux solutions par une membrane semi-perméable poreuse se présentant le plus souvent sous la forme d'un boudin de dialyse. Par effet d'osmose et d'agitation moléculaire les petites molécules traverseront la membrane, tandis que les macromolécules seront retenues dans le boudin.

Protocole expérimental

Les deux types de solutions protéiques solubilisées sont récupérés et mis dans un boudin de dialyse de 20 ml doté d'un bouchon spécial et un seuil de coupure de 3.5 MWCO.

Le boudin contenant la solution protéique à analyser est plongé dans un bain contenant un tampon tris-HCl (0.01M, et pH8.6) de contre dialyse (Figure 8).

La dialyse est réalisée pendant 48 heures pour chaque échantillon protéique avec un changement de tampon au bout de 24 heures (**Kamble et al., 2006**).

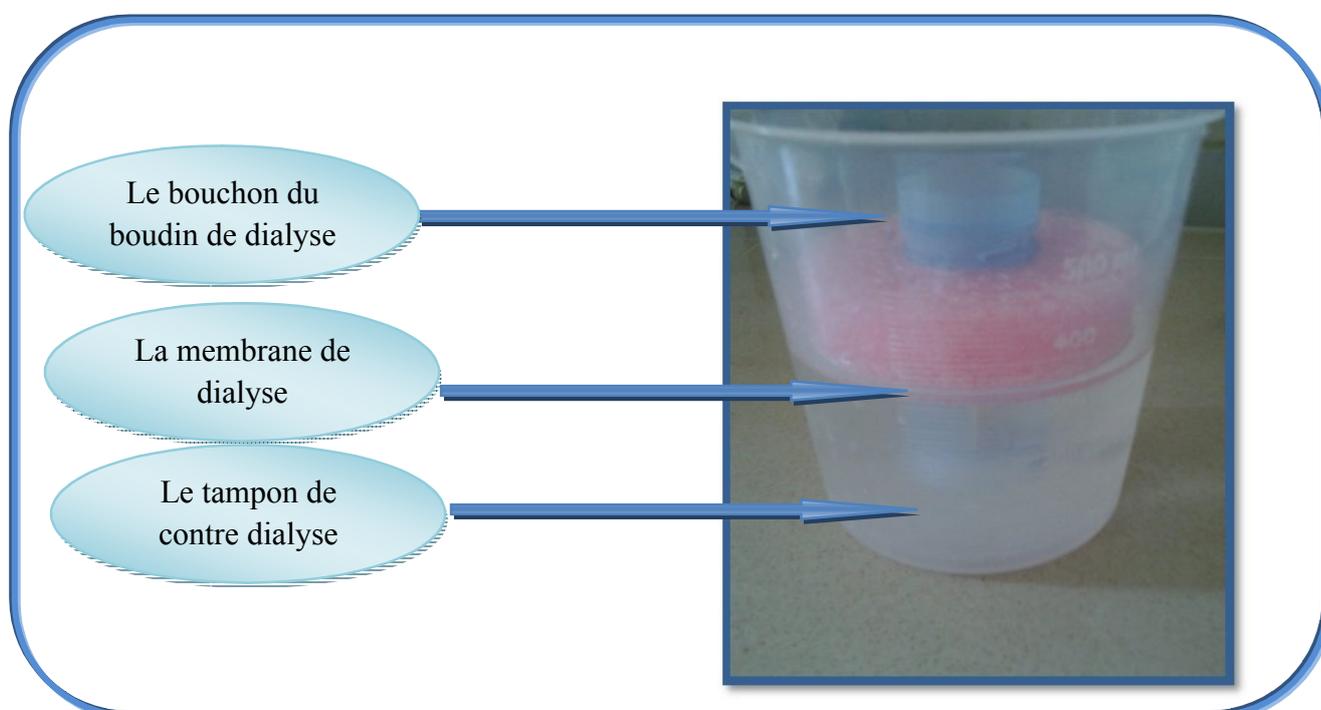
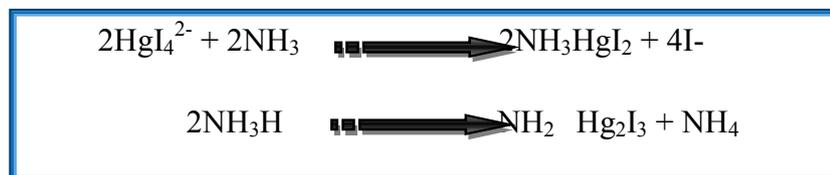


Fig. 8. Schéma montrant le principe de la dialyse

II.1.4. Révélation de l'activité de l'asparaginase

Afin de vérifier la présence de l'asparaginase dans la solution protéique obtenue, cette dernière est soumise à un test chimique en utilisant le réactif de Nessler.

En effet, l'hydrolyse de L-asparagine en L-aspartate en présence de l'asparaginase libère l'ammoniac. Ainsi, l'activité de l'asparaginase est révélée par le réactif de Nessler (Iodo-mercurate de potassium alcalin, **Annexe II**) qui réagit avec l'ammoniac en donnant une coloration allant du jaune à l'orange (**Anonyme, 2011**). La coloration est due à la décomposition de l'ammoniac avec formation d'iodure de dimercuriammonium selon la réaction suivante :



II.1.5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford, 1976

Principe

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 électrostatiques 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 spectrométrie.

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 complexations 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 verte foncée 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.

Préparation du réactif de Bradford

12,5 mg de bleu de Coomassie G-250 sont solubilisés dans 6,25 ml d'éthanol absolu. Le mélange est vortexé puis mélangé avec 12,5 ml d'acide orthophosphorique (85%). Le volume final est ajusté à 500 ml avec de l'eau distillée. La solution ainsi obtenue est filtrée puis conservée à 4°C et à l'abri de la lumière.

N.B : le réactif utilisé dans cette étape est une solution de stock achetée (**SIGMA-ALDRICH**).

❖ Dosage des protéines

500µl de chaque échantillon sont mélangés avec 2 ml de réactif de Bradford. Le mélange vortexé est incubé à l'obscurité pendant 5 mn. La densité optique est lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les concentrations en protéines sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage (**Annexe III**) effectuée avec une solution de sérum albumine bovine et préparée dans les mêmes conditions.

II.1.6. Séparation de l'asparaginase par SDS-PAGE

L'électrophorèse est une technique dont le principe est de fractionner des molécules protéiques selon leur mobilité différentielle en les soumettant à un courant électrique dans un support poreux. L'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (**Laemmli et al ., 1970**) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

II.1.6.1. Préparation des gels d'électrophorèse

Pour analyser la solution protéique par SDS-PAGE, nous avons utilisé un gel de séparation à 12 % de polyacrylamide et un gel de concentration à 7.5% de polyacrylamide.

Les gels de polyacrylamide (**Annexe IV**) développés par **Hochstrasser *et al.*, (1988)**, pour la séparation des protéines sont des milieux poreux dont la taille des pores est similaire à celle des protéines ce qui renforce la différence de migration des protéines. Ils proviennent de la polymérisation de monomères d'acrylamides (C_3H_5NO) en longues chaînes reliées par le bis-acrylamide ($C_7H_9N_2O_2$). La plupart des travaux actuels, sur des milieux gélifiés pour la séparation électrophorétique des protéines font intervenir la chimie des dérivés de l'acrylamide.

La polymérisation est initiée en ajoutant du persulfate d'ammonium et le N, N, N', N'-tetra-méthyl-éthylène-di-amine (TEMED), ce dernier joue un rôle de catalyseur lors de la formation des radicaux libres du persulfate. La taille des pores est donc directement influencée par la concentration en acrylamide permettant de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, en présence d'un détergent le dodécyl sulfate de sodium (SDS), qui masque la charge naturelle des protéines. Les protéines chargées négativement par le SDS migrent vers l'anode.

II.1.6.2. Migration électrophorétique :

❖ Traitement des échantillons avant la migration

Avant de procéder à leur dépôt, les échantillons protéiques (50 μ l) ont été dilués avec un rapport de 1/1 (v/v) dans 50 μ l de tampon de charge constitué de: 0.625ml de Tris-HCl 0.5M à pH 6.8, 0.1ml SDS 10% (p/v), 1 ml de glycérol, 0.25ml de β -mercaptoéthanol, 0.05ml de bleu de bromophénol 5% (p/v) et 0.475ml d'eau distillée. Les protéines sont ensuite dénaturées à 100°C pendant 5 min

❖ Migration

Après avoir été traités dans le tampon de charge, les échantillons protéiques ont été déposés à raison de 20 μ l/puits. La migration électrophorétique a été effectuée dans un tampon Tris-HCl 25 mM contenant 192 mM glycine et 10% de SDS. La migration se fait à température basse ($\approx 10^\circ C$) sous une différence de potentiel de 120 V pour le gel de concentration, et 150 V pour la migration dans le gel de séparation.

II.1.6.3. Révélation

A la fin de la migration, les gels ont été récupérés, le gel de concentration a été éliminé, tandis que celui de séparation est fixé à 20 min avec la solution de décoloration. Il est ensuite traité par une solution de coloration contenant le bleu de Coomassie brillant R250 à 0.25% (p/v), 45% de méthanol, 10% d'acide acétique et 45% d'eau distillée sous agitation pendant 2h et on le laisse une nuit dans la solution de coloration.

Le gel est ensuite décoloré par des lavages successifs avec une solution contenant: 45% de méthanol, 10% d'acide acétique et 45% d'eau distillée pendant 24h sous agitation.

II.2. Résultats

II.2.1 Obtention de colonies bactériennes

Le repiquage des deux souches de *Dickeya* 37 39 et *P. c* ssp. *carovorum* 88.22 réalisé sur le milieu KB par la méthode des stries nous a permis d'avoir des colonies bien isolées spécifiques à chaque souche comme le montre les figures 9 et 10.

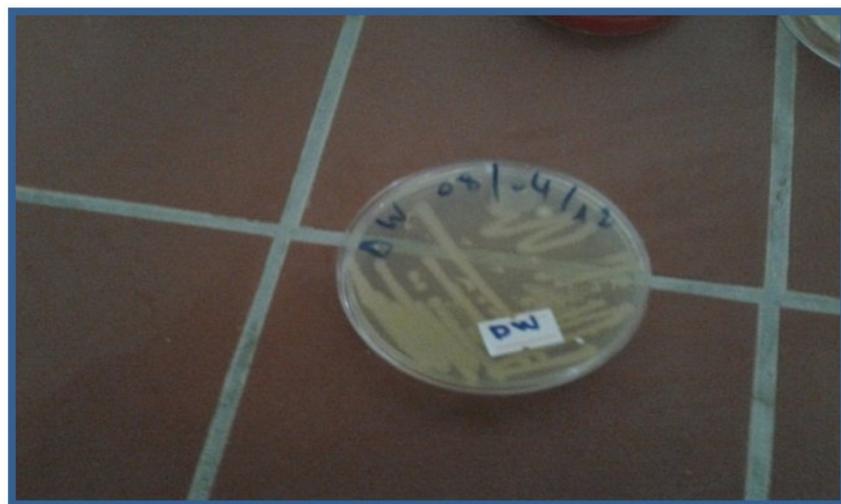


Fig. 9 : Colonies isolées de *Dickeya* 37 39



Fig. 10 : Culture de *P. c* ssp. *carovorum* sur KB

II.2.2 Précipitation par le sulfate d'ammonium à différentes saturations

Les résultats obtenus après purification partielle des extraits bruts de L-asparaginase avec les différentes saturations au sulfate d'ammonium sont présentés dans les **tableaux IV** et **V** pour la solution enzymatique provenant respectivement de *Dickeya* 3739 et de *P. c ssp. carovotorum* 8822.

Tableau IV: Précipitation de la solution protéique provenant de *Dickeya* sp.

Les saturations	Résultats
Saturation 50%	Un précipité irrécupérable
Saturation 60%	Pas de précipité
Saturation 80%	Un précipité très minime sur la paroi du tube
Saturation 100%	Un précipité sous forme de petits cristaux de couleur blanche d'aspect brillant.

Tableau V: Précipitation de la solution protéique provenant de *P. c ssp. carovotorum* 8822.

Les saturations	Résultats
Saturation 50%	Pas de précipité
Saturation 60%	Pas de précipités
Saturation 80%	Pas de précipités
Saturation 100%	Présence d'un précipité sous forme de petits cristaux brillants et blancs

Après la dernière saturation suivie d'une centrifugation réfrigérée, un précipité blanchâtre sous forme de petits cristaux est obtenu au fond du tube (Figure 11). Une bonne précipitation est obtenue en utilisant une saturation allant de 80% à 100% pour les deux souches *Dickeya* et pour *P. c ssp. carovotorum* 8822. Ces cristaux ont augmenté de volume et de forme après un séjour de 4 nuits au réfrigérateur. Après une dernière centrifugation réfrigérée à 10000 rpm pendant 30 min, et élimination du surnageant, nous avons obtenu des cristaux assez volumineux dont la taille varie d'une solution protéique à l'autre. En effet, à vue d'œil les cristaux issus de la souche de *Dickeya* 3739 sont beaucoup plus volumineux que ceux issus de la souche de *P.c. ssp carotovorum* 8822.

