

République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire de fin d'études en vue l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures
en Biologie

Option : **Microbiologie**

Thème

01
02

***Les Asparaginases Microbiennes :
Production et Applications***

Membre de jury :

Examineur : Mme N.Tahiri

Encadreur: Dr.H.Ouled Haddar

Préparé par

* Lakehel Leila

* Mohamedi Ratiba

* Merazka Malika



Promotion : 2009



Remerciements

Avant tout, nous rendons grâce à ALLAH de nous avoir aidé et pour nous avoir facilité la tâche de la réalisation de ce projet.

Nous remercions notre encadreur « Dr. Ouled Haddar » d'avoir accepté de nous encadrer durant cette année, ainsi pour son aide, ses conseils instructifs, et surtout sa patience.

Nous remercions vivement les membres du jury pour avoir accepté de juger notre modeste travail.

Nous exprimons notre gratitude à nos enseignants qui nous ont aidé à compléter notre étude.

*Nous remercions également nos chers amis et collègues.
Merci à toutes nos familles et à tous ceux qui ont partagé avec nous les bons moments durant notre formation.*

En fin nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin...

❖ SOMMAIRE

Introduction	1
I- Chapitre I : Enzymologie de l'asparaginase	
I-1-La structure de l'asparaginase.....	3
I-2-Le site actif de l'asparaginase.....	4
I-3-Les constantes cinétiques de l'asparaginase.....	5
I-4-Mode d'action de l'asparaginase.....	6
I-5-Propriétés physico-chimiques de l'asparaginase.....	7
I-6-La purification de l'asparaginase.....	9
II- Chapitre II : Production de l'asparaginase d'origine microbienne	
II-1-Les sources de l'enzyme.....	10
II-1-1-Les bactéries.....	10
II-1-2-Les levures.....	10
II-1-3-Les moisissures.....	11
II-2-La production industrielle de l'asparaginase.....	13
II-2-1-La source de carbone.....	13
II-2-2-La source d'azote.....	14
II-2-3-Le pH de la production.....	15
II-2-4-La température de la production	15
II-2-5-L'aération.....	16
II-3-Les gènes de l'asparaginase.....	18
III- Chapitre III : Les utilisations de l'asparaginase microbienne :	
III-1-L'utilisation de l'asparaginase microbienne en thérapie.....	20
III-1-1-Les différentes asparaginases indiquées en thérapie.....	20
III-1-2-Administration de l'asparaginase.....	22
III-1-3-Les effets indésirables de l'utilisation de l'asparaginase.....	23
III-2-L'utilisation de l'asparaginase en agroalimentaire.....	24
III-3-Les asparaginases commercialisées.....	25

Conclusion.....28

Références

Résumé

Liste des tableaux :

- **Tableau 1 :** Caractéristiques physico-chimiques d'asparaginase de différentes Sources.....8
- **Tableau 2 :** Les méthodes de purification l'asparaginase.....9
- **Tableau 3 :** Quelques microorganismes producteurs de l'asparaginase12
- **Tableau 4 :** Les conditions de la production de l'asparaginase à partir de différentes sources17
- **Tableau 5 :** Les gènes de l'asparaginase clonés dans différents Microorganismes.....19

Liste des figures :

- **Figure 1 :** Illustration de la sous unité A de l'asparaginase d'*Erwinia carotovora*.....3
- **Figure 2 :** Les résidus catalytiques du site actif d'une l'asparaginase.....4
- **Figure 3 :** Le mécanisme général d'action de l'asparaginase.....6
- **Figure 4 :** Le mécanisme de la formation de l'acrylamide dans les aliments...24
- **Figure 5 :** ERWINASE commercialisée.....26
- **Figure 6 :** Kidrolase commercialisée.....26

Liste des abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique

ASP : asparaginase

CM : carboxy méthyl

DEAE : Diethyl amino ethyl

DONV: 5-Diazo-4-Oxo-L-Norvaline

EDTA : acide ethylenediaminetetraacétique

KDA : kilodalton

K_m: constante de Michaelis

PAGE : Polyacrylamide gel électrophorèse

PCR: réaction de polymérisation en chaîne

PEG : poly éthylène glycol

PM : poids moléculaire

T° : température

Introduction

Introduction :

Toutes les réactions biochimiques nécessitent l'intervention d'enzymes, macromolécules protéiques, qui jouent un rôle fondamental de biocatalyseurs (Augère, 2001).

L'asparaginase (L-asparagine amidohydrolase EC : 3.5.1.1) est l'enzyme qui active la catalyse de l'acide aminé asparagine libre, en acide aspartique et ammonium. Cette enzyme possède des caractères physico-chimiques et biologiques variables, selon l'organisme duquel elle est isolée. (Cornea et al, 2002).

L'hydrolyse enzymatique de l'asparagine était observée premièrement par Lang en 1904, le résultat de Lang étaient confirmés par Furth et Friedman en 1910 qui ont mis en évidence l'hydrolyse de l'asparagine chez le cheval, et les organes du porc, ils ont conclu que tous les tissus animaux possèdent le même niveau de l'activité asparaginase. Clémenti (1922), montrait qu'elle est présente dans le foie des Omnivores, tandis que les organes des mammifères carnivores, des amphibiens, et des reptiles ne contiennent pas tous l'enzyme, par contre chez les herbivores, elle peut être trouvée pratiquement dans tous les tissus. Ce n'est qu'en 1961, que l'activité antitumorale du sérum du porc de Guinée a été attribuée à l'asparaginase par les travaux de Broome (Mickalska et Jaskolski, 2006).

La confirmation de l'effet anticancéreux de l'asparaginase d'origine animale a été suivie par d'autres travaux, se basant sur la recherche des sources microbiennes capables de produire cette enzyme en grande quantité et trouvent que seulement les asparaginases dérivées d'*Erwinia carotovora* et d'*Escherichia coli* possèdent une activité antitumorale particulièrement dans les leucémies lymphoblastiques aiguës (Cornea et al, 2002). Certains microorganismes ont deux types d'asparaginases I, et II comme *Saccharomyces cerevisiae*, et *Escherichia coli*. L-asparaginase I de cette dernière, trouvée dans le cytoplasme, et a une faible affinité à l'asparagine, et L-asparaginase II, qui est périsplasmique, utilisée dans le traitement des leucémies lymphoplastiques aiguës avec une affinité élevée au substrat (Ghasemi et al, 2008).

L'asparaginase est utilisée aussi en industrie agroalimentaire pour diminuer le taux d'acrylamide cancérigène dans les aliments (Friedman, 2003).

Le mémoire a pour but l'étude de quelques caractéristiques physicochimiques de l'asparaginase, sa production à l'échelle industrielle et son application.

Chapitre I:

Enzymologie de
l'asparaginase

I-1-La structure de l'asparaginase :

Il a été montré que l'asparaginase purifiée d'*Escherichia coli* est un polypeptide homotétramérique, possédant quatre ponts disulfures, et dépourvu de sucres et de phospholipides. L'asparaginase I est constituée de 322 acides aminés dans chaque sous unité, et l'asparaginase II constituée de 321 acides aminés (Mokrane, 2003).

Les études faites sur l'asparaginase purifiée de *Wolinella succinogenes* ont montré qu'elle est constituée de quatre sous unités identiques, et chacune d'elles comprend 330 acides aminés. Ces acides aminés présentent une similitude de 40-50% aux autres acides aminés des enzymes isolées d'autres sources bactériennes (Lubkowski et al, 2004)

En 1982, Guy et Daniel étudient la D-asparaginase purifiée de *Thermus aquaticus* et découvraient qu'elle contient six ponts disulfures.

Concernant l'asparaginase II purifiée de *Saccharomyces cerevisiae*, elle est une glycoprotéine (Kim et al, 1988), et la L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* consiste à 8 monomères (A, B, C, D, E, F, G, H), chacun est constitué de 330 acides aminés (Anderson, 2006).

La figure (1) illustre la structure tridimensionnelle de la sous unité A de l'asparaginase d'*Erwinia carotovora*.

