

*République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abderrahmane Mira –Bejaia
Faculté des sciences exactes
Département physique*

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

*En vue de l'obtention du diplôme de master en physique
Option: biophysique et imagerie*

Thème

*Effets des nanoparticules de
dioxyde de titane sur l'activité
enzymatique de l'asparaginase*

Elaboré par:

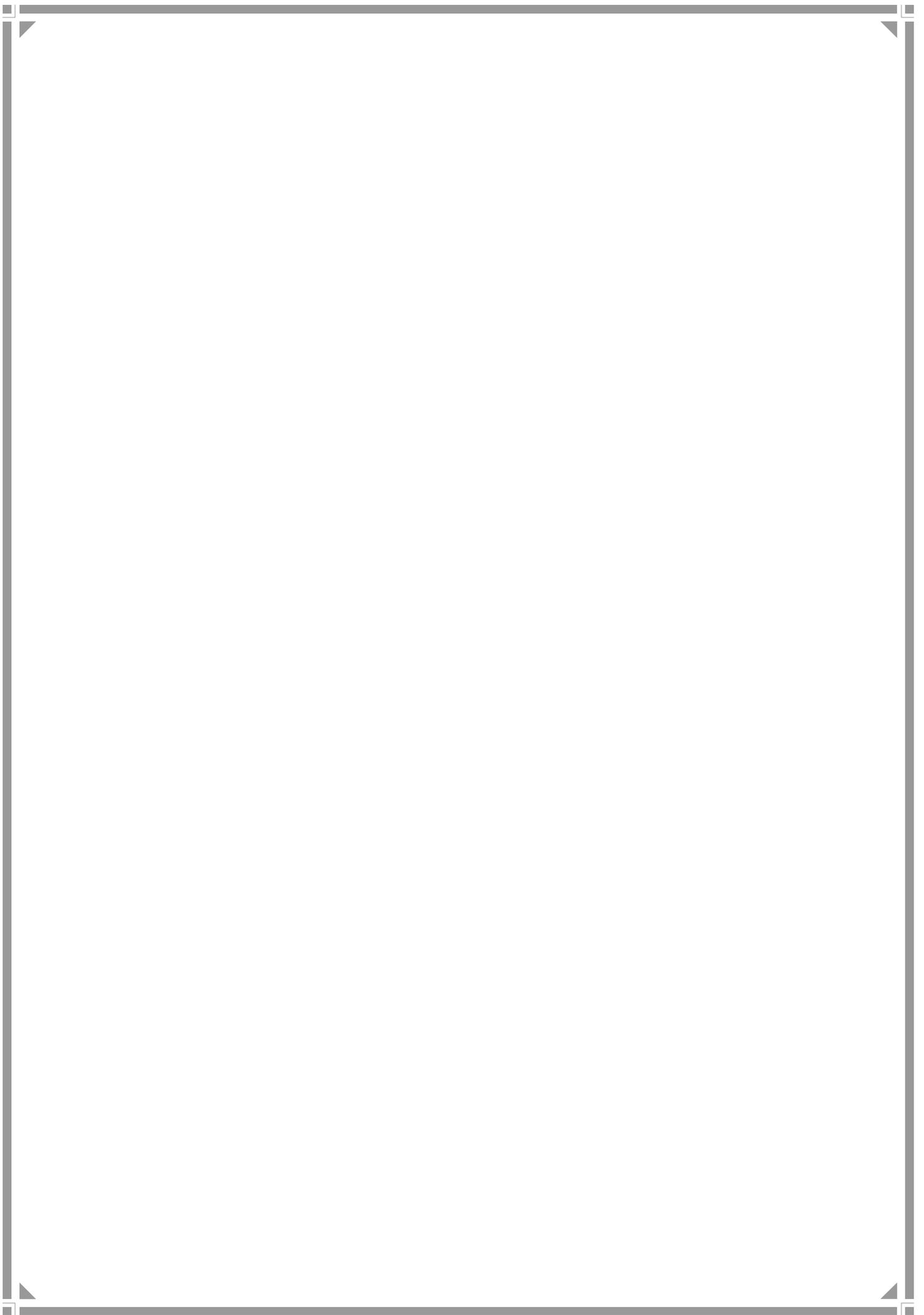
*M^{lle} HADDADI Fadila
M^{lle} REZGUI Samira*

Encadré par :

*M^{lle} Allouache
D^r T.A. Mostefaoui*

*Président Mr BOUFALA
Examineur Mr SWISSI*

*Année universitaire
2014/2015*



A Mes adorables parents :

A mon père pour son sacrifice et aide moral.

A ma chère maman pour son amour et ses soutiens.

A mes formidables sœurs : Sabrina, souhila, Lynda, Kenza et Amina.

A mes chères amies.

.....

Mille mercis, Samira

Quelle que soit la longueur de la nuit, le jour finit par se révéler.

Je dédie ce mémoire à ;

- *Ma mère, qui par ses prières a toujours cru en ma réussite, que Dieu la bénisse.*
- *Mon père, qui n'a jamais cessé de m'encourager, que Dieu le garde.*
- *Ma sœur et son marié pour leurs encouragements.*
- *Mes frères; merci pour votre assistance et le réconfort que vous m'avez toujours apporté.*
- *A mes cousine ; Nassima, Fatima, Zahia..... et leurs familles*
- *A ma binôme ; samou*
- *A tous mes amis(es); Samira, Nassia, Soade, Sabrina, Kenza*
- *A tous ceux qui ont participé à la réussite de cette mémoire, veuillez trouver l'expression de mes sincères salutations.*
- *A ceux que ma plume a oubliés...*

Fadila

Remercîments

En premier lieu, nous tenons à remercier le dieu, qui nous à donner la force et patience pour remplir ce modeste travail.

Une mention toute particulière, d'admiration, et d'un grand respect à notre encadreur Monsieur Dr T.A. Mostefaoui dont les nombreux conseils méthodologiques et la constante disponibilité, ont été plus que déterminants pour la réalisation de ce mémoire.

Nous adressons aussi nos remerciements à notre consultante copromotrice M^{elle} Allouache Selma Pour sa compréhension, sa patience et ces remarques Précieuses.

Notre remerciements s'adressent également à tous ceux qui nous ont aidée dans la réalisation de cette étude Parmi eux nous citerais Les doctorantes du laboratoire de LAM

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

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

Première partie :

I.I.1 introduction.....	1
I.I.2.Considération générales sur l'asparaginase.....	2
I.I.3.Les enzymes.....	2
1. Définition.....	2
2. Protéine et ces différentes structures.....	2
a. Structure primaire.....	3
b. structure secondaires.....	3
c. Structure tertiaire.....	4
d. Structure quaternaire.....	4
I.I.4.Les grands principes de la classification et de la nomenclature des enzymes.....	5
I.I.5.Structures tridimensionnelle de L-asparaginases.....	6
I.I.6.Mécanisme d'action et la réaction enzymatique de L-asparaginase.....	7
I.I.7.Les différentes sources et formes de L-asparaginase.....	9
1) L-Asparaginase issue d' <i>Escherichia col</i>	9
2) Autres types d'Asparaginases issues d' <i>E. Col</i>	10
3) L-Asparaginases produites par <i>Erwinia</i>	11

Table des matières

I.I.8.Production d'enzymes.....	11
---------------------------------	----

Deuxième partie :

I.II.1.introduction.....	14
I.II.2.Généralistes sur les nanoparticules.....	15
I.II.3.D'oxyde de titane.....	16
1. Définition.....	16
2. Propriétés.....	16
a. Propriété structurale.....	16
b. Propriétés physiques et thermodynamiques.....	17
3. Principales caractéristiques et applications.....	19
I.II.4.Application de TiO ₂	20
I.II.5.Effets de dioxyde de titane.....	21
1. Les effets généraux.....	21
2. Effets sur l'être vivants.....	22

CHAPITRE II : Etude expérimentale

II.1.Matériel et méthodes

II.1.1.Matériel.....	24
II.1.2.Préparation de la suspension bactérienne.....	24
II.1.3.Etapes de production de l'asparaginase.....	24
1. Préparation du bouillon nutritif et culture bactérienne.....	24
2. Filtration.....	24
3. Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	25
4. Solubilisation.....	26
II.1.3.Révélation de l'activité de l'asparaginase.....	27
II.1.4.Révélation de l'activité enzymatique de l'asparagine.....	28
II.1.5.Préparation de la solution de TiO ₂	28
II.2.Résultats et discussions.....	29

Table des matières

II.2.1.Obtention des colonies bactériennes.....	29
II.2.2Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	29
II.2.3.Réalisation de la courbe d'étalonnage.....	30
II.2.4.Réalisation de l'activité enzymatique.....	30
II.2.5.Inclusion de TiO₂ dans les échantillons enzymatiques.....	31
II.3Discussion Générale.....	36
Conclusion Générale	
Référence bibliographique	
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

NP : les nanoparticules

CEA (ECA) : E. Coli Asparaginase

ERA : Erwinia Asparaginase

LAL : leucémie aigue lympholastique

NH₃ : acide ammoniac

Kda : kilo dalton unité de mesuré des protéines

TiO₂ : dioxyde de titane

STM : le microscopie a effet tunnel (en anglais Scanning tunneling microscopie)

CIRC : centre international de recherche sur le cancer

PMN : polymor phonucleaires ou neutrophiles

ROS : espèces réactives de l'oxygène

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Numéro de page
figure 1	Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine	03
figure 2	Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine	03
figure 3	Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine	04
figure4	Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine	04
Figure 5	Structure de tétramère 222 symétrique de la L-asparaginase II (péri plasmique) d'Escherichia coli.	06
Figure 6	Dimère intime de la CEA, montrant l'aspartate (cyan, van des Waals représentation) lié dans chacun des sites actifs équivalents	07
Figure 7	Mécanisme général derrière la toxicité sélective de la L-asparaginase	08
Figure 8	Illustre le mécanisme de réaction de la L-asparaginase	09
Figure9	Le TiO ₂ a différentes échelles. Adroite : structure du TiO ₂	16
Figure 10	Structure cristallographique de TiO ₂ : (a) anatase, (b) brookite, (c) rutile	17
Figure 11	Eglise du Jubilé a Rome, contenant du TiO ₂ nanométrique dans son ciment	20
Figure 12	Culture de Dickeya solani (Ds) sur KB	29
Figure 13	Précipité obtenu après saturation de la solution par sulfate d'ammonium.	29
Figure 14	La courbe d'étalonnage avec de sulfate d'ammonium	30
Figure 15 et 16	Le blanc et l'échantillon enzymatique	31
Figure 17	Résultats de l'activité enzymatique après la 1 ^{ère} inclusion du TiO ₂	33
Figure 18	Résultats de l'activité enzymatique après la 2 ^{ème} inclusion du TiO ₂	34
Figure 19	Les courbes de l'activité enzymatique pour chaque échantillon après la 1ere inclusion du TiO ₂	35
Figure 20	Les courbes de l'activité enzymatique pour chaque échantillon après la 2eme inclusion du TiO ₂	36
Figure 21	Les échantillons après ajout de réactive de Nessler	37
Figure22	L'activité enzymatique de chaque échantillon pour les deux inclusions	37

Liste des tableaux

N°	Titre de tableau	Numéro de page
Tableau 1	Classification des enzymes.	05
Tableau 2	Microorganismes producteur de l'asparaginase.	12
Tableau 3	Données cristallographiques des phases anatase, rutil et brookite du dioxyde de titane.	17
Tableau 4	Comparaison des propriétés physique et thermodynamique des différentes phases du TiO ₂	18
Tableau 5	Caractéristique physique de dioxyde de titane	19
Tableau 6	Tableau de la précipitation par le sulfate d'ammonium	26
Tableau 7	Les valeurs d'absorbance pour la différente dilution.	30
Tableau 8	Résultats d'absorbances pour les différents échantillons.	31
Tableau 9	Les valeurs d'activité	31
Tableau 10	Les valeurs d'absorbance des différents échantillons enzymatiques pour les différentes dilutions	32
Tableau 11	Les valeurs d'absorbance des différents échantillons enzymatiques pour les différentes dilutions dans la 2eme inclusion.	32
Tableau 12	L'activité enzymatique des différents échantillons dans la 1 ^{ère} inclusion.	32
Tableau 13	L'activité enzymatique des différents échantillons dans la 2 ^{ème} inclusion	33

Introduction générale

A l'heure actuelle, les nanotechnologies font l'actualité scientifique, et le cas du dioxyde de titane est particulièrement intéressant et passionnant puisque ses propriétés autant que ses dangers sont, aujourd'hui, mis à l'épreuve. De plus les questions de développement durable et d'écologie sont de plus en plus à la mode. Les propriétés du TiO_2 sont à 1^{er} vue très intéressantes vus leurs effets sur notre vie et l'environnement.

Asparaginase (L'asparagine amide hydrolase, EC 3.5.1.1) est un agent antinéoplasique, utilisé dans la chimiothérapie de la leucémie aigue lymphoblastique[1]

Deux types de L-asparaginases bactériennes ont été identifiées : type I et de type II. Type I d'asparaginases sont exprimées constitutivement dans le cytoplasme et catalysent l'hydrolyse d'Asparaginase. Alors que le type II d'asparaginase exprimé dans des conditions anaérobies dans l'espace péri plasmique des membranes bactériennes et affiche une plus grande spécificité pour la d'asparaginase hydrolyse [2] L'hydrolyse de l'asparaginase en aspartate par l'enzyme est relativement large, elle est présente dans beaucoup de bactérie, plantes, et le sérum de certains rongeurs, absente chez l'homme. La source microbienne est très intéressante pour l'asparaginase parce que elles peuvent être facilement cultivée et l'extraction aussi la purification de l'enzyme a 'partir d'eux et pratique, facilement la production à l'échelle industrielle c'est ce qui on a appel la biotechnologie.[3]

Pour cela l'objectif de notre mémoire est donc d'examiner l'effet des nanoparticules(NP) du dioxyde de titane sur l'activité enzymatique de l'asparaginase. Notre mémoire est structure en deux parties,La première partie est une synthèse bibliographique concernant l'asparaginase est les NP de dioxyde de titane. La deuxième partie est la présentation des méthodes pratiques suivies d'une étude expérimentale qui résume l'effet du TiO_2 sur l'activité enzymatique.

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1.1. INTRODUCTION :

Il n'y a encore pas si longtemps un enfant atteint de leucémie aiguë lymphoblastique avait très peu de chance de survie [4].

Pour cela la recherche en matière de cancer a progressé depuis ces dernières années, permettant d'offrir de nouvelles perspectives d'avenir à tous ces enfants malades.

La polychimiothérapie s'est développée donnant de très bons résultats. Un des maillons essentiels de celle-ci est l'asparaginase dont les propriétés antileucémiques ont été découvertes au début des années 60 [4].

On distingue deux formes d'asparaginase : **L-asparaginase 1**, 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 elle a été intensivement étudiée durant ces dernières cinq années [5].

Cette enzyme, dont l'efficacité antitumorale est incontestable, provoque malheureusement des effets secondaires qui représentent un frein à son utilisation et à la guérison des malades. C'est pourquoi les recherches se sont orientées afin de réduire cette toxicité et que de nouvelles formes d'asparaginase sont apparues [4].

Dans cette partie, on va voir si quoi L'asparaginase, nous présentons aussi sont historique, sa structure, sont mécanisme d'action et en fin en vira si effets positifs et négatifs.

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.I.2.Considération générales sur l'asparaginase :

L'asparaginase est une hydrolase, une enzyme qui catalyse la réaction de l'asparagine en aspartate et NH_3 , Asparaginase (également connue sous le nom de L-asparaginase, commercialisée sous le nom Elspar) est un médicament utilisé pour arrêter la croissance du cancer et la formation de nouvelles cellules cancéreuses. [6]

Elle est également un médicament cytostatique antinéoplasique utilisé en chimiothérapie et notamment indiqué contre la leucémie aiguë lymphoblastique [7] qui produit des blastes incapables de produire leur propre asparagine, (contrairement aux lymphocytes sains), ce qui les rend sensibles à cette enzyme [8]. Elle est également utilisée dans certains protocoles contre le mastocytome [9].