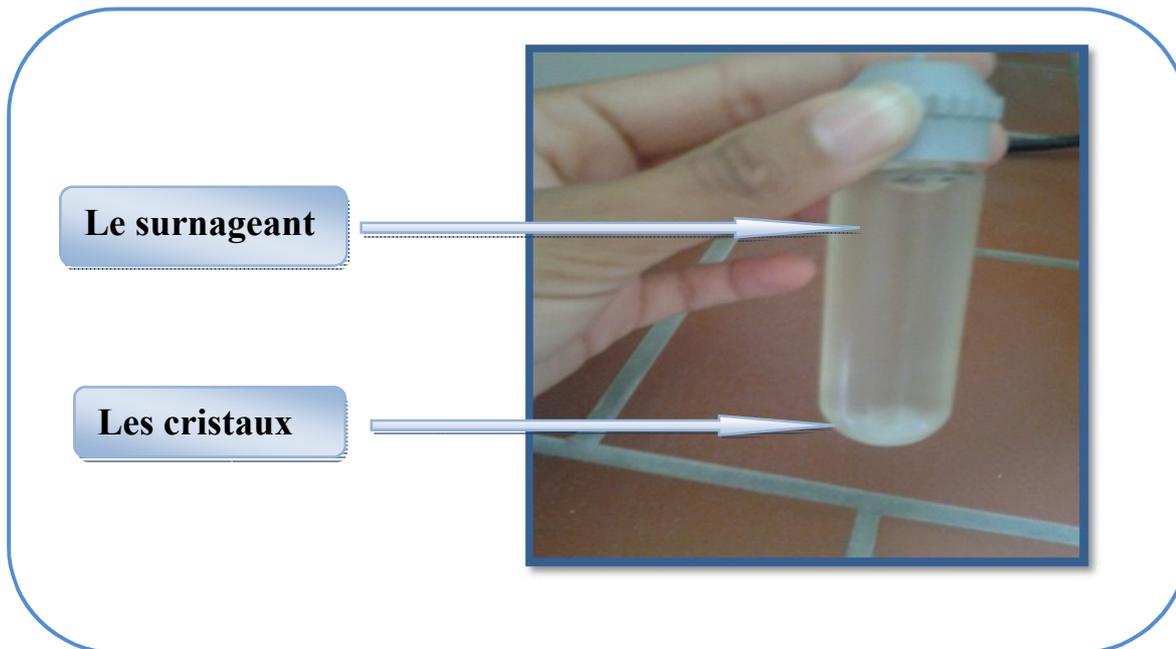


Fig.11 : Précipité obtenu après saturations de la solution protéique au sulfate d'ammonium

II.2.3. Dialyse

Après la dialyse, le volume en extrait protéique préalablement solubilisé est réduit de 4 ml dans le boudin contenant les extraits issus de *Dickeya sp.* Il était de 20 ml avant la dialyse pour passer à 16 ml après dialyse. Celui de l'extrait protéique de *Pcc 8822* passe de 20 ml à 18 ml.

II.2.4. Mise en évidence de l'activité asparaginase

La mise en évidence de la présence de l'asparaginase a été réalisée sur deux types de solution protéiques. La première concerne celle issue de la centrifugation suivie de la filtration du bouillon et la deuxième représente la solution protéique obtenue après dialyse.

Les résultats sont présentés dans la (figure 12) et **tableau VI**.



Fig.12 : Réaction du réactif de Nessler avec l'ammoniac

Tableau VI: Résultat de la réaction avec le réactif de Nessler avant précipitation et après dialyse.

Sources de protéines	Avant la Précipitation		Après dialyse	
	Couleur	Résultat	Couleur	Résultats
<i>Dickeya</i> 3739	Jaune	Positif	Orange	Positif
<i>Pcc</i> 88. 22	Jaune clair	Positif	Orange clair	Positif

Le réactif de Nessler a permis de mettre en évidence la présence de l'asparaginase dans la solution protéique issue des deux souches bactériennes testées. L'intensité de la couleur obtenue à la fin de la réaction est beaucoup plus importante chez *Dickeya* 3739 comparée à *Pcc* 2288.

II.2.5 Teneur en protéines des extraits avant et après dialyse

Les résultats relatifs au dosage des protéines dans les extraits issus des deux souches sont présentés sous forme d'un histogramme dans la figure 13.

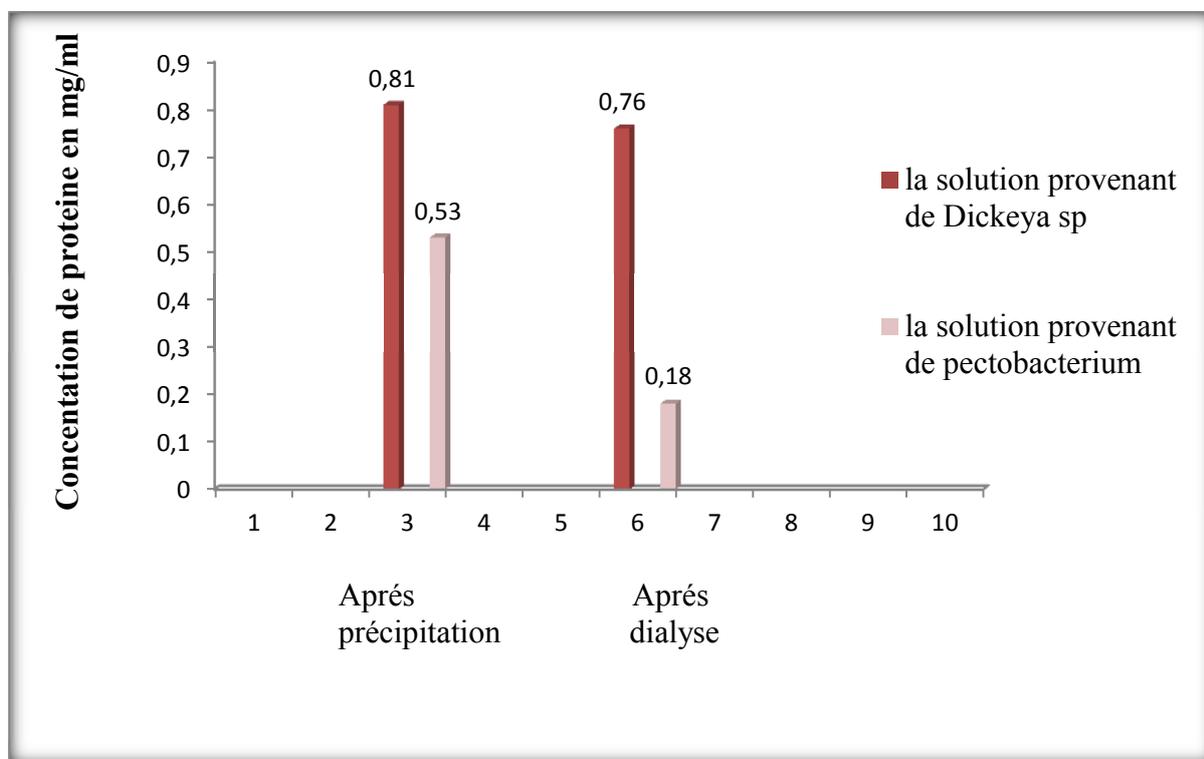


Fig. 13 : Résultats du dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cet histogramme montre clairement que l'échantillon issu de *Dickeya sp* 3739 a une teneur beaucoup plus importante en protéines comparée à celui de *P. c. ssp. carotovorum* 8822. Une quantité de 0,81 mg/ml de protéines contre 0,53mg/ml est obtenue avant la précipitation respectivement pour les deux souches. Ces valeurs sont réduites après dialyse, 0,76mg/ml de protéines pour l'échantillon obtenu avec *Dickeya* et 0,18 mg/ml pour celui issu *P. c. ssp. carotovorum* 8822.