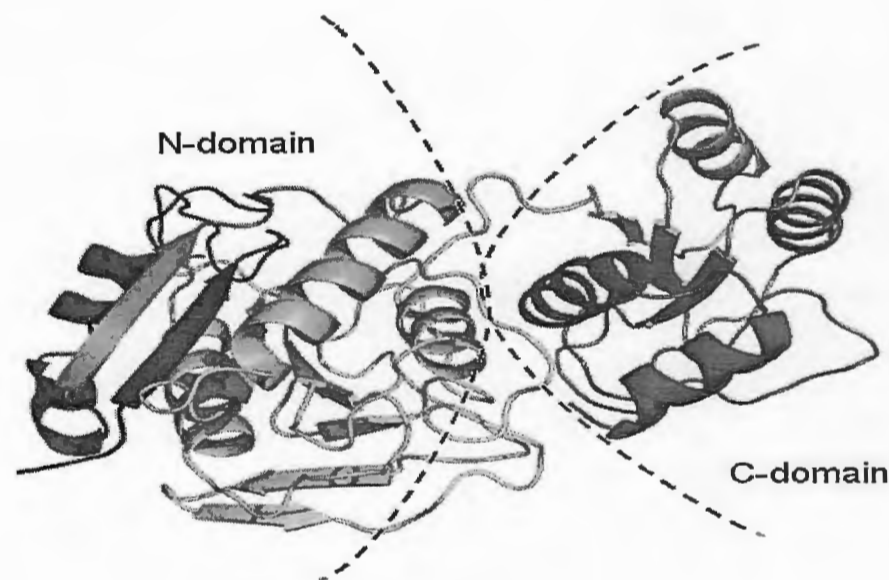


Figure 1 : Illustration de la structure tridimensionnelle de la sous unité A de l'asparaginase d'*Erwinia carotovora* (Anderson, 2006)

I-2-Le site actif de l'asparaginase :

Le site actif d'une enzyme est la partie protéique responsable de la fixation et la transformation du substrat en produit (Kamoun et al, 2003)

Comme toutes les enzymes, l'asparaginase a un site actif qui a une affinité pour l'asparagine, mais sa structure diffère selon les sources.

Escherichia coli possède quatre sites actifs; chacun est constitué de dix acides aminés qui sont par ordre Val-Gly-Ala-Met-Arg-Pro-Ser-Thr-Ser-Met (Mokrane, 2003).

La partie rigide du site actif de *Wolinella succinogenes* inclue la triade Thr93-Lys166-Asp94 (Lubkowski et al, 2004).

Les résidus impliqués dans le site actif d'*Erwinia carotovora* sont Thr15, Ser62, Thr96 et Asp120 (Anderson, 2006).

La figure (2) illustre les résidus catalytiques du site actif d'une asparaginase.

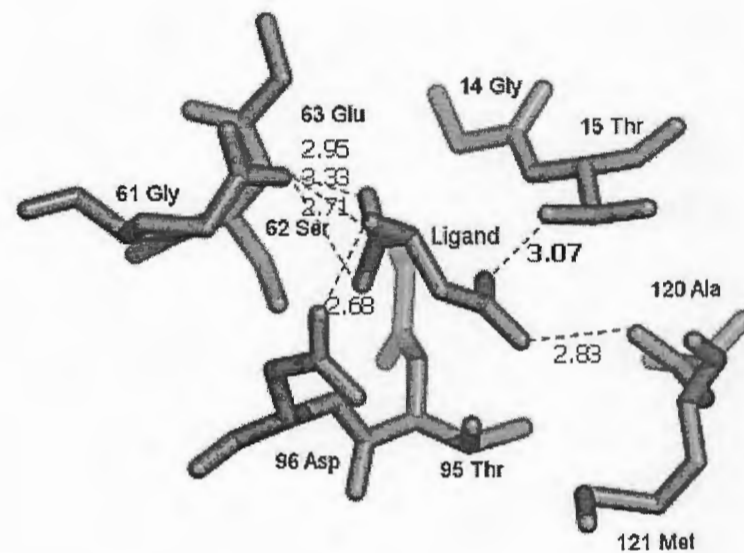


Figure2 : Les résidus catalytiques du site actif d'une asparaginase (Anderson, 2006)

I-3-les constantes cinétiques de l'asparaginase :

Des études ont démontré la présence d'une différence entre les valeurs des constantes de Michaelis (K_m) de l'asparaginase selon la source de l'enzyme et le substrat de la réaction. Les valeurs de cette constante de l'asparaginase purifiée de *Citrobacter* lors de l'utilisation de 5mM de L-asparagine, et D-asparagine comme substrat étaient égales à $2.6 \times 10^{-5}M$, et $1.4 \times 10^{-4}M$ respectivement (Bascomb et al, 1975), la K_m de l'asparaginase d'*Erwinia aroideae* NRRLB135 a été estimé à $3 \times 10^{-3}M$ (Peterson et Ciegler, 1969a).

En plus, il a été trouvé que la constante k_m du glutaminase-asparaginase purifiée à partir de *Pseudomonas acidovorans* était égale à $1.5 \times 10^{-5}M$ en cas d'utiliser L-asparagine comme substrat de la réaction, et lorsque le substrat ait le L-glutamine la K_m était égale à $2.2 \times 10^{-5}M$ (Davidson et al, 1977).

En 1977, Gaffar et Shethna ont estimé la valeur de la K_m de l'asparaginase de l'espèce *Azotobacter vinelandii* à $1.1 \times 10^{-4}M$. Selon Guy et Daniel (1982), le K_m de D-asparaginase purifiée de *Thermus aquaticus* était de 2mM. L'étude faite par Tosa et ses collaborateurs en 1972 a montré que la K_m de l'asparaginase de *Proteus vulgaris* varie selon le substrat de la réaction, et le trouve qu'il prenne les valeurs $2.6 \times 10^{-5}M$, $4.3 \times 10^{-7}M$ et $5 \times 10^{-3}M$ lorsqu'il utilise L-asparagine, D-asparagine et le L-glutamine respectivement.

Pour les deux types d'asparaginases d'*Escherichia coli* la K_m est évalué à 3.5mM et 10pM pour l'asparaginase I et l'asparaginase II respectivement en utilisant le L-asparagine comme substrat (Ghasemi et al, 2008)

Concernant l'asparaginase isolée à partir de *Pseudomonas aeruginosa* 50071 elle a une K_m égale à 0.147mM et une V_{max} de 35.71U (El Bassoumy et Al omaïr, 2004).



I-4-Le mode d'action de l'asparaginase :

Le mécanisme d'action de l'enzyme est inconnu bien que le procédé d'hydrolyse se fait en deux étapes par l'intermédiaire de complexe B-acyl-enzyme. La première étape s'effectue en deux réactions : premièrement, il y a une attaque nucléophile de la liaison amide de l'asparagine, pour former un intermédiaire tétraédrique. La décomposition de ce dernier conduit à la formation du complexe B-acyl-enzyme suivie de libération d'ammonium et son remplacement par une molécule d'eau. La deuxième étape se débute par une réaction inverse de la deuxième réaction . Elle conduit à la formation d'un deuxième intermédiaire tétraédrique, qui se décompose en aspartate et l'enzyme actif selon la (figure 3). (Mickalska et Jaskolski, 2006).

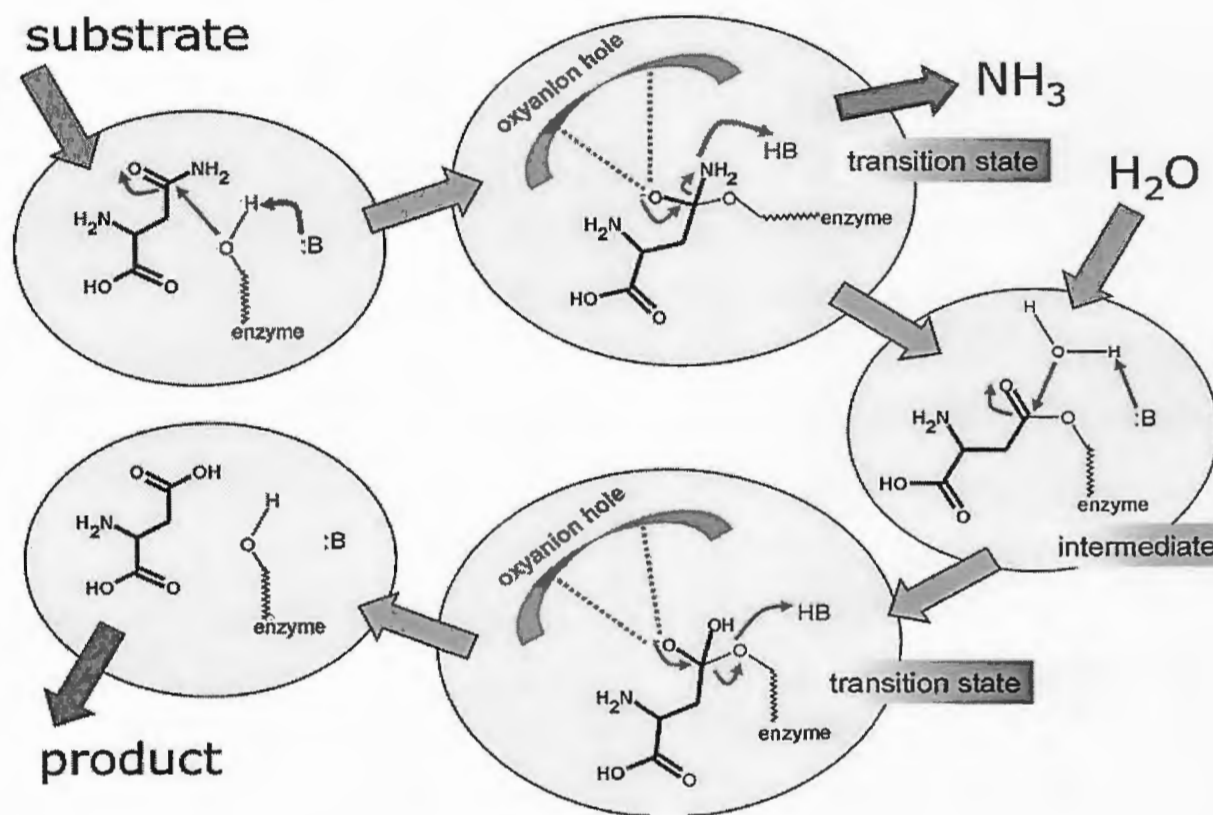


Figure 3 : Le mécanisme général d'action de l'asparaginase.
(Mickalska et Jaskolski, 2006).