Cette enzyme est présente chez tous les êtres vivants. On la trouve en grande quantité chez plusieurs espèces de vertébrés comme dans le sérum du cochon d'Inde et de l'agouti de même que chez les mycètes et plusieurs souches bactériennes, Chez l'homme, elle est exprimée dans le cerveau, les reins, les testicules et l'intestin [10].

I.I.3.Les enzymes :

1. Définition :

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques des organismes vivants, elles sont considérées comme des macromolécules majoritairement de nature protéique et chirale. Elles sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série *L* unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 et 1 000 kDa [11].

2. Protéine et ces différentes structures :

Les protéines sont des composants essentiels pour tous les organismes vivants. Impliquées dans la plupart des processus biologiques, elles peuvent être des cibles thérapeutiques et aussi des médicaments potentiels. Leur simple identification ne suffit souvent pas à comprendre toutes les fonctions dans lesquelles elles sont impliquées. En effet,

Chapitre I : synthèse bibliographique

la caractérisation d'une protéine requiert la compréhension de trois caractéristiques : sa fonction, sa structure et sa dynamique, puisqu'elles agissent souvent en formant des complexes avec différents partenaires, qu'elles ne sont actives que dans une conformation spécifique et qui peut varier au cours du temps, selon sa localisation et son activité. Il existe un large éventail de techniques pour étudier les protéines. Leur fonction, par exemple, est le plus souvent caractérisée par des méthodes biochimiques. Leur structure et leur dynamique sont plutôt étudiées par des techniques biophysiques [11].

a. Structure primaire

L'ordre dans lequel sont arrangés les acides aminés constitue ce que l'on appelle la structure primaire des protéines (**figure1**).

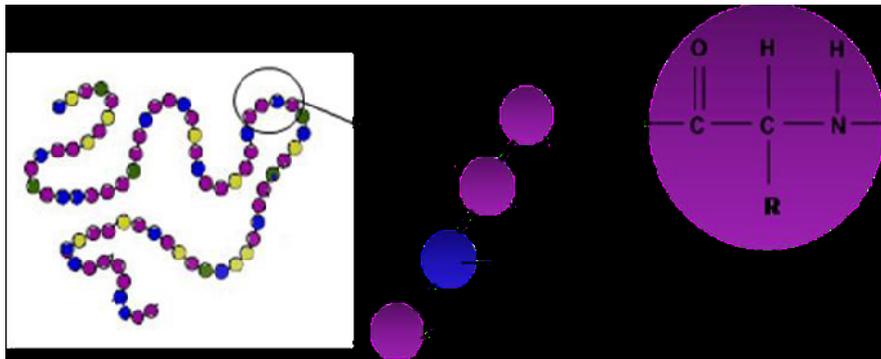


Figure1. Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine[11]

b. structure secondaires

Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β (**figure2**) ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes.

Chapitre I : synthèse bibliographique

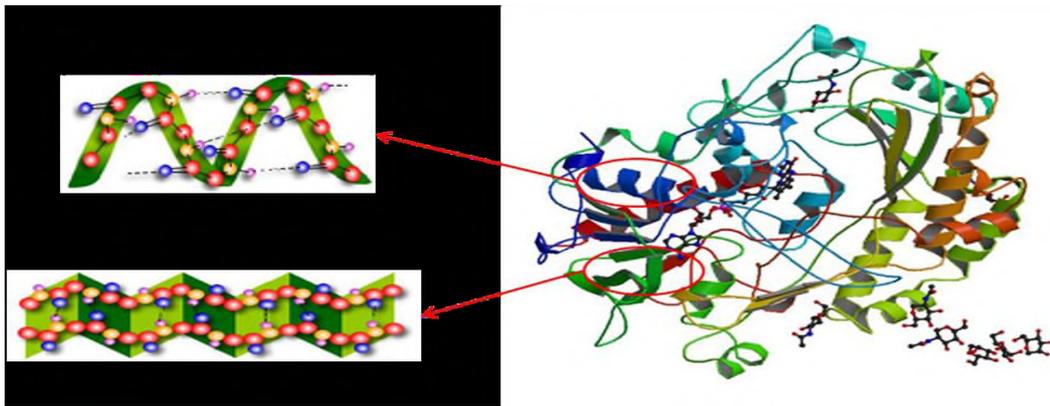


Figure2. Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine[11]

c.Structure tertiaire :

L'arrangement de ces structures secondaires de l'enzyme les unes par rapport aux autres, forme une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures (**figure3**).

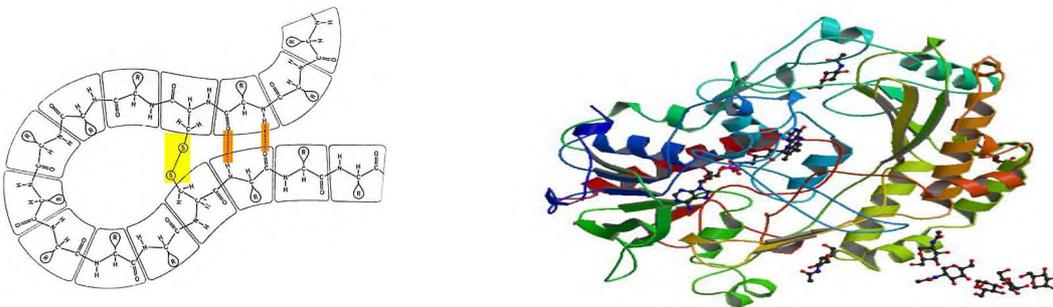


Figure3. Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine [11]

d.Structure quaternaire :

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes (**figure4**). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité lui permettant de reconnaître un substrat en particulier *via* une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.

Chapitre I : synthèse bibliographique

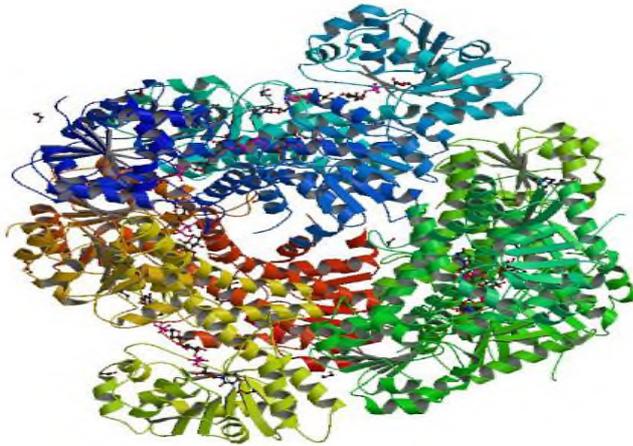


Figure4. Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine[11]

I.1.4. Les grands principes de la classification et de la nomenclature des enzymes :

Les enzymes sont classés de façon hiérarchisée essentiellement en fonction de la description du type de réaction catalysée et non pas de leur caractéristiques structurales ou de la nature des substrats (si on doit utiliser des critères de substrat et ça se fait évidemment, ce sera au dernier niveau de la hiérarchie) [12].

La classification est hiérarchisée : on dénombre 6 grandes classes de réactions, comme le montre le **tableau1**, Chaque classe est divisée en sous-classes et chaque sous-classe en sous-sous-classes Les enzymes sont alors nommés au sein de chaque sous-sous-classe. A chaque enzyme est associé un "numéro" de classification appelé "EC numéro". Il est construit ainsi :[numéro de la classe]. [Numéro de la sous-classe]. [Numéro de la sous-sous-classe]. [Numéro individuel de série dans les sous_sous classes][12].

La classification numérotée ne distingue pas les enzymes de différentes sources (plante, bactérie, ou animale) ni les iso enzymes, une seule entrée pour tous. Associé au classement et au "EC numéro", la nomenclature des noms devient systématique :

Chapitre I : synthèse bibliographique

Le nom systématique de chaque enzyme classée utilise le groupe de classement et la nature des substrats physiologiques standards ; Le nom systématique est formé par [le(s) nom(s) du(es) substrats] [le nom de la nature de la réaction] puis le suffixe ase [12].

Tableau 1 : Classification des enzymes[12].

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

I.I.5.Structures tridimensionnelle de L-asparaginases :

Les structures cristallines de la **CEA** à la fois et **ERA** sont connues. Ces deux enzymes sont actives comme homotétramères ; chacun a un monomère d'environ 330 acides aminés avec un pli à deux domaines. Les deux domaines s'inscrivent dans la classe alpha / bêta ; le plus grand domaine N-terminal contient un gaucher bêta-alpha-bêta croisement inhabituel similaire à celui trouvé dans flavodoxine, qui forme un «berceau» pour le site actif [13].

Chapitre I : synthèse bibliographique

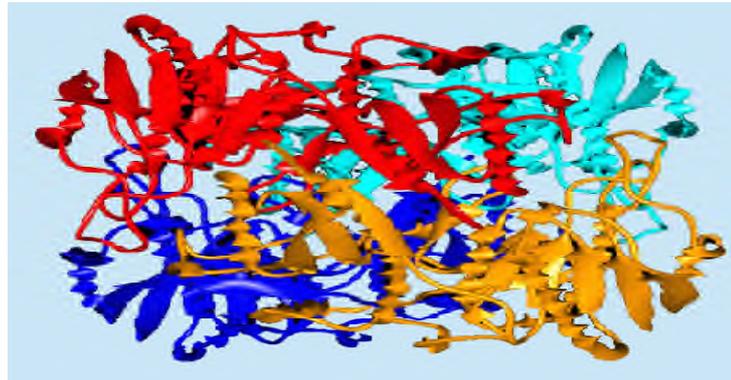


Figure5. Structure de tétramère 222 symétrique de la L-asparaginase II (péri plasmique) d'*Escherichia coli* [13].

Le tétramère se compose d'une paire de dimères, chacun avec une interface du dimère étendue : il peut être décrit comme un dimère de dimères "intime" (rouge, bleu et orange sur la **figure5**.

Chaque dimère intime **figure6** contient deux sites actifs, et chaque site actif contient des résidus des deux monomères dans le dimère intime. La structure cristalline de la CEA contient quatre molécules de L'aspartate (le produit de la réaction "avant" ou le substrat pour la réaction "reverse"), une liaison dans chaque site actif. Deux thréonine résidus T12 et T89 - ECA - qui existent dans toute la famille L-asparaginase, et sont connus pour être essentiels pour l'activité, se trouvent à proximité de l'aspartate lié [13].

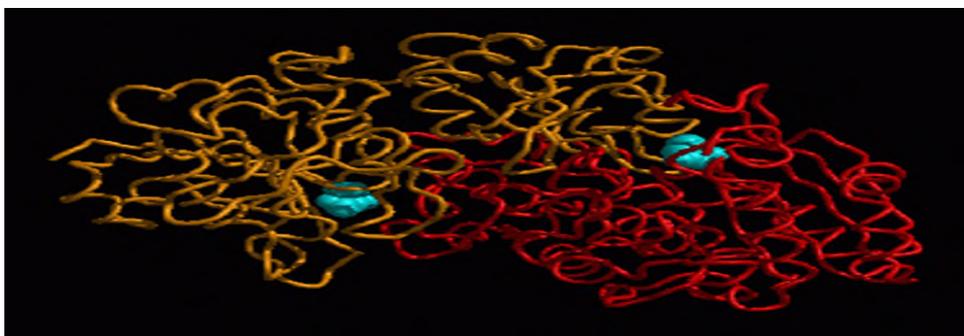


Figure6 : "dimère intime" de la CEA, montrant L'aspartate (cyan, van der Waals représentation) lié dans chacun des sites actifs équivalents [13].

Chapitre I : synthèse bibliographique

La structure cristalline du mutant inactif T89V a été récemment résolue. Il a été modélisé et raffiné avec le ligand lié par covalence à l'aspartate T12 intermédiaire de son groupe carboxyle de la chaîne latérale, dans une structure qui peut ressembler à un acyl-enzyme intermédiaire. Cela indique au moins que T12 peut agir comme nucléophile primaire, même si cette activité peut être causée par l'absence d'un groupe nucléophile sur 89 résidus [13].

I.I.6.Mécanisme d'action et la réaction enzymatique de L-asparaginase :

LAL correspondent à la leucémie aiguë la plus connue chez les enfants contribuant à environ 80% des leucémies infantiles et 20% des leucémies adultes. Les résultats de l'activité antinéoplasique de l'épuisement de L'asparagine par la L-asparaginase, qui à son tour inhibe la synthèse des protéines, provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en phase et en fin de compte l'apoptose dans les cellules leucémiques sensibles. Contrairement aux cellules normales, les cellules leucémiques et les autres cellules cancéreuses ont peu ou pas d'asparagine synthétase et par conséquent elles ne sont pas en mesure d'effectuer la synthèse d'asparagine, entraînant l'inhibition de la synthèse des protéines et la mort des cellules tumorales (**Figure7**)[14].

Chapitre I : synthèse bibliographique

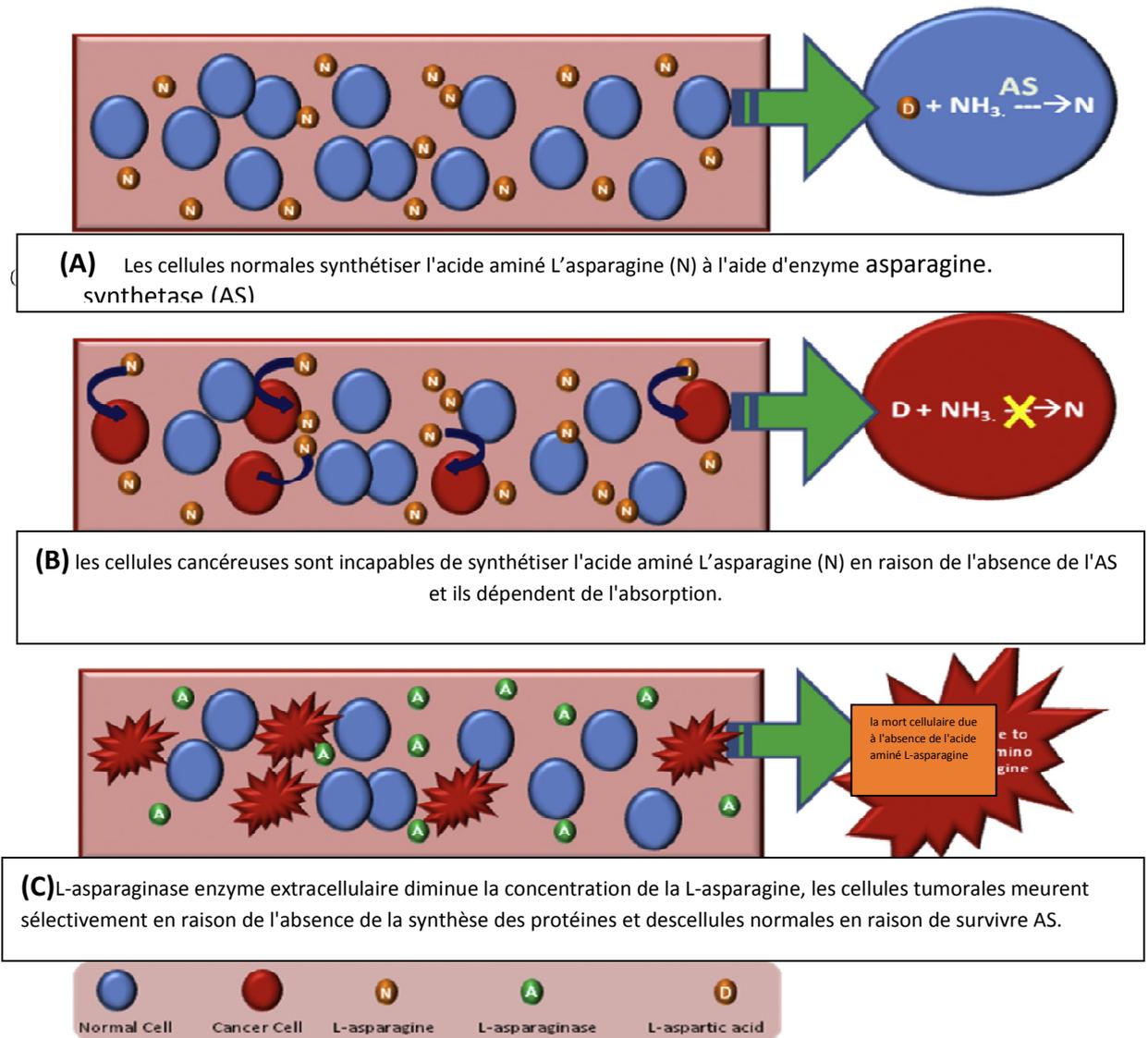


Figure 7 : Mécanisme général derrière la toxicité sélective de la L-asparaginase [14, p. 3]

Les effets secondaires mentionnés ci-dessus de la L-asparaginase peuvent être dû à plusieurs raisons, y compris son activité L-glutaminasique. Cette activité accompagne une certaine réduction du taux plasmatique de L-glutamine. L-asparaginase possède une affinité vis-à-vis la glutamine, mais cette affinité reste minime si on la compare avec L'asparagine. Comme glutamine agit comme un donneur de groupe amino de la synthèse de l'enzyme l'asparagine pour une nouvelle biosynthèse de L'asparagine, en conséquence, le niveau de glutamine diminuera en raison de l'exposition L-asparaginase aident également à maintenir la

Chapitre I : synthèse bibliographique

réduction du niveau de l'asparagine et contribue ainsi à l'effet thérapeutique de la L-asparaginase [14].