Nous remarquons une baisse dans la teneur en protéines après dialyse pour les deux échantillons et, celle observée avec l'échantillon issu de *P. c. ssp. carotovorum* 8822 est spectaculaire dont la perte en protéines correspond à 0,35 mg/ml. Cette variabilité pourrait s'expliquer par le fait qu'après dialyse le volume final du tampon de solubilisation des protéines ne soit pas le même pour les deux échantillons il est de 16 ml pour *Dickeya* et de 18 ml pour *P. c. ssp. carotovorum* 8822.

II.2.6. Estimation du poids moléculaire de l'asparaginase par SDS-PAGE

Le profil électrophorétique obtenu est caractérisé par la présence d'une seule bande ayant migré de la même manière pour les deux échantillons testés (figure 14). En la comparant avec une gamme de protéines standards de poids moléculaires connus, cette bande correspondrait à une protéine de masse moléculaire de 33 KDa qui est l'asparagine.

Les étapes de purification effectuées semblent être très performantes étant donné que nous avons visualisé ce profil électrophorétique.

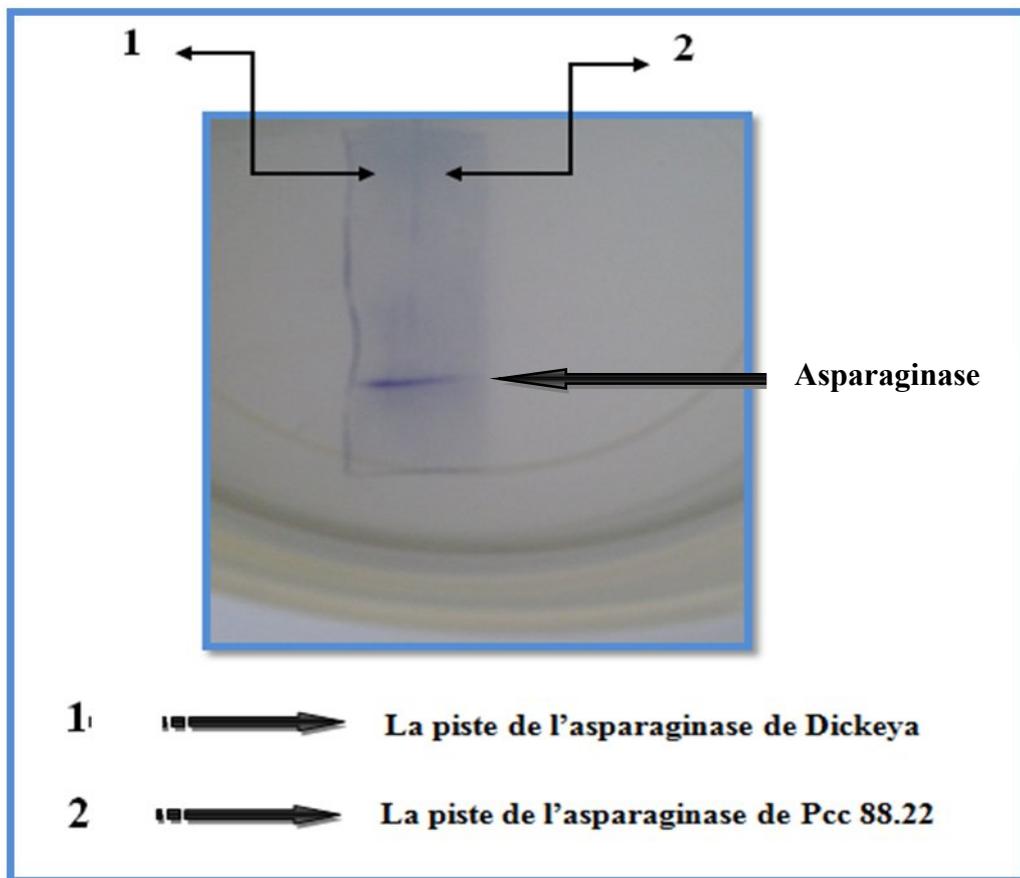


Fig. 14 : Profil de migration de l'asparaginase des deux souches bactériennes

II.3 Discussion générale :

L'objectif de la présente étude, est de mettre en évidence la production de l'asparaginase à partir de deux souches bactériennes différentes, *Dickeya 37 39* et *P. c. ssp. carotovorum* 8822 et de procéder par la suite à sa purification.

La mise en évidence de l'asparaginase à partir des deux souches bactériennes réalisée sur un milieu à base d'extrait de viande et de la peptone comme source de carbone et d'azote est une étape très importante. Elle permet une optimisation des besoins nutritionnels nécessaires au processus de production d'enzymes. En effet, les travaux réalisés par **Baskar & Renganathan (2009)** sur la production d'asparaginase par *Aspergillus terreus* MTCC 1782 ont confirmé que le choix de la source en azote est une étape cruciale pour la production optimale de cette enzyme.

La purification partielle est obtenue par la précipitation en utilisant le sulfate d'ammonium à différentes saturations. La saturation qui permet la meilleure précipitation est comprise entre 80 et 100% tout en gardant l'activité de l'asparaginase révélée par un test chimique en utilisant le réactif de Nessler qui donne une coloration de jaune à orange en présence de l'ammoniac. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Kamble et al. (2006)** en étudiant la production et la purification de l'asparaginase par une souche d'*Erwinia carotovora*. MTCC 1428.

D'autres travaux menés par **El Bessoumy et al. (2004)** sur la production et la purification de l'asparaginase de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré que la meilleure purification est obtenue avec une saturation 80% de sulfate d'ammonium tout en préservant l'activité de l'enzyme.

La purification poursuivie par dialyse, permet d'éliminer les petites molécules telles que le sulfate d'ammonium ainsi que des protéines de petits poids moléculaire, ce qui implique une diminution du volume de la solution contenant les extraits bruts de l'asparaginase des deux souches. Cette baisse dans le volume n'est pas surprenante car il a été signalé par **Kamble et al. (2006)** qu'à partir de 100 ml de milieu de culture 35 et 25 ml sont récupérés respectivement après traitement au sulfate d'ammonium suivi d'une dialyse.