I-5-Les propriétés physicochimiques de l'asparaginase :

Les propriétés physicochimiques de l'asparaginase diffèrent selon l'organisme d'où elle est purifiée.

Certains asparaginases ont un faible poids moléculaire (PM) comme celles purifiées de *Thermus aquaticus* qui a un PM de 60 KDa (Guy et Daniel, 1982) d'autres, par contre, ont un grand poids moléculaire citons l'exemple de l'asparaginase II purifiée de *Saccharomyces cerevisiae* qui a un PM de 800 KDa (Mokrane, 2003).

Les asparaginases produites par certains micro-organismes présentent une activité maximale dans des conditions de pH alcalins c'est le cas des asparaginases de *Pseudomonas aeruginosa* (El Bassoumy et al, 2004) et *Pseudomonas acidovorans* (Davidson et al, 1977). Celles purifiées d'autres sources microbiennes préfèrent pour une activité maximale un pH neutre ou proche de la neutralité comme l'asparaginase d'*Esherichia coli* (Youssef et Al-omaïr, 2008) et de *Serratia marcescens* (NovaK et Phillips, 1974).

L'asparaginase est le plus souvent active à des températures proche de 37°C les cas des asparaginases d'*Esherichia coli*, de *Pseudomonas aeruginosa*, et de *Saccharomyces cerevisiae* (Mokrane, 2003; El Bassoumy et al, 2004 ; Youssef et Al-omaïr, 2008) mais dans certains cas, comme l'asparaginase isolée de *Bacillus kaustophilus* qui montre une température optimale égale à 74°C (Mokrane, 2003).

Le tableau (1) ci-dessous représente certaines propriétés physicochimiques des asparaginase isolées de différentes sources.

Tableau (1) caractéristiques physicochimiques d'asparaginase de différentes sources :

Enzyme	Source microbienne	Masse moléculaire	pH	T°	Inhibiteur	Référence
Asparaginase	<i>Serratia marcescens</i>	/	6.8	/	L-glutamine (inhibiteur compétitif)	Novak et Phillips, 1974
Asparaginase	<i>Vibrio succinogenes</i>	146 kDa	7.3	/	/	Distasio et al, 1976
Asparaginase	<i>Pseudomonas acidovorans</i>	156 kDa	9.5	/	/	Davidson et al, 1977
Asparaginase	<i>Azotobacter vinelandii</i>	84 kDa	8.6	48°C	/	Gaffar et Shethna, 1977
Asparaginase	<i>Thermus aquaticus</i>	60 kDa	/	/	Acides cétoniques Concentration élevée en NaCl	Guy et Daniel, 1982
Asparaginase	<i>Pisum sativum L</i>	69 kDa	/	/	Aspartate Glycine	Chagas et Sodek, 2001
Asparaginase II Asparaginase I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	400 kDa 800 kDa	8.5 6.5	35°C	/	Mokrane,2003
Asparaginase	<i>Erwinia aroideae</i>	108 kDa	9.5	41°C	/	Mokrane,2003
Asparaginase	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	80 kDa	7	40°C	/	Mokrane,2003
Asparaginase	<i>Bacillus kaustophilus</i>	120-124 kDa	9.2-9.3	74°C	/	Mokrane,2003
Asparaginase II	<i>Escherichia coli</i>	140-160 kDa	7.5	37°C	DONV	Youssef et Al-omaïr , 2008
Asparaginase	<i>Withania somnifera</i>	72 kDa	8.5	37°C	/	Oza et al, 2009

DONV=5-Diazo-4-oxo-L-norvaline

I-6-l'extraction et la purification de l'enzyme :

La localisation de l'enzyme dans la cellule (extracellulaire, intracellulaire) nous oriente vers la meilleure méthode de sa purification et le tableau suivant représente quelques méthodes utilisées pour purifier l'asparaginase de quelques microorganismes producteurs.

Tableau 2 : les méthodes de purification de l'asparaginase

Producteurs	Types d'asparaginases	Méthodes d'extraction et de purification	Références
Sérum des porcs de la Guinée	Asparaginase	-fractionation au sulfate de sodium -filtration sur gel Sephadex G200 -chromatographie sur DEAE-cellulose -chromatographie sur hydroxyapatite de calcium	Yellin et Wriston ,1966
<i>Proteus vulgaris</i>	L-asparaginase (intracellulaire)	-lyse cellulaire par le lysozyme -fractionation au sulfate d'ammonium -filtration sur gel du Sephadex G100 -chromatographie sur DEAE Sephadex -cristallisation par addition du sulfate d'ammonium	Tosa et al, 1972
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Asparaginase (extracellulaire)	Chromatographie d'affinité	Gaffar et Shethna, 1977
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	L-asparaginase (extracellulaire)	-chromatographie échangeuse de cation sur CM cellulose -centrifugation -élution	Bierau, 2000
<i>Pisum sativum L</i>	Asparaginase (extracellulaire)	Chromatographie sur Sephacryl S200 mobilité sur PAGE natif	Chagas et Sodek, 2001
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Asparaginase (extracellulaire)	Chromatographie d'affinité par un ion métallique immobilisé	Jianquan et Bachas, 2002
<i>Escherichia coli</i>	L-asparaginaseII (intracellulaire)	-Lyse cellulaire par le lysozyme et EDTA. -ultrafiltration -chromatographie échangeuse d'ion DEAE-cellulose -filtration sur gel Sephadex G200	Mokrane, 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L-asparaginase (extracellulaire)	-fractionation par le sulfate d'ammonium -filtration sur gel Sephadex G100 et sur CM-Sephadex C50	El Bassoumy et Al omair, 2004
<i>Withania somnifera</i>	Asparaginase	Filtration sur gel de Sephadex	Oza et al, 2009

Chapitre II :

production de
l'asparaginase
microbienne

II-1-Les sources de l'enzyme :

En 1983, Kidd trouvait que le sérum des porcs de Guinée inhibe la croissance des cellules tumorales des souris ; et Broome en 1961 propose que cet effet anticancéreux est dû à l'asparaginase. Après la confirmation de l'effet anticancéreux de l'asparaginase, les chercheurs ont basé leurs travaux sur la recherche des sources microbiennes capable de la produire et trouvent que cette enzyme est produite par un grand nombre des bactéries, de levures et de champignons (Ghasemi et al, 2008).

II-1-1-Les bactéries :

L'asparaginase est produite plus spécialement par les bactéries Gram négatif (Neto et al, 2006). Les sources bactériennes qui ont la capacité de les produire sont très nombreuses on trouve par exemple : *Escherichia coli* qui a deux types d'asparaginases I et II, l'asparaginase I se trouve dans le cytoplasme avec une faible affinité pour le L-asparagine par rapport à l'asparaginase II qui est péri-plasmique. Elle est utilisée dans le traitement des leucémies (Ghasemi et al, 2008). Plusieurs bactéries capables de produire une asparaginase ont été citées : *Aerobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Proteus* et *Hydrogenomonas* (Peterson et Ciegler, 1969b).

Citrobacter possède une asparaginase capable d'hydrolyser D-asparagine et L-glutamine à 7 et 5% respectivement de leurs activités vis-à-vis L-asparagine (Bascomb et al, 1975).

I-1-2-Les levures :

Les levures sont largement répandues dans le domaine alimentaire et le domaine biotechnologique où elles sont capables de produire différents métabolites pendant la phase de croissance parmi eux les enzymes comme l'asparaginase.

Certaines levures peuvent produire l'asparaginase par exemple : *Saccharomyces cerevisiae* (Kim, 1988), *Candida utilis* (El Bassoumy et Al omaïr, 2008), *Pichia etchelsii* et *Hansenula petersonii* (Mokrane, 2003).

I-1-3-Les moisissures :

Les moisissures sont généralement exploitée à grande échelle pour la fabrication des acides organiques (acide citrique), des médicaments (antibiotiques) et des enzymes tel que l'asparaginase qui est produite par *Fusarium*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamarri*, *Aspergillus niger* MCS67, *Penicillium notatum* MCS168, *Penicillium camemberti*4845 et *Rhizopus nigricans* 169 (Roberts et al, 1968 ; De Moura Sarquis et al, 2004).

Dans le tableau (3) sont citées quelques espèces de microorganismes producteurs de l'asparaginase.

La présence de l'asparaginase dans le sérum de certains animaux appartenant à la sous famille de *Cavioideae* et dans le sérum de certains singes (Saimiri) et même dans le foie du poulet a été mise en évidence (Mokrane, 2003).

En plus, elle se trouve aussi chez les plantes comme *Pisum sativum* (Chagas, 2001) et *Withania somnifera* (Oza et al, 2009) mais elle est absente chez l'Homme (Cornea et al, 2002).

Tableau (3) : Quelques microorganismes producteurs de l'asparaginase

Les producteurs	L'activité	Référence
Les bactéries		
<i>Escherichia coli</i>	0-225 UI/g	Peterson et Cieglar, 1969b
<i>Aerobacter aerogenes</i>	0-65 UI/g	
<i>Bacillus subtilis</i>	0-55 UI/g	
<i>Bacillus megaterium</i>	0-35 UI/g	
<i>Erwinia aroideae</i>	55-770 UI/g	
<i>Erwinia carotovora</i>	40-450 UI/g	
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	175-21 0UI/g	
<i>Serratia marcescens</i>	100-335 UI/g	
<i>Xanthomonas campestris</i>	50 UI/g	
<i>Photobacterium fischeri</i>	0 UI/g	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	40-150 UI/g	
<i>Proteus vulgaris</i>	65-370 UI/g	
<i>Hydrogenomonas eutropha</i>	620 UI/g	
<i>Citrobacter</i>	45 UI/mg protéine	Bascomb et al, 1975
<i>Zymomonas mobilis</i>	16 UI/l	Neto et al, 2006
Les moisissures		
<i>Aspergillus niger</i> MCS67	/	Roberts et al, 1968
<i>Penicillium notatum</i> MCS168	/	
<i>Penicillium camemberti</i> 4845	/	
<i>Rhizopus nigricans</i> 169	/	
<i>Aspergillus terreus</i>		De Moura Sarquis et al, 2004
<i>Fusarium</i>	58 U/l	
<i>Aspergillus tamarri</i>	/	
	/	
Les levures		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	/	Kim et al, 1988
<i>Candida utilis</i>	/	Youssef et Al omaïr, 2004

II-2-La production industrielle de l'asparaginase:

La vie ou le développement d'un microorganisme nécessite la présence, dans le milieu, d'une source d'énergie ainsi que tous les éléments nécessaires aux synthèses. Pour qu'un milieu permette le développement d'un microorganisme, il doit donc contenir tous les éléments nécessaires à sa nutrition et de plus sous une forme utilisable par ce microorganisme.

II-2-1-La source de carbone :

Pour effectuer leur métabolisme, les microorganismes doivent trouver dans le milieu une source de carbone qui est nécessaire à la formation du squelette de toutes les molécules organiques et serve aussi comme source d'énergie (Prescott et al, 2003).

En 1983, Del casale et ses collaborateurs montraient que l'espèce bactérienne *Escherichia coli* a deux types d'asparaginases I et II qui diffèrent dans les conditions de leur production. La culture aérobie d' *Escherichia coli* dans le milieu M9 modifié contenant le glucose comme source de carbone conduit à la production seulement de l'asparaginase I, parce que la présence du glucose dans le milieu inhibe l'expression du gène *AnsB* codant pour l'asparaginase II, ce qui pousse Ghasemi et ses collaborateurs en 2008, à changer la source de carbone du milieu du glucose à un disaccharide pour réduire la quantité du glucose intracellulaire, et permet la production de l'asparaginase II, il a été trouvé que le maltose est le meilleur disaccharide à utiliser. En plus d' *Escherichia coli*, il y a d'autres microorganismes qui utilisent le glucose comme source de carbone pour produire l'asparaginase comme *Erwinia aroideae* NRRLB-138 cultivé en milieu TGY (Peterson et Ciegler, 1972), *Serratia marcescens* cultivé sous des conditions aérobies (Sukumaran et al, 1979) et les champignons filamenteux cultivés en milieu CzapeckDOX (De Moura Sarquis et al, 2004).

Dans certains cas, il existe d'autres sources de carbone comme le fumarate de sodium utilisé pour la culture de *Proteus vulgaris* OUT8226 à 30°C pendant 70heures et les mélasses de sucre utilisées par *Zymomonas mobilis* pour produire l'asparaginase (Neto et al, 2006).

II-2-2-La source d'azote :

Les microorganismes utilisent la source d'azote pour la production des acides aminés, purines, pyrimidines et certains glucides et lipides (Prescott et al, 2003) ; et comme l'asparaginase est une enzyme de nature protéique, elle nécessite pour sa production la présence d'une source d'azote dans le milieu. La qualité de cette source affecte la formation du produit de la fermentation à l'échelle industrielle.

Ferrara et ses collaborateurs en 2004 ont évalué l'urée comme un substitut de la proline dans la fermentation d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae ure 2 dal 80* pour la production de l'asparaginase II pendant une phase stationnaire rapide. Il a été observé que dans les deux cas soit en présence de la proline ou de l'urée l'asparaginase II avait une activité maximale égale à 265 UI/L mais lorsqu'il change la source d'azote déjà utilisé par l'ammonium, il a trouvé que l'activité de l'enzyme soit égale à 157 UI/L.

L'extrait de levure est une source d'azote utilisée par *Erwinia aroideae NRRLB-138* cultivée en milieu TGY (Peterson et Ciegler, 1972) et *Zymomonas mobilis* cultivé dans un milieu à base de sucre (Neto et al, 2006)

En plus, *Proteus vulgaris OUT8226* et *Citrobacter* utilisent l'eau de lavage de maïs comme source d'azote (Tosa et al, 1971 et Bascomb et al, 1975), il a été trouvé que la production de l'asparaginase d' *Escherichia coli* et des champignons filamenteux nécessite la présence des acides aminés dans le milieu de culture, où on observe que la production de l'asparaginase II d' *Escherichia coli* nécessite une forte concentration en acides aminés tandis que la production de l'asparaginase I nécessite la présence de l'asparagine comme source d'azote (Del casale et al, 1983).

Aspergillus terreus est un champignon filamenteux ayant une productivité élevée de l'asparaginase lorsqu'il est cultivé en milieu contenant 2% proline, et généralement le règne *Fungi* présente une faible productivité en présence du glutamine et d'urée comme source de nitrogène (De Moura Sarquis et al, 2004).

On peut produire l'asparaginase à partir d'une culture de *Serratia marcescens* à 37°C pendant 24 heures dans un milieu contenant l'extrait de bœuf comme source d'azote (Sukumaran et al, 1979).

II-2-3-pH de la production :

Le pH du milieu affecte le développement des microorganismes et par conséquent la production des métabolites et la production de l'asparaginase aussi est affectée par les variations du pH et préfère celui qui se situe entre 6,2 et 8 selon le tableau (4) mais la plupart des microorganismes produisent cette enzyme à pH égale à 7 comme *Escherichia coli*, *Erwinia aroideae*, et *Proteus vulgaris* (Del casale et al, 1983 ; Peterson et Ciegler, 1972 et Tosa et al, 1971) et il existe d'autres sources qui la produisent dans un milieu légèrement acide comme les champignons filamenteux (pH=6,2) (De Moura Sarquis et al, 2004) alors que *Azotobacter vinelandii* produit l'asparaginase dans un milieu ayant une gamme de pH qui varie de 6,5 à 8 (Gaffar et Shethna, 1977).

II-2-4-La température de la production :

Les microorganismes comme tous les êtres vivants, sont profondément affectés par la température de leur environnement, un des facteurs les plus importants concernant les effets de la température sur la croissance, est la thermo-sensibilité des réactions catalysées par les enzymes (Prescott et al, 2003)

Les études faites sur l'asparaginase ont montré que sa production par les microorganismes est le plus souvent à 37°C tel que les deux types d'asparaginase d'*Escherichia coli* (Ghasemi et al, 2008), l'asparaginase de *Serratia marcescens* (Sukumaran et al, 1979) et de *Citrobacter* (Bascomb et al, 1975) mais on peut aussi obtenir l'asparaginase à partir des cultures microbiennes à des températures plus basses comme l'exemple de la culture de *Zymomonas mobilis* et *Proteus vulgaris* à 30°C (Neto et al, 2006 et Tosa et al, 1971) et la culture des champignons filamenteux à 26°C pendant une durée de 7 jours (De Moura Sarquis et al, 2004)

Notons que la température optimale de la production enzymatique peut différer de celle qui offre un optimum d'activité à l'enzyme par exemple il est observé les cellules d'*Azotobacter vinelandii* produisent l'asparaginase à une température qui se situe entre 30 et 37°C malgré que cette enzyme a un optimum d'activité à 48°C (Gaffar et Shethna, 1977).