Le mécanisme d'action exacte de la L-asparaginase n'est pas encore clair, bien que l'hydrolyse de L'asparagine est connue et se fait en deux étapes via un intermédiaire β -acyl-enzyme **Figure8**. Cependant, l'activité de glutaminase et l-asparaginases contribue aux effets secondaires associés, mais cette activité est également liée à l'inhibition de la croissance cellulaire dans certains traitements du cancer [14].

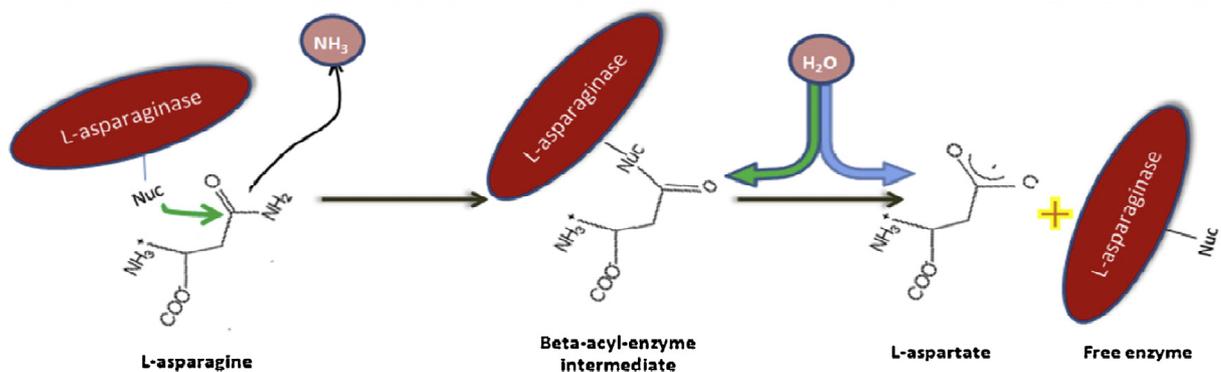


Figure8 : Illustre le mécanisme de réaction de la L-asparaginase [14].

Au cours de la réaction de L-asparaginase, covalente intermédiaire (β -Acyl-Enzyme) est formée par attaque nucléophile par l'enzyme. Les flèches vertes indiquent une attaque nucléophile. Cet intermédiaire est converti plus tard en L'aspartate et donne des produits finaux de la réaction qui est l'aspartate et de l'ammoniac [14].

I.I.7. Les différentes sources et formes de L-asparaginase

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

Chapitre I : synthèse bibliographique

réalisées par Merck & Co sous le nom d'Elspar [15]. En France, cette forme est disponible sous le nom de Kidrolase et est fabriquée par Aventis pharma [16].

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 [17].

De nombreuses expériences ont été réalisées à la fin des années 70 et 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 [18]. Les premiers essais cliniques chez l'homme ont été réalisés en 1984 [19].

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 caractérisés 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 [20].

Chapitre I : synthèse bibliographique

Jusqu'ici, L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* s'est avérée utile dans les tests cliniques en tant qu'alternative à celle d'*E. Coli*[21].

3) L-Asparaginases produites par *Erwinia*

a. 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 [22].

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*[23]

Les travaux menés par **Samson et al.**[24] 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.I.8. 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 d'*Erwinia* est équivalente à celle de l'asparaginase d'*E. Coli*. Ce n'est qu'en 1970 que l'asparaginase d'*Erwinia* fût utilisée pour la première fois en alternative de la forme native.

Chapitre I : synthèse bibliographique

Son poids moléculaire est de 138000 daltons[25] Elle est disponible aux Etats-Unis sous le nom de L-Asparaginase d'*Erwinia* d'Ogden BioServices pharmaceutique référentiel. Ce produit est commercialisé au Canada et en Europe sous le nom d'Erwinase^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[26]. Beaucoup d'autres bactéries sont capables de produire l'asparaginase mais leurs applications en clinique restent limitées. Les différences espèces et sous espèces bactériennes et fongiques capables de produire cette enzyme sont présente dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Microorganismes producteur de l'asparaginase

Microorganismes	Références
Penicillium camemberti	(Dox, 1909) cité par (Imada et al, 1973)
Aspergillus niger	(Bach, 1928 ; schmalfluss & Mothes, 1930) cite par (Imada et al., 1973)
Brucella abortu	(Altenbern & Housewright, 1954)
E .coli	(Howard& James., 1968)
Erwinia carotovora	(Aghaniypour et al 2001
carotovora NCYC1526	(Georgia et al., 2005)
enterobacter aergenes MTTCC 2823	(Baskaret et al, 2011)
corynebacterium aglutamicum	(juan et al, 1990)
candida utilis	(kil et al, 1995)
staphylococcus aureus	(Muley et al, 1998)
thermus thermophilus	(prista et kyridio. 2001)
pisum sativum	(siechiechowcicz & Ireland., 1989)
thermus aquticus,	(Curran et al, 1985)
vibrio succinogenes	(David et al, 194)
citrobacter freundii	(Davidson et al, 1977)
streptomyces griseus	(Dejong, 1972)

Chapitre I : synthèse bibliographique

Erwinia aroideae NRRL B-138	(Liu and zajic, 1972)
Proteus vulgaris	(Tosa et al, 1972)
Zymomonas mobilis	(Pinheiro et al, 2001)
Bacillus licheniformis	(Golden et al ,1985)
Pseudomonas aeruginosa 50071	(El bessoumy et al ,2004)
Aspergillus terreus MTCC 1782	(Baskar & Renganathan, 2009)
Streptomyces tendae TK-VL_333	(Naturforsch, 2010)
Aspergillus sp.VS-26	(Sreenivasulu et al, 2008)
Bacillus cereus MNTG-7	(Sunitha et al, 2010)
Erwinia chrysanthemi NCPPB 1125	(David et al, 1988)
Erwinia chrysanthemi NCPPB1066	(Harry et al, 1986)
Aspergillus terreus MTCC 1782	(Baskar & Renganathan, 2009)
Streptomyces tendae TK-VL333	(kavitha & V ijayalakshmi, 2010)
Cylindrocarpon obtusisporum MB-10	(Raha et al, 1990)
Pseudomonas stutzeri MB-405	(Manna et al, 1995)
Erwinia aroideae NRRL B-138	(Liu et Zajic, 1972)

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.II.1.INTRODUCTION :

Les nanoparticules (NP) sont des structures composées de quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Du fait de leur taille, les propriétés physiques et chimiques de ces NP sont différentes de celles des matériaux classiques. Leur champs de développement est extrêmement vaste et inclut la recherche médicale : on peut différencier deux grands groupes, les NP organiques (système micellaire, NP à base de polymères, nanotubes de carbone, fullerènes) et les NP inorganiques (NP d'oxyde de fer magnétique). La polyvalence de ces NP est grande car elles peuvent être conçues et modelées pour servir de vecteurs de médicaments (thérapeutique), de sonde d'imagerie (diagnostique), voire les deux à la fois (théranostique) [27].

Dans notre cas nous étudierons les effets des nanoparticules sur l'activité enzymatique à base de dioxyde de titane découlant de l'insertion de ce composé dans une enzyme qui est L-Asparaginase (médicament). Ce chapitre décrit les principales caractéristiques du dioxyde de titane qui est l'un des éléments les plus abondants dans la nature [28].

Le TiO_2 suscite également un grand intérêt de par sa stabilité chimique, sa non toxicité, son bas coût et d'autres propriétés additionnelles. Il peut être synthétisé sous la forme de produits très poreux avec une surface spécifique accrue. Sa grande affinité avec de nombreuses molécules permet aussi de modifier facilement sa surface. De par son haut indice de réfraction, il est utilisé pour des revêtements antireflets, dans des cellules solaires en silicium et également dans de nombreux films minces développés pour des dispositifs optiques [29].

Le TiO_2 est utilisé avec succès pour des applications de détection de gaz en raison de la dépendance de sa conductivité électrique en fonction de la composition du gaz ambiant [30].

Chapitre I : synthèse bibliographique

Il est aussi utilisé comme biomatériau pour remplacer et renforcer mécaniquement les implants osseux grâce à sa biocompatibilité avec le corps humain [31].

Pour finir, le dioxyde de titane est considéré comme l'oxyde semi-conducteur présentant la plus forte activité photocatalytiques et le meilleur rendement quantique (rapport du taux de réaction en mole par seconde sur le flux photonique efficace en photons par seconde) [32], Par conséquent, il est utilisé dans de nombreuses applications basées sur ses propriétés photo-induites.

Ce chapitre est dédié à l'oxyde de titane ainsi que leurs propriétés structurales et physiques avec quelques caractéristiques physique, chimiques et électriques. Le chapitre donne aussi une idée sur les domaines d'applications de l'oxyde de titane et ses effets sur l'environnement et l'être vivant.

I.II.2.Généralistes sur les nanoparticules :

Une nanoparticule est définie comme étant une particule dont sa dimension est inférieure à 100 nm [33], le préfix nano est utilisé pour désigner un milliardième (un nanomètre correspond à 10^{-9} mètre) [34]. On distingue trois types de NP : naturelles comme la poussière émises lors combustion ou par les volcans, NP produites par l'homme de façon non intentionnelle comme les particules ultrafines de la pollution atmosphérique, et enfin celles produites par l'homme de façon intentionnelle (NP manufacturées) [35]. Ces NP sont produites dans le cadre des nanotechnologies, leurs champs d'application est multiples et en plein d'essor, dans plusieurs domaines par exemple le secteur de la santé (délivrance de médicaments, imagerie diagnostique,...). Elles possèdent une réactivité accrue et leurs propriétés physico-chimiques sont potentiellement très différentes de celles des grosses particules.

Face au développement rapide dans le domaine de nanotechnologie et malgré des bénéfices potentiels conséquents dans ce domaine, des inquiétudes sont émises quant à l'éventuelle toxicité humaine et environnementale des nanoparticules. Leur biodégradabilité, ou encore leurs effets secondaires à long terme par exemple. Comme la génération de stress oxydant, un effet pro-inflammatoire, un effet prothrombotique, la possibilité d'apparition de fibrose et d'emphysème pulmonaire ou de dommages à l'ADN [36]. Pour cela des mesures de prévention passent avant tout par une limitation de l'exposition. Comme il n'existe, à l'heure actuelle, aucune valeur limite professionnelle d'exposition spécifique aux nanoparticules, cela complique la mise en œuvre de mesures de prévention.

Cependant, il est nécessaire d'adopter une attitude prudente, de façon à limiter au maximum une exposition aux nanoparticules : [37]

Chapitre I : synthèse bibliographique

- Par exemple de mettre en place des procédés de travail optimisés pour avoir le moins d'émission de poussières possible.
- En préférant la mise en suspension des nanoparticules dans un milieu liquide plutôt que la fabrication sous forme de poudre.
- De mettre en place des installations permettant la prise de douches en fin de période de travail.
- Le changement de vêtements de façon à limiter la contamination potentielle du milieu extérieur au site de production.

I.II.3.D'oxyde de titane :

1. Définition :

L'oxyde de titane **figure9** est parmi les produits non toxiques les plus utilisés dans le monde, l'oxyde de titane avec un volume de vente annuel supérieur à 3,5 millions de tonnes et une consommation mondiale augmentant d'environ 2% par an [38].

Le TiO_2 est un oxyde métallique est le 9^{ème} composant le plus abondant dans la croute terrestre [39]. Il appartient à la famille chimique des oxydes des métaux de transition. Il est produit industriellement depuis le 20^{ème} siècle comme pigment pour peintures blanches, en remplacement des oxydes de plomb, très toxiques [40].

Il a un indice de réfraction particulièrement élevé et son insensibilité à la lumière visible, en raison de sa large bande interdite (3.2 eV) lui permet de s'absorber que dans le proche ultraviolet [40].

Chapitre I : synthèse bibliographique

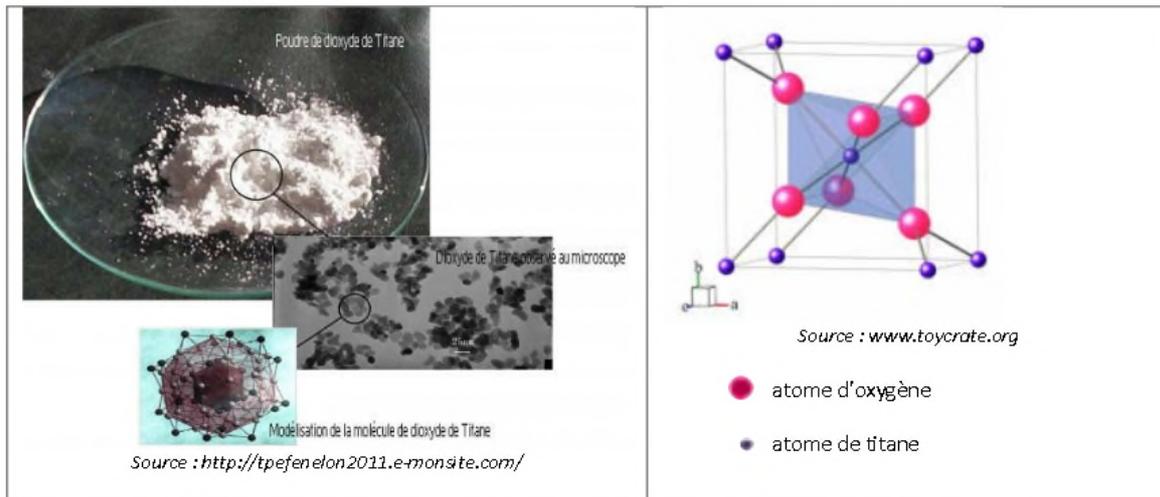


Figure9 : Le TiO_2 à différentes échelles. A droite : structure du TiO_2 .

2. Propriétés :

a. Propriété structurale :

Le dioxyde de titane existe sous plusieurs formes dont les trois principales sont l'anatase, le rutile et la brookite. Leurs structures cristallographiques sont représentées dans **figure10** lorsque le **tableau3** résume les données cristallographiques de ces trois phases [41].

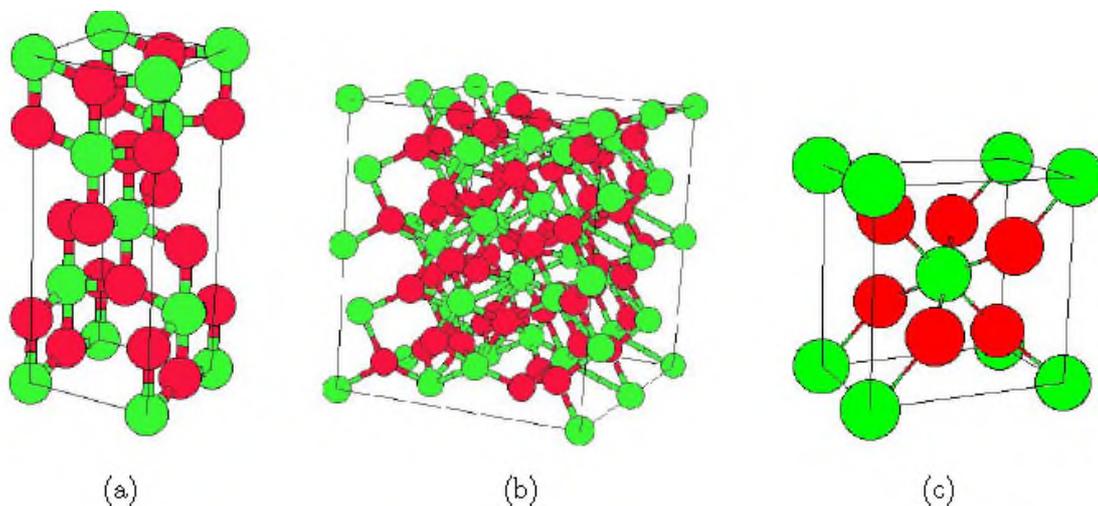


Figure10 : Structures cristallographiques de TiO_2 : (a) anatase, (b) brookite, (c) rutile. [41]

Seuls l'anatase et le rutile présentent un intérêt technologique. Ces deux phases sont tétragonales. Dans les deux structures, l'atome de titane est entouré de six atomes d'oxygène et chaque atome d'oxygène est entouré de trois atomes de titane. TiO_2 possède une bande interdite de 3,2 eV pour l'anatase et 3,0 eV pour le rutile [41].

Chapitre I : synthèse bibliographique

Tableau3 : Données cristallographiques des phases anatase, rutile et brookite du dioxyde de titane [41].

	Anatase	Rutile	Brookite
Structure	Tétraгонаle	Tétraгонаle	Orthorhombique
Paramètre de maille	a=3,7852 c=9,5139	a=4,5930 c=2,9590	a=5,4558 b=9,1819 c=5,1429
Z	4	2	8

b. Propriétés physiques et thermodynamiques :

Le dioxyde de titane est très stable grâce aux fortes liaisons entre les cations Ti^{+4} (tétravalents), et les anions O^{-2} (bivalents) et est ainsi très inerte chimiquement. Il est insoluble dans tous les liquides à l'exception de l'acide sulfurique concentré et l'acide fluorhydrique. Le **tableau4** ci-dessous regroupe les différentes propriétés des trois phases du dioxyde de titane.

Tableau4 : Comparaison des propriétés physiques et thermodynamiques des différentes phases du dioxyde de titane [42].

Nom	Dioxyde de Titane, Oxyde de Titane(IV), Titania		
Formule Chimique	TiO₂		
Masse molaire g.mol⁻¹	79.890		
Apparence	Solide blanc		
Phase Cristalline	Rutile	Anatase	
Brookite			
Système cristallin	Quadratique P	Quadratique I	Orthorhombique Pbc

Chapitre I : synthèse bibliographique

Symétrie	D_{4h}^{14}	D_{4h}^{19}	D_{2h}^{15}
Paramètres de maille (Å°)	a=b=4.594	a=b=3.5	a=9.14 b=5.447 c=5.145
Rayons atomique (Ti ⁴⁺)=0.605 (Å°)	R (Ti ⁴⁺)= 0.605 R (O ²⁻)=1.36	R (Ti ⁴⁺) = 0=605 R(O ²⁻)=1.36	R R (O ²⁻) =
d (Ti ⁴⁺ , O ²⁻) (Å°)	1.95-1.99	1.93-1.98	1.86-2.04
Coordinance	[Ti ⁴⁺]=6 [O ²⁻]=3	[Ti ⁴⁺]=6 [O ²⁻]=3	[Ti ⁴⁺]=6 [O ²⁻]=3
Compacité	0.705	0.645	0.655
Masse volumique (g.cm ⁻³)	4.24	3.89	4.12

3. Principales caractéristiques et applications :

a. Les principales caractéristiques :

Caractérisation physiques des différentes structures de TiO₂ :

Les principales caractéristiques physiques du dioxyde de titane sont indiquées sur le **tableau5**.

Tableau5 : caractéristiques physiques de dioxyde de titane[43]

Formules allotropiques	Rutile	anatase	brookite
Masse molaire	79,9	79,9	79,9
Structure	quadratique	quadratique	Orthorombique

Chapitre I : synthèse bibliographique

cristalline			
Point de fusion	1830-1855°C Avec décomposition à 1860°C	Se transforme en rutile à partir de 915°C	Se transforme en rutile à partir de 750°C
Point d'ébullition	A partir de 2500°C	A partir de 2500°C	A partir de 2500°C
Densité(D)	4,13-4,24	3,8-3,9	4,13
Indice de réfraction (à550nm)	2,75	2,54	-

Caractéristiques chimiques :

TiO₂ non ultra- fin est un produit très peu réactif. Il n'est pas attaqué par les acides chlorhydrique ou nitrique, mais attaqué par l'acide sulfurique concentré chaud ainsi que par l'acide fluorhydrique avec lequel il forme l'acide fluotitanique. Il peut également être attaqué par les bases concentrées. Le lithium, le magnésium et le zinc peuvent réduire le dioxyde de titane avec plus ou moins d'incandescence. En raison de leurs surface spécifique plus élevée, le dioxyde de titane présente des propriétés photocatalytiques améliorées par rapport aux particules de plus grande taille : elles sont susceptibles de générer des espèces réactives de l'oxygène (radicaux hydroxyles, radical superoxyde) après exposition aux rayons ultraviolets et réactions avec l'eau ou l'oxygène. [44]

Caractéristiques électriques :

Le dioxyde de titane sous sa forme anatase possède une bande interdite (gap) de 3,23 eV (384 nm) et sous sa forme rutile un gap de 3,02 eV (411nm). Le TiO₂ est de ce fait un semi-conducteur reconnu pour son excellente activité photocatalytique, mais aussi pour son utilisation dans la fabrication de cellules photovoltaïques [45].

I.II.4.Application de TiO₂ :

Du fait de ces propriétés, on peut trouver différents champs d'applications pour le TiO₂, micrométrique tout d'abord puis nanométrique à présent :

- a) **Comme pigment** : un peu moins de 4 millions de tonnes de TiO₂ sont consommés dans le monde chaque année. Son indice de réfraction et sa blancheur font qu'il est utilisé dans les peintures, revêtements, plastiques, encres... comme pigment Il entre

Chapitre I : synthèse bibliographique

également, pour la même raison, dans la composition de médicaments et dentifrices. Enfin, le TiO_2 est un colorant alimentaire [46].

- b) **Dans les écrans solaires :** le TiO_2 est beaucoup utilisé dans l'industrie cosmétique comme pigment mais aussi comme écran solaire, du fait de son indice de réfraction et de ses propriétés d'absorption d'UV. Le TiO_2 est, à l'heure actuelle, utilisé dans presque toutes les crèmes solaires, car les absorbeurs d'UV minéraux (à base de TiO_2 ou d'oxyde de zinc) entraînent moins de problèmes de photoallergie que les absorbeurs d'UV chimiques. De plus, le TiO_2 nanométrique est plus intéressant que le TiO_2 micrométrique pour les crèmes solaires car il laisse moins de traces sur la peau [46].
- c) **Dans les implants biologiques :** le TiO_2 micrométrique a longtemps été considéré comme un matériau inerte, ce qui en faisait un bon composant des implants biologiques. De plus, la présence de TiO_2 nanométrique dans les implants biologiques permet d'augmenter la prolifération et la différenciation cellulaire, ce qui augmente la biocompatibilité de l'implant comparé aux implants contenant du TiO_2 micrométrique [47].
- d) **Comme photocatalyste :** les UV adsorbés à la surface du TiO_2 nanométrique permettent d'oxyder l'eau en O^2 et H^2 (phénomène connu sous le nom d'effet Honda Fujishima, découvert en 1967 par Akira Fujishima [48]). Il peut également oxyder l'oxygène ou la matière organique, ce qui fait qu'il est également incorporé dans les peintures, ciments **Figure11** ou fenêtres pour ses propriétés autonettoyantes, bactéricides ou désodorisantes.



Figure11 : église du Jubilee à Rome, contenant du TiO_2 nanométrique dans son ciment [48].

Le TiO_2 nanométrique est, dans ce cas, utilisé pour ses propriétés autonettoyantes. On estime la production actuelle mondiale de TiO_2 à 4 millions de tonnes, dont une quantité pour l'instant assez faible (de l'ordre de quelques % de la quantité totale de TiO_2 produit) de TiO_2 nanométrique. Ceci est principalement dû au coût élevé de fabrication du TiO_2 nanométrique (plus de 170 \$/ kg contre 2 \$/kg pour le TiO_2 micrométrique) et les prévisions indiquent que

Chapitre I : synthèse bibliographique

cette quantité va croître très rapidement dans le futur, du fait de ses propriétés physicochimiques plus intéressantes que celles du TiO_2 micrométrique [48].

I.II.5.Effets de dioxyde de titane :

1. Les effets généraux :

- a) Il a la particularité d'adsorber la molécule d'eau et de la dissocier. Lorsque le système est éclairé par une lumière ultra-violette, la dissociation augmente, ce qui améliore le mouillage et l'eau s'étale sur la surface [49]. Cet étalement rend une vitre (pare-brise, miroir) transparente même lorsqu'elle est recouverte d'eau. La photodissociation de l'eau donne lieu à des réactions de décomposition de molécules organiques utiles pour la purification de l'eau ou le nettoyage d'objets [50]. Le TiO_2 est également à la base des cellules solaires [51]. Son grand indice de réfraction le rend utile en optique, que ce soit pour des domaines de pointes (lentilles, miroirs), ou des produits plus courants (peintures, lotions solaires, . . .) ; par exemple : En 2001, la société Pilkington a commencé à commercialiser le vitrage autonettoyant suivie par Saint-Gobain ... et d'autres manufacturiers.
- b) Dans son état stœchiométrique, le TiO_2 est un isolant. Mais quelques atomes de O manquants modifient drastiquement sa conduction, ce qui permet de l'utiliser comme capteur de gaz [52]. Cette modification de conduction est très utile pour la recherche sur ce matériau, car toutes les méthodes standards d'analyse du solide ou des surfaces impliquant des mouvements de charges sont applicables et en particulier l'imagerie STM.
- c) Dans le cas d'une pollution au cadmium, la présence de NP de TiO_2 entraîne une augmentation de la constante de prélèvement du cadmium du milieu par le poisson [53]. En 1994, il a été démontré que le dioxyde de titane sous forme anatase permettait de décomposer des colorants organiques ou inorganiques provenant de cendres de cigarettes ou de résidus de bougie ainsi que des molécules organiques telles que la phénantroquinone ou le chlorophénol [54].
- d) Le métabolisme de l'épinard a également fait l'objet de nombreuses études de la part d'une équipe de chercheurs mettant ainsi en évidence un meilleur déroulement de la photosynthèse. Une activité accrue de la rubisco ainsi qu'un métabolisme azoté plus efficace, après une exposition à des NP de TiO_2 [55].
- e) Des études ont mis en évidence une perturbation du réseau de microtubules chez *Arabidopsis thaliana* après exposition à des NP de TiO_2 [56].

Chapitre I : synthèse bibliographique

2. Effets sur l'être vivants :

- a) Le TiO_2 a des effets indésirables (cytotoxicité, dommages à l'ADN) liés à sa forme cristalline (rutile ou anatase) et à la surface spécifique très grande (particules nanométriques). Cependant, en l'état actuel des connaissances, il est difficile d'évaluer si les données de toxicité *in vitro* peuvent se transposer à l'individu entier, exposé par voie orale et à des doses compatibles avec l'exposition humaine. Jusque-là une seule étude *in vivo* témoigne d'un effet génotoxique du TiO_2 chez la souris exposée par l'eau de boisson [57].

Si ces auteurs concluent à un risque de promotion de la cancérogenèse colorectale après exposition orale, leur conclusion est toutefois à pondérer compte tenu de doses d'exposition ($>50\text{mg/kg/j}$) très supérieures à celles estimées pour l'homme (4-6mg/personne et par jour) [58]. Cette étude ne permet pas non plus d'apprécier le devenir des éléments de TiO_2 dans l'intestin et sous quelle forme il est absorbé pour produire ces effets [59].

- b) La production des espèces radicalaires est aussi à l'origine de problèmes sanitaires. En effet, les espèces OH° et O_2° sont des espèces susceptibles de générer un stress oxydant si elles s'accumulent dans les cellules (animales ou végétales). Si les enzymes du système antioxydant sont incapables de réguler le stress, il y a alors endommagement des membranes, apparitions de lésions à l'ADN pouvant conduire à la mort de la cellule ou encore à l'apparition de mutations. Après révision par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), le TiO_2 a été reclassé dans les cancérigènes possibles pour l'homme dans la catégorie 2B (produit supposé cancérigène mais pour lequel on ne dispose pas de suffisamment de données en laboratoire). Aux Etats-Unis (2005), une législation régleme l'exposition des travailleurs aux NP de TiO_2 à 1 mg/m^3 (concentration moyenne pondérée pour une durée de travail de 40 h hebdomadaires) [60].

Exemple :

L'effet de stress oxydant est particulièrement bien illustré dans une étude de l'impact des NP de TiO_2 sur des juvéniles de carpes [61], lors d'une exposition à de faibles concentrations de NP de TiO_2 (10 et 50 mg/L), le système antioxydant est activé, en particulier l'activité de la catalase augmente. Néanmoins, lorsque la concentration ou le temps d'exposition augmente, le système antioxydant est inactivé et l'activité enzymatique chute [62].

- c) Plusieurs études montrent que les NP induisent une augmentation de la mortalité des bactéries du sol [63] qui dépend parfois de la concentration en NP [64]. Certaines études ont aussi mis en avant la nécessité d'un contact physique entre les NP et la surface des bactéries pour entraîner leur mort [65]. Ainsi, lorsque le milieu d'exposition contient des acides humiques, ces derniers ont tendance à faire précipiter les NP ou bien à modifier le potentiel de surface des NP de telle sorte que les contacts entre bactéries et NP sont diminués. Les auteurs constatent en parallèle une diminution de la mortalité de même [66], les bactéries sécrétant des substances extracellulaires polymériques diminueraient les contacts avec les NP et donc leur sensibilité.

Chapitre I : synthèse bibliographique

L'internalisation de NP a été constatée, notamment dans le cas de cupriavidus metallidurans et Escherichia coli lors de leur exposition à des NP de TiO₂[67].

- d)** Les effets génotoxiques des NP de TiO₂ sur des cellules d'ail et de tabac ont été mis en évidence à travers le test des comètes¹, le dénombrement des micronoyaux et la présence d'aberrations chromosomiques [68].
- e)** La majorité des études portant sur l'effet des NP de TiO₂ sur le processus inflammatoire décrivent leurs effets au niveau de l'inflammation pulmonaire. Il s'agit de la principale voie d'entrée d'une NP à l'intérieur du corps humain puisque les NP sont souvent absorbées sous forme d'aérosol. Le TiO₂ est aussi connu comme étant capable de transmigration à travers l'épithélium, il peut donc être absorbé par la peau et se retrouver dans la circulation sanguine affectant ainsi d'autres organes. Dans une étude effectuée chez le rat, celui-ci y suggère que les NP ultrafines de TiO₂ provoquent une plus grande inflammation (augmentation du nombre de PMN « polymorphonucléaires ou neutrophiles ») aigue pulmonaire que celle induite par les NP de TiO₂ avec un diamètre plus grand [69].
- f)** Les différents types cellulaires ont tous produit différentes quantités de ROS [espèces réactives de l'oxygène] lorsqu'ils sont exposés aux mêmes concentrations de TiO₂. Étonnement, fibroblastes sont parmi les types cellulaires en ayant produit le plus qui a le rôle de : protecteur contre la constitution d'athéromes, de renouvellement du collagène et des protéines et défense anti-infectieuse et antivirale par la sécrétion de facteur chimiotactiques [70].
- g)** Les poussières de dioxyde de titane peuvent entraîner une irritation mécanique des yeux et des voies respiratoires, mais l'ingestion de petites quantités de TiO₂ n'entraîne pas de trouble, par contre toute les recherche n'ont montré aucune sensibilisation cutanée ou respiratoire chez l'homme [71].

¹ Est un test qui permet de mesurer les cassures induites directement par l'agent génotoxiques.

Chapitre I : synthèse bibliographique

Chapitre II : partie pratique

II.1. Matériel et méthodes :

II.1.1. Matériel :

- *Dickeya solani* (Ds), provient du Laboratoire de Protection des Plantes et de Biotechnologie- Faculté interuniversitaire de Biotechnologie et de Médecine/Université de Gdansk Pologne.
- *TiO2*

II.1.2. Préparation de la suspension bactérienne :

La souche bactérienne 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 :

1. Préparation du bouillon nutritif et culture bactérienne :

La production de l'enzyme est réalisée selon le protocole décrit par **Kamble et al. (2006)** [72] avec quelques modifications.

Les bactéries isolées sont cultivées dans un bouillon nutritif (**Hi media Mv 088**) **annexe 2** stérile. La stérilisation est effectuée pendant 20 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.

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.1 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 8000 g pendant 20 min afin d'éliminer la masse bactérienne.

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 [73].

a. 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 [74].

La solubilité d'une molécule protéique dépend des interactions qu'elle établit avec le solvant : lorsqu'elles sont fortes, la protéine se disperse dans le milieu ; lorsqu'elles sont faibles, les interactions protéine-protéine dominent, il y a formation d'agrégats et précipite. Les protéines globulaires sont généralement solubles dans les solutions salines diluées alors que la plupart des protéines fibreuses ne le sont pas. Le sel neutre le plus fréquemment employé est le sulfate d'ammonium qui est très soluble dans l'eau avec une force ionique élevée.

Les protéines globulaires solubilisées deviennent insolubles lorsque la concentration en sel augmente : c'est le **relargage**. Celui-ci ne se produit pas à la même concentration pour toutes les protéines : certaines précipitent après une très faible augmentation de la teneur en sel alors que pour d'autres il faut qu'elle soit très élevée. On peut ainsi, par une méthode de **précipitation sélective**, séparer les différentes protéines d'un mélange.

Cette méthode relativement peu spécifique s'applique bien aux grands volumes qu'on obtient souvent en début de processus de purification. Elle permet d'enlever une bonne partie protéines dont on veut se débarrasser [75].

b. Protocole expérimental :

Le surnageant récupéré après la centrifugation réfrigérée est collecté et traité par le sulfate d'ammonium à une saturation de : 80 % (m/v). Le surnageant récupéré par la centrifugation réfrigère est traité par le sulfate d'ammonium et la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter dans la solution protéique en fonction de cette saturation est présentée dans le tableau de saturation des protéines à 25° **Tableau6** suivie d'une centrifugation réfrigérée à 4°C (pour éviter la dégradation des protéines) à 10000rpm pendant 30min. Le culot et le surnageant sont récupère et conservé.

Tableau6 da la précipitation par le sulfate d'ammonium : [76]

%	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10	28	57	86	118	137	190	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694	
15		28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657	
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619	
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431	
50										33	66	101	137	176	214	256	302	345	392	
55											33	67	103	141	179	220	264	307	353	
60												34	69	105	143	183	227	269	314	
65													34	70	107	147	190	232	275	
70														35	72	110	153	194	237	
75															36	74	115	155	198	
80																38	77	117	157	
85																	39	77	118	
90																		38	77	
95																				39

4. Solubilisation :

La solubilisation du culot protéique obtenu a été faite selon la méthode décrite par **Rabilloud, T. 1996**. [77] Avec quelques modifications. Elle est réalisée pendant 2 heures à 30°C dans un tampon de solubilisation tris-HCl (1M, pH 8) **annexe6**.

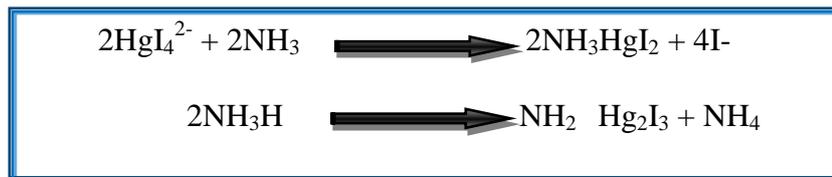
Les cristaux blancs observés au fond du tube sont réduits en poudre à l'aide d'une baguette en verre préalablement passée à l'alcool. 25 ml de tampon de solubilisation sont ajoutés goutte à goutte sur la poudre pour la décoller des parois du tube. L'homogénat est ensuite récupéré dans des fioles.

II.1.3. Révélation de l'activité de l'asparaginase

1. Qualitatif :

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-mercure de potassium alcalin, **Annexe 9**) qui réagit avec l'ammoniac en donnant une coloration allant du jaune à l'orange [78]. La coloration est due à la décomposition de l'ammoniac avec formation d'iodure de dimercuriammonium selon la réaction suivante :



1. Quantitatif :

a. Courbe d'étalonnage :

La courbe d'étalonnage standard est préparée en utilisant des concentrations de 0.25, 0.5, 1mM de sulfate d'ammonium avec l'acide trichloracétique, NAOH et le réactif de nessler selon la méthode décrite par (**Gulati et al. 1997**).

La préparation des différentes dilutions est faite comme suit :

La solution mère de 10Mm : dissoudre 132g de sulfate d'ammonium dans 100ml d'eau distillée.

Solution 1mM : on prend 5ml de la solution précédente + 50ml d'eau distille.

Solution 0.5 mM : on prend 5ml de la solution de 1mM + 50ml d'eau distille.

Solution 0.25mM : même prélèvement que la solution précédente.

Préparation de solution :

On mélange 1600ul d'eau distille + 200ul de réactif de nessler + 200ul sulfate d'ammonium, après on mesure l'absorbance de chaque d'élution avec un spectromètre à 425 selon la méthode décrite par (**Kumar et al. 2008**)

II.1.4.Révélation de l'activité enzymatique de l'asparagine :

L'activité enzymatique de la L-asparaginase est révélée en suivant le Protocol de **Kumar et al, 2008** en suivant les étapes suivantes :

- La mixture enzymatique consiste à rajouter 900ul d'asparagine (100mM) dissoudre dans du tris-Hcl (pH =8) + 100ul de nous extrait enzymatique.
- Une incubation à 37°C pendant 30 minutes.
- Ajout de 100ul de TCA 15%.
- On lui effectué une centrifugation à 10000xg pendant 5minute afin de se débarrasser du précipité.
- On déterminer la quantité d'ammoniac libre en ajoutant 100ul du réactif de nessler dans 100ul de surnageant de nous échantillons + 800ul d'eau distille.
- Mélanger les échantillons.
- Les incubes à T°=ambiante pendant 10 minute.
- Lire les densités optiques à 425nm sur un spectromètre (**Annexe11**) contre le blanc (le blanc : C'est les échantillons prépare après addition de TCA).

II.1.5.Préparation de la solution de TiO₂ :

- 1- Ce qui concerne la solution de TiO₂ on a fait dissoudre 0.01g de la poudre de TiO₂ dans 10ml d'eau distille.
- 2- On laisse la solution se repose on fait une dilution pour 0.25mM, 0.5mM, 1mM, on mesure 1ml de la solution mère de TiO₂ dans 10ml d'eau distillé pour la solution de 1mM, après pour la solution de 0.5mM, en prend 1ml de la solution de 1mM dans 10ml d'eau distille. On fait la même étape pour 0.25mM.

II.2.Résultats et discussions :

II.2.1.Obtention des colonies bactériennes :

Une réalisation de repiquage de souche *Dickeya solani* (Ds) dans le milieu King B avec la méthode des stries nous a permis d'avoir des colonies bien isolées comme le montre la **figure12**.

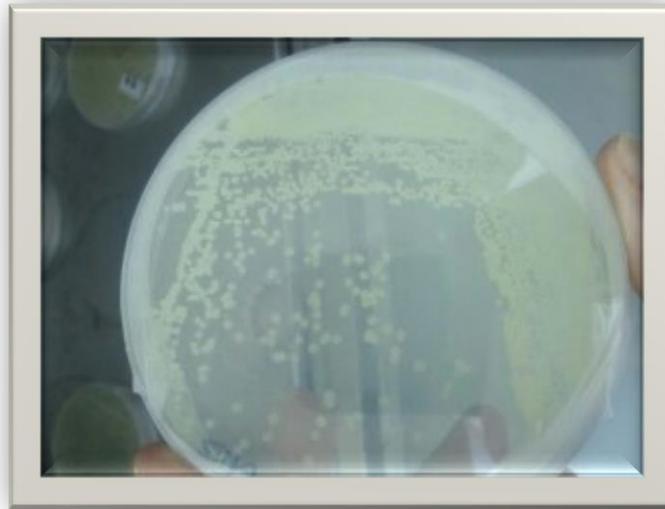


Figure12 : culture de *Dickeya solani* (Ds) sur KB.

II.2.2Précipitation par le sulfate d'ammonium : Obtention d'un précipité bien défini avec une précipitation par le sulfate d'ammonium d'une saturation de 80% pour la solution enzymatique.

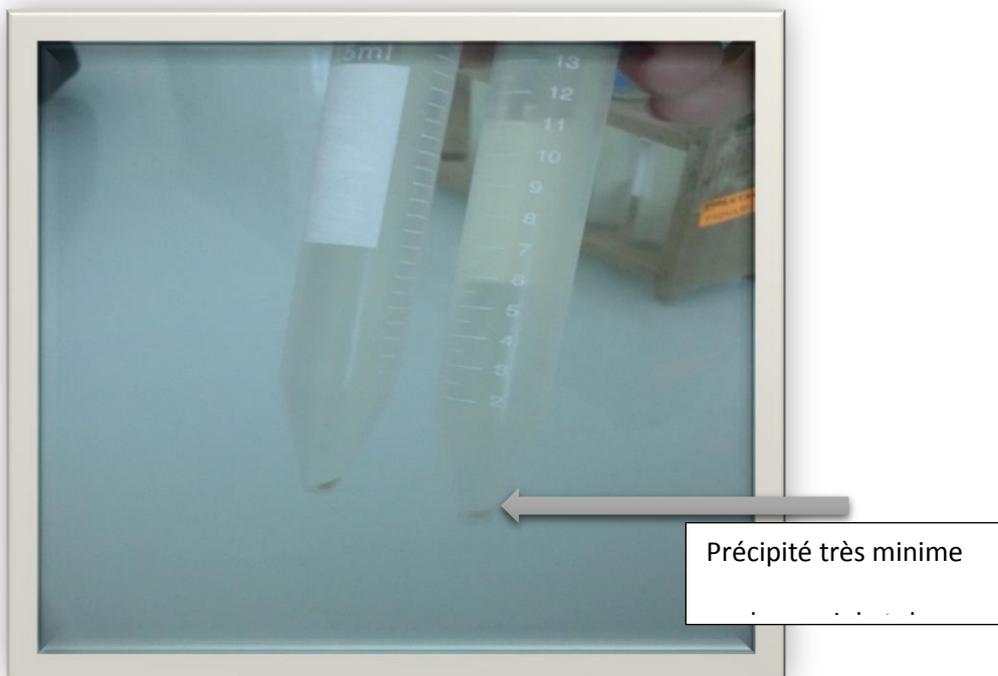


Figure13 : précipité obtenu après saturation de la solution par sulfate d'ammonium.

La figure en dessus nous montre que après avoir effectué une filtration ensuite d'une centrifugation réfrigère, une présence d'une précipité blanc au fond de tube.

II.2.3.Réalisation de la courbe d'étalonnage :

Les résultats obtenus par le spectromètre sont présentés dans le **Tableau7** qui nous à permet de réalise la courbe d'étalonnage présente dans la **figure14**.

Tableau7 :

Solutions (mM)	0.25	0.5	1
Absorbance	0.790	1.201	2.5

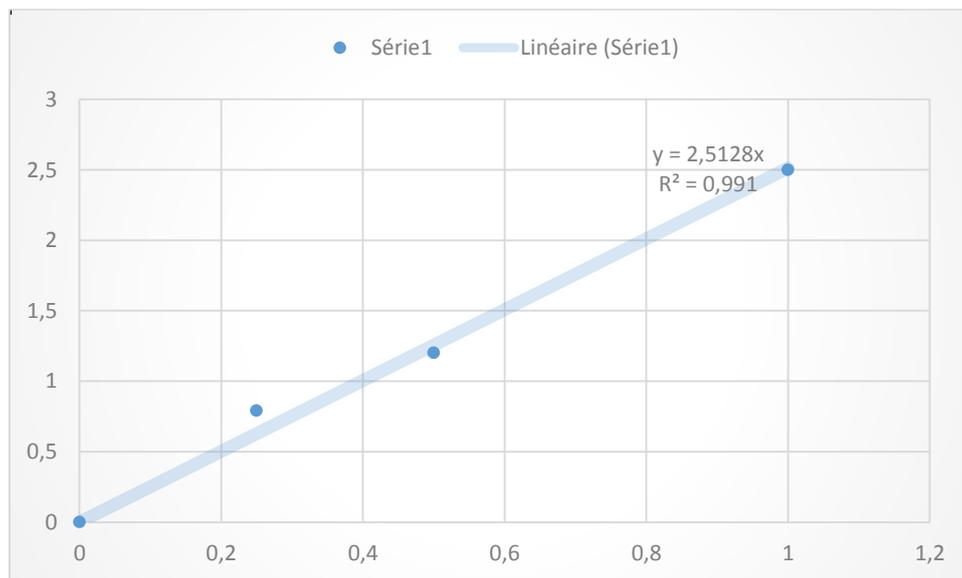


Figure14 : courbe d'étalonnage avec de sulfate d'ammonium.

II.2.4.Réalisation de l'activité enzymatique :

On mélange tous les produit et ont réalisent toute les étapes de l'activité enzymatique, les deux produits finals : le blanc et notre l'échantillon préparé comme le montre les **figures14 et 16** sont introduit dans le spectromètre pour lire les valeurs de l'absorbance pour chaque produit trouve de nous échantillons, les valeurs sont présenté dans le **Tableau8**

Figure15 et 16 : le blanc et l'échantillon enzymatique.

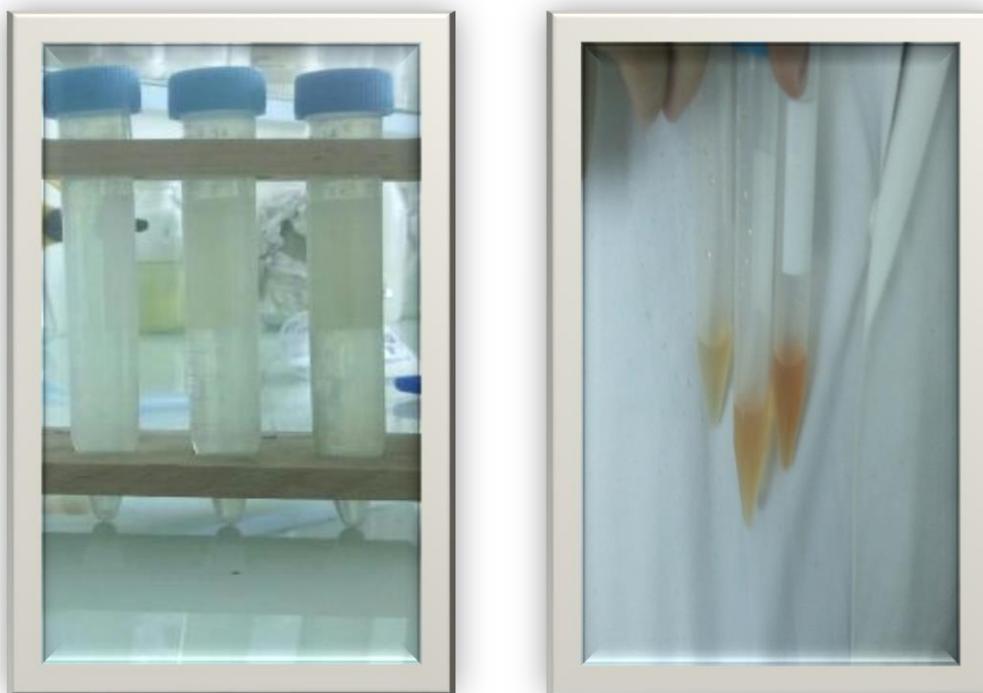


Tableau8 : résultats d'absorbances pour les différents échantillons.

Echantillon	Absorbance des échantillons	Absorbance de blanc	Valeur d'absorbance
étre brute	1.315	0.125	1.19
Surnageant	3.621	0.039	3.582
Précipité	4	0.094	3.906

Grace à la courbe d'étalonnage réalisé précédemment $Y=2,512X$, on calcule l'activité pour les différents échantillons qui sont réalisé sur le **Tableau9**.

Tableau9 : valeurs d'activité

Echantillon	Activité
étre brute	0.552
Surnageant	1.427
Précipité	1.555

x représente l'activité enzymatique.

II.2.5. Inclusion de TiO₂ dans les échantillons enzymatiques :

1^{ère} inclusion :

Mélange 1000ul de la solution de TiO₂ dans 2000ul de l'échantillon enzymatique, les valeurs d'absorbances trouvées sont représentées sur le **Tableau9**.

Tableau9 : valeurs d'absorbances des différents échantillons enzymatiques pour les différentes dilutions.

Echantillons	Absorbances			
	Solution mère (10mM)	1mM	0.5mM	0.25mM
étre brute	3.02	0.779	1.286	1.650
surnageant	2.77	1.802	3.021	1.867
Précipité	2.30	1.630	3.146	2.477

2^{ème} inclusion :

Mélange 2000ul de la solution de TiO₂ dans 2000ul de l'échantillon enzymatique.

Les valeurs d'absorbances trouvées sont représentées dans le **tableau10**.

Tableau10 :

Echantillons	Absorbances			
	Solution mère (10mM)	1mM	0.5mM	0.25mM
étre brute	3.019	1.529	1.438	1.915
surnageant	2.768	1.830	1.845	3.146
Précipité	2.301	2.146	2.281	1.933

Avec un spectromètre on a trouvé les valeurs d'absorbances représentées sur les deux tableaux en dessus, est grâce à la courbe d'étalonnage on va calculer la concentration des échantillons enzymatiques pour les deux inclusions (tableau11, et 12).

Activité pour la 1^{ère} inclusion : 1000ul- 2000ul

Tableau11 : activité enzymatique des différents échantillons.

Echantillons	Activité			
	Solution mère (10mM)	1mM	0.5mM	0.25mM
étre brute	1.202	0.310	0.512	0.657
surnageant	1.102	0.717	1.203	0.743
Précipité	0.916	0.649	2.693	0.986

Les résultats sont introduits sur l'histogramme suivant :

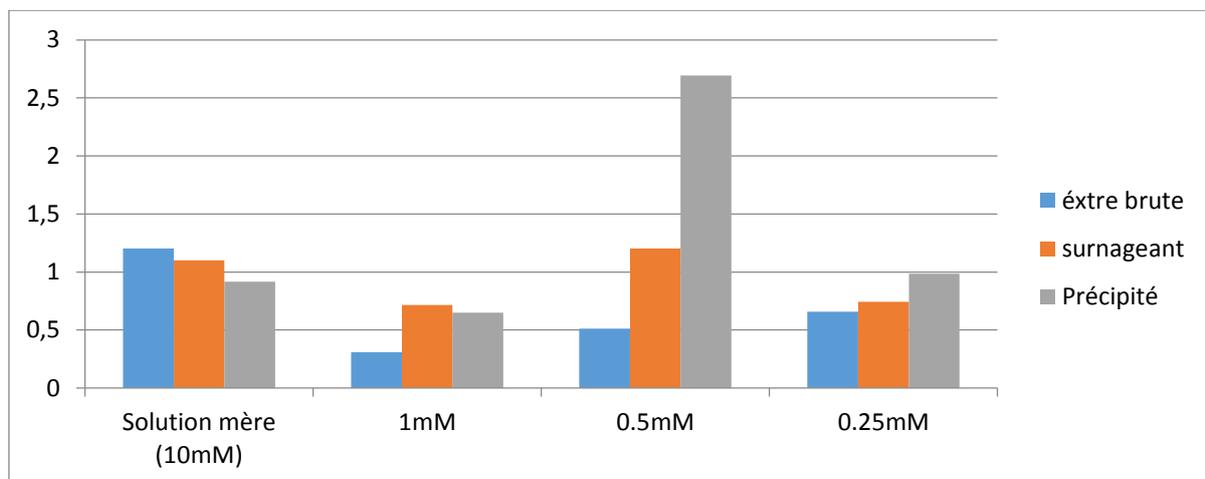


Figure17 : résultats de l'activité enzymatique âpre inclusion du TiO₂.

Activité pour la 2^{ème} inclusion : 2000ul-2000ul

Tableau12 : activité enzymatique pour différents échantillons.

Echantillons	Activité			
	Solution mère (10mM)	1mM	0.5mM	0.25mM
étre brute	1.202	0.608	0.572	0.762
surnageant	1.102	0.728	0.734	1.252
Précipité	0.916	0.854	0.274	0.769

Les résultats sont introduits sur l'histogramme suivant :

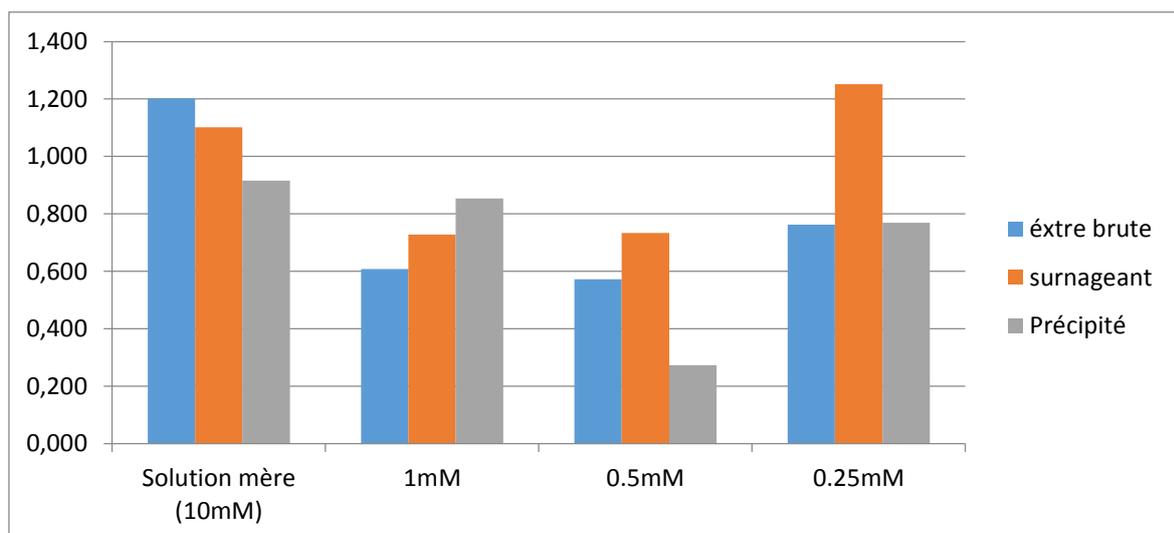


Figure18 : résultats de l'activité enzymatique âpre inclusion du TiO₂.

Courbe de l'activité enzymatique pour chaque échantillon de la première inclusion :

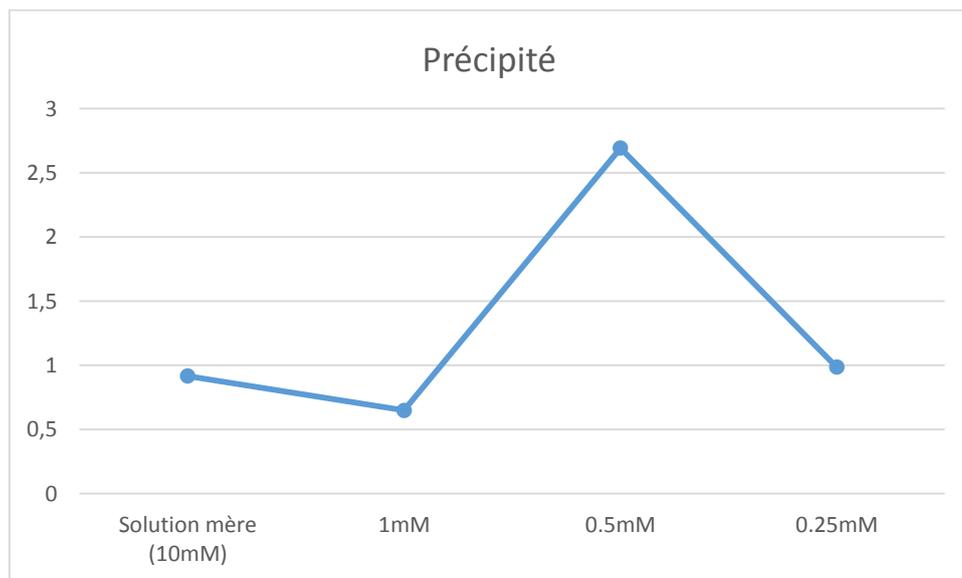
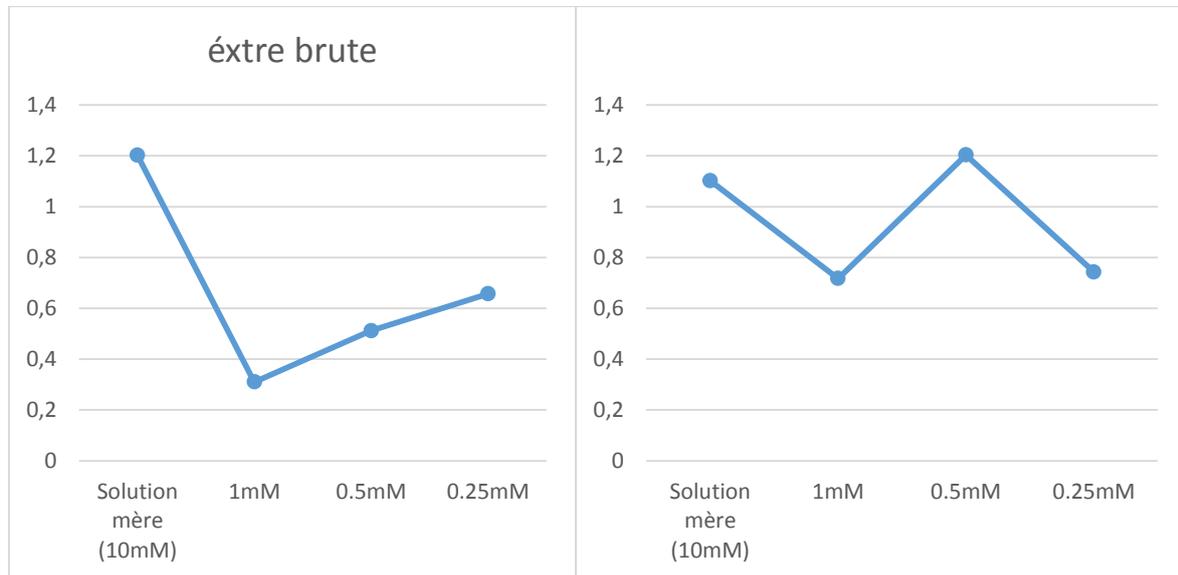


Figure19 : courbes de l'activité enzymatique pour chaque échantillon.

Courbe de l'activité enzymatique pour chaque échantillon de la deuxième inclusion :

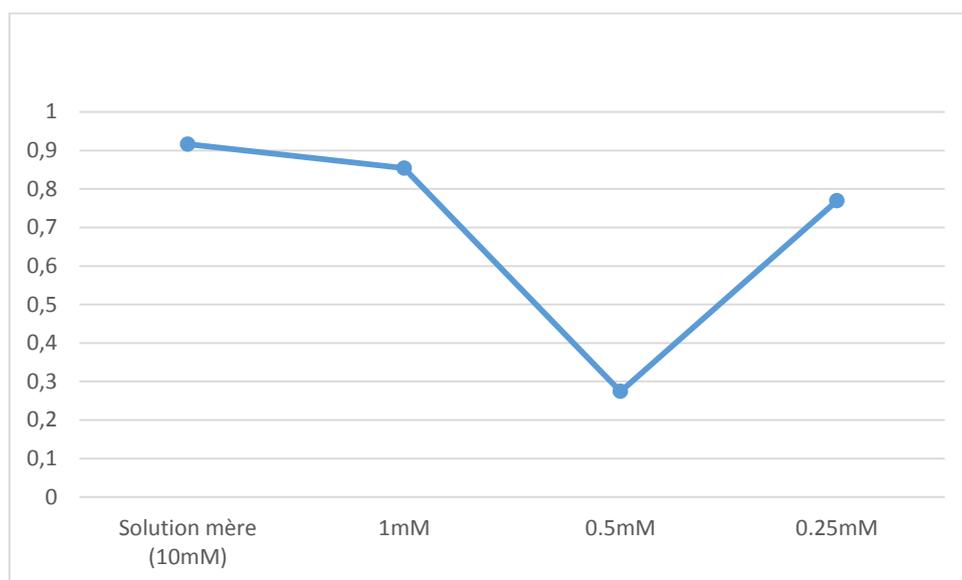
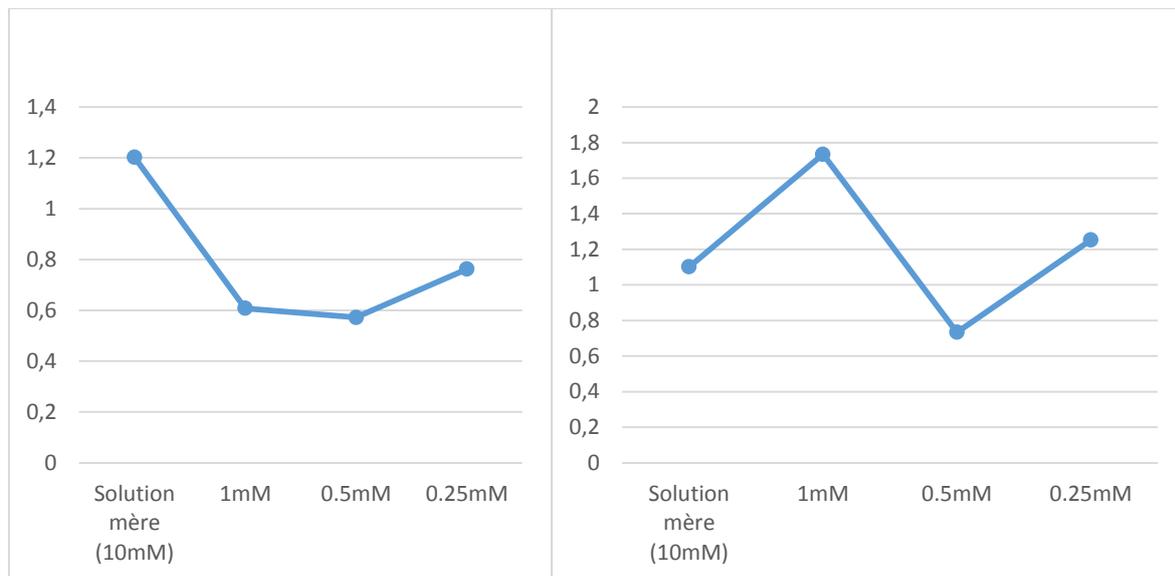


Figure20 : courbes de l'activité enzymatique pour chaque échantillon pour la deuxième inclusion.

II.3 Discussion Générale :

L'objectif de la présente étude, est de mettre en évidence la production de L'asparaginase à partir d'une souche bactérienne il s'agit de *Dickeya solani* et de procéder par la suite à sa purification.

La mise en évidence de l'asparaginase à partir de la souche bactérienne 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)** [79] sur la production d'asparaginase par *Aspergillus terreus* MTCC1782 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 d'une saturations 80% 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 a orange en présence de l'ammoniac. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Kamble et al. (2006)** [80] 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)** [81] sur la production et la purification de l'asparaginase de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré que la meilleure purification est obtenu avec une saturation 80% de sulfate d'ammonium tout en préservant l'activité de l'enzyme.

La présence de l'asparaginase est prouvée d'abord par un test qualitatif, en utilisant le réactif de Nessler qui révèle la présence de l'ammoniac dans le milieu. L'ammoniac étant l'un des produits de l'activité de l'asparaginase. Le résultat était positive en effet l'obtention de la coloration orange **figure21** prouve l'existence de l'ammoniac [82]. Mais cette révélation, est limitée puisque le milieu peut contenir l'ammoniac par différentes sources autre que l'hydrolyse de l'asparagine par l'enzyme. Alors une mise en évidence cette fois ci quantitative a été faite en suivant le Protocol de **Kumar et ; 2010** et on a pu observer une augmentation de l'activité enzymatique dans les précipités par rapport aux extraits brutes ce qui prouve qu'on a procédé à la purification de l'enzyme ; Les valeurs sont comparable à ceux mené par Kumar et al ; 2008.



Figure21 : les échantillons après ajout de réactif de nessler.

L'objectif principale de notre travail est de tester les effets des NP de TiO₂ sur l'activité enzymatique et pour cela on a testé différentes concentrations de TiO₂ voir 10mM, 1mM, 0.5mM et 0.25mM. On a observé un changement de l'activité enzymatique en présence des NP de TiO₂ et à chaque fois qu'on change de concentration de TiO₂ ; L'activité enzymatique change que ce soit dans l'extrait brute, le surnageant ou bien le précipité comme le montre la **figure22**. L'activité enzymatique dans l'extrait brute et le surnageant a montré une diminution dans les différentes concentrations de TiO₂ ; ces deux échantillons contiennent des bactéries et la diminution observés peut être lié à l'effet antibactérien du TiO₂ [83]. Cependant le précipité qui contient l'asparaginase ; son activité a montré une diminution légère dans les concentrations de 10 mM ; 1mM et 0.25mM et une augmentation de l'activité enzymatique dans une concentration de TiO₂ égale à 0.5mM. Cela nous laisse dire que le TiO₂ augmente l'activité enzymatique de l'asparaginase mais à une concentration bien déterminé qu'on appelle la concentration optimale du TiO₂ qui permet une meilleur activité de l'enzyme.

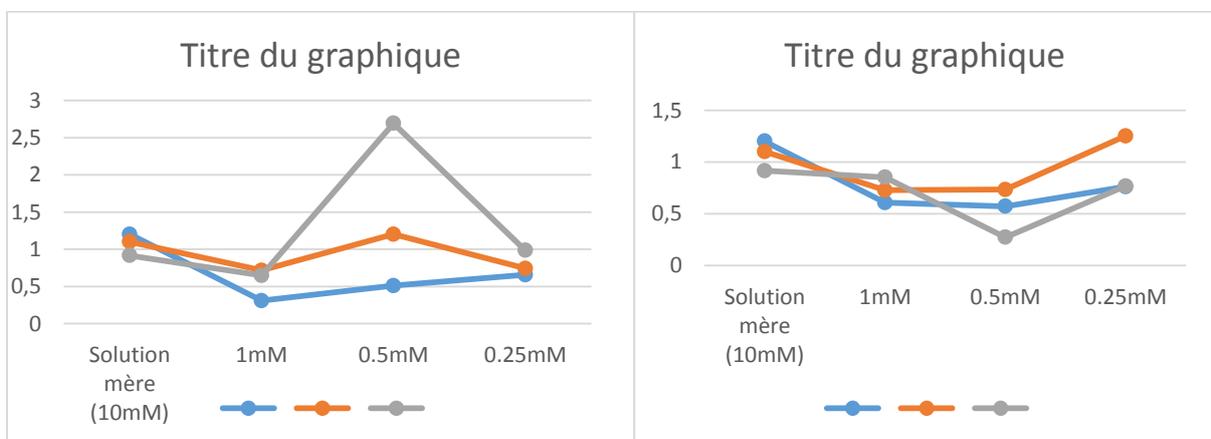


Figure22 : l'activité enzymatique de chaque échantillon pour les deux inclusions.

Bibliographie :

- [1] V. Varalakshmi, L-asparaginase, An Enzyme of Medicinal Value. International Journal of green and herbal chemistry, Vol.2, 2013, pp. 544-555.
- [2] H. Campbell, Two Asparaginase from Escherichie coli B, their separation, Purification and antitumor property. Biochemistry, kotzia, G.A: Journal of Biotechnology, 1967, pp. 309-323.
- [3] T. M. a. A. M, Synthesis, physiochemical and immunological properties of oxidized inulin L-asparaginase bioconjugate, Journal of Biotechnology, 2009, pp. 189-195.
- [4] Bertrand T, l'asparaginase dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique de l'enfant, 2003, p11.
- [5] Pedreschi, Fa. Kaack, K b., Granby, Kc.The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries Food Chemistry, 2008, p386–392.
- [6] Olga, Gale Encyclopedie of Cancer Bessmertny, Copyright. Asparaginase, 2002.
- [7] British National Formulary (BNF 57), Royaume-Uni, BMJ Group et RPS Publishing,, mars 2009, p. 476.
- [8] J. D. Broome, L-Asparaginase: discovery and development as a tumor-inhibitory agent , Cancer Treatment Reports, vol. 65,, 1981, pp. 111-114.
- [9] C. v. K.-B. R. S. e. R. P. I.M.Appell, Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic, Leukemia, vol. 21, no 11, novembre 2007, pp. 2377-2380.
- [10] H. G. e. S. Gencer, Production of L-asparaginase in Enterobacter aerogenes expressing Vitreoscilla hemoglobin for efficient oxygen uptake, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 63, no 6, février 2004, pp. 691-697.
- [11] H. JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, 2011, pp. 12-13.
- [12] H. JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, 2011, p. 14 .
- [13] G. e. al, FEBS letts, 1996, pp. 211-216.
- [14] A. A. K. Abhinav Shrivastavaa, recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent, india: Elsevier, janvier 2015, p. 2.
- [15] A. BL, The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. Adv Exp Med Biol. 457:621-9, 1999.
- [16] H. L. S. m. M. E. W. S. J. R. G. W. B. P. C. R. M. Woo MH, Anti-asparaginase antibodies following E. coli asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Leuk 12(10):1527- 33.,

1998.

- [17] K. S. A. W. Narta UK, Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 61(3):208-21, 2007.
- [18] A. A. P. N. D. F. Van Es T, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem.* 252:3578-81., 1977.
- [19] K. G. V. C. Abuchowski A, Cancer therapy with chemical modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol L-asparaginase conjugates. *Can Biochem Biophys.* 7: 175-186., 1984.
- [20] S. D. S. S. S. a. Lele.S, Application of Evolutionary Optimization Technique in Maximizing the Recovery of L-Asparaginase from *Erwinia carotovora* MTCC 1428. *Glob J of Biotechnol and Biochem.* 5 (2): 97-105., 2010.
- [21] P. a. M. Benny, L-asparaginase activity in bacteria from sediments and mollusk. *Indian J. Mar Sci.* 20:36-39., 1991.
- [22] K. A. Pérombelon MCM, Ecology of soft rot erwinias. *Annual Rev. phytopatol.* 18:361-387, 1980.
- [23] B. B. K. R. & S. Winslow, & Lelliot, R.A., and Dickey, R.S., 1984. Genus VII. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA: Williams & Wilkins Co., 1: 469-476., 1920.
- [24] 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 pa*.
- [25] C. D. G. D. G. R. F. G. K. H. K. P. M. J. S. R. Beard ME, L-asparaginase in treatment of acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br Med J.* 690:191-5., 1970.
- [26] E. R. H. D. K. J. S. K. Wade H, A new L- asparaginase with antitumor activity. *Lancet.* 2:776-77., 1968.
- [27] G. C. P. C. e.-R. I. G. O. d. I. S. f. d. m. n. e. i. m. (SFMN), *Revue générale Les nanoparticules*, 2010.
- [28] O. Carp, C.L. Huisman, A. Reller, *Prog. Solid State Chem.* 32 (2004) 33.
- [29] H.A. Macleod, *Thin film Optical fillers*. New York: Macmillan, 1986.
- [30]] N. Kumazawa, M.R. Islam, M. Takeuchi, *J. Electroanal. Chem.* 472 (1999) 137.
- [31] Y.X. Leng, N. Huang, P. Yang, J.Y. Chen, H. Sun, J. Wang, *Surf. Coat. Tech.* 156 (2002).
- [32] K.I. Hadjiivanov, D.G. Kissurski, *Chem. Soc. Rev.* 25 (1996) 61.
- [33]
- [34]
- [35] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008, p26–49).

- [36] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008, p26–49.
- [37] J. Boczkowski, S. Lanone, *Nanoparticules : une prévention est-elle possible*, Elsevier Masson, mars 2010, p215-216.
- [38] MECHERI Fatima, Préparation et caractérisation des nano-cristallites de TiO₂ Effets des conditions préparatoires, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA, 2014, p10.
- [39] Lucie ARMAND, Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métalprotéases, influence des paramètres physicochimiques, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, 2011, p12.
- [40] M.Subramanian, S.Vijayalakshmi, et all, *thin Solid Films* 516, 2008, p3776.
- [41] Catherine Pighini, Synthèses de nanocristaux de TiO₂ anatase à distribution de taille contrôlée. novembre 2006, p33.
- [42] S.Yan, W.Guixin et Y.Kangping. *international journal of hydrogenenergy*, 36(2011)15502.
- [43] ARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Lyon, Centre international de recherché sur le cancer, 2010, Vol.93, p : 193-276.
- [44] Pascal P-Nouveau traité de chimie minérale, Vol9, Paris, Masson et Compagnie, P : 1208-1963.
- [45] U. Diebold, *Surface Science Reports* 48 (2003) 53.
- [46] Sambandan DR, Ratner D: Sunscreens: an overview and update. *J Am AcadDermatol*2011, 64:748-758.
- [47] Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, and Cooper LF: Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 2008, 29:3822-3835.
- [48] Fujishima A, Honda K: Electrochemicalphotolysis of water at a semiconductorelectrode. *Nature* 1972, 238:37-38.
- [49] R. Wang, K. Hashimoto, A. Fujishima, M. Chikuni, E. Kojima, A. Kitamura, M. Shimohigoshi, and T. Watanabe, *Nature* 388, 431 (1997).
- [50] A. Mills, R. H. Davies, and D. Worsley, *Chem. Soc. Rev.* 22, 417 (1993).][P. C. Maness, S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum, and W. A. Jacoby, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4094 (1999).
- [51] B. O'regan and M. Gratzel, *Nature* 353, 737 (1991).
- [52] A. M. Ruiz, G. Sakai, A. Cornet, K. Shimano, J. R. Morante, and N. Yamazoe, *Sens. Actuator B-Chem.* 103, 312 (2004).
- [53] Hu, C. W. li, M, Cui, Y. B. Li, D.S, Chen, j. & Yang, L.Y. (2010). Toxicological effets offets of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry* 42(4): P586-591).

- [54] Développement industriel des ciments à base de TiO₂, Claude HAEHNEL, Responsable LMA, CTG Italcementi Group, Paris, 2007, p12.
- [55] thèse : présentée par C.LARUE, IMPACT DE NANOPARTICULES DE TIO₂ ET DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LES VEGETAUX, 2011, p45.
- [56] wang.S.H.W.S.H. Kurepa,j.& Smalle,j,a,ultra-small tio₂ nanoparticles disruptmicrotubular networks in arabidopsis thaliana, plant cell and environment,2011,p811-820.
- [57] Trouiller B., Reliene R.,et al , 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69, 8784-9.Turner J.R., 2006. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical a.
- [58] Lomer M.C., Hutchinson C., Volkert S., Greenfield S.M., Catterall A., Thompson R.P., Powell J.J.,2004. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br J Nutr* 92, 947-55.
- [59] E. Houdeau, Nanoparticules et barrière intestinale : comprendre les mécanismes de franchissement, 2012, p107-108.
- [60] thèse présente par Camille LARUE, IMPACT DE NANOPARTICULES DE TiO₂ ET DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LES VEGETAUX, novembre 2011, p23.
- [61] Hao, L. H. Wang, Z.Y. &Xing, B. S. (2009). Effet of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp(cyprinus carpio). *Journal of environmental sciences-china* 21(10) : p1459-1466.
- [62] Thèse présente par Camille LARUE, IMPACT DE NANOPARTICULES DE TiO₂ ET DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LES VEGETAUX, novembre 2011, p35.
- [63] Chen, L. X. Rajh, T, et al XAFS studies of surface structures of TiO₂ nanoparticles and photocatalytic reduction of metal ions, the journal of physical chemistry B 101(50), p 10688-10697.
- [64] Adams, L.K.Lyon, D.Y. & Alvarez, P.J.J, comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*,2006 , p3527-3532.
- [65] Dimkpa, C.O.D.O,Calder, A, Gajjar,P,Merugu, et al, interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, pseudomonas chlororaphis, journal of hazardous materials,2011 ,p428-435.
- [66] Fabrega, J, Renshaw, J.C.1Lead, J.R,interactions of silver nanoparticles with pseudomonas putida biofilms, environmental science & technology, 2009,p9004-9009.
- [67] Simon-Deckers,A,Loo,S,Mayne-l'hermite,M, et al, composition-and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria, environmental science & technology, 2009,p8423-8429.
- [68] Ghosh, M, Bandyopadhyay, M. & Mukherjee,A, Genotoxicity of titanium dioxide tio₂ nanoparticles et two trophic levels plant and human lymphocytes, *Chemosphere*,2010,P1253-

1262.

- [69] Ferin, J., G. Oberdorster and D. P. Penney. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, p 535-542.
- [70] mémoire réalisé par : David Gonçalves, PROPRIÉTÉS PRO-INFLAMMATOIRES IN VITRO ET IN VIVO DES NANOPARTICULES DE TiO₂, Université du Québec, 2010, p43.
- [71] Institute National de Recherche et de Sécurité, FICHE TOXICOLOGIQUE : Dioxyde de titane, édition 2013, p9/14.
- [72] 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*
- [73] Wilson, K., Walker, J., (1994). *Principles and techniques of practical biochemistry* (4e éd) Cambridge University Press. Oxford.
- [74] De Jesso, F (1968). Ammonium Sulfate Concentration Conversion Nomograph for 0°, *J of Biol and Chem*. 243:2022.
- [75] RMC Dawson, DC Elliot, WH Elliot, KM Jones, *Data for biochemical research*, Clarendon Press, Oxford, 1986 p. 537-538.
- [76] Green, A. A., and Hughes, W. L., (1955). Protein fractionation on the basis of solubility. *Methods Enzymol.*, 1:67-90.
- [77] Rabilloud, T. 1996. Solubilisation of proteins for electrophoresis analys. *Electroph* 17: 813-29.
- [78] 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.
- [79] Kamble V P1, Srinivasa Rao R1, Prita S Broker1, Khobragade CN1 & Dawane BS2. (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..
- [80] 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*
- [81] 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..
- [82] 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*
- [83] G. Carre, compréhension des mécanismes lors de la photocatalyse appliquée a la dégradation des microorganismes.application au traitement de l'air et aux textiles auto-décontaminants,

Université de Strasbourg, août 2013.

[84] B. D. Robert, *Elements de Biologie cellulaire*, Paris: posté par Boyaya, 3e édition, 2004, p. 33.

[85] 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 dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters. *Indian J of*

Conclusion

L'asparaginase est devenue un constituant de traitement des leucémies aiguës lymphoblastique de l'enfant. Elle a non seulement une très grande efficacité, elle permet d'obtenir des taux de rémission supérieurs mais aussi L'avantage de cette enzyme est qu'elle existe sous trois formes : l'Elspar^R, l'Erwinase^R, et le pegaspargase^R.

Le dioxyde de titane avec son grand intérêt dans de nombreux domaines très variés comme la médecine ou encore le développement durable, non seulement c'est la NP la plus utilisée dans la recherche scientifique mais elle possède également le plus grand chiffre de consommation à l'heure actuelle.

L'objectif principal de ce mémoire est de réaliser qu'elles sont les nanoparticules de dioxyde de titane sur l'activité enzymatique de l'asparaginase.

Tout d'abord, on a mis en évidence la production de l'asparaginase à partir d'une souche bactérienne *dickeya salani*, suivie de sa purification partielle. Les résultats obtenus nous permettent de conclure que la présence de l'asparaginase est bien prouvée que soit par les tests qualitatifs en utilisant le réactif de Nessler, et même par les tests quantitatifs qui ont montré l'augmentation de l'activité dans l'échantillon purifié. L'activité change à chaque fois qu'on change des concentrations de TiO₂, des diminutions à cause de l'effet antibactérien de TiO₂ et des augmentations dans l'activité avec des valeurs bien précises qu'on appelle l'activité optimale.

Le travail sera intéressant si :

- On optimise la purification des protéines avec des étapes complémentaires comme la dialyse, la chromatographie échangeuse d'ion, chromatographie par exclusion moléculaire, hydrophobe, et la chromatographie d'affinité en utilisant le substrat de l'enzyme pour avoir une enzyme pure.
- Des essais de l'influence des nanoparticules avec différents états : poudre, solution synthétisée, ou bien des mélanges entre plusieurs NP.
- Des essais d'autres NP comme ZnO.....
- Tester l'effet des NP sur l'activité anticancéreuse de l'enzyme.

Bibliographie :

- [1] V. Varalakshmi, L-asparaginase, An Enzyme of Medicinal Value. International Journal of green and herbal chemistry, Vol.2, 2013, pp. 544-555.
- [2] H. Campbell, Two Asparaginase from Escherichie coli B, their separation, Purification and antitumor property. Biochemistry, kotzia, G.A: Journal of Biotechnology, 1967, pp. 309-323.
- [3] T. M. a. A. M, Synthesis, physiochemical and immunological properties of oxidized inulin L-asparaginase bioconjugate, Journal of Biotechnology, 2009, pp. 189-195.
- [4] Bertrand T, l'asparaginase dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique de l'enfant, 2003, p11.
- [5] Pedreschi, Fa. Kaack, K b., Granby, Kc.The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries Food Chemistry, 2008, p386–392.
- [6] Olga, Gale Encyclopedie of Cancer Bessmertny, Copyright. Asparaginase, 2002.
- [7] British National Formulary (BNF 57), Royaume-Uni, BMJ Group et RPS Publishing,, mars 2009, p. 476.
- [8] J. D. Broome, L-Asparaginase: discovery and development as a tumor-inhibitory agent , Cancer Treatment Reports, vol. 65,, 1981, pp. 111-114.
- [9] C. v. K.-B. R. S. e. R. P. I.M.Appell, Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic, Leukemia, vol. 21, no 11, novembre 2007, pp. 2377-2380.
- [10] H. G. e. S. Gencer, Production of L-asparaginase in Enterobacter aerogenes expressing Vitreoscilla hemoglobin for efficient oxygen uptake, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 63, no 6, février 2004, pp. 691-697.
- [11] H. JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, 2011, pp. 12-13.
- [12] H. JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, 2011, p. 14 .
- [13] G. e. al, FEBS letts, 1996, pp. 211-216.
- [14] A. A. K. Abhinav Shrivastavaa, recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent, india: Elsevier, janvier 2015, p. 2.
- [15] A. BL, The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. Adv Exp Med Biol. 457:621-9, 1999.
- [16] H. L. S. m. M. E. W. S. J. R. G. W. B. P. C. R. M. Woo MH, Anti-asparaginase antibodies following E. coli asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Leuk 12(10):1527- 33.,

1998.

- [17] K. S. A. W. Narta UK, Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 61(3):208-21, 2007.
- [18] A. A. P. N. D. F. Van Es T, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem.* 252:3578-81., 1977.
- [19] K. G. V. C. Abuchowski A, Cancer therapy with chemical modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol L-asparaginase conjugates. *Can Biochem Biophys.* 7: 175-186., 1984.
- [20] S. D. S. S. S. a. Lele.S, Application of Evolutionary Optimization Technique in Maximizing the Recovery of L-Asparaginase from *Erwinia carotovora* MTCC 1428. *Glob J of Biotechnol and Biochem.* 5 (2): 97-105., 2010.
- [21] P. a. M. Benny, L-asparaginase activity in bacteria from sediments and mollusk. *Indian J. Mar Sci.* 20:36-39., 1991.
- [22] K. A. Pérombelon MCM, Ecology of soft rot erwinias. *Annual Rev. phytopatol.* 18:361-387, 1980.
- [23] B. B. K. R. & S. Winslow, & Lelliot, R.A., and Dickey, R.S., 1984. Genus VII. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA: Williams & Wilkins Co., 1: 469-476., 1920.
- [24] 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 pa*.
- [25] C. D. G. D. G. R. F. G. K. H. K. P. M. J. S. R. Beard ME, L-asparaginase in treatment of acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br Med J.* 690:191-5., 1970.
- [26] E. R. H. D. K. J. S. K. Wade H, A new L- asparaginase with antitumor activity. *Lancet.* 2:776-77., 1968.
- [27] G. C. P. C. e.-R. I. G. O. d. I. S. f. d. m. n. e. i. m. (SFMN), *Revue générale Les nanoparticules*, 2010.
- [28] O. Carp, C.L. Huisman, A. Reller, *Prog. Solid State Chem.* 32 (2004) 33.
- [29] H.A. Macleod, *Thin film Optical fillers*. New York: Macmillan, 1986.
- [30]] N. Kumazawa, M.R. Islam, M. Takeuchi, *J. Electroanal. Chem.* 472 (1999) 137.
- [31] Y.X. Leng, N. Huang, P. Yang, J.Y. Chen, H. Sun, J. Wang, *Surf. Coat. Tech.* 156 (2002).
- [32] K.I. Hadjiivanov, D.G. Kissurski, *Chem. Soc. Rev.* 25 (1996) 61.
- [33]
- [34]
- [35] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008, p26–49).

- [36] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008, p26–49.
- [37] J. Boczkowski, S. Lanone, *Nanoparticules : une prévention est-elle possible*, Elsevier Masson, mars 2010, p215-216.
- [38] MECHERI Fatima, Préparation et caractérisation des nano-cristallites de TiO₂ Effets des conditions préparatoires, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA, 2014, p10.
- [39] Lucie ARMAND, Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métalprotéases, influence des paramètres physicochimiques, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, 2011, p12.
- [40] M.Subramanian, S.Vijayalakshmi, et all, *thin Solid Films* 516, 2008, p3776.
- [41] Catherine Pighini, Synthèses de nanocristaux de TiO₂ anatase à distribution de taille contrôlée. novembre 2006, p33.
- [42] S.Yan, W.Guixin et Y.Kangping. *international journal of hydrogenenergy*, 36(2011)15502.
- [43] ARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Lyon, Centre international de recherché sur le cancer, 2010, Vol.93, p : 193-276.
- [44] Pascal P-Nouveau traité de chimie minérale, Vol9, Paris, Masson et Compagnie, P : 1208-1963.
- [45] U. Diebold, *Surface Science Reports* 48 (2003) 53.
- [46] Sambandan DR, Ratner D: Sunscreens: an overview and update. *J Am AcadDermatol*2011, 64:748-758.
- [47] Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, and Cooper LF: Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 2008, 29:3822-3835.
- [48] Fujishima A, Honda K: Electrochemicalphotolysis of water at a semiconductorelectrode. *Nature* 1972, 238:37-38.
- [49] R. Wang, K. Hashimoto, A. Fujishima, M. Chikuni, E. Kojima, A. Kitamura, M. Shimohigoshi, and T. Watanabe, *Nature* 388, 431 (1997).
- [50] A. Mills, R. H. Davies, and D. Worsley, *Chem. Soc. Rev.* 22, 417 (1993).][P. C. Maness, S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum, and W. A. Jacoby, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4094 (1999).
- [51] B. O'regan and M. Gratzel, *Nature* 353, 737 (1991).
- [52] A. M. Ruiz, G. Sakai, A. Cornet, K. Shimano, J. R. Morante, and N. Yamazoe, *Sens. Actuator B-Chem.* 103, 312 (2004).
- [53] Hu, C. W. li, M, Cui, Y. B. Li, D.S, Chen, j. & Yang, L.Y. (2010). Toxicological effets offets of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry* 42(4): P586-591).

- [54] Développement industriel des ciments à base de TiO₂, Claude HAEHNEL, Responsable LMA, CTG Italcementi Group, Paris, 2007, p12.
- [55] thèse : présentée par C.LARUE, IMPACT DE NANOPARTICULES DE TIO₂ ET DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LES VEGETAUX, 2011, p45.
- [56] wang.S.H.W.S.H. Kurepa,j.& Smalle,j,a,ultra-small tio₂ nanoparticles disruptmicrotubular networks in arabidopsis thaliana, plant cell and environment,2011,p811-820.
- [57] Trouiller B., Reliene R.,et al , 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69, 8784-9.Turner J.R., 2006. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical a.
- [58] Lomer M.C., Hutchinson C., Volkert S., Greenfield S.M., Catterall A., Thompson R.P., Powell J.J.,2004. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br J Nutr* 92, 947-55.
- [59] E. Houdeau, Nanoparticules et barrière intestinale : comprendre les mécanismes de franchissement, 2012, p107-108.
- [60] thèse présente par Camille LARUE, IMPACT DE NANOPARTICULES DE TiO₂ ET DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LES VEGETAUX, novembre 2011, p23.
- [61] Hao, L. H. Wang, Z.Y. &Xing, B. S. (2009). Effet of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp(cyprinus carpio). *Journal of environmental sciences-china* 21(10) : p1459-1466.
- [62] Thèse présente par Camille LARUE, IMPACT DE NANOPARTICULES DE TiO₂ ET DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LES VEGETAUX, novembre 2011, p35.
- [63] Chen, L. X. Rajh, T, et al XAFS studies of surface structures of TiO₂ nanoparticles and photocatalytic reduction of metal ions, the journal of physical chemistry B 101(50), p 10688-10697.
- [64] Adams, L.K.Lyon, D.Y. & Alvarez, P.J.J, comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*,2006 , p3527-3532.
- [65] Dimkpa, C.O.D.O,Calder, A, Gajjar,P,Merugu, et al, interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, pseudomonas chlororaphis, journal of hazardous materials,2011 ,p428-435.
- [66] Fabrega, J, Renshaw, J.C.1Lead, J.R,interactions of silver nanoparticles with pseudomonas putida biofilms, environmental science & technology, 2009,p9004-9009.
- [67] Simon-Deckers,A,Loo,S,Mayne-l'hermite,M, et al, composition-and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria, environmental science & technology, 2009,p8423-8429.
- [68] Ghosh, M, Bandyopadhyay, M. & Mukherjee,A, Genotoxicity of titanium dioxide tio₂ nanoparticles et two trophic levels plant and human lymphocytes, *Chemosphere*,2010,P1253-

1262.

- [69] Ferin, J., G. Oberdorster and D. P. Penney. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, p 535-542.
- [70] mémoire réalisé par : David Gonçalves, PROPRIÉTÉS PRO-INFLAMMATOIRES IN VITRO ET IN VIVO DES NANOPARTICULES DE TiO₂, Université du Québec, 2010, p43.
- [71] Institute National de Recherche et de Sécurité, FICHE TOXICOLOGIQUE : Dioxyde de titane, édition 2013, p9/14.
- [72] 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*
- [73] Wilson, K., Walker, J., (1994). *Principles and techniques of practical biochemistry* (4e éd) Cambridge University Press. Oxford.
- [74] De Jesso, F (1968). Ammonium Sulfate Concentration Conversion Nomograph for 0°, *J of Biol and Chem*. 243:2022.
- [75] RMC Dawson, DC Elliot, WH Elliot, KM Jones, *Data for biochemical research*, Clarendon Press, Oxford, 1986 p. 537-538.
- [76] Green, A. A., and Hughes, W. L., (1955). Protein fractionation on the basis of solubility. *Methods Enzymol.*, 1:67-90.
- [77] Rabilloud, T. 1996. Solubilisation of proteins for electrophoresis analys. *Electroph* 17: 813-29.
- [78] 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.
- [79] Kamble V P1, Srinivasa Rao R1, Prita S Broker1, Khobragade CN1 & Dawane BS2. (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..
- [80] 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*
- [81] 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..
- [82] 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*
- [83] G. Carre, compréhension des mécanismes lors de la photocatalyse appliquée a la dégradation des microorganismes.application au traitement de l'air et aux textiles auto-décontaminants,

Université de Strasbourg, août 2013.

[84] B. D.Robert, Elements de Biologie cellulaire, Paris: posté par Boyaya, 3e édition, 2004, p. 33.

[85] 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.

Annexe1 :four paster



Annexe 2 :

Préparation de milieu Hi Media. Mv 088 :

Extrait de viande.....1, 5g

La peptone.....2,5g

L'eau distillée.....500ml

Annexe3 :

Centrifugeur réfrigère :



Annexe4 :

Préparation de sulfate ammonium : on fait la saturation pour 80%

On a pour une saturation de 100%:

56,1g —————> 100ml d'eau distille

47,124g —————> 84 ml d'eau distille

Annexe5:

Préparation d'une solution de 1M de H-cl :

37% = 12M(H-cl)

Donc pour 100ml de 1M H-cl :

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{M_2 V_2}{M_1} = \frac{1 \cdot 100}{12}$$

$$V_1 = 8,33\text{ml}$$

On effectue :

On mélange 8,33ml de H-cl dans 100ml d'eau distille.

Annexe6 :

Préparation de 50mM de tris-H-cl :

$$\text{Tris} = 121,14 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 6,06\text{g}$$

Donc on dissout 6,06g de tris dans 1L d'eau distille

Après on ajuste jusqu'à avoir un pH=8 avec le H-cl (1M).

Annexe7 :

Préparation de 100mM d'asparagine :

$$m_{\text{asp}} = 100 \cdot 10^{-3} \cdot 20 \cdot 10^{-3} \cdot 132,12 = 0,264\text{g}$$

On dissout 0,264g d'asparagine dans 20ml tris-H-cl.

Annexe8 :

Préparation de TCA :

On a une solution de TCA de 15% on va prélever 15ml de cette solution et on va la diluer dans 100ml d'eau distille.

Annexe9 :

Préparation de réactif de nessler :

Chlorure de mercurique.....10g

Iodure de potassium.....7g

Hydroxyde de sodium.....16g

Eau distille.....100ml

Annexe10 :

Un spectromètre