Le faible volume perdu dans l'extrait issu de *P. c. ssp. carotovorum* 8822 après dialyse qui est de moitié comparé à celui perdu dans l'extrait issu de *Dickeya* pourrait s'expliquer par un faible gradient de concentration du fait que la teneur en asparaginase de *P. c. ssp. carotovorum* 8822 est faible comme le témoignent les résultats obtenus après dosage.

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford a confirmé la différence dans la teneur en protéines entre les deux souches utilisées, la concentration en protéines. En effet, elle est plus importante chez *Dickeya* 3739 que chez *P. c. ssp. carotovorum* 8822. Il est connu que parmi les *Erwinia* pectinolytiques celles qui produisent le plus d'asparaginase appartiennent au genre *Dickeya*.

De nombreuses autres souches de *Pectobacterium carotovorum* ont la capacité de produire l'asparaginase mais à des degrés moindres comparés au *Dickeya* (**Kamble et al ., 2006 , Warangkar et al ., 2009**). De nombreux auteurs confirment également que *Dickeya sp.* est la source principale de l'asparaginase (**Bertrand, 2003 , Harry et al ., 1985 , Sanches et al ., 2007**).

La présence d'une seule bande sur le gel d'électrophorèse (SDS-Page) ne prouve que l'étape de solubilisation des protéines est bien réalisée vu l'absence de composés capables d'interférer avec les protéines et perturber l'électrophorèse. La localisation de l'unique bande dans le gel montre qu'il s'agit bien d'un seul type d'enzyme qui est l'asparaginase dont le poids moléculaire correspond bien à celui décrit dans la littérature (**Kamble et al ., 2006 , Harry et al ., 1985 , EL-Sayed et al ., 2011**),

Conclusion

Les bactéries restent toujours une source importante d'enzymes connus pour leurs propriétés thérapeutiques.

L'objectif de ce présent travail a porté sur la recherche de l'asparaginase à partir de deux souches bactériennes *Pectobacterium carovotorum* 88.22 et *Dickeya sp.3739* anciennement appelée *Pectobacterium chrysanthemi* isolées respectivement à partir de la pomme de terre présentant les symptômes de pourriture molle et de jambe noire.

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude ont montré que la meilleure précipitation des protéines d'intérêt est obtenue avec une saturation allant de 80% à 100% de sulfate d'ammonium. Ils ont montré également que les deux souches testées produisent la même asparaginase. En effet, en réagissant avec le réactif de Nessler, une couleur orange apparaît en présence des ions ammoniac libérés par l'action de l'asparaginase sur l'asparagine. Elle est plus intense chez la *Dickeya sp. 3739* avec une concentration en protéines de 0.76 mg/ml que chez *P.c. ssp. carovotorum* 88.22 dont la concentration est de 0.18 mg/ml. Ce réactif a permis également de mettre en évidence la persistance de l'activité de l'asparaginase avant et après les différentes étapes de purification.

Par ailleurs, l'analyse du profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante obtenu a montré la présence d'une seule bande pour chacune des souches qui a migré au même niveau. En la comparant avec une gamme de référence, cette bande correspondrait à l'asparaginase qui selon la littérature a une masse moléculaire de 33 KDA.

La production de l'asparaginase par les bactéries pourrait constituer une piste intéressante sachant qu'elle est utilisée pour traiter certains types de cancer. Pour cela, il sera intéressant :

- d'élargir la recherche sur une gamme plus large de bactéries.,
- D'optimiser la production en tenant compte des différents paramètres (pH, température, sources de carbone et d'azotes, Inoculum etc..),
- Utiliser d'autres étapes de purification complémentaires.,
- Faire des tests sur les cellules cancéreuses dans la mesure du possible une fois l'enzyme parfaitement purifiée,

- ❖ **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. *Proc Biochem.* **38**: 115-122.
- ❖ **Abuchowski A, Kazo G, Verhoest C. (1984)**; Cancer therapy with chemical modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol L-asparaginase conjugates. *Can Biochem Biophys.* **7**: 175-186.
- ❖ **Aghaiypour, K., Wlodowes, A. and Lubkowski, J. (2001).** Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochem.* **40**:5655-5664.
- ❖ **Alapati. K and Muvva.V. (2010).** Optimization and Purification of L-Asparaginase Produced by *Streptomyces tendae* TK-VL_333Z. *Naturforsch.* **65**:528–531.
- ❖ **Altenberrn., A. & Housewright. ,D . (1954).** Stereospecific asparaginases in smooth *Brucella abortus*, strain 19. *Arch of Biochem Biophys* **49**:130-137.
- ❖ **Anese, M^a., Quarta, B^a., Frias, J^b. (2011).** Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuit . *Fd Chem.***126**: 435–440
- ❖ **Asselin BL. (1999)** The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv Exp Med Biol.* **457**:621-9.
- ❖ **Avramis VI, Panosyan EH. (2005).** Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet.* **44(4)**:367-393.

- ❖ **Baskar, G¹ and Renganathan, S². (2009).** Evaluation and Screening of Nitrogen Source for L-asparaginase Production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using Latin Square Design Research . *J of Math Stat* **1(2):** 55-58.

- ❖ **Beard ME, Crowther D, Galton DA, Guyer RJ, Fairley GH, Kay HE, Knapton PJ, Malpas JS, Scott RB. (1970).** L-asparaginase in treatment of acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br Med J.* **690:**191-5.

- ❖ **Benny, P.J a& Muraleedharan,K.G .(1991).** L-asparaginase activity in bacteria from sediments and mollusk. *Indian J. Mar Scie.***20:**36-39.
- ❖ **Bertrand ;T. (2003)** L'asparaginase dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique de l'enfant. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Nantes. P: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. *J of Ped.* **108:**698-701.

- ❖ **Borek, D¹.& Jaskólski, M¹. (2001).** Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity . *Acta bioch Polon.* **48 (4):** 893–902.

- ❖ **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:** 284 254.

- ❖ **Campbell.,H, Mashburn., L. (1969)** L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Bioch.* **9 (37):** 68-75.

- ❖ **Capizzi., R.L, Bertino. J.R, Skeel., R.T, Creasey WA, Zanes R, Olayon C, Peterson RG, Handschumacher RE. (1971)** L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann Intern Med.* **74(6):**893-901.
- ❖ **Clavell, L.A., Gelber, R.D., Cohen, H.J., Hitchcock-Bryan, S., Cassady, J.R., Tarbell, NJ., 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. *N Engl J Med.* **315(11):**657-63.
- ❖ **Curran, M.P., R.M. Daniel, G.R. Guy and H.W. Morgan. (1985).** A specific L-asparaginase from *Thermus aquaticus*. *Arch of Biochem Biophy.* **241:** 571-576.
- ❖ **David Filpula, James W.Nagle, Steve Pulford & David M.Anderson. (1988).** Sequence of L-asparaginase gene from *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125. *Nuc Ac Resrch,* **16:** 21.
- ❖ **David, K. & G. David. (1974).** Asparaginase production by the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. *Appl. Microbiol.* **27:** 206-209.
- ❖ **Davidson, L., M. Burkom, S. Ahn, L.C. Chang & Kitto.B. (1977).** L-Asparagainases from *Citrobacter freundii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **480:** 282-294.
- ❖ **Dejong, P.J. (1972).** L-asparaginase Production by *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* **23:**1163-1164.
- ❖ **De Jesso, F (1968).** Ammonium Sulfate Concentration Conversion Nomograph for 0°, *J of Biol and Chem.* **243:**2022
- ❖ **Delobette, H., Friry, A., Plewniak, F., and Egly, J.M. (1991).** Dosage des protéines. *Le techscop de bioftr* **41 :** 3-12.
- ❖ **Derst, C. Lubkowski, J.S. Schleper , Roehm KH , Wlodawer A. (1994).** A crystallographyc Asparaginase of *Escherishia coli*, *J of biochem.***85:**17-19.

- ❖ **Distasio JA, Salazar AM, Nadji M, Durden DL. (1982).** Glutaminasefree asparaginase from *Vibrio succinogenes*: An anti-lymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *Intern J of Can.* **30**:343-347.
- ❖ **Dolowy W, Henson D, Cornet J, Sellin H. (1966).** Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. *Can .* **19**:1813-9.
- ❖ **Duval, M., Suciu, S., Ferster, A., Rialland, 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)**:2734-9.
- ..
- ❖ **El-Bessoumy.,A, Safhan.,M & Mansour.J. (2004).** Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas Aeruginosa 50071* Using Solid-state Fermentation. *J of Biochem Mol Biol.* **37(4)**:387-393.
- ❖ **EL-Sayed , M. El-Sayed¹ , Sanaa T. El-Sayed*², Wafaa, G. Shousha¹, Abeer, N. Shehata² and Shimaa, S.Hanafy². (2011)** Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from Chicken liver. *J of Amer Scien.* **7(1)**:439-449.
- .
- ❖ **Golden, K.J. & R.W. Bernlohr, (1985).** Nitrogen catabolite repression of the L-asparaginase of *Bacillus licheniformis*. *J of Bacter.* **164**: 938-940
- ❖ **Green, A. A., and Hughes, W. L., (1955).** Protein fractionation on the basis of solubility . *Methods Enzymol.,* **1**:67-90

- ❖ **Harry J. Gilbert,*? Richard blazek, Hillary,M. S. Bulman and Negel P .(1986).** Minton. Cloning and Expression of the *Erwinia chrpanthemi* Asparaginase Gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. *Journal of General Microbiology*. **132**: 151 – 160.
- ❖ **Hill, J.M ; Roberts, J ; Loeb, E ; Khan, A; MacLellan, A ; Hill, R.W. (1967).** L-Asparaginase Therapy for Leukemia and Other Malignant Neoplasms Preliminary. *Commun.JAMA*. **202(9)**:882-888
- ❖ **Hochstrasser, D.F., Patchornick, A., and Merril, C.R. 1988.** Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal of Biochem*. **173** :412-423.
- ❖ **Howard, C. & H.S. Jame. (1968).** Production of L-Asparaginase II by *Escherichia coli*. *J of Bact*. **96**: 2043-2048.
- ❖ **Imada. A, Igarasi.S, Nakahama.K & Isono.M. (1973).** Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. *J of Genrl Microb*.**76**:85-99.
- ❖ **Jaffe N, Traggis D, Das L. (1971).** Favorable remission induction rate with twice week doses of L-asparaginase. *Can Resrch*. **33**:1-4.
- ❖ **Kamble V P¹, Srinivasa Rao R¹, Prita S Broker¹, Khobragade CN¹& Dawane BS². (2006).** Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidinederivative on some of its kinetic parameters. *Indian J of Biochem Biophy*. **43**: 391-394.
- ❖ **Kil, J. O., Kim, G. N. & Park, I. (1995).** Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Biosc. Biotechnol. Biochem*.**59**:749-750.
- ❖ **Konecna P1, Klejdus B.2, Hrstkova H.1. (2004).**Monitoring the asparaginase activity and asparagine level in children with acute lymphoblastic leukemia treated with different treated asparaginase preparations, *Scripta Medica (BRNO)*. **77(2)**: p55-62.

- ❖ **Kotzia, G.A., Labrou, N.E.(2007).** L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. *J of biotechnol.* **127**:657-669.

- ❖ **Lelliot, R.A., and Dickey, R.S., 1984.** Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers & Smith 1920, 209. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA: Williams & Wilkins Co.,**1**: 469-476.

- ❖ **Liu, F.S AND Zajic, J.E. (1973).** Fermentation Kinetics and Continuous Process of L-Asparaginase Production, American Society for Microbiology, *Ameri Soci for Microb*, Jan., p. 92-96

- ❖ **Manna, S., Sinha, A., Sadhukhan, R and Chakrabarty, S.L. (1995).** “Purification, characterization and antitumor activity of Lasparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405,” *Current Microb.* **30(5)**: 291–298.

- ❖ **Mario Sanches¹, #, Sandra Krauchenco¹ and Igor Polikarpov*. (2007).** Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases. *Current Chemical Biology.* **1**: 75-86.

- ❖ **Michalska K., Jaskolski M. (2006),** Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. *Acta Biochim. Polon.* **53**:62.

- ❖ **Miller H, Slaser J, Balis M. (1969).** Amino acid levels following L-asparaginase amidohydrolase (EC.3.5.1.1.) therapy. *Canc Resrch* .**29**:183-87.

- ❖ **Miller, M., Rao, J. K. M., Wlodawer, A. & Gribskov, M. R. (1993)** A left-handed crossover involved in amidohydrolase. Crystal structure of *Erwinia chrysanthemil*-asparaginase with bound L-aspartate, *FEBS Lett.* **328**: 275–279.

- ❖ **Mukherjee, J., Majumadar, S. and Scheper, T. (2000).** Studies on nutritional and oxygen requirements for production of Lasparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Appl. Microbial Biotechnol.* **53**:180-184.
- ❖ **Muley, R. G., Sarker, S., Ambedkar, S. and Nail, S. R. (1988).** Influence of alkali treated corn steep liquor containing medium on protein production by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiology.* **43**: 31-34.
- ❖ **Narta UK, Kanwar SS, Azmi W. (2007).** Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the traitement of leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* **61(3)**:208-21.
- ❖ **Nesbit M, Chard R, Evans A, Karon M, Hammond G. (1979).** Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* **1**:9-13.
- ❖ **Oettgen H, Stephenson P, Schwartz M, (1979).** Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Can.* **25**:253-78.
- ❖ **Palm GJ , Lubkowski J. , Derst C. , S. Schleper , Roehm KH , Wlodawer A. (1996).** A covalently bound catalytic in *Escherishia coli*, Crystal structure of a thr-98-val mutant. *FEBS Lett.* **390**:211-216.
- ❖ **Pedreschi, F^{a*}., Kaack, K^b., Granby, Kc., (2008).** The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries Food Chemistry **109**:386–392
- ❖ **Pérombelon MCM , Kelman, A.(1980).** Ecology of soft rot erwinias. Annual Rev. *Phytopathol.* **18**: 361-387
- ❖ **Peterson, R.E. and A. Ciegler. (1969).** L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. *Appl. Microbiol.* **18**: 64-67.
- ❖ **Pinheiro, I.O., J.M. Araujo, E.C.P.A. Ximenes and J.C.S. (2001).** Production of L-asparaginase by *Zymomonas mobilis* strain CP4. *Biomater. Diagnosti.* **6**: 243-244.

- ❖ **Prathusha Dhavala. (2010).** Structural studies on enzymes of biotechnological and biomedical interest. . University of Turku. TURUN YLIOPISTON JULKAISUJA ANNALES UNIVERSITATIS TURKUENSIS. *SARJA - SER. D OSA - TOM. 941* , p :55

- ❖ **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. *J of ped.* **100 (6):**984-9.

- ❖ **Prista, A. A. and Kyridio, D. A. (2001).** L-asparaginase of thermothermophilus: purification, properties and identification of essential amino acids for catalytic activity. *Mol. Cell. Biochem.* **216:** 93-101.

- ❖ **Rabilloud, T. 1996.** Solubilisation of proteins for electrophoresis analys. *Electroph* **17:** 813-29.

- ❖ **Raha, S.K., Roy, S. K. Dey, and Chakrabarty, S.,L. (1990).** “Purification and properties of an L-asparaginase from *Cylindrocarpum obtusisporum* MB-10,” *Biochem Intern.* **21(6):**987–1000.

- ❖ **Richardson, J. S. (1981).** *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, New York. pp 167-339.

- ❖ **Sanches, M¹,# Krauchenco, S¹ and Polikarpov, I*,1.(2007).** Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases. *Current Chem Biol* **1:** 75-86

- ❖ **Samson R ,Legendre J B, Christen R , Achouak et 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. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Intern J of Systema and Evol Microb.* **55**:1415–1427.

- ❖ **Sanjay, K., Veeranki, V. D *, Kannan, P. (2010).** Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 *Proc Biochem.* **45**:223–229

- ❖ **Sansom C.E. and Jaskolski M. (1996).** Structure, Dynamics and Electrostatics of the L-Asparaginase Catalytic Centre : Implications for Reaction Mechanism *Bioinfor-stru.***26**:17-21

- ❖ **Schmalfusks. & Mothesk, (1930).** Uber die fermentative Desamidierung durch *Aspergillus niger*. *Biochem Zeitsrvt* **221**:134-153.

- ❖ **Siechiehowicz, K. and Ireland, R. (1989).** Isolation and properties of an asparaginase from leaves of *Pisum sativum*. *Phytochem.* **28**: 2275 p.

- ❖ **Soniyamby.AR1, Lalitha.S1, Praveesh.BV2 and Priyadarshini.V1. (2011).** Isolation, Production and Antitumor Activity of *Penicillium* sp. *Intern J of Microb Resrch.* **2(3)**: 38-42.

- ❖ **Stecher, A.L^a, Morgantetti de Deus P.^aPolikarpov, I., ^bAbrahão-Neto , J^a, (1999).** Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment *Pharma Acta Helvet.* **74**: 1–9

- ❖ **Supria. D. Saptarshi. S. S and Lele.S. (2010).** Application of Evolutionary Optimization Technique in Maximizing the Recovery of L-Asparaginase from *Erwinia carotovora* MTCC 1428. *Globa J of Biotechnol and Biochem.* **5 (2):** 97-105.
- ❖ **Swain, A.L., Jaskolski, M., Housset, D., Mohana Rao, J.K., Wlodawer,A.,(1993).** Crystal structure of *E. coli* asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90:**1474–1478.
- ❖ **Tosa, T., R. Sano, K. Yamamoto, M . Nakamura and I. Chibata. (1971).** L-asparaginase from *Proteus vulgaris*. *Appl. Microbiol.* **22:** 387-392.
- ❖ **Trueworthy R, Sutow W, Pullen J.(1978).** Repeated use of L-asparaginase in multidrug therapy of childhood leukemia. *Med Pediatr Oncol;***4:**91-7.
- ❖ **Van Es T, Abuchowski A, Palczuk N, Davis F. (1977).** Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem.* **252:**3578-81.
- ❖ **Wade H, Elsworth R, Herbert D, Keppie J, Sargeant K. (1968).** A new L-asparaginase with antitumor activity. *Lancet .* **2:**776-77.
- ❖ **Warangkar S.C.¹, Khobragade C.N.^{1*}, Dawane B.S.² and Bhosale R.B.². (2009).** Effect of dihydropyrimidine derivatives on kinetic parameters of *E. carotovora* L-asparaginase. *Intern J of Biotechnol Appl.* **1:**5-13.
- ❖ **Whitecar, J.J., Bodey, G., Harris, J., Freireich, E. (1969).** Current concepts: L-asparaginase. *N Engl J Med.* **282:**732.
- ❖ **Wikman.LEK and Papageorgiou.A.C. (2005).** Crystallization and preliminary crystallographic analysis of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Acta Crystallogr Sect F. Struct Biol Cryst Commun .***61:**407-409.
- ❖ **Wilson, K., Walker, J., (1994).** Principles and techniques of practical biochemistry (4e éd) Cambridge University Press. Oxford.

- ❖ **Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Evans WE, Sandlund JT, Rivera GK, Wang B, Pui CH, Relling MV. (1998).** Anti-asparaginase antibodies following E. coli asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk* **12(10)**:1527-33.

- ❖ **Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B., Andrivon, D. (2003).** Biochemical and molecular variability among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Path.* **52**: 28-40.

- ❖ **Anonyme. (2006).** [http://fr.wikipedia.org/wiki/fichier: polyacrylamide-polyacrylamide.png](http://fr.wikipedia.org/wiki/fichier:polyacrylamide-polyacrylamide.png).

- ❖ **Anonyme. (2011).** Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

Annexe II :

❖ Préparation du réactif de Nessler :

Chlorure mercurique..... 10 g

Iodure de potassium 7 g

Hydroxyde de sodium..... 16 g

Eau (exempte d'ammoniac)..... jusqu'à 100 mL

Annexe III :**❖ Préparation du tampon acétate :**

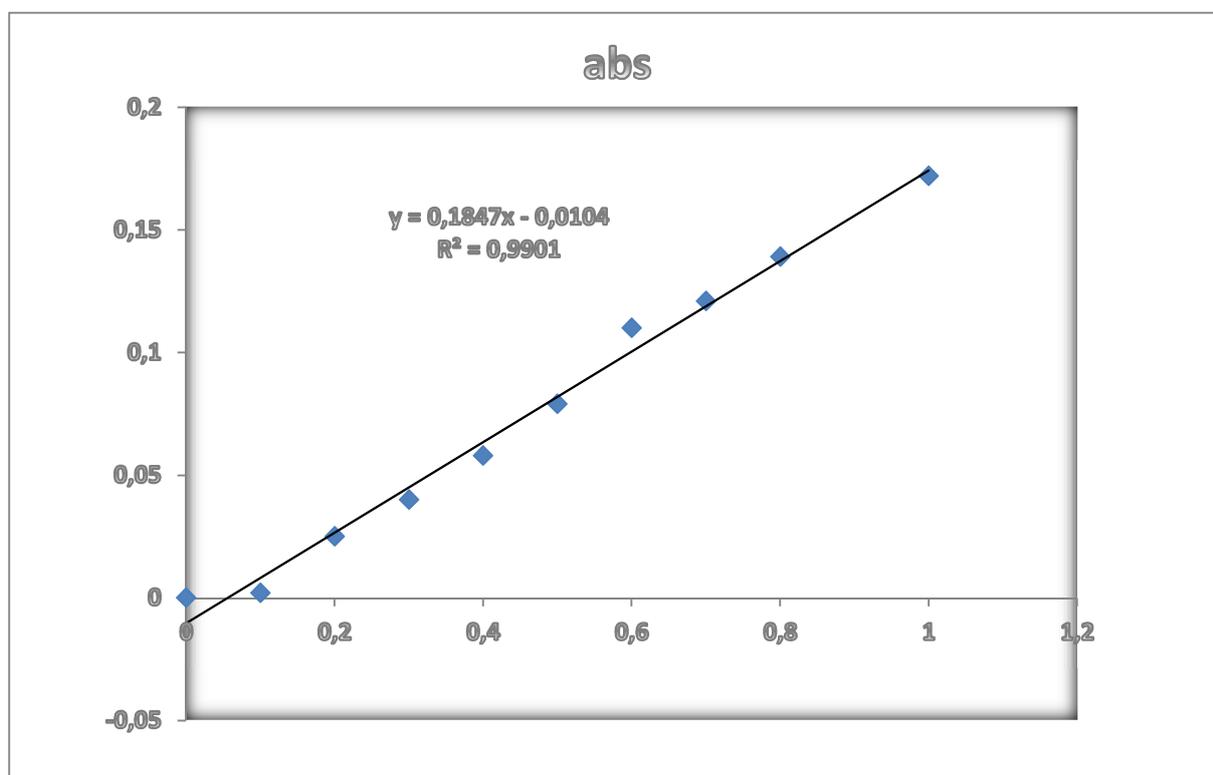
7.4 ml —————> **acide acétique**

17.6 ml —————> **acétate de sodium**

Ajuster avec de l'eau distillé jusqu'à 50 ml

❖ Préparation de la BSA 4mg/ml : on fait dissoudre 0.12g de BSA dans 30 ml dans du tampon acétate, ensuite on prépare les solutions filles en faisant des dilutions avec le même tampon (acétate), et pour la lecture on met 4 ml de réactif de Bradford dans 1 ml de solution fille après incubation 5 min on fait la lecture au spectrophotomètre.

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



Annexe IV :

Préparation des solutions d'électrophorèse dénaturante SDS-PAGE

a/-préparation des tampons

1-Tampon de séparation

Tris-HCl72,7g

SDS.....1,6g

β -mercaptoéthanol.....0,8g

Eau pure.....qsp...200ml

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré.

2-Tampon de concentration :

Tris-HCl.....12,114g

SDS.....0,8g

β -mercaptoéthanol400 μ l

Eau pureqsp..200ml

Ajuster le pH à 6,8.

b. Migration des solutions protéiques dans l'SDS-PAGE :



Résumé

L'asparaginase est une enzyme qui hydrolyse l'asparagine pour donner l'acide aspartique et l'ammoniac, cette enzyme est produite par un grand nombre de micro-organisme et seules l'asparaginase d'*E. coli* et d'*Erwinia* qui est dotée d'une activité anti-cancéreuse. L'objectif de cette étude est de rechercher si les souches d'*Erwinia* pectinolytique utilisé au sein de notre laboratoire étaient capables de synthétiser et de produire l'asparaginase. 2 souches ont fait l'objet de cette étude ; il s'agit de *Pectobacterium carovotorum* 88.22 et *Dickeya* sp. La présence de l'enzyme a été mise en évidence en utilisant le réactif de Nessler et l' SDS-PAGE. Les résultats obtenus à l'issus de cette étude ont montré que les deux souches produisent l'asparaginase. En effet, en réagissant avec le réactif de Nessler, une couleur orange apparait en présence des ions ammoniac libérés par l'action de l'asparaginase sur l'asparagine Elle est plus intense chez la *dickeya* que chez *P.c carovotorum* 88.22. En plus, le profil électrophorétique obtenu a montré une seule bande. En la comparant avec une gamme de référence, cette bande correspondrait à l'asparaginase qui selon la littérature a une masse moléculaire de 33 KDA.

Mots clés: Asparaginase, *Dickeya*, *Pectobacterium*, Production

Abstract

Asparaginase catalyzes the hydrolysis of L-asparagine into L-aspartate and ammonia. This enzyme is produced by a large number of micro-organism and only asparaginase of *E. coli* and *Erwinia* which is provided with an anti-cancer activity. The objective of this study was to investigate whether strains of pectinolytic *Erwinia* used in our laboratory were able to synthesize and produce asparaginase. 2 strains were the subject of this study; it is *Pectobacterium carovotorum* 88.22 and *Dickeya* sp. The presence of the enzyme has been demonstrated using Nessler's reagent and SDS-PAGE. The results obtained from this study showed that both strains produce asparaginase. Indeed, by reacting with Nessler's reagent, an orange color appears in the presence of ammonia ions liberated by the action of asparaginase on asparagine It is more intense in the *Dickeya* than *Pc carovotorum* 88.22. In addition, the electrophoretic profile obtained showed a single band. By comparing with a reference range, this band would correspond to asparaginase according to the literature which has a molecular mass of 33 kDa.

Keywords: Asparaginase, *Dickeya*, *Pectobacterium*, Production