

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER

Filière : Science biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par : M^{elle} BELLAOUI Batoun
M^{elle} BENSELMA Souhila

Thème

Analyse in silico de glucoamylase
de Pseudomonas fragi

Soutenu publiquement, le 12/06/2024, devant le jury composé de :

M. BOURAS Nouredine	Professeur	Univ. Ghardaïa	Président
M. BAKLI Mahfoud	Maître de conférences A	Univ. Ghardaïa	Directeur de mémoire
M. BENBEKHTI Zineddine	Maître assistant A	Univ. Ghardaïa	Examineur

Année universitaire : 2023 2024

Remerciements

*En premier lieu, nous exprimons notre gratitude envers **ALLAH** pour nous avoir accompagnées dans notre cheminement et pour nous avoir aidées à atteindre cette étape.*

*Nous saisissons cette occasion pour adresser nos remerciements les plus profonds à notre encadreur **M. BAKLI Mahfoud** pour tout le soutien et l'encadrement qu'il nous a donné.*

*Nous souhaitons également remercier les membres du jury **M. BOURAS Noureddine** et **M. BENBEKHTI Zineddine** et d'avoir accepté d'évaluer notre travail.*

Nous remercions le corps enseignant administratif de la faculté des sciences de la nature de la vie et science de la terre,

Enfin, nous tenons à remercier chaleureusement tous nos collègues et toutes les personnes qui nous ont prodigué conseils, assistance et encouragements pour compléter notre mémoire de fin d'études en Master microbiologie appliquée.

Dédicace

*En premier, je remercie **ALLAH**, le tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour la réalisation de ce travail.*

*Je dédie ce travail, À **mes chers parents** pour leur soutien, leur patience, leur encouragement durant mon parcours scolaire.*

*À **mes sœurs et mon frère** ainsi à toute **ma famille**.*

*À tous **mes amis**.*

*À mon cher binôme **Souhila***

*Et à l'ensemble des **étudiants** de la promotion **MASTER** microbiologie appliquée de l'année 2023_2024.*

À tous ceux qui ont contribué à ce travail.

M^{elle}. Batoun

Dédicace

MON DIEU... La nuit n'est bonne que grâce à votre gratitude, la journée n'est bonne que grâce à votre obéissance, et les moments ne sont pas mauvais uniquement à cause de votre souvenir, et l'au-delà n'est bon que grâce à votre pardon, et le paradis n'est bon que grâce à votre vision... MON DIEU.

À celui qui a transmis le message, rempli la confiance et conseillé la nation, au Prophète de la Miséricorde et de la Lumière des Mondes, au Maître de la Création et à notre honorable Messenger Muhammad, que Dieu le bénisse et lui accorde la paix, et à ceux qui le suivent dans la justice jusqu'au jour du jugement.

Pour moi, très ambitieux, je pensais que je ne pouvais pas, mais celui qui a dit que j'étais à elle l'a eu.

*À l'être cher dont je porte fièrement le nom, mon nom est chanté haut dans le ciel portant l'honneur de ton titre et en toute fierté je suis pour cet homme la fille de celui qui m'a pris la main pour achever mon chemin de la récolte des épines. Sur mon chemin, mon côté ferme et la source de ma force... **mon cher père.***

*À celle à qui Dieu a mis le paradis sous ses pieds, dont le cœur m'a embrassé entre ses mains et m'a facilité l'adversité par ses prières, au cœur compatissant et à la bougie qui était pour moi dans les nuits obscures... **ma chère mère.***

*À ceux qui sont ravis de ma réussite, et à ceux qui ont été une aide et un soutien sur ce chemin : **mes chères sœurs**, mon honorable famille, mes amis et compagnons au fil des années, et ceux qui sont dans l'adversité et les crises.*

À mon cher binôme Batoun.

Et à l'ensemble des étudiants de la promotion MASTER 2 Microbiologie appliquée de l'année 2023_2024.

M^{elle} Souhila

Résumé :

Glucoamylase (E.C. 3.2.1.3) sont des enzymes capables d'hydrolyser à la fois les liaisons α -1,4 et α -1,6-glucosidiques, produisant des monomères de glucose, des disaccharides de maltose et des oligosaccharides. Ces enzymes possèdent le potentiel de libérer du glucose comme produit final principal pour diverses applications dans les industries alimentaires et des boissons. La structure de la glucoamylase, conservée à travers les espèces, lui permet d'hydrolyser l'amidon traité et non traité en β -D-glucose, lui conférant une importance industrielle mondiale. Néanmoins, les glucoamylase provenant de souches bactériennes sont les moins étudiées par rapport à celles provenant de souches fongiques. Dans cette étude, diverses analyses physico-chimiques, une analyse de la structure secondaire, des propriétés structurales incluant la modélisation par homologie, le raffinement et la validation de la qualité du modèle, ainsi que des analyses fonctionnelles de la glucoamylase de la bactérie *Pseudomonas fragi* ont été réalisées à l'aide de plusieurs outils de bioinformatique. Cette analyse est la première étude *in silico* à explorer les propriétés structurales et fonctionnelles de cette enzyme chez *P. fragi*, ce qui pourrait améliorer sa production et son utilisation dans divers secteurs industriels.

Mots clés :

Glucoamylase, *Pseudomonas fragi*, outils de bioinformatique, modélisation par homologie, analyses fonctionnelles.

Abstract:

Glucoamylase (E.C. 3.2.1.3) are enzymes capable of hydrolyzing both α -1, 4 and α -1, 6-glycosidic linkages, producing glucose monomers, maltose disaccharides, and oligosaccharides. These enzymes possess the potential to release glucose as a primary end product for various applications in the food and beverage industries. The structure of glucoamylase, conserved across species, allows it to hydrolyze processed and unprocessed starch to β -D-glucose, giving it global industrial importance. However, glucoamylase from bacterial strains are the least studied compared to those from fungal strains. In this study, various physicochemical analyses, analysis of secondary structure, structural properties including homology modeling, refinement and validation of model quality, as well as functional analyzes of glucoamylase from the bacterium *Pseudomonas fragi* were carried out using several bioinformatics tools. This analysis is the first *in silico* study to explore the structural and functional properties of this enzyme in *P. fragi*, which could improve its production and use in various industrial sectors.

Key words:

Glucoamylase, *Pseudomonas fragi*, bioinformatics tools, homology modeling, functional analyses.

الملخص:

الجلوكوأميلاز (EC 3.2.1.3) عبارة عن إنزيمات قادرة على التحلل المائي لكل من الروابط α -1,4 و- α -1,6 الغلوكوزيدية ، وإنتاج جزيئات الجلوكوز الاحادية ، وثنائيات السكاريد المالتوز، والسكريات قليلة التعدد. تمتلك هذه الإنزيمات القدرة على إطلاق الجلوكوز كمنتج نهائي أساسي لمختلف التطبيقات في صناعات الأغذية والمشروبات. تسمح بنية الجلوكوأميلاز، المحفوظة عبر الأنواع، بتحلل النشا المعالج وغير المعالج إلبالجلوكوز β -D ، مما يمنحه أهمية صناعية عالمية. ومع ذلك، فإن الجلوكوأميلاز الناتجة عن السلالات البكتيرية هي الأقل دراسة مقارنة بتلك الموجودة في السلالات الفطرية. في هذه الدراسة، تم إجراء العديد من التحليلات الفيزيائية والكيميائية، وتحليل البنية الثانوية، والخصائص الهيكلية بما في ذلك نمذجة التماثل، والتحسين والتحقق من جودة النموذج، بالإضافة إلى التحليلات الوظيفية للجلوكوأميلاز من بكتيريا *Pseudomonas fragi* باستخدام العديد من أدوات المعلوماتية الحيوية. يعد هذا التحليل هو الأول من نوعه في دراسة *in silico* لاستكشاف الخصائص الهيكلية والوظيفية لهذا الإنزيم في *P. Fragi*، والتي يمكن أن تحسن إنتاجه واستخدامه في مختلف القطاعات الصناعية.

الكلمات المفتاحية :

الجلوكوأميلاز ، *Pseudomonas fragi*، أدوات المعلوماتية الحيوية، نمذجة التماثل، التحليلات الوظيفية.

Tableau des matières

Liste des abreviation	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux.....	III
Introduction.....	1
1.Glucoamylase.....	2
1.1.Définition.....	2
1.2.Classification de glucoamylase	2
1.3.Propriétés structural de glucoamylase	3
1.3.1.Glucoamylase fongique	3
1.3.2.Glucoamylase de levure.....	4
1.4.Biotechnologie de la glucoamylase	4
1.4.1.Production d'amidon et gestion des déchets alimentaires.....	6
1.4.2.Production de sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS)	6
1.4.3.Production de bioéthanol	6
1.4.4.Aide digestive.....	6
1.4.5.Production de bioplastique.....	7
2. <i>Pseudomonas fragi</i>	7
2.1.Historique	7
2.2.Définition.....	7
2.3.Isolement et caractérisation de <i>Pseudomonas fragi</i>	8
2.4.Morphologie de <i>Pseudomonas fragi</i>	9
2.5.Ecologie et pathogenicