

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domain: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

Etude cinétique de l'inhibition de l'uréase du soja (*Glycine max* L.) par le fluorure de sodium

Présenté par :

M^{lle}. KHALI IMENE

M^{lle}. ADJALI SOUMIA

Devant le jury :

Président :	M. SIFI Ibrahim	Maitre de Conférences Classe A	Université de Laghouat
Rapporteur :	M. LBOUKH Mourad	Maitre Assistant Classe A	Université de Laghouat
Examinatrice :	M. BENACEUR Farouk	Maitre de Conférences Classe A	Université de Laghouat
Co-Rapporteur :	M. GOUZI Hicham	Professeur	Université de Laghouat

Soutenu publiquement : Juin 2022

Remerciements

*Nous exprimons nos profonds remerciements à nos Encadreurs Messieurs **GOUZI Hicham** et **LEBOUKH Mourad**, Enseignants au Département de Biologique de l'université Ammar Thelidji –Laghouat d'avoir accepté de diriger ce mémoire qui sont toujours montré à l'écoute et pour leur patience, leur encouragement et leur disponibilité et pour leur efforts qu'ils ont consenti durant la réalisation de ce mémoire. Un grand merci pour l'inspiration, l'aide et le temps que vous avez bien voulu nous consacrer. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'ils trouvent ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.*

*Nous sommes particulièrement reconnaissants et honoré que Monsieur Docteur **BENNACEUR Farouk**, enseignant à l'université de Laghouat à bien voulu accepter d'examiner notre travail.*

Soyez assurée de notre respect le plus profond.

*A cette même occasion, nous remercions énormément Monsieur Docteur **SIFI Ibrahim** enseignant à l'université de Laghouat d'avoir acceptée de présider le jury de notre mémoire et pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.*

Nous tenons particulièrement à remercier les ingénieurs de Laboratoire de Département de Biologie pour ces disponibilités et pour leurs précieuses aide dans notre travail expérimental.

ENORMÉMENT MERCI



Dédicaces



C'est avec amour, respect et gratitude que je dédie cette mémoire :

A Mes très chers parents

Vous êtes pour moi source de joie. Vos prières n'ont jamais cessé et si je suis à cette étape de la vie c'est grâce à vos encouragements et vos paroles de soutien.

Pour mon éducation vous avez fait beaucoup de sacrifices, pour mon bonheur vous ne vous êtes pas épargnés. Les mots seuls ne pourraient exprimer tout mon amour ni mon estime pour vous. Ce travail est le vôtre.

A mes sœurs particulièrement Khadidja, Chaima et mon frère Djelloul

La fraternité est un faible mot pour décrire ce qui nous unit. Nous avons partagé de très bons moments. Nos éclats de rire et nos disputes sont le soleil de ma vie. Vous êtes ce merveilleux cadeau du Seigneur et je vous souhaite beaucoup de bénédictions.

A mes Deux famille ADJALI et GHEZAL.

A toute ma famille, merci pour vos encouragements et vos conseils, à tous les personnes qui ont prié pour moi.

Une énorme dédicace à mes proches amies Imene, Oumelkhir, Zineb, Kheira, Senia. En particulier Imane .H, Nora, Zahra, Imane, Souad, Batoul qui m'ont soutenu et apporter aide, écoute et encouragements.

SOUMLA...



Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu à Mes parents, qui ont toujours été présents à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Je ne saurai jamais vous remercier pour la patience dont vous faites preuve ni pour le réconfort que je trouve auprès de vous. Je n'aurais sûrement pas réalisé tout ce chemin sans votre aide constante.

Je le dédie à mon frère Moustafa et mes sœurs et en particulier Taha le fils de ma grande sœur.

Une énorme dédicace à mes proches amies Soumia, Oumelkhir, Zineb, Kheira, Nora, Senia qui m'ont soutenu et apporter aide, écoute et encouragements.

A toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu, encourager, je vous remercie beaucoup.

Enfin, je réserve une pensée particulière à toutes les personnes qui ont prié pour moi sans que je le sache.

IMENE...

Résumé

Le but de ce travail est d'étudier l'effet inhibiteur du fluorure de sodium sur l'urease du soja (*Glycine max* L.). L'urease a été extraite à partir des graines de cette plante selon un protocole simple qui donne une activité uréasique plus ou moins élevée. L'activité urease déterminée à pH 6.8 (tampon Tris-HCl 0.05 M ; 30°C) par méthode colorimétrique à l'aide du rouge du phénol (0.05%) en utilisant un spectrophotométrie réglé à 560 nm en présence de différentes concentration d'urée montre que l'enzyme suit une cinétique michaelienne et les valeurs de K_m et V_{max} ainsi calculée sont respectivement: 9.6 mM et 0.24 Abs_{560nm}/min.

Le NaF est un inhibiteur puissant de l'uréase et il est capable de réduire l'activité enzymatique à 50% à 0.4 mM (pH 6.8, 30°C). Le NaF est un inhibiteur compétitif de l'urease et provoque une augmentation du K_m sans changement de la vitesse maximale.

Mots clés : Soja, Glycine max, Uréase, Extraction, Cinétique, Inhibition, NaF, Mécanisme.

Abstract

The aim of this study is to determine the inhibitory effect of sodium fluoride on the urease of soy (*Glycine max.L.*). Urease was extracted from the seeds of this plant according to a simple protocol which gives a higher or lower urease activity. The urease activity determined at pH 6.8 (Tris-HCl buffer 0.05 M; 30°C) by colorimetric method using phenol red (0.05%) using spectrophotometry set at 560 nm in the presence of urea concentrations shows that the enzyme follows Michaelian kinetics and the values of K_m and V_{max} thus calculated are respectively: 9.6 mM and 0.24 Abs_{560nm}/min.

NaF was a potent urease inhibitor and is capable of reducing enzyme activity to 50% at 0.4 mM (pH 6.8, 30°C). NaF is a competitive urease inhibitor and causes an increase in K_m with no change in maximum velocity.

Keywords: Soybean, Glycine max, Urease, Extraction, Kinetics, Inhibition, NaF, Mechanism.

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثير التثبيطي لفلوريد الصوديوم على إنزيم يوريا فول الصويا (*Glycine* max L.). تم استخلاص اليورياز من بذور هذا النبات وفقا لبروتوكول بسيط يعطي أكبر أو أقل لليوريا. تم تحديد نشاط اليورياز عند درجة حموضة 6.8 (0.05 Tris-HCl مولار) و درجة حرارة 30 درجة بطريقة قياس اللونية باستخدام الفينول الأحمر 0.05% باستعمال مقياس الطيف الضوئي المحدد عند 560 نانومتر في وجود تراكيز مختلفة لليوريا يوضح إن الإنزيم يتبع حركية ميكائيليان و بالتالي يتم حساب قيم Km و Vmax على التوالي: 9.6 ميليمولار و 0.24 Abs560nm / min

NaF هو مثبط قوي لليوريا و هو قادر على تقليل نشاط الإنزيم إلى 50% عند 0.4 ميليمولار عند (درجة حموضة 6.8 ، درجة حرارة 30 درجة مئوية). NaF هو أحد مثبطات اليورياز التنافسي ويسبب زيادة في Km دون تغيير في السرعة القصوى.

الكلمات المفتاحية: فول الصويا ، الجليسين ماكس ، اليوريا ، الاستخلاص ، الخواص الحركية ، التثبيط ، نافا ،

آلية.

Liste d'abréviations

B	E	G
BPU : <i>Bacillus pastorii</i> uréase.	E : Enzyme.	G. max (L.) : <i>Glycine max. L</i>
	EI : Complexe Enzyme – Inhibiteur.	GFP : Green Florescent Protéine.
H	I	J
HCl : Acide chlorhydrique.	[I] : Concentration d'inhibiteur	JBU : Jack Bean Uréase.
HP : <i>Helicobacter pylori</i>	IC₅₀ : Concentration inhibant 50 % des enzymes	
K	N	P
KAU : <i>Klebsiella aerogenes</i> uréase.	NaF : Fluorure de sodium	
K_i : Constante de dissociation d'inhibiteur	NBPT : N-butyl- thiophosphotriamide	PH : Potentiel hydrogène
K_m : Constante de Michaelis- Menten.	NBPTO : N-butyl- phosphotriamide	
	Ni : Nickel	
R	S	V
R² : Coefficient de corrélation linéaire	S : Substrat. [S] : Concentration de substrat	V_{max} : Vitesse maximale V_o : Vitesse initiale

Liste des Figures

Figure 1: Les structures conservées de l'urease.....	4
Figure 2: les mécanismes réactionnels de l'urease.	6
Figure 3: Schéma de la réaction d'hydrolyse de l'uree catalyse par l'urease.	7
Figure 4: les graines de soja	11
Figure 5: la plante de soja.....	11
Figure 6: le soja (<i>Glycine max</i>) légumineuse herbacée	13
Figure 7: Schéma de la répartition géographique de soja en rouge.....	15
Figure 8: Les graines de soja (<i>Glycine max</i>)	17
Figure 9: Les étapes de la préparation d'extrait brut de l'urease.....	18
Figure 10: Teste d'activité enzymatique par la méthode colorimétrique.....	18
Figure 11: Mesure l'activité enzymatique de l'urease par la méthode colorimétrique	21
Figure 12: l'effet de la concentration de l'uree sur l'activité de l'urease de soja (<i>Glycine max</i>).	22
Figure 13: mesure de l'activité inhibitrice de l'urease par la méthode colorimétrique dans un milieu réactionnel 1 ml.....	23
Figure 14: L'effet de la concentration de NaF sur l'hydrolyse de l'uree par l'urease de soja (<i>Glycine max</i>)..	24
Figure 15: mesure l'inhibition d'activité de l'urease par le NaF.	25
Figure 16: Le graphe de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitif de l'activité enzymatique de l'urease de soja (<i>Glycine max</i>) sur l'uree par le NaF.....	27
Figure 17: Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitif.	28