II-2-5-L'aération :

En 1983, Del casale et ses collaborateurs observait que l'asparaginase II d'*Escherichia coli* était produite lors du passage des conditions aérobies aux conditions anaérobies, où en milieu aérobie il y a production d'une toute petite quantité de l'enzyme par contre l'arrêt de l'aération augmente l'activité de l'asparaginase II, ces observations conduisent à considérer l'oxygène comme un inhibiteur de la production d'asparaginase II, alors que l'asparaginase I est produite en aérobiose.

Autres études démontraient que la production de l'asparaginase II par la souche *Escherichia coli* k12 est seulement sous des conditions anaérobies (Mokrane, 2003). Lors de l'étude de l'effet de l'aération sur la production de l'asparaginase par *Erwinia aroideae* NRRLB-138 il a été montré que la bonne aération conduit à une augmentation de biomasse (0,18g poids sec/L) et une diminution de l'activité de l'enzyme à 70% (230 U/g poids sec) par rapport aux faibles taux d'aération qui donnent une productivité élevée de l'enzyme (960 U/g poids sec) sans effet considérable sur la biomasse (0,14g poids sec/L) (Peterson et Ciegler, 1969a). La même chose pour la souche *Proteus vulgaris* OUT8226, où il a été trouvé que la meilleure production de l'asparaginase serait sous des conditions de culture aérobies (absorption d'un mmol d'oxygène par litre de milieu de culture par minute) (Tosa et al, 1971).

Certaines conditions de la production de l'asparaginase à partir de différentes sources sont montrées dans le tableau (4)

Tableau (4) : Les conditions de la production de l'asparaginase à partir de différentes sources

Sources microbiennes	Type d'enzyme	pH optimum	T° optimal	Source de carbone	Source d'azote	Référence
<i>Escherichia coli</i>	L-asparaginase II	7	37	Faible concentration en sucre	Fortes concentrations en acides aminés	Del casale et al, 1983
	L-asparaginase I	7	37	Glucose	L-asparagine	Ghasemi et al, 2008
<i>Proteus vulgaris</i> <i>OUT8226</i>	L-asparaginase	7	30	Fumarate de sodium	Eau de lavage de maïs	Tosa et al, 1971
<i>Erwinia aroideae</i> <i>NRRLB138-</i>	L-asparaginase	7	28	Glucose	Extrait de levures	Peterson et Ciegler, 1972
<i>Citrobacter</i>	L-asparaginase	/	37	/	Eau de lavage de maïs	Bascomb et al, 1975
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Asparaginase	6,5-8	30-37	/	Azote libre	Gaffar et Shethna, 1977
<i>Serratia marcescens</i>	L-asparaginase	6,8-7	37	Glucose	Extrait de bœuf	Sukumaran et al, 1979
Les champignons filamenteux	L-asparaginase	6,2	26	Glucose	L-asparagine	De Moura Sarquis et al, 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Asparaginase II	6,5	/	/	Urée, proline	Ferrara, 2004
<i>Zymomonas mobilis</i>	L-asparaginase	/	30	Mélasses de sucre	Extrait de levures	Neto et al, 2006

II-3-Les gènes de l'asparaginase :

Le clonage moléculaire consiste à introduire un fragment d'ADN dans une cellule hôte d'un organisme unicellulaire, le plus souvent une bactérie ou une levure, le fragment introduit est alors facilement reproduit en grande quantité et il peut être isolé à partir d'un clone issu de multiplication de la cellule réceptrice. Le clonage d'un gène ou d'un fragment d'ADN fait appel à une succession d'étapes qui reposent sur la technologie de la recombinaison *in vitro* entre molécules d'ADN aboutissant à l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur.

Dans le but d'une surproduction de l'asparaginase il est nécessaire de cloner le gène codant cette enzyme.

L'étude de Youssef et Al omair en 2008, reposait sur le clonage du gène *AnsII*, codant l'asparaginase II, d'*Escherichia coli* W3110 en utilisant le vecteur d'ADN pGEX-2T. L-asparaginase est exprimée dans *Escherichia coli* BL21 (DE 3) dans le milieu LB contenant l'extrait de levure et supplémenté d'ampicilline.

Une autre étude dans la même année (2008), était réalisée par Yano et ses collaborateurs. Elle était basée sur le clonage et l'expression du gène *AnsA* codant l'asparaginase I recombinante de *Bacillus subtilis* dans *Escherichia coli*. Le gène *AnsA* de *Bacillus subtilis* était amplifié par PCR et cloné et exprimé dans *Escherichia coli*.

L'enzyme était produite par le clone avec une activité spécifique élevée par rapport à l'asparaginase II d'*Escherichia coli* ce qui permet de l'appliquer en agroalimentaire.

Avant ces études, ils y avaient d'autres, comme celle basée sur le clonage du gène *ybik* codant l'asparaginase III d'*Escherichia coli* (Michalska et Jaskolski, 2006) et le clonage du gène *AnsB* d'*Escherichia coli* IBB13, qui code l'asparaginase II dans le vecteur pUC19 et son transfert dans *Escherichia coli* HB101 (Cornea et al, 2002).

Plus anciennement que ces études, en 1988, Kim et ses collaborateurs clonèrent le gène *Asp3* de *Saccharomyces cerevisiae* qui code l'asparaginase II.

Le tableau (5) suivant présente quelques essais de clonage du gène de l'asparaginase.

Tableau (5) : Les gènes de l'asparaginase clonés dans différents microorganismes

Gène	Enzyme	Source	Hôte	Vecteur	Références
<i>ASP3</i>	Asparaginase II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	/	/	Kim et al, 1988
<i>AnsB</i>	Asparaginase II	<i>Escherichia coli</i> IBB13	<i>Escherichia coli</i> HB101	pUC19	Cornea et al, 2002
<i>ybiK</i>	Asparaginase III	<i>Escherichia coli</i>	/	/	Michalska et Jaskolski, 2006
<i>AnsII</i>	L-asparaginase II	<i>Escherichia coli</i> W3110	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	pGEX-2T DNA	Youssef et Al-omaïr, 2008
<i>AnsA</i>	Asparaginase I	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	/	Yano et al, 2008

III-1-L'utilisation de l'asparaginase microbienne en thérapie :

La croissance des cellules malignes ou des cellules normales de l'organisme nécessite un certain nombre de produits indispensables, certains sont synthétisés par la cellule, d'autres ont besoin d'être métabolisés par le foie, d'autres encore d'être apportés par la nourriture. Le L-asparagine est un acide aminé non indispensable synthétisé par transamination de l'acide L-aspartique, l'enzyme étant la L-asparagine synthétase. Cette enzyme existe dans beaucoup de tissus, mais à toutes petites concentrations. Dans certaines tumeurs malignes dérivées des lymphocytes. L'apport de L-asparaginase donne un effet de déplétion rapide et complète de L-asparagine circulante (Lemerle, 1989).

III-1-1-Les différentes asparaginases indiquées en thérapie :

En 1922, Clementi trouvait l'asparaginase dans le sérum des porcs de Guinée, les propriétés anti-tumorales de l'enzyme sont reconnues après un temps lorsque Broome découvrait que la régression du lymphosarcome transplanté dans les souris traitées par le sérum des porcs de Guinée résulte de la dépendance nutritionnelle des cellules malignes en L-asparagine. Les cellules résistantes à l'effet de l'enzyme contiennent l'asparagine synthétase capable de produire l'asparagine en cas d'une déficience. Les bactéries contiennent une L-asparaginase ayant une activité anti-tumorale et *Escherichia coli* était la seule source de l'enzyme utilisée en thérapie (Cammack et al, 1972).

L-asparaginase II d'*Escherichia coli* est une enzyme importante comme agent thérapeutique des leucémies lymphocytiques, des maladies de Hodgkin, des leucémies myélocytique chroniques, dans le traitement du lymphosarcome, du réticulosarcome et du mélanosarcome. Le rôle de L'asparaginase II dans le traitement des cellules leucémiques lymphocytiques est basé sur l'incapacité des cellules à synthétiser L-asparagine. Au contraire, les cellules normales sont protégées de la déplétion de L-asparagine par l'action de l'asparaginase II. A travers quelques espèces productrices de l'asparaginase II, seulement les asparaginases d'*Escherichia coli* et *Erwinia carotovora* étaient utilisées en médecine comme un médicament efficace dans la leucémie lymphocytique à cause de leur affinité élevée pour le substrat et les facteurs affectants la tolérance de l'enzyme vis-à-vis de substrat de la réaction (Youssef et Al-omair, 2008).

L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* et d'*Escherichia coli* sont capables d'inhiber et d'éliminer certains types des cellules tumorales. Cependant quelques toxicités étaient observées pendant les études cliniques (Cammack et al, 1972).

Bien que les techniques de purification améliorées aident à diminuer la fréquence des réactions antigéniques exposées par quelques patients, autres sources de cette enzyme sont désirées et parmi eux *Erwinia aroideae* NRRLB-138 qui était trouvée capable de produire des quantités considérables de l'asparaginase.

Les études ultérieures indiquent que le rendement enzymatique était égal à 2 UI/ml et peut être facilement obtenu après 8 heures par ce microorganisme.

Grâce à la demande des quantités de l'asparaginase pure et une perte d'activité de 60% à 95% associée aux techniques de purification, une recherche était entreprise pour augmenter le rendement enzymatique à travers l'optimisation du substrat et l'aération (Peterson et Ciegler, 1972).

L'administration de l'asparaginase II d'*Escherichia coli* pendant une longue durée en générale produit des anticorps correspondant dans les êtres vivants, les anticorps causent des chocs anaphylactiques, ou la neutralisation de l'effet du médicament ; donc la découverte d'une nouvelle asparaginase immunologiquement différente de celle d'*Escherichia coli* était énormément désirée. Il était observé que l'asparaginase de *Proteus vulgaris* assurait une activité anti-tumorale et différait immunologiquement de l'enzyme d'*Escherichia coli* (Tosa et al, 1971).

La L-glutaminase-L-asparaginase de *Pseudomonas acidovorans* produit une augmentation marginale du temps de la survie des souris C3H/HE portant la tumeur 6C3HED Gardner et les souris blanches Swiss portant la forme ascitique d'Ehrlich lymphoma (Davidson et al, 1977).

Une L-asparaginase intracellulaire munie d'une activité anti-tumorale était purifiée à partir d'une souche de *Citrobacter*. L'activité anti-lymphomique de l'enzyme était démontré avec le lymphosarcome et était trouvé qu'elle est légèrement moins puissante que Crasnitin (Bascomb et al, 1975).

L'asparaginase microbienne était étudiée particulièrement pour son application comme agent thérapeutique dans le traitement de certains types de cancer humain. Elle est utilisée pour le traitement du carcinome pancréatique et du lymphosarcome bovin. La recherche d'autres sources d'asparaginase comme les microorganismes eucaryotes,

peut conduire à une enzyme avec moins d'effets négatifs. Il était observé que les microorganismes eucaryotes comme les levures et les champignons filamenteux ont une production potentielle de l'asparaginase par exemple : les genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (De Moura Sarquis et al, 2004). L'asparaginase purifiée partiellement d'*Aspergillus terreus* possède des propriétés anti-tumorales contre les ascites d'Ehrlich (El Bassoumy et al, 2004).

En 1983, Durden et ses collaborateurs examinent les effets hépatotoxiques du traitement prolongé avec les asparaginases d'*Escherichia coli* et *Erwinia carotovora* et comparent les toxicités observées à ceux observées à l'asparaginase-glutaminase libre des *Vibrio succinogenes* en utilisant des souris. Ils concluent que l'asparaginase glutaminase libre isolée de *Vibrio succinogenes*, ayant une activité élevée antilymphome, n'est pas hépatotoxique, même après un traitement prolongé. Par conséquent, il peut s'avérer être un agent anti-tumoral plus efficace chez l'Homme.

III-1-2-Administration de l'asparaginase :

L'asparaginase est une enzyme cytostatique inhibant la synthèse protéique d'origine bactérienne provoquant une carence en asparagine au niveau des cellules leucémiques et des hépatocytes (pas de résistance croisée avec les autres cytostatiques), relativement allergisants. Elle a une diffusion tissulaire et des demi-vies de 8 à 30 heures (variation individuelle) (Dorosz, 2004).

L'asparaginase se présente sous forme d'ampoules de 10000 unités de poudre injectable.

La dose est de 7500 à 10000 UI/m²/24 heures pour un adulte et de 500 à 1000 UI/Kg/24 heures pour enfant. Cette dose mélangée avec 2,5 ml d'eau PPI est administrée par une perfusion intraveineuse ou intramusculaire.

L'asparaginase peut être administrée par voie intrarachidienne à une dose de 50 à 1000 UI/Kg/injection en faisant attention en cas de diabète.

Le traitement avec l'asparaginase peut être un traitement d'attaque par injection du médicament tous les jours pendant 6 à 21 jours, un traitement d'entretien 1 à 2 fois par semaine ou un traitement de réinduction tous les jours pendant 5 à 15 jours, associé à une corticothérapie 24 à 48 heures avant.

Ce médicament doit être conservé au réfrigérateur à 2°C -8°C avant sa reconstitution mais après sa reconstitution il faut éviter de conserver plus de 24 heures.

Il faut que l'asparaginase ne soit pas mélangée à un autre produit dans la même seringue et la même perfusion (Chevrel et al, 2001).

III-1-3-Les effets indésirables de l'utilisation de l'asparaginase :

Comme tous les médicaments, l'asparaginase, en plus de l'importance considérable en thérapie, a des effets indésirables parmi eux les chocs anaphylactiques avec phénomène d'hypersensibilité, des toxicités cérébrales, pancréatiques (dans 15% des cas) et hépatiques avec une dégénérescence graisseuse. La diminution de la synthèse des protéines peut entraîner des troubles de la coagulation et on observe quelques fois des diabètes (Lemerle, 1989).

Il peut exister aussi des toxicités digestives : nausées, vomissements fréquents (30 à 60%) mais plus rarement des diarrhées, ulcération muqueuse, anorexie...

On peut observer aussi des toxicités biologiques comme l'ictère, l'hypercholestérolémie, l'hypo albuminémie, l'hyper bilirubinémie, une élévation des phosphatases alcalines et une hyperuricémie et les toxicités cutanées comme l'éruption urticarienne, les réactions érythémateuses prurigineuses ou non, et Œdème de Quinke (Belon, 1999).

En fin il peut exister des fièvres, des frissons, alopecie, aménorrhée, azoospermie, hypofibrinémie intense, hypoglycémie, et une faible toxicité hématologique (Dorosz, 2004).

En 2006, Distasio et ses collaborateurs réalisent une expérience dans le but d'évaluer les effets hépatotoxiques de différentes asparaginases puisque les atteintes de foie sont la toxicité principale liée au traitement par les enzymes microbiennes. Les souris BALB/C sont traitées avec 50 UI d'asparaginase d'*Escherichia coli* quotidiennement.

Les sections transversales du foie des souris traitées par l'asparaginase de *Vibrio succinogenes* ont semblé normales par rapport aux spécimens des animaux témoins. La mesure de la concentration des lipides extractibles totaux du foie des animaux traités par l'asparaginase d'*Escherichia coli* a indiqué une augmentation de 45% et de 127% de concentration en lipides par rapport aux souris témoins après 4 et 5 jours de traitement

respectivement. L'enzyme de *Vibrio* n'a pas causé un changement de concentration en lipides extractibles par rapport aux animaux témoins. Les concentrations d'albumine, de triglycéride, du cholestérol et de l'antithrombine III du plasma ont tous diminué chez les souris traitées par l'asparaginase d'*Escherichia coli* confirmant l'hépatotoxicité. Aucune modification n'a été observée au niveau des protéines du plasma chez les souris traitées avec l'asparaginase des *Vibrio succinogenes*. Les lipides du plasma ont diminué d'une façon minimale mais seulement le niveau du cholestérol s'est avéré statistiquement significatif par rapport aux témoins. Les données soutiennent fortement le concept que l'épuisement spécifique d'asparaginase n'est pas sensiblement hépatotoxique. Donc, l'asparaginase des *Vibrio succinogenes* peut servir d'agent anti-leucémique efficace sans endommager les tissus normaux.

III-2-L'utilisation de l'asparaginase en agroalimentaire :

L'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) est un produit industriel utilisé pour synthétiser le polyacrylamide. A cause de ses effets sur les cellules, les tissus, les animaux, et l'Homme, il a été étudié considérablement.

L'acrylamide se forme dans plusieurs produits alimentaires à base de pomme de terre (chips, frites) ou de céréales (orge, riz, blé tendre), les biscuits, les pains et le pop-corn, mais il n'apparaît jamais dans les aliments d'origine animale (le poulet, les viandes et les poissons) et les aliments bouillis. A cause de sa présence dans les aliments, il provoque une neurotoxicité, une toxicité reproductive et une cancérogénicité. Cette molécule toxique est le fruit d'une réaction des sucres réducteurs (glucose, fructose) avec l'asparagine selon la figure (4) connue sous le nom de « réaction de Maillard ».

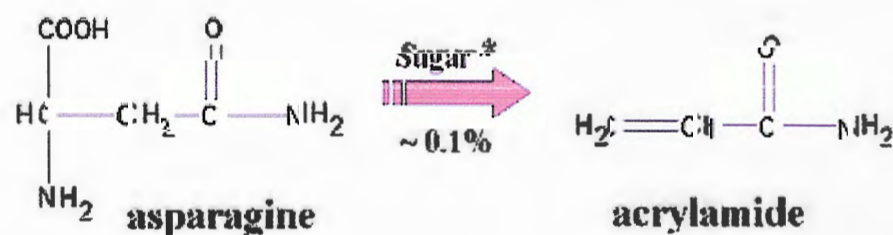


Figure (4) : le mécanisme de la formation de l'acrylamide dans les aliments
(site web n°1)

L'étude de la dépendance de la température montrait que la formation de l'acrylamide augmente avec la température de 120°C à 170°C puis diminue.

Il était nécessaire de trouver une solution pour résoudre ce problème : C'est l'ajout de l'asparaginase comme additif alimentaire pendant la préparation des aliments qui permet de réduire la formation d'acrylamide en transformant l'asparagine, précurseur de l'acrylamide, en acide aspartique (Friedman, 2003).

Dans les produits à base de pâte, on ajoute l'asparaginase à la pâte avant la cuisson. La dose recommandée de préparation d'asparaginase est de 200-2500 ASP U/kg dans le produit fini.

Pour les frites, le traitement peut s'effectuer en trempant les morceaux de pomme de terre dans un bain d'enzyme dont la concentration peut s'élever jusqu'à 12000 ASP U/L d'eau pendant un laps de temps déterminé.

L'enzyme devrait être désactivée en grande partie par la chaleur au cours de la fabrication ou de la préparation de l'aliment (par exemple pendant la cuisson ou la friture) (site web n°1).

III-3-Les asparaginases commercialisées :

Voir son intérêt considérable, l'asparaginase occupe une place importante dans le marché mondial et elle est commercialisée sous différents noms selon les entreprises productrices et selon son utilisation soit thérapeutique ou alimentaire.

EUSA Pharma commercialise l'asparaginase sous deux noms :

- **ERWINASE** présente sous forme d'ampoules de 10000 U lyophilisée pour solution injectable (Crisantaspase=asparaginase d'*Erwinia chrysanthemi*). Elle est utilisée en combinaison avec d'autres agents anti-néoplastiques pour traiter les leucémies lymphoblastiques aiguës.

Les patients traités par L-asparaginase d'*Escherichia coli* qui développent une hypersensibilité contre cette forme d'enzyme, sont capables de continuer le traitement par ERWINASE.

Erwinase est enregistrée en Allemagne, au Portugal, au Danemark, Grèce, au Norvège, au Canada et en Egypte.

La figure (4) représente la présentation de l'asparaginase commercialisée sous le nom d'ERWINASE.



Figure (5) : ERWINASE commercialisée

- **KIDROLASE** présente sous forme de poudre pour solution injectable (10000 UI de l'asparaginase d'*Escherichia coli*) indiquée au traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës, les méningites leucémiques et les lymphomes non Hodgkiniens.

Elle est enregistrée dans 17 pays parmi eux : la Bulgarie, la France, l'Algérie, l'Argentine, l'Égypte, le Maroc, et la Palestine (site web n°2).

La figure (5) représente la présentation de l'asparaginase commercialisée sous le nom de Kidrolase.



Figure (6) : Kidrolase commercialisée

DSM est une entreprise néerlandaise qui a découvert une enzyme PreventASE (l'asparaginase d'*Aspergillus niger*) capable de réduire la teneur en acrylamide de certains aliments. Cette enzyme transforme le précurseur asparagine en un autre acide aminé, l'aspartate et permet ainsi de réduire de 90% la formation d'acrylamide (site web n°2).

Novozyme commercialise l'asparaginase sous différents noms : asparaginaseII, L-asparaginase, colaspase, elspar, leunase, crasnitin, ∞ -asparaginase et Acrylaway.

Acrylaway c'est l'asparaginase d'*Aspergillus oryzae* utilisée comme additif pendant la préparation des aliments pour convertir l'asparagine en aspartate et réduit la formation d'acrylamide (site web n°3).

Il y a 3 préparations d'asparaginase : une enzyme dérivée d'*Escherichia coli* (ASP, Elspar), une enzyme d'*Escherichia coli* modifiée par attachement au polyéthylène glycol (PEG, Oncospar) et une enzyme dérivée d'*Erwinia chrysanthemum* (ERW, Erwinase) (Friedman, 2003).

Conclusion

Conclusion :

L'asparaginase a un grand intérêt industriel. Elle est caractérisée par un optimum d'activité dans les conditions de pH et de température du corps humain, ce qui facilite son utilisation en thérapie. Elle est utilisée aussi en industrie agroalimentaire pour diminuer le taux d'acrylamide dans les aliments.

Généralement, il s'agit d'enzyme microbienne produite par procédés de fermentation.

D'après notre étude sur les différentes asparaginases d'origine microbienne ainsi que sur leurs applications, on peut dire que cette enzyme a des avantages dans le traitement de plusieurs tumeurs (lymphosarcome, mélanosarcomeetc.).

D'autre part, cette enzyme présente des effets indésirables chez les humains lors du traitement prolongé (toxicité hépatique, digestive, et biologique). Pour cette raison, il semble préférable de rechercher d'autres sources microbiennes d'asparaginases dotées d'activité antitumorale et présentant moins d'effets indésirables.

En se basant sur les nouvelles technologies moléculaires comme les modifications génétiques (mutagenèse dirigée, ingénierie métabolique), de nouvelles enzymes avec des propriétés améliorées peuvent être produites.

Références:

Anderson, C. S. (2006) Structural studies of *Erwinia carotovora* L-asparaginase x-ray crystallography. Master of Science Thesis. Linköping University.

Augère, B. (2001) Les enzymes biocatalyseurs protéiques. Ellipses. Edition Marketing. France.7.

Bascomb, S.; Banks, G. T.; Skarstedt, M. T.; Fleming, A.; Bettelheim, K. A. and connors, T. A. (1975) The properties and large-scale production of L-asparaginase from *Citrobacter*. J. Gen. Microbiol. 91: 1-16.

Belon, J. P. (1999) Thérapeutique pour le pharmacien hématologie. Masson. Paris.106-107.

Bierau, H. (2000) Process integration of cell disruption and fluidised bed adsorption of microbial enzymes: application to the retro-design of the purification of L-asparaginase. Thèse de Doctorat. University of Birmingham.

Cammack, K. A.; Marlborough, D. I. and Miller, D. S. (1972) Physical properties and subunit structure of L-asparaginase isolated from *Erwinia carotovora*. Biochem. J. 126: 361-379.

Chagas, E. P. and Sodek, L. (2001) Purification and properties of asparaginase from the testa of immature seeds of pea (*Pisum sativum*L). Braz. Arch. Biol. Technol. 44: 239-245.

Chevrel, G. ; Descotes, J. ; Grauvogel, J. M. ; Mathieu, H. and Pierron, C. (2001) Le vade mecum des médicaments injectables. MMI Editions Masson. France. 423.

Cornea, C. P. ; Lupescu, I. ; Vatafu, I. ; Caraiani, T. ; Savoiu, V. G. ; Campeanu, Gh. ; Grebenisan, I. ; Negulescu, Gh. P. and Constantinescu, D. (2002) Production of L-asparaginase II by recombinant *Escherichia coli* cells. Roum. Biotechnol. lett. 7 (3): 717-722.

- Davidson, L.;** Brear, D. R.; Wingard, P.; Hawkins, J. and Kitto, G. B. (1977) Purification and properties of L-glutaminase-L-asparaginase from *Pseudomonas acidovorans*. J. Bact. 129 (3): 1379-1386.
- Del casale, T.;** Sollitti, P. and Chesney, R. H. (1983) Cytoplasmic L-asparaginase Isolation of a defective strain and mapping of *AnsA*. J. Bacteriol. 154: 513-515.
- De Moura Sarguis, M. I.;** Morias oliveira, E. M.; Santos, A. S. and Dacosta, G. L. (2004) Production of L-asparaginase by filamentous fungi. Mem. Inst. Oswalado. Cruz. 99 (5): 489-492.
- Distasio, J. A .;** Niederman, R. A.; Kafkewitz, D. and Goodman, D. (1976) Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. J. Biol. Chem. 251: 6929-6933.
- Distasio, J. A.;** Salazar, A. M.; Nadji, M. and Durden, D. L. (2006) Glutaminase-Free asparaginase from *Vibrio succinogen*: An antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. Inter. J. Canc. 30: 343-347.
- Dorosz, Ph.** (2004) Guide pratique des médicaments. 24 édition Malaine. Paris. 1711.
- Durden, D. L.;** Salazar, A. M. and Distasio, J. A. (1983) Kinetic analysis of hepatotoxicity associated with antineoplastic asparaginase. Canc. Res. 43: 1602-1605.
- El-bassoumy, A. A.;** Sarhan, M. and Mansour, J. (2004) Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa 50071* using solid-state fermentation. J. Biochem . Mol. Biol. 37: 387-393.
- Ferrara, K. A.;** Mattoso, J. M. V.; Bon, E. P. S. and Pereira, N. (2004) Kinetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae ure2dal80* mutant. Effect of nitrogen nutrition and pH. Appl. Biochem. Biotech. 113-116: 299-305.
- Friedman, M.** (2003) Chemistry, Biochemistry, and safety of acrylamide A review. J. Agric. Food chem. 51 (16): 4504-4526.

Gaffar, S. A. and Shethna, Y. I. (1977) Purification and some biological properties of asparaginase from *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(3): 508-514.

Ghasemi, Y.; Ebrahiminezhad, A.; RasoulAmini, S.; Zarrini, G.; Ghoshoon, M.; Raee, M. J.; Morowvat, M. H.; Kafilzadeh, F. and Kazemi, A. (2008) An optimized medium for screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*. *J. Biochem. Biotech.* 4 (4): 422-424.

Guy, G. R. and Daniel, R. M. (1982) The purification and some properties of a stereospecific D-asparaginase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus aquaticus*. *Biochem. J.* 203 (3): 787-790.

Jianquan, W. Juli.; and Bachas, L. G. (2002) Biosensor for asparagines using a thermostable recombinant asparaginase from *Archaeoglobus fulgidus*. *Anal. Chem.* 74 (14): 33336-3341.

Kamoun, P.; Lavoinne, A. and De verneuil, H. (2003) *Biochimie et Biologie moléculaire*. Edition flammarion. France. 77.

Kim, K.; Kamerud, J. Q.; Livingston, D. M. and Roong, R. J. (1988) Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae* .characterization of the *Asp3* gene. *J. Biol. Chem.* 263: 11948-11953.

Lemerle, J. (1989) *Encyclopédie des cancers de l'enfant*. Flammarion Medicine Sciences. France. 66.

Lubkowski, J.; Palm, G. J.; Gilliland, G. L.; Derst, C.; Rohm, K. H. and Wlodawer, A. (2004) Crystal structure and amino acid sequence of *Wolinella succinogenes* L-asparaginase. *Eur. J. Biochem.* 241: 201-207.

Michalska, K. and Jaskolski, M. (2006) Structural aspects of L-asparaginase, their friends and relations. *Acta. Biochimica. Polonica.* 53: 627-640.

- Mokrane, S. A.** (2003) Production, purification et caractérisation de l'asparaginase II d'un isolat d'*Escherichia coli*. Thèse de doctorat. Université de Bagdad
- Neto, D. C.; Buzato, J. B. and Borsato, D.** (2006) L-asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation: optimization of culture condition using factorial desing. *Acta sci. Technol. Maringa.* 28: 151-153.
- Novak, E. K. and Phillips, A. W.** (1974) L-glutamine as a substrat for L-asparaginase from *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 117 (2): 593-600.
- Oza, V. P.; Trivedi, S. D.; Parmar, P. P. and Subramanian, R. B.** (2009) *Withania somnifera*(Ashwagandha): a novel source of L-asparaginase. *J. Integr. Plant. Biol.* 51: 201-206.
- Peterson, R. E. and Ciegler ,A.** (1969a) L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. *Appl. Microbiol.* 18 (1): 64-67.
- Peterson, R. E. and Ciegler ,A.** (1969b) L-asparaginase production by various bacteria. *Appl. Microbiol.* 17: 929-930.
- Peterson, R. E. and Ciegler, A.** (1972) Factors influencing L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. *Appl. Microbiol.* 23: 671-673.
- Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A.** (2003) *Microbiologie*. Edition de Boeck Université. France. pp 96-98-125.
- Roberts, J.; Burson, G. and Hill, J. M.** (1968) New procedures for purification of L-asparaginase with high yield from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 95 (6): 2117-2123.
- Sukumaran, C. P.; Singh, D. V. and Mahadevan, P. R.** (1979) Synthesis of L-asparaginase by *Serratia marcescens* (Nima). *J. Biosci.* 1: 263-269.
- Tosa, T.; Sano, R.; Yamamoto, K.; Nakamura, M. and Chibata, I.** (1971) L-asparaginase from *Pritus vulgaris*. *Appl. Microbiol.* 22: 387-392.

Tosa, T.; Sano, R.; Yamamoto, K.; Nakamura, M. and Chibata, I. (1972) L-asparaginase from *Protus vilgaris*, purification, crystalisation, and enzymatique properties. *Biochem.* 11: 217.

Yano, S.; Minato, R.; Thongsanit, J.; Tachiki, T. and Wakayama, M. (2008) Overexpression of type I L-asparaginase of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*, rapid purification and characterization of recombinant type I L-asparaginase. *Ann. Microbiol.* 58 (4): 711-716.

Yellin, T. O. and Writson, J. C. (1966) Purification and properties of Guinea pig serum asparaginase. *Biochem.* 5: 1605-1612.

Youssef, M. M. and Al-omair, M. A. (2008) Cloning, purification characterization and immobilization of L-asparaginase II from *Escherichia coli*W3110. *As. J. Biochem.* 3 (6): 337-350.

Site web n°1: www.hc-sc.gc.ca. Consulté le 13/05/2009.

Site web n°2: www.Eusa-pharma.com. Consulté le 18/05/2009.

Site web n°3: www.dsm.com. Consulté le 18/05/2009.

Site web n°4: www.fao.com. Consulté le 15/05/2009.

Les asparaginases microbiennes : production et application

Résumé :

Les asparaginases sont les enzymes qui exercent une action hydrolytique sur la liaison amide de l'asparagine libre libérant l'aspartate et ammonium.

Elles ont des pH et des températures d'activité qui diffèrent selon les espèces productrices : végétales, animales ou microbiennes, cette dernière est la source la plus importante vue l'importance économique du rendement.

Il existe plusieurs types de microorganisme producteurs : *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*...etc.

Ces enzymes sont produites à grande échelle sur des milieux de culture adéquats à la croissance des microorganismes aussi qu'à une production maximale.

Les asparaginases ont trouvé des applications pharmaceutiques comme agents antitumoraux et en industrie alimentaire pour la réduction du taux d'acrylamide cancérigène dans les aliments.

Mots clés : asparaginase, antitumorale, acrylamide, *Escherichia coli*

Microbial asparaginases : production and application

Abstrat :

Asparaginases are enzymes that showed a hydrolytic activity on amide bonds of free asparagine liberating aspartic acid and ammonia.

They have optimum pH and optimum temperature for activity that vary according to the source of the enzyme: plants, animals or microbial, the last one is the most important source because of the economic value of the production yield.

Many microorganisms produced asparaginase: *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*...etc.

These enzymes are produced at large scale on optimized culture media for growth and maximum production.

Application of asparaginase includes: pharmaceutical as anti-tumoral agent and food industry to reduce carcinogen acrylamide in foods.

Key words: asparaginase, antitumor, acrylamide, *Escherichia coli*

الأسباراجيناز الميكروبي: إنتاجه و تطبيقاته

الملخص:

الأسباراجيناز هي الإنزيمات التي لها القدرة على إمامة الرابطة الأميدية للأسباراجين الحر لتحرر حامض الأسبارتيك و الأمونيوم. هذه الإنزيمات تنشط في رقم هيدروجني ودرجة حرارة تختلف حسب مصادرها سواء كانت نباتية، حيوانية أو ميكروبية، إلا أن أهم مصدر هو المصدر الميكروبي لأنه ذو أهمية كبيرة من الناحية الاقتصادية.

توجد عدة أنواع من الكائنات الدقيقة المنتجة لهذه الإنزيمات أهمها *Escherichia coli* و *Erwinia carotovora*. يتم إنتاج هذه الإنزيمات اعتمادا على أوساط مناسبة لتنمية هذه الأنواع البكتيرية من أجل الحث على الزيادة في إنتاجها. تستعمل هذه الإنزيمات في مجالات عديدة مثل صناعة الأدوية كعوامل مضادة للسرطن و الصناعات الغذائية من أجل انقاص نسبة الأكريلاميد في الأطعمة.

كلمات المفتاح: اسباراجيناز، مضادة السرطن، أكريلاميد، اشريشيا القولون