Liste des Tableaux

Tableau 1: Les valeurs des constantes cinétiques (V_{max} , K_m) apparentées et efficacité catalytique de substrat vis-à-vis de l'activité de l'urease de soja.....	22
Tableau 2: Les valeurs IC_{50} d'inhibition de l'urease de soja à partir des différentes sources de NaF.	24
Tableau 3: Les paramètres cinétiques de l'inhibition d'activité enzymatique de l'urease de soja (<i>Glycine max</i>) par le NaF.	26

Table des matières

Résumé.....	I
Liste des abréviations	II
Liste des Figures	III
Liste des Tableaux	IV
Introduction	1
Chapitre I : généralité sur l'urease	
I.1 Historique	2
I.2 Définition de l'urease	2
I.4 Structure de l'urease.....	3
I.4.1 Le site actif.....	4
I.5 Mécanismes réactionnelles de l'urease	5
I.6 Source de l'urease	6
I.7 Localisation cellulaire de l'enzyme	6
I.8 Activité enzymatique de l'urease.....	7
I.9 Le rôle de l'urease	7
I.9.1 Rôle physiologique de l'urease	7
I.9.2 Rôle microbienne de l'urease.....	8
I.10 L'uréase et le pouvoir pathogène bactérien	8
I.10.1 Les bactéries uréolytiques de la cavité buccale.....	8
I.10.2 <i>H. pylori</i> , une bactérie uréolytiques pathogène de l'estomac	9
I.10.3 Les bactéries uréolytiques uropathogènes	9
I.10.4 Les bactéries uréolytiques responsables d'infections respiratoires	9
I.11.4 L'inhibition de l'urease en présence d'acide borique	10
Chapitre II : généralité sur le soja	
II.1 Généralité sur le soja (<i>Glycine max</i>).....	11
II.2 Définition de soja.....	11

II.3 Classification de la plante	12
II. 4 Description botanique de soja.....	12
II.5 Ecologie de soja	13
II. 4.1 Le climat	13
II. 4.2 Le sol.....	13
II.6 Origine de soja	13
II.7 Composition biochimique.....	14
II.7. 1 Protéines.....	14
II. 7.2 Lipides	14
II. 7. 3. Glucides	14
II. 7. 4 Les minéraux.....	14
II. 7. 5 Les vitamines	15
II. 8 La répartition géographique de soja (<i>Glycine max</i>) dans le monde.....	15
II. 9 Utilisation de Soja.....	16
II.9.1 L'alimentation humaine	16
II.9.2 L'alimentation animale	16
II. 9. 3 En agriculture.....	16
Chapitre III : Matériels et méthodes	
III.1 Matériels	17
III.1.1 Matériel biologique.....	17
III.1.2 Produits chimiques	17
III.2 Méthodes	17
III.2.1 Préparation de l'extrait brut de l'urease	17
III.2.2 Mesure de l'activité de l'urease.....	18
III. 2. 2 Détermination des paramètres cinétiques	19
III. 2.3 Etude de l'effet du NaF sur l'activité uréase	19
III. 2.3.1 Détermination de la valeur IC ₅₀	19

III. 2.3.2 Détermination du mécanisme cinétique d'inhibition.....	19
III. 2.4 Analyse des résultats expérimentaux.....	20
Chapitre IV : Résultats et discussion.....	
IV.1 Extraction de l'urease de soja (<i>Glycine max</i>).....	21
IV. 2Détermination des paramètres cinétiques.....	21
IV.3 Détermination de la valeur d'IC ₅₀ de l'effet de le NaF sur l'activité enzymatique de l'urease de soja (<i>Glycine max</i>)	23
IV.4 Inhibition Compétitive de l'activité d'urease de soja (<i>Glycine max</i>) par le NaF.....	25
Conclusion et perspectif	
Conclusion et perspectif	29
Référence bibliographique.....	
Référence bibliographique.....	30

Introduction

L'uréase (Urée Amidohydrolase; E.C. 3.5.1.5) est une métalloenzyme dépendante du nickel qui catalyse l'hydrolyse de l'urée pour produire de l'ammoniac et du carbonate. Ce dernier le composé s'hydrolyse spontanément pour former de l'acide carbonique et une autre molécule d'ammoniac. Fonctionnellement, les uréases appartiennent à la super famille des amidohydrolases et les phosphotries.

La première cristallisation de l'uréase est celle du haricot jack qui a été identifiée comme la première métalloenzyme de nickel, et l'uréase du haricot sabre (*Canavalia ensiformis*) a été la première enzyme à cristalliser. L'uréase est une enzyme se trouve dans de nombreuses bactéries, champignons, plantes très abondante dans la graine de nombreux membres de la famille des Légumineuses et certains invertébrés, ainsi comme dans les sols, en tant qu'enzyme du sol (Banerjee et *al.*, 2013).

Sa principale fonction est le recyclage de l'azote issu de l'urée. L'uréase des haricots est la mieux caractérisée du point de vue biochimique, alors qu'au niveau génétique les informations proviennent essentiellement de l'étude de l'uréase chez le soja (*Glycine max L.*) (Merigout., 2006).

L'étude de l'inhibition de l'uréase est d'une grande importance dans le domaine médicale et agroalimentaire ainsi que l'étude du mécanisme catalytique de l'enzyme (Saboury et Moosavi-movahedi, 1997).

D'après nos connaissance aucune étude n'as était réalisé sur l'inhibition de l'uréase du soja par le fluorure du sodium.

La présentation de ce mémoire a été organisée en différents chapitres décrivant les étapes successives de cette étude. La première et la deuxième partie concernent un rappel bibliographique aussi précis que possible sur l'uréase et le soja. La troisième partie est dédiée à la présentation du matériel et des méthodes expérimentales utilisées lors de cette étude. L'interprétation des résultats obtenus est présentée dans la quatrième partie. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur l'uréase sont regroupées dans la dernière partie.

Chapitre I.

Généralités sur l'uréase

I.1 Historique

L'urée, substrat naturel des uréases, a été isolée pour la première fois de l'urine humaine par Rouelle en 1773, et environ un demi-siècle plus tard, Wöhler a réussi à synthétiser l'urée, la première molécule organique obtenue à partir de molécules inorganique. Le premier micro-organisme uréolytique, *Micrococcus ureae*, a été isolé par van Tiehem en 1864, et la première enzyme à activité uréolytique a été isolée de l'urine putride par de l'urine putride par Musculus en 1874 (Kappaun et *al.*, 2018). Le nom "uréase" a été proposé en 1890 par Miquel. L'uréase a contribué à deux jalons historiques en biochimie. Tout d'abord, la cristallisation de l'uréase isolée des graines de haricot (*Canavalia ensiformis*) par James B. Sumner, en 1926, a démontré la nature protéique des enzymes, une découverte qui a fait date, une découverte récompensée par le prix Nobel de chimie en 1946 (Kappaun et *al.*, 2018).

Deuxièmement, l'importance biologique du nickel a été reconnue en 1975, après que des études du groupe de Zerner aient révélé la présence d'ions de nickel dans le site actif de l'uréase du haricot (*JBU*), obligatoire pour son activité catalytique. L'identification d'une toxine végétale en tant qu'uréase en 2001 peut être considérée comme une troisième percée dans le domaine des uréases. Concernant les uréases, car elle a conduit à la découverte des propriétés non catalytiques de ces enzymes. Cette découverte a élargi nos connaissances sur l'ensemble des fonctions remplies par ces protéines, en plus de leur rôle dans le métabolisme de l'azote (Kappaun et *al.*, 2018).

I.2 Définition de l'uréase

L'uréase (urée amidohydrolase, EC 3.5.1.5) est une enzyme très répandue dans la nature. Elle est synthétisée par de nombreux organismes, y compris les plantes, les bactéries, les algues, les champignons et les invertébrés. également présente dans les sols en tant qu'enzyme du sol (Krajewska., 2018). L'enzyme est comptée parmi les enzymes les plus performantes connues à ce jour. Toutes les uréases sont de haut poids moléculaire élevé, des enzymes multisubstances. Les uréases bactériennes diffèrent de celles des plantes et des champignons, typiquement homoexamériques, en ce qu'elles sont composées de sous-unités hétéromériques. Plus important encore, indépendamment de la source et de la composition structurale, la caractéristique principale des uréases est le site actif qui contient un centre bi-nickel avec une structure caractéristique conservée parmi les enzymes (Krajewska., 2018).

I.3 Les types de l'uréase

Le soja produit deux uréases différentes. L'uréase ubiquiste est homotrimérique et synthétisée dans l'ensemble des tissus végétaux. L'uréase embryonnaire existe sous la forme d'hexamères ou de trimères et elle est spécifique des graines matures et des racines des jeunes plantules (Mérigout., 2006). L'isoenzyme embryonnaire représente 0,2% à 0,5% des protéines totales de la graine, son activité est respectivement 100 à 500 fois plus importante que l'uréase ubiquiste dans les embryons en développement et les embryons matures. Chacune des deux uréases est codée par un gène distinct: Eu1 code l'uréase spécifique de l'embryon et Eu4 l'isoenzyme ubiquiste. En revanche, la pomme de terre, la tomate, plusieurs autres espèces de *Sanacées*, et aussi *Arabidopsis*, ont un unique gène uréase (Mérigout., 2006).

I.4 Structure de l'uréase

La purification et la caractérisation biochimique des différentes uréases ont montré que ces enzymes sont des protéines de très haut poids moléculaire (168 à 625 kDa). L'uréase des eucaryotes est constituée d'une seule sous-unité alors que celle des procaryotes en comporte trois : UreA, UreB et UreC (Florent., 2002). L'uréase des *Helicobacter* fait exception à la règle puisqu'elle n'est formée que de deux sous-unités: UreA et UreB. La comparaison des séquences primaires des sous-unités de structure des uréases des procaryotes et des eucaryotes a indiqué que ces enzymes sont très conservées d'une espèce à l'autre (Florent., 2002). La structure quaternaire de la majorité des uréases bactériennes, comme celle de *Bacillus pastorii* (BPU) ou celle de *Klebsiella aerogenes* (KAU), est composée d'un trimère de trimères $(\alpha\beta\gamma)_3$, chaque sous-unité α contenant un site actif. Les uréases présentes chez *Helicobacter Pylori* sont une exception puisqu'elles sont composées de 4 trimères de dimères $((\alpha\beta)_3)_4$ offrant un total de 12 sites actifs. Quand aux uréases des plantes, dont les uréases Jack Bean (JBU), elles sont composées de 2 homotrimères $(\alpha_3)_4$ et contiennent 6 sites actifs (Danièle., 2011).

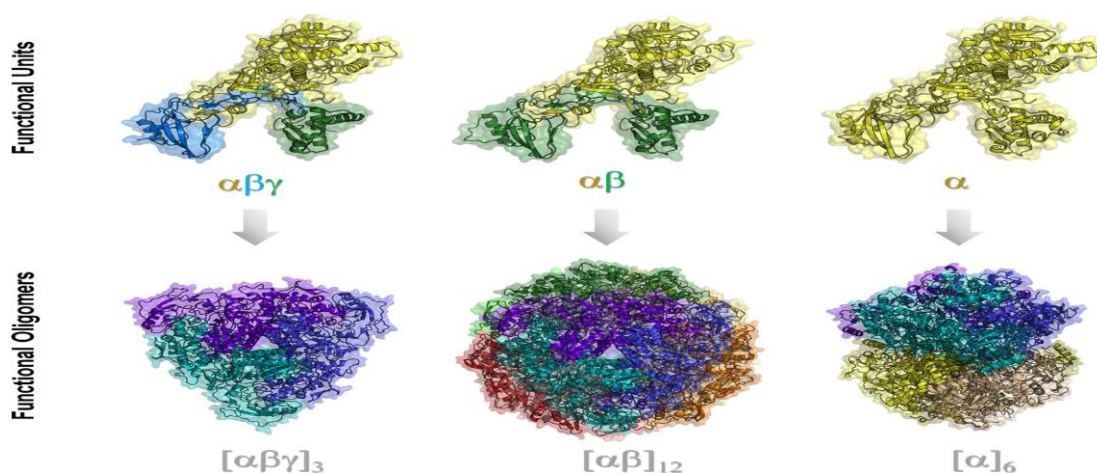


Figure 1: Les structures conservées de l'urease (Kappaun et *al*, 2018)

I.4.1 Le site actif

Toutes les uréases décrites à ce jour nécessitent la présence de deux ions nickel dans leur site catalytique pour être active (métallo-enzyme à nickel). Le site actif de l'uréase de *K.pneumoniae* a été particulièrement étudié. Il est localisé dans la sous-unité structurale Uree et les résidus His-134, His-136, His-246; His-272, Asp-360 et Lyscarbamate-217, qui sont conservés dans toutes les uréases bactériennes, interagissent avec deux atomes de nickel pour former le site actif de l'enzyme. (Florent., 2002) L'un des deux atomes d'azote des résidus His-34 et His-36, l'un des deux atomes d'oxygène des résidus Lyscarbamate-217, Asp-360 et d'une molécule d'eau établissent des liaisons de coordination avec l'un des deux atomes de nickel. La liaison de coordination du deuxième atome de nickel met en jeu l'un des deux atomes d'azote des résidus His-246 et His-272 et le deuxième atome d'oxygène du résidu Lyscarbamate-217. (Florent., 2002)

Ce dernier acide aminé forme donc un pont entre les deux atomes de nickel du site actif. D'autres acides aminés (Ala-167, His-219, Gly-277, His-320, Ala-363, et Met-364) constitueraient le site de fixation de l'urée et participeraient à la catalyse enzymatique. Le résidu His en position 320 est impliqué directement dans la catalyse enzymatique alors que celui en position 219 permet la fixation du substrat via une liaison hydrogène. (Florent., 2002).

I.5 Mécanismes réactionnelles de l'urease

Le mécanisme proposé par Benini et al. implique que l'urée lie le Ni(1), le plus électrophile des deux, via son atome d'oxygène. Cette liaison est stabilisée par l'état de protonation de His α 222, qui agit comme un donneur de liaison hydrogène (Gallaud., 2012). Un des groupements amine de l'urée se rapproche alors du Ni(2), conduisant à une liaison du carbamide avec les deux atomes de nickel. On assiste alors à un changement de conformation du centre catalytique, conduisant à une rotation de Ala α 326 dont l'atome d'oxygène va pointer vers le Ni(2) (Gallaud., 2012). Les groupements carbonyle Ala α 170 et Ala α 366 sont alors en position idéale pour agir comme accepteurs de liaisons hydrogène envers le groupement amine de l'urée, liant le Ni(2). De plus, comme l'urée est un ligand peu avide de par le caractère de base de Lewis faible de ses groupements NH₂, les liaisons établies avec Ala α 170 et Ala α 366 augmentent la basicité de ces groupements et facilite ainsi la liaison avec le Ni(2) (Gallaud., 2012). La liaison bidentate de l'urée aux deux atomes de nickel, très électrophiles, conjointement à l'établissement des liaisons hydrogène décrit ci-dessus, active fortement l'urée en polarisant les liaisons C=O et C-NH₂. Cette conformation de liaison du substrat rapproche l'atome de carbone de l'urée et le Ni(1). Le carbone de l'urée génère alors une attaque électrophile sur l'ion hydroxyde coordonné avec le Ni(1), lui-même activé par Asp α 363, qui va accroître sa charge négative (Gallaud., 2012). His α 222 et His α 323 interagissent alors avec le produit de transition, lié de manière tétraédrique à la fois au nickel et à l'ion hydroxyde pour stabiliser ses charges. Le proton nécessaire au clivage de la liaison C-N du groupement amine distal est apporté par l'ion hydroxyde dont le pK_a a été abaissé par la liaison C-O. Ce transfert est assisté par le groupement carboxylate d'Asp α 363. La molécule d'ammoniac naissante est liée à His α 323 (Gallaud., 2012). Dans l'étape finale, la liaison C-N est rompue, l'ammoniac est expulsé du site actif, aidé par la rotation de His α 323. Le carbamate formé est alors chargé négativement et se trouve dans un environnement de liaison défavorable entre le Ni(1) et Asp α 363. Aidé par la rotation d'Arg α 329, il est relargué de la poche catalytique (Gallaud., 2012).

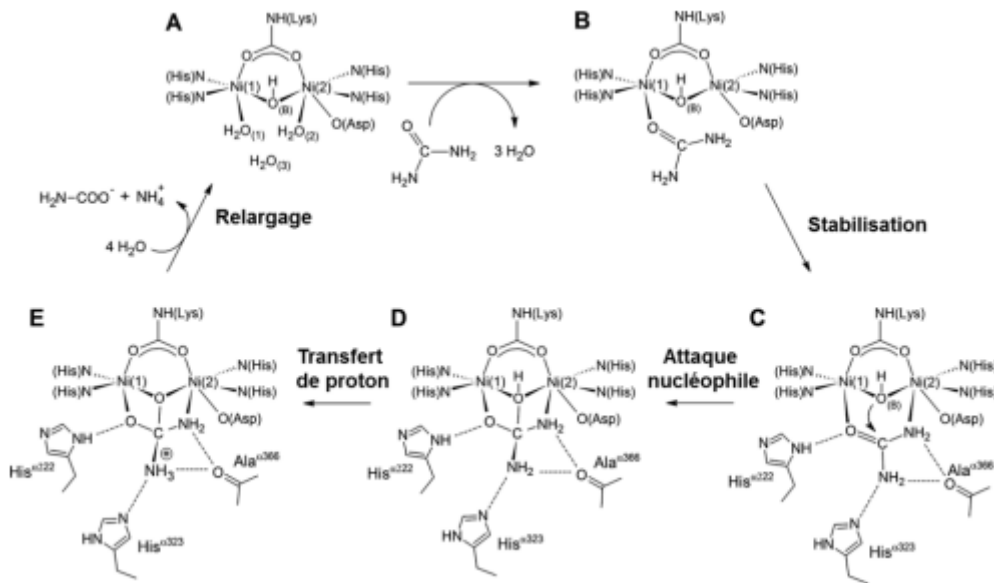


Figure 2: les mécanismes réactionnels de l'urease (Gallaud., 2012).

I.6 Source de l'urease

L'enzyme uréase est présente dans une grande variété de tissus chez l'homme, comme ainsi que dans les bactéries, les levures, les moisissures, les plantes et les invertébrés. En 1926, Sumner fut le premier chimiste à montrer que l'urée était une protéine de la globuline type avec un point isoélectrique de cinq. Les uréases microbiennes et végétales ont signification clinique profonde (Banerjee et al., 2013).

I.7 Localisation cellulaire de l'enzyme

Il est admis que les uréases des bactéries sont toutes localisées dans le cytoplasme. Néanmoins, chez *H. pylori*, bien que majoritairement trouvée dans le cytoplasme, l'enzyme est aussi détectée à la surface cellulaire. L'absence d'un peptide signal dans les sousunités structurales UreA et UreB a suggéré la possibilité d'une sécrétion de l'enzyme par un système de sécrétion distinct de la Voie Générale de Sécrétion (système Sec). Cette hypothèse était supportée par des travaux de Vanet et co-auteurs, montrant que l'urée était en partie détectée dans le surnageant de culture. . Alors que la β -galactosidase (protéine non sécrétée et utilisée dans cette étude comme témoin de localisation sub-cellulaire) était présente uniquement dans le culot cellulaire (Florent., 2002). Cependant, en utilisant la même technologie, mais en prenant comme contrôles le transporteur d'urée Urel (qui est situé dans la membrane cytoplasmique) et la Green Florescent Protéine ou GFP (qui n'est pas produite par *H. pylori* et vraisemblablement pas sécrétée par la bactérie), Marcus et co-auteurs ont observé que la GFP et la protéine UreB étaient toutes deux présentes dans le surnageant de culture des bactéries. Dans cette même étude, l'absence de détection de la

β -galactosidase laissait penser que les données de Vanet et co-auteurs étaient très vraisemblablement un artefact de laboratoire. Ainsi, la présence de UreB à la surface de la bactérie résulterait d'une lyse cellulaire et non pas d'un export de la molécule (Florent., 2002).

I.8 Activité enzymatique de l'urease

L'urease (EC 3.5.1.5, urée amidohydrolase), un métallo enzyme dépendante du nickel, catalyse l'hydrolyse de l'urée pour former de l'ammoniac et du dioxyde de carbone. L'hydrolyse d'une molécule d'urée entraîne la libération de deux molécules d'ammoniac et d'une molécule de dioxyde de carbone. Plusieurs tests, principalement basés sur la mesure des quantités de produits libérés au cours de l'action, sont disponibles pour quantifier l'activité urease (Sirko et Brodzik ., 2000).

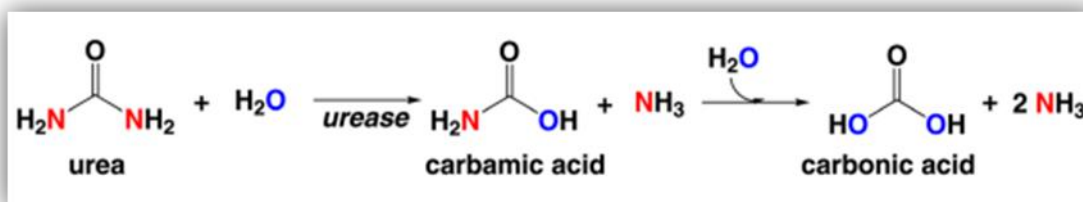


Figure 3: Schéma de la réaction d'hydrolyse de l'urée catalysée par l'urease (Svane et *al.*, 2020).

I.9 Le rôle de l'urée

I.9.1 Rôle physiologique de l'urée

Après le carbone, l'azote est le principal élément limitant la performance des plantes. Une constante sur les plantes pour une utilisation efficace de l'azote, ce qui conduit au développement de mécanismes efficaces d'absorption de l'azote et de voies métaboliques de remobilisation de l'azote. L'urée est une importante source primaire de N pour les plantes. L'action de l'arginase est la seule voie confirmée pour la génération d'urée *in vivo*.

L'urée ne peut être assimilée qu'après son hydrolyse en ammoniac et en dioxyde de carbone par l'uréase. (Real-Guerra, Stanisçuaski et Carlini., 2013). L'ammoniac sera ensuite réassimilé par la glutamine synthétase en utilisant le glutamate comme substrat. L'activité de l'uréase est présente pratiquement dans toutes les espèces végétales et est ubiquiste. L'uréase est une cible pour les études sur l'amélioration du métabolisme de l'azote des plantes basé sur l'urée. Le modèle très intéressant pour les études sur le rôle physiologique de l'uréase dans les plantes c'est le soja, car il est le plus grand producteur d'uréase au monde (Real-Guerra, Stanisçuaski et Carlini., 2013).

I.9.2 Rôle microbienne de l'uréase

L'uréase et son substrat, l'urée, représentent des jalons historiquement importants dans les premières recherches scientifiques. L'intérêt scientifique pour l'uréase microbienne est en grande partie lié à la pertinence de cette activité enzymatique dans l'infection. Cet intérêt a été fortement stimulé depuis la découverte de l'association de *H. pylori* avec la gastrite et le cancer de l'estomac. (Mora et Arioli., 2014)

L'uréase est considérée comme une réponse au stress qui a été développée par plusieurs bactéries pour contrer un faible niveau de pH environnemental. L'hydrolyse de l'urée entraîne une augmentation du pH en raison de la diffusion rapide de l'ammoniac à l'extérieur de la cellule. Le rôle de l'uréase dans la plupart des microorganismes qui présentent cette activité enzymatique est très différent (Mora et Arioli., 2014).

I.10 L'uréase et le pouvoir pathogène bactérien

Lors de la colonisation d'un hôte, les bactéries doivent mettre en place des voies métaboliques synthétisant des composés absents ou indisponibles chez l'hôte et, qui sont indispensables à leur croissance. Parmi l'ensemble des protéines impliquées dans le métabolisme bactérien, l'uréase participerait à l'assimilation de l'azote. Cette enzyme confère également un pouvoir pathogène à certaines bactéries (Florent., 2002).

I.10.1 Les bactéries uréolytiques de la cavité buccale

Toutes les espèces bactériennes contribuant à cette activité n'ont pas été encore identifiées. *S. salivarius* est probablement l'espèce qui contribue le plus à l'uréolyse dans la cavité buccale. Néanmoins, cette bactérie n'est pas un constituant prédominant du biofilm dentaire dans lequel les bactéries uréolytiques sont majoritairement des *Actinomyces* et des *Haemophilus* (Florent., 2002). L'hydrolyse microbienne de l'urée pourrait être à l'origine du maintien du pH neutre et de la composition de la flore de la cavité buccale.

Au cours de l'alimentation, le pH de la plaque dentaire s'acidifie et les dents se déminéralisent ; ensuite, le pH de la cavité buccale devient neutre et les dents se reminéralisent. Le développement de la carie résulte d'un processus impliquant des cycles de déminéralisation et de reminéralisation des dents. (Florent., 2002).

I.10.2 *H. pylori*, une bactérie uréolytique pathogène de l'estomac

Helicobacter pylori est une bactérie qui infecte les muqueuses de la paroi de l'estomac humain. Elle est notamment responsable des gastrites chroniques, des ulcères duodénaux et joue un rôle important dans la genèse de certains cancers gastriques. (ARABI., 2012) Cette infection s'acquiert à l'enfance et dans la très grande majorité des cas, elle devient chronique, s'accompagne d'une inflammation de la muqueuse gastrique et est la cause de 90 % de toutes les gastrites chroniques (ARABI., 2012).

I.10.3 Les bactéries uréolytiques uropathogènes

Les bactéries uréolytiques sont fréquemment associées aux infections du tractus urinaire, en particulier, chez les patients ayant des malformations anatomiques ou fonctionnelles du rein et/ou de la vessie et, éventuellement porteurs de sonde urinaire. (Florent., 2002) Les espèces associées à ces infections sont *P. mirabilis*, *P. penneri*, *E. coli*, *Klebsiella spp*, *P. stuartii* mais aussi *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp*, et *Ureaplasma urealyticum*. *P. mirabilis* est responsable de cystites et de pyélonéphrites aiguës parfois compliquées de lithiase (Florent., 2002).

I. 10. 4 Les bactéries uréolytiques responsables d'infections respiratoires

B. bronchiseptica, *Mycobacterium bovis* et *A. pleuropneumoniae* sont toutes trois pathogènes pour les voies respiratoires de bovins et porcins et produisent une uréase. (Florent., 2002) Par une approche expérimentale similaire il a été démontré pour chacune de ces bactéries que l'enzyme intervient dans la colonisation bactérienne de l'arbre respiratoire. (Florent., 2002) Plus particulièrement, l'uréease de *A. pleuropneumoniae* favorise la persistance bactérienne en perturbant la réponse immunitaire de l'hôte (Florent., 2002).

I.11 inhibiteurs de l'uréase

Les inhibitions de l'uréase ont été largement étudiées en raison de leur utilisation potentielle telles que la thérapie contre l'uréase bactérienne, qui induit des états pathogènes chez l'homme, tels que la formation de calculs urinaires, l'ulcère gastroduodéal, la pyélonéphrite et le coma hépatique, la protection du sol contre élévation du pH et la perte d'azote après l'utilisation d'engrais à base d'urée en contrôlant l'hydrolyse de l'urée dans

le sol, et une technique analytique pour déterminer les substances agissant comme inhibiteurs enzymatiques peuvent être classés comme (Upadhyay ., 2012) :

I.11.1 Le fluorure

En 1943, on a démontré pour la première fois que le fluorure était un inhibiteur de l'urease du rumen bovin. Plus tard, il a été signalé qu'il était un inhibiteur compétitif de l'urease du haricot et non compétitif pour l'urease de la pastèque. Il a été signalé que l'inhibition du fluorure dépend du temps et donne des valeurs d'état d'équilibre. (Upadhyay ., 2012)

I.11.2 Les acides hydroxamiques

Les propriétés inhibitrices des acides hydroxamiques ont été découvertes pour la première fois en 1962, sur l'urease Jack Bean. Les acides hydroxamiques sont des bons agents chélatants et se lient au site actif des urease de façon compétitive (Danièle., 2011).

I.11.3 l'inhibition d'urease par le NBPT

Les thiophosphorotriamides ne sont que de pauvres inhibiteurs d'uréase. Leur effet dépend essentiellement de leur taux de conversion en phosphorotriamides dans les sols. Dans le cas du NBPT, l'espèce inhibitrice est le NBPTO, résultat de la substitution de l'atome de soufre par un atome d'oxygène. Cette transformation se produit très rapidement dans les sols (Danièle., 2011).

I.11.4 L'inhibition de l'uréase en présence d'acide borique

Les acides boriques et boroniques ont été signalés comme des inhibiteurs compétitif simple de l'uréase de *P. mirabilis*, du haricot et de *K. aerogenes*. L'inhibition de l'uréase par l'acide borique été maximale à un pH acide (5) et minimale à un pH alcalin (10) (Upadhyay .,2012)

Chapitre II.
Généralités sur le soja

II.1 Généralité sur le soja (*Glycine max*)

Le soja, soya ou soybean (*Soja hispida* ou *Glycine max*) est la légumineuse la plus importante du point de vue de la production et de la commercialisation. Sa teneur en lipides (20%) et en protéines (50%) fait d'elle, au même temps, une plante oléagineuse et protéagineuse. Avec un taux de consommation respectivement 69% et 31%, ses protéines et son huile sont de loin les protéines et l'huile végétale les plus consommés dans le monde.

(Ghalem., 2010)

Le soja la graine d'or, la graine sacrée, la viande des pauvres ou cendrillon de légumineuses, constitue un aliment idéal pour les populations défavorisées. Cette légumineuse est riche en vitamine A, B, C et D, en acide gras insaturé, sels minéraux notamment le calcium et le potassium elle apporte les huit acides aminés essentiels en proportion appréciables. (Ghalem., 2010)

II.2 Définition de soja

Classé dans la catégorie des légumineuses comme le pois ou le haricot, le soja (*Glycine Maxima*) est une plante d'environ 80cm de haut. Après une floraison colorée allant du rouge au blanc en passant par le mauve, apparaissent les gousses qui contiennent entre 2 et 5 graines. Ce sont ces graines qui sont ensuite utilisées entières pour la fabrication des aliments au soja (www.ensa-eu.org).



Figure 4: les graines de soja (site web)



Figure 5: la plante de soja (Amrane et Tahra., 2020)

II.3 Classification de la plante

Le *G. max (L.) Merr*, ou soja cultivé, appartient à la famille des Légumineuses, à la sous-famille des Papilionacées, à la tribu des Phaséolées, au genre *Glycine* Willd. et au sous-genre *Soja* (Amrane et Tahra., 2020).

- **Règne** : Plantae
- **Sous-règne** : Tracheobionta
- **Division** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Sous-classe** : Rosidae
- **Famille** : Fabaceae
- **Sous-famille** : Faboideae
- **Tribu** : Phaseoleae
- **Sous-tribu** : Glycininae
- **Genre** : *Glycine*
- **Sous-genre** : *Soja*
- **Espèce** : *Glycine max (L.) Merr*
- **Ordre** : Fabales (Amrane et Tahra., 2020).

II. 4 Description botanique de soja

Le soja est une plante herbacée annuelle cultivée. Ses nombreuses variétés comprennent des plantes grimpantes ou rampantes et des formes naines. La plante est entièrement couverte de fins poils gris ou bruns. Les tiges dressées ont une Les feuilles sont trifoliées rappelant celles du haricot. Les folioles mesurent de 6 à 15 cm de long sur 2 à 7 cm de large. Les deux premières feuilles sont entières et opposées (Roulier.,2012).

Les fleurs, petites, blanches ou pourpres, groupées en grappes de 3 à 5, apparaissent à l'aisselle des feuilles. Elles sont hermaphrodites et autogames, la pollinisation croisée Les fruits sont des gousses velues, longues de 3 à 8 cm de forme droite ou arquée, et contenant de 2 à 4 graines (rarement plus).

Les graines, comestibles, de forme sphérique ou elliptique ont un diamètre de 5 à 11 mm (Roulier., 2012).

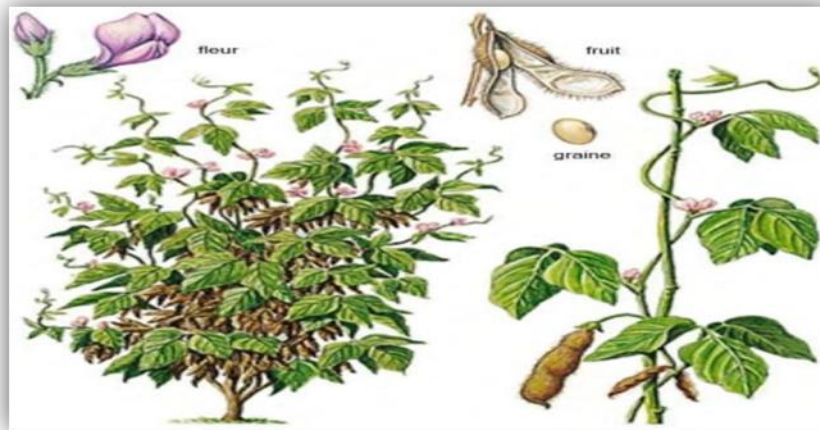


Figure 6: le soja (*Glycine max*) légumineuse herbacée (Amrane et Tahra., 2020).

II.5 Ecologie de soja

La période de croissance peut s'étaler sur une période de **75** jours suivant la variété (Amrane et Tahra., 2020).

II. 4.1 Le climat

Le soja est généralement qualifié de la plante de jour court, bien que des cultivars insensibles à la longueur du jour aient été développés récemment au Brésil. Aux Etats-Unis, les cultivars sont classés en 12 groupes de maturité d'après leur réaction à la longueur du jour.

II. 4.2 Le sol

Le soja pousse sur une grande variété de sols, allant de sable limoneux aux limons argileux, à condition qu'ils soient profonds et bien drainés (Amrane et Tahra., 2020).

II.6 Origine de soja

L'histoire du soja commence en Orient, au moins 3000 ans avant l'ère chrétienne, comme aliment de base. Le soja est consommé en Asie depuis au moins 5000 ans. En Chine, il fait même partie des cinq grains sacrés (avec le blé, orge, riz et millet). La médecine traditionnelle chinoise utilise le germe de soja fermenté, pour ses propriétés sédatives, anti pyrétiques et carminatives (Bazibuhe., 2011). De la Chine, le soja s'est répandu vers le sud, en Chine centrale et méridionale, et en Corée. Au 15^{ème} siècle, le soja était cultivé au Japon, en Indochine, en Thaïlande, dans la péninsule de Malaisie, en Birmanie, au Népal et dans le nord de l'Inde (Bazibuhe., 2011).

Aux Etats-Unis, la production de soja a connu une progression sensible durant la seconde guerre mondiale afin de répondre à une demande accrue en huiles végétales.

Depuis les années 1970, la production s'est étendue dans les régions tropicales, y compris en Afrique tropicale (Bazibuhe., 2011). La distribution actuelle du soja sauvage concerne certaines régions de la Chine et de l'est de l'ex-union Soviétique, Taïwan, le Japon et la Corée. Le soja a été introduit en Europe autour de 1790, et au début du 19ème siècle dans le Nouveau Monde et en Afrique. . Sur le continent africain, il a d'abord été cultivé en Algérie avant de se répandre vers le début du 20ème siècle au Nigeria, en Ouganda, au Congo- Kinshasa et au Zimbabwe (Bazibuhe., 2011).

II.7 Composition biochimique

II.7. 1 Protéines

Les protéines de soja sont principalement utilisées sous forme de tourteaux, de farines contenant de 45 à 65 % de protéines, de concentrés contenant de 65 à 90 % de protéines ou d'isolats enrichis à plus de 90 %. On trouve respectivement dans la matrice sèche du germe et des cotylédons de 35 à 45 % et de 40 à 50 % de protéines totales. Leur qualité est idéale en termes de profil d'acides aminés et de digestibilité (Hubert., 2006).

II. 7.2 Lipides

Le germe de soja et les cotylédons contiennent respectivement de 13 à 16 % et de 18 à 20 % de lipides totaux, dont environ 85% sont composés d'acides gras polyinsaturés riches en acides linoléique et linoléique. Leur teneur dépend de la variété et des conditions de culture et leur répartition varie dans les différents compartiments de la graine (Hubert., 2006).

II. 7. 3. Glucides

La graine de soja contient de 30 à 35 % de sucres dont 15 % sont des sucres solubles incluant le saccharose et d'autres oligosaccharides. Le soja est aussi une excellente source de fibres alimentaires. Les sucres insolubles issus de ces fibres, dont la cellulose, les hémicelluloses, la pectine et l'amidon, représentent 15 % des cotylédons et 9 % du germe (Hubert., 2006).

II. 7. 4 Les minéraux

La graine de soja contient de 4 à 5 % de minéraux, les principaux éléments étant le potassium, le phosphore, le magnésium et le calcium. La biodisponibilité du calcium et du zinc dans le soja est plus élevée que celle du fer d'origine végétale qui est difficilement absorbé par l'organisme (Hubert., 2006).

II. 7. 5 Les vitamines

L'apport en vitamines des graines de soja est également significatif, puisqu'on y trouve les vitamines liposolubles A, E, D et K ainsi que les vitamines hydrosolubles essentiellement du groupe B (Hubert., 2006).

II. 8 La répartition géographique de soja (*Glycine max*) dans le monde

Au cours des trois premières décennies du XXe siècle, la production de soja était essentiellement confinée à l'orient (Chine, Indonésie, Japon et République de Corée). Toutefois, dans les années 1940, les Etats-Unis ont dépassée tout l'orient en termes de production (Guide., 2018). Le soja est très sensible à la lumière du jour et est donc cultivé dans des régions où la lumière est disponible environ 12-13 heures par jour. Aux Etats-Unis, plus de la moitié du soja produit provient de la ceinture de maïs. En Asie, la région de culture du soja est principalement concentrée à l'Est, et au Brésil, la plupart des graines de soja sont cultivées dans le sud. Aux États-Unis et en Chine, les zones de production de soja les plus importantes sont situées entre 35 et 45° de latitude. (Guide., 2018).



Figure 7: Schéma de la répartition géographique de soja en rouge (Guide., 2018).

II. 9 Utilisation de Soja

L'importance du soja est due à sa nature de plante légumineuse et oléagineuse au même temps, ainsi qu'à la qualité nutritionnelle de ses graines et la diversité de leurs produits dérivés. Comme aliment, les chinois utilisent le soja « la viande des pauvres » la première source de protéine et d'huile dans le monde (Ghalem., 2010). Ses graines peuvent contenir de **30** à **50%** de protéines de qualité du fait qu'elles apportent les **8** acides aminés indispensables (Ghalem., 2010). Elles renferment aussi **15%** à **25 %** d'huile de qualité. Il constitue une bonne source de minéraux, de vitamine B, d'acide folique et d'isoflavones qui sont reconnues pour leur capacité à ralentir le développement des cancers, des maladies cardiovasculaires et de l'ostéoporose (Ghalem., 2010).

II.9.1 L'alimentation humaine

Utilisées les graines sèches en divers façons telle que réduite de farine, sous forme de préparations diverses (galettes, soupe, etc...); sous forme de : lait condensé ou frais, fromage, café, etc... ; ou bien utilisée l'huile de soja pour préparer : l'huile de table, les margarines, des peintures, l'encre d'imprimerie, etc... grâce à la lécithine qu'elle contient (Ghalem., 2010).

II.9.2 L'alimentation animale

Les tourteaux, qui sont les résidus d'huilerie, contiennent une grande proportion de protides (Ghalem., 2010).

II. 9. 3 En agriculture

Le soja a une grande capacité pour fixer l'azote, il a un effet bénéfique sur la structure du sol et offre la possibilité de réduire le nombre de passages pour la préparation de la culture, le cycle de soja permet de limiter les maladies et les parasites qui se conservent dans le sol et rompre le cycle des mauvaises herbes.

Le soja est une culture qui nécessite très peu de traitements antiparasitaires contre les ravageurs et les maladies. (Ghalem., 2010).

Chapitre III.

Matériel et méthodes

III.1 Matériels

III.1.1 Matériel biologique

Les graines de soja (*Glycine max*) de couleur ont été achetées chez un herboriste du marché local de la région de Laghouat. Les graines sont broyées à l'aide d'un mortier puis la poudre obtenue est conservées à température ambiante pour être utilisée ultérieurement.



Figure 8: Les graines de soja (*Glycine max*), (Original, 2022)

III.1.2 Produits chimiques

L'urée, le rouge de phénol, le NaF, Tris et HCl sont fournis par Fluka (Sigma-Aldrich). Tous les autres produits chimiques utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

III.2 Méthodes

III.2.1 Préparation de l'extrait brut de l'uréase

L'uréase a été extraite à partir des graines de soja (*Glycine max*) selon la méthode d'extraction d'écrite par Pratama et *al.* (2021) (modifier). 25 g de graines de soja (*Glycine max*) sont broyées à l'aide d'un mortier puis introduites dans 50 mL d'eau distillé. Après 4 heures de macération à 4°C, l'homogénat est filtré à travers trois couches de compresse et le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000 tr/min. Le surnageant d'un volume total de 50 mL de couleur marron-jaunâtre représente l'extrait brut de l'uréase du soja. L'extrait enzymatique brut est répartis dans des tubes Eppendorph en plastique qui seront conservées à -10°C (Figure 10).



Figure 9: Les étapes de la préparation d'extrait brut de l'urease, (original, 2022)

III.2.2 Mesure de l'activité de l'urease

L'activité de l'extrait brut de l'urease du soja (*Glycine max*) est mesurée à pH 6.8 (tampon Tris- HCl à 0.05 M) à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS γ Spectrophotometer, England) réglé à 560 nm en utilisant l'urée comme substrat. L'activité de l'urease est déterminée dans le milieu réactionnel 1 ml contenant, 100 μ l de rouge de phénol à 0.05%, 100 μ L d'urée à 1M, et 700 μ L de Tris-Hcl (0.05M) à pH 6.8. L'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel est enregistrée chaque 20 sec pendant 20 minutes après l'ajout de l'extrait enzymatique (Gouzi et *al.*, 2013).



Figure 10: Teste d'activité enzymatique par la méthode colorimétrique, (original, 2022)

III. 2. 2 Détermination des paramètres cinétiques

Dans le but de déterminer la constante de Michaelis-Menten (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}), l'activité de l'urease d'extrait brut de soja est mesurée à température ambiante, en utilisant l'urée à 1 M dans 50 mM de tampon au pH 6,8, à différentes concentrations comprises entre (5 mM ; 100 mM). Les valeurs apparentes de V_{max} et K_m ont été calculées à partir des représentations graphiques de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk (Gouzi et *al.*, 2013).

III. 2.3 Etude de l'effet du NaF sur l'activité uréase

III. 2.3.1 Détermination de la valeur IC_{50}

Pour déterminer la concentration du NaF qui provoque une diminution de l'activité ureasique par 50% (IC_{50}), l'activité enzymatique a été mesurée à température ambiante et à pH 6.8 (tampon Tris-HCl 0.05 M), en absence et en présence de différentes concentrations du NaF entre 0.3-5 mM et ceci pour une concentration constante de l'urée à 1M.

L' IC_{50} est déterminée à partir de la présentation de l'activité enzymatique relative en fonction de la concentration croissante de l'inhibiteur (Gouzi et *al.*, 2013).

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

III. 2.3.2 Détermination du mécanisme cinétique d'inhibition

Pour déterminer le mécanisme cinétique d'inhibition de l'urease du soja (*Glycine max*) par le NaF l'activité enzymatique de l'enzyme a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de l'inhibiteur (NaF) 1,5 et 2,5 mM à différente concentration de l'urée comprise entre 50 et 300 mM.

Le type d'inhibition a été déterminé à partir de la représentation en double inverse de lineweaver- Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat pour chaque inhibiteur (Arslan et Dogan., 2005).

Les constantes d'inhibition K_I a été calculée à partir du graphe secondaire des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur. K_I représente la constante de dissociation du complexe Enzyme -Inhibiteur (EI). La constante d'inhibition K_I , est une mesure quantitative du pouvoir inhibiteur des inhibiteurs réversibles. Par conséquent, dans notre étude, l'efficacité d'un inhibiteur est exprimée par le K_I , qui est l'inverse de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur.

III. 2.4 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2D™ (JandelScientific Windows v2.03, Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 2010), SigmaPlot 2012 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0,12.0) et Origin 8.0 (Microcal(TM) Origin Version 8.0, Copyright © 1995-2008 Microcal Software, Inc.)

Chapitre IV.

Résultats et discussion

IV.1 Extraction de l'uréase de soja (*Glycine max*)

Le protocole utilisé pour extraire l'uréase de soja (*Glycine max*), décrit par (Partama et al., 2021), nous avons fait deux essais pour obtenir un extrait brut de couleur marron jaunâtre. L'uréase est souvent signalée comme une enzyme latente, qui peut être activée *in vitro* par le substrat.

IV. 2 Détermination des paramètres cinétiques

L'effet de la nature du substrat et de sa concentration sur l'uréase de soja a été étudié en utilisant l'urée à de concentration 1M. Les autres paramètres physico-chimiques sont maintenus constants (tampon Tris-HCl 0.05 M ; pH 6,8 ; température ambiante). Nos résultats expérimentaux ont été ajustés par le graphe de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk. D'après les valeurs du coefficient de corrélation linéaire (R^2), l'hydrolyse de l'urée par l'uréase de soja suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat.



Figure 11: Mesure l'activité enzymatique de l'uréase par la méthode colorimétrique dans un milieu réactionnel 1ml (original, 2022).

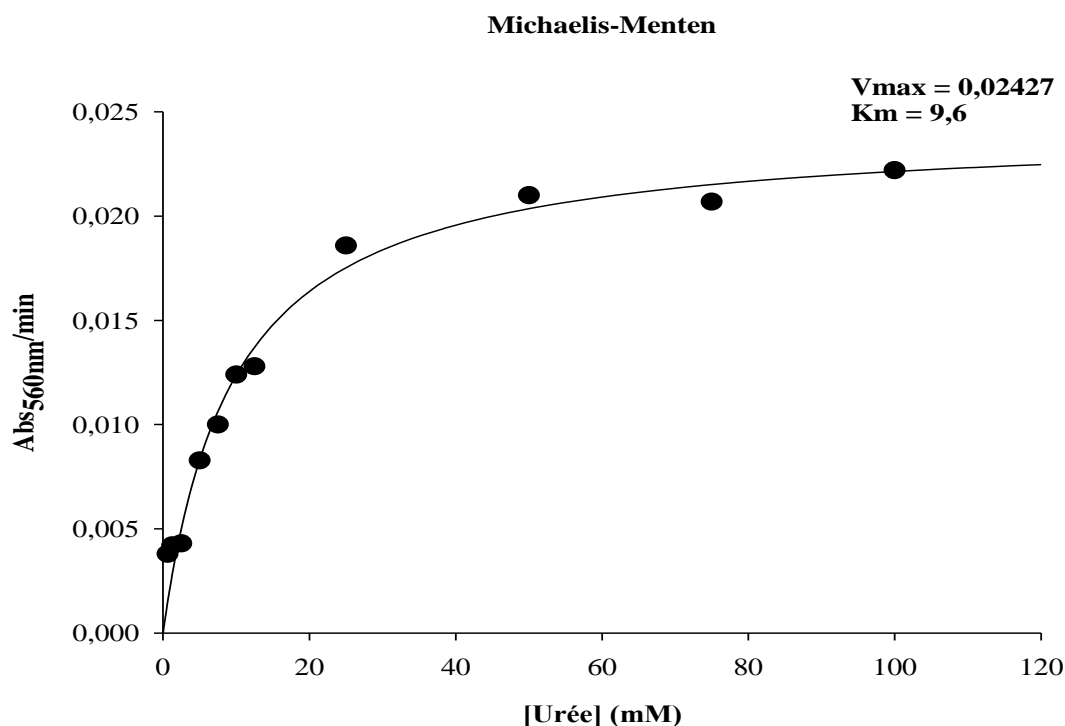


Figure 12: l'effet de la concentration de l'uree sur l'activité de l'urease de soja (Glycine max) Les conditions d'essais : température ambiante, 1,0 ml de milieu réactionnel contiennent 0,05M de tampon Tris-Hcl (pH 6,8). Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais.

Tableau 1: Les valeurs des constantes cinétiques (V_{max} , K_m) apparentées et efficacité catalytique de substrat vis-à-vis de l'activité de l'urease de soja.

Substrat	Longueur d'onde (nm)	V max (Δ Abs/min)	K m (mM)
L'uree	560	0,02427	9,6

L'enzyme possède presque la même affinité par rapport à d'autres uréases isolées à partir de différentes sources (K_m 0,2- 22 mM) (Kappaun et al., 2018; Krajewska et al., 2012; Stephanie et al.,1992). Les valeurs de K_m et V_{max} de l'urease varient le plus souvent avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction.

IV.3 Détermination de la valeur d'IC₅₀ de l'effet de le NaF sur l'activité enzymatique de l'urease de soja (*Glycine max*)

L'effet de différentes concentrations de le NaF sur l'hydrolyse de l'uree par l'urease de soja (*Glycine max*) est étudié. La figure montre que l'activité enzymatique de l'enzyme diminue en fonction de la concentration de NaF dans le milieu réactionnel.

La valeur d'IC₅₀ de le NaF définie comme étant la concentration de ce composé pour provoquer une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50% ainsi calculée égale à 0,4 mM.



Figure 13: mesure de l'activité inhibitrice de l'urease par la méthode colorimétrique dans un milieu réactionnel 1 ml (originale, 2022).

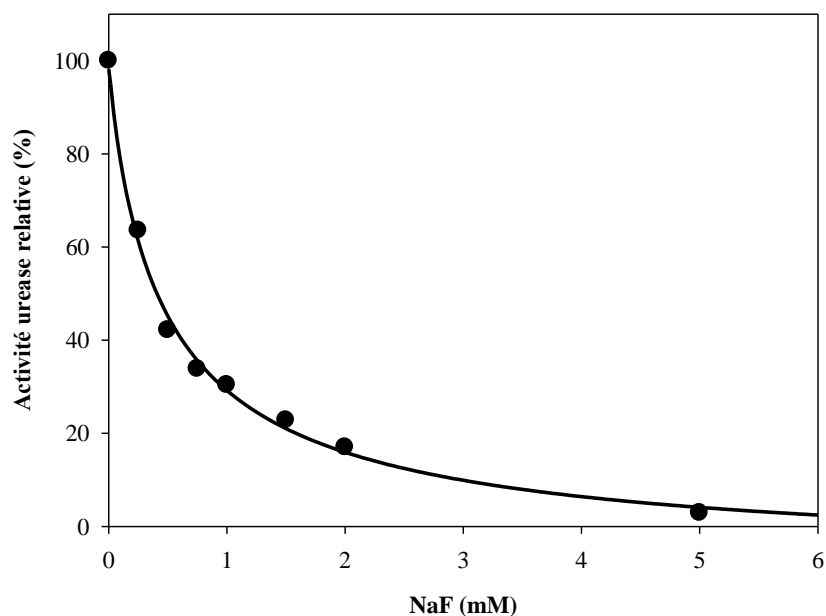


Figure 14: L'effet de la concentration de NaF sur l'hydrolyse de l'uree par l'urease de soja (*Glycine max*). Les conditions d'essais : température ambiante, 1,0 ml de milieu réactionnel contiennent 0,05M de tampon Tris-Hcl (pH 6,8). Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais.

D'après les résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur du le NaF et la valeur d'IC₅₀ dépend de la source d'enzyme et le type de substrat choisi pour la mesure de l'activité de l'urease de soja. On fait une comparaison de l'effet de NaF sur l'activité enzymatique de l'urease, de différentes sources végétales de cette enzyme avec leur substrats, a partir le NaF représentée dans le Tableau (2) ci-dessous.

Tableau 2: Les valeurs IC₅₀ d'inhibition de l'urease de soja à partir des différentes sources de NaF.

Sources	IC ₅₀ (mM)	Références
Soja (<i>Glycine max</i>)	0,4	Notre étude
Haricot sabre (<i>canavalia ensiformis</i>)	0,0391	Saeed et al.,2017
Soybean (<i>Glycine max</i>)	2,9	Kumar et Kayastha.,2010
<i>A. naeslundii</i>	1	Barboza et al.,2005
<i>S. salivarius</i>	0,2	Barboza et al.,2005

Les valeurs de l'IC₅₀ déterminées pour le NaF sur l'activité enzymatique de l'urease de soja (*Glycine max*) été comparées par rapport à celles obtenues pour d'autres ureases (tableau 2) ; On remarque quand on utilise le substrat de l'uree et un inhibiteur de la même source végétale de soja (*Glycine max*). Elle est relativement similaire, et On constate que la valeur d'IC₅₀ varie de manière significative avec la source de l'enzyme et du substrat utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique.

IV.4 Inhibition Compétitive de l'activité d'urease de soja (*Glycine max*) par le NaF

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'hydrolyse de l'uree par l'urease de soja, suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les cinétiques d'inhibitions de NaF agissant sur l'enzyme ont été déterminées par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk.



Figure 15: mesure l'inhibition d'activité de l'urease par le NaF (original, 2022).

La Figure (16) montre que les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence de fluorure de sodium. La représentation graphique de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées. La valeur de V_{max} demeure constante tandis que, la valeur de K_m augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. Ceci indique que, le NaF est considéré comme un inhibiteur compétitif de l'activité enzymatique de l'urease de soja. L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition compétitive s'écrit comme suit:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Avec :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

K_I : constante de dissociation du complexe EI (mM)

K_m : constante de Michaelis-Menten

[I] : concentration d'inhibiteur (mM)

V_{max} : La vitesse maximale

Tableau 3: Les paramètres cinétiques de l'inhibition d'activité enzymatique de l'urease de soja (*Glycine max*) par le NaF.

[NaF] mM	K_I (mM)	V_{max} (Abs/min)	R^2	Type d'inhibition
0	0,2494	65,2944	0,989	Compétitive
1,5				
2,5				

Le NaF se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme c'est indiqué dans le Tableau (3), les constantes d'inhibition (K_I) pour le NaF, utilisant l'uree comme substrat, 0,2494mM. Indiquant que l'affinité de l'enzyme pour le NaF est plus grand.

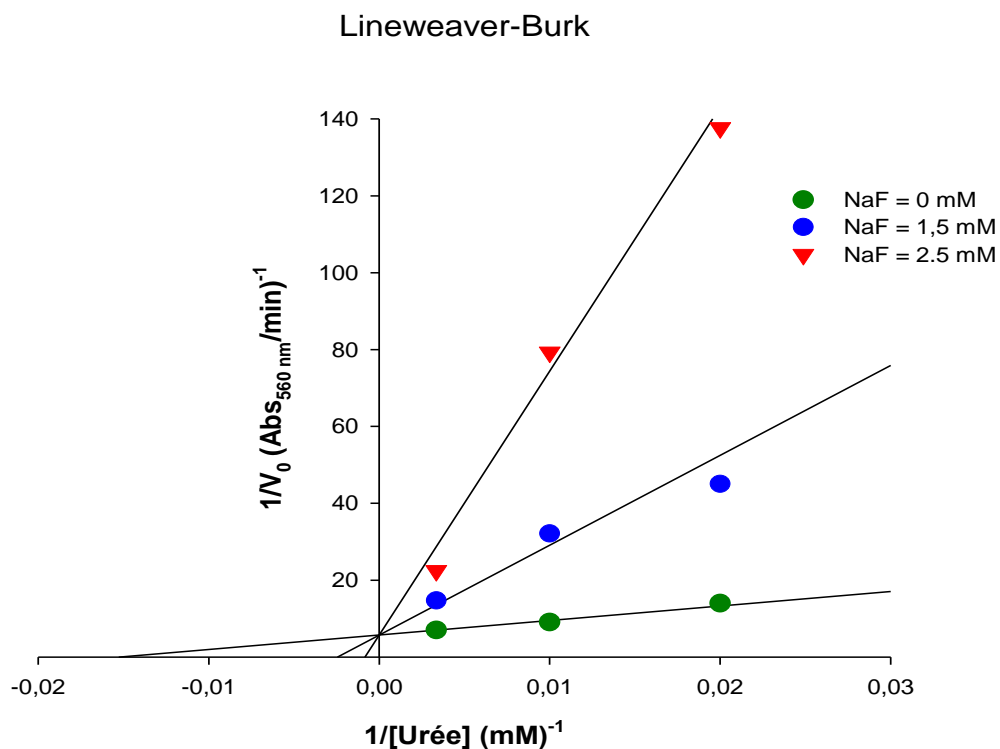


Figure 16: Le graphe de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitif de l'activité enzymatique de l'urease de soja (Glycine max) sur l'uree par le NaF. . Concentrations de le NaF sont: 0 (●), 1.5 (●), et 2,5(▼) mM. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais ±ES.

L'inhibition compétitive de l'urease par le NaF observée dans notre étude, est en accord avec les résultats trouvés pour l'urease de Jack bean par Dixon et *al.*, (1979) et pour d'autres ureases obtenues à partir de différentes sources (Kumar et Kayastha., 2010; Saboury et Moosavi., 1997).

Le NaF est un inhibiteur compétitive se fixe sur la forme libre de l'enzyme non pas sur le complexe enzyme-substrat, la fixation d'un inhibiteur (I) sur l'enzyme (E) aboutit à la formation d'un complexe binaire (EI) . La représentation de Michaelis-Menten montre que la Vmax n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteur, alors que la (Km) augmente.

La présence de cet effecteur rend donc l'enzyme moins afffin pour son substrat. Pour que la Vmax soit atteinte, il faut augmenter la quantité de substrat (S) dans le milieu. La présence d'inhibiteur représenté en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk.

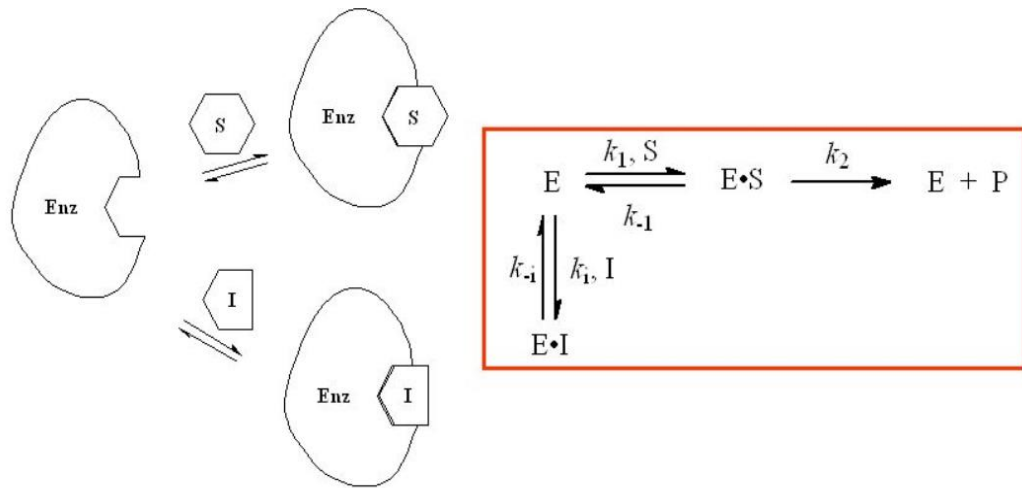


Figure 17: Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitif (Barkat, 2010).

Conclusion et perspective

Ce travail nous a permis de conclure que le soja est une source excellent d'uréase et que cette enzyme est soluble et par conséquent son extraction était facile à l'aide un protocole simple à mettre en œuvre qui donne un rendement d'activité remarquable.

L'extrait brut d'uréase est capable d'hydrolyser l'urée avec une affinité plus ou moins élevée. Les valeurs des paramètres cinétiques de l'enzyme sont influencées d'une part par la source de l'obtention d'enzyme et par les conditions physicochimiques de la mesure de l'activité.

Les résultats de la cinétique d'hydrolyse de l'urée suivent parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten.

L'uréase est inhibée fortement par le fluorure de sodium et son activité catalytique diminue par moitié en présence du NaF à 0.4 mM.

L'étude cinétique de l'inhibition de l'uréase par le NaF montre que ce dernier est un inhibiteur compétitif, c'est-à-dire qu'il empêche la fixation de l'urée sur le site de reconnaissance de l'urée.

Le NaF peut être donc utilisé comme inhibiteur de la croissance des bactéries ureolytiques comme *Hélécobacter pylori* dans le traitement de l'ulcère.

A fin de compléter cette étude, il serait envisageable de purifier l'enzyme et de tester l'effet inhibiteur de quelques plantes médicinales.

Références bibliographique

1. Amrane, N., & Tahra, H. (2020). Effet du stress cadmique sur les paramètres morpho métriques du soja (*Glycine max L.*).
2. Arkoun, M. (2012). Etude de la nutrition uréique et ammoniacale chez le colza (*Brassicinapus L.*) et développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification (Doctoral dissertation, Université de Caen Basse Normandie).
3. Barboza-Silva, E., Castro, A. C. D., & Marquis, R. E. (2005). Mechanisms of inhibition by fluoride of ureaseactivities of cell suspensions and biofilms of *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomycesnaeslundii* and of dental plaque. *Oral microbiology and immunology*, 20(6), 323-332.
4. Britannica, E. (1993). *Encyclopædiabritannica*.
5. Cesarea, S. D., & Langton, S. R. (1992). Kinetic properties of *Helicobacter pylori* urease compared with jack bean urease. *FEMS microbiology letters*, 99(1), 15-21.
6. Dixon, Nicholas E., Robert L. Blakeley, and Burth Zerner. "Jack bean urease (EC 3.5.1.5). III. The involvement of active-site nickel ion in inhibition by β -mercaptoethanol, phosphoramidate, and fluoride. "Canadian journal of biochemistry,58(6), 481-488.
7. Gallaud, J. (2012). Etude des réseaux d'interactions protéiques impliqués dans le trafic du nickel et de l'ammoniac et de leurs rôles dans la virulence chez *Helicobacter pylori* (Doctoral dissertation, Université Paris Diderot Paris 7).
8. GHALEM, M. (2010). Contribution à l'étude du développement de la culture du soja: Effets du sol et de l'inoculation, rendement et caractérisation des bactéries associées (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
9. Gouzi, H., Leboukh, M., &Bouchouka, E. (2013). Antioxidant and antiradicalproperties of methanolicextractsfrom Algerian wildedibledeserttruffles (*Terfezia* and *Tirmania*, *Ascomycetes*). *International Journal of MedicinalMushrooms*, 15(5).
10. Hubert, J. (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja: étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines (Doctoral dissertation).
11. Joubrel, G. Le soja, au cœur de la diversification et de l'équilibre alimentaire.

12. Kappaun, K., Piovesan, A. R., Carlini, C. R., & Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties—A review. *Journal of advanced research*, 13, 3-17.
13. Krajewska, B. (2018). Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 59-67.
14. Krajewska, B., van Eldik, R., & Brindell, M. (2012). Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of jack bean urease. Implications for the catalytic mechanism. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(7), 1123-1134.
15. Kumar, S., & Kayastha, A. M. (2010). Inhibition studies of soybean (*Glycine max*) urease with heavy metals, sodium salts of mineral acids, boric acid, and boronic acids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(5), 646-652.
16. L'INOCULATION, F. A. U. E. A., DE, S. L. D. P. E., LES, P. D., & DE WALUNGU, T. D. K. M. E. Année Académique: 2010–2011.
17. Lacombe, J., Herblot, S., Rojas-Sutterlin, S., Haman, A., Barakat, S., Iscove, N. N., ... & Hoang, T. (2010). Scf regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(4), 792-803.
18. Merigout, P. (2006). Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturaux. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté (Doctoral dissertation, INAPG (AgroParisTech)).
19. Mora, D., & Arioli, S. (2014). Microbial urease in health and disease. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004472.
20. Pratama, G. B. S., Yasuhara, H., Kinoshita, N., & Putra, H. (2021). Application of soybean powder as urease enzyme replacement on EICP method for soil improvement technique. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 622, No. 1, p. 012035). IOP Publishing.
21. Pro, D. (2011). Développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification à des fins phytosanitaires (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes).
22. Ramakrishna, G., Kaur, Nigam, D., Chaduvula, P. K., Yadav, S., Talukdar, A., & Gaikwad, K. (2018). Genome-wide identification and characterization of inDels and

- SNPs in Glycine max and Glycine soja for constrasting seed permeability traits. *BMC plant biology*, 18(1), 1-15.
23. Real-Guerra, R., Stanisçuaski, F., &Carlini, C. R. (2013). Soybeanurease: over a hundredyears of knowledge. In *A Comprehensive Survey of International SoybeanResearch-Genetics, Physiology, Agronomy and NitrogenRelationships*. IntechOpen.
24. Romeida, A., Pujiwati, H., &Herawati, R. (2021, June). The Induction of Callus in Four Diverse Black Soybeans (*Glycine soja* Sieb. &Zucc) withVariousCombinations of Cytokinins and 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. In *International Seminar on Promoting Local Resources for Sustainable Agriculture and Development (ISPLRSAD 2020)* (pp. 557-562). Atlantis Press.
25. Saboury, A. A., &Moosavi-Movahedi, A. A. (1997). A simple novelmethod for studying the combinedinhibitoryeffects of ethylurea and N, N-dimethylurea on jack beanurease. *Journal of enzyme inhibition*, 11(3), 217-222.
26. Saeed, A., Rehman, S. U., Channar, P. A., Larik, F. A., Abbas, Q., Hassan, M., ... &Seo, S. Y. (2017). Long chain 1-acyl-3-arylthioureas as jack bean urease inhibitors, synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 77, 54-63.
27. Sebbane, F. (2002). Caractérisation génétique du locus uréase de *Yersinia pestis* et *Yersinia pseudo tuber culosis* (Doctoral dissertation, Lille 1).
28. Sirko, A., &Brodzik, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta BiochimicaPolonica*, 47(4), 1189-1195.
29. Sujoy, B., & Aparna, A. (2013). Potential clinical significance of urease enzyme. *European Scientific Journal*, 9(21).
30. Svane, S., Sigurdarson, J. J., Finkenwirth, F., Eitinger, T., &Karring, H. (2020). Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific reports*, 10(1), 1-14. Guide, S. (2018). CROP
31. Upadhyay, Lata Sheo Bachan. "Urease inhibitors: A review". (2012).

Web graphies

<https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-1-4614-1533-6>

Résumé

Le but de ce travail est d'étudier l'effet inhibiteur du fluorure de sodium sur l'uréase du soja (*Glycine max* L.). L'uréase a été extraite à partir des graines de cette plante selon un protocole simple qui donne une activité uréasique plus ou moins élevée. L'activité uréase déterminée à pH 6.8 (tampon Tris-HCl 0.05 M ; 30°C) par méthode colorimétrique à l'aide du rouge du phénol (0.05%) en utilisant un spectrophotométrie réglé à 560 nm en présence de différentes concentration d'urée montre que l'enzyme suit une cinétique michaelienne et les valeurs de K_m et V_{max} ainsi calculée sont respectivement: 9.6 mM et 0.24 Abs_{560nm}/min. Le NaF est un inhibiteur puissant de l'uréase et il est capable de réduire l'activité enzymatique à 50% à 0.4 mM (pH 6.8, 30°C). Le NaF est un inhibiteur compétitif de l'uréase et provoque une augmentation du K_m sans changement de la vitesse maximale.

Mots clés : Soja, Glycine max, Uréase, Extraction, Cinétique, Inhibition, NaF, Mécanisme.

Abstract

The aim of this study is to determination the inhibitory effect of sodium fluoride on the urease of soy (*Glycine max.L.*). uréase was extracted from the seeds of this plant according to a simple protocol which gives a higher or lower uréase activity. The uréase activity determined at pH 6.8 (Tris-HCl buffer 0.05 M; 30°C) by colorimetric method using phenol red (0.05%) using spectrophotometry set at 560 nm in the presence of urea concentrations shows that the enzyme follows a michaelian kinitics and the values of K_m and V_{max} thus calculated are respectively: 9.6 mM and 0.24 Abs_{560nm}/min.

NaF was a potent urease inhibitor and is capable of reducing enzyme activity to 50% at 0.4 mM (pH 6.8, 30°C). NaF is a competitive uréase inhibitor and causes an increase in K_m with no change in maximum velocity.

Keywords: Soybean, Glycine max, Urease, Extraction, Kinetics, Inhibition, NaF, Mechanism.

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثير التثبيطي لفلوريد الصوديوم على إنزيم يوريا فول الصويا (*Glycine max* L.). تم استخلاص اليورياز من بذور هذا النبات وفقا لبروتوكول بسيط يعطي اكبر أو اقل لليوريا. تم تحديد نشاط اليورياز عند درجة حموضة 6.8 (Tris-HCl 0.05 مولار) و درجة حرارة 30 درجة بطريقة قياس اللونية باستخدام الفينول الأحمر 0.05% باستعمال مقياس الطيف الضوئي المحدد عند 560 نانو متر في وجود تراكيز مختلفة لليوريا يوضح إن الإنزيم يتبع حركية ميكائيليان و بالتالي يتم حساب قيم K_m و V_{max} على التوالي: 9.6 ميلمولار و 0.24 Abs_{560nm} / min.

NaF هو مثبط قوي لليوريا و هو قادر على تقليل نشاط الإنزيم إلى 50% عند 0.4 ملليمولار عند (درجة حموضة 6.8 ، درجة حرارة 30 درجة مئوية). NaF هو أحد مثبطات اليورياز التنافسي ويسبب زيادة في K_m دون تغيير في السرعة القصوى.

الكلمات المفتاحية: فول الصويا ، الجلوسين ماكس ، اليوريا ، الاستخلاص ، الخواص الحركية ، التثبيط ، نافا ، آلية.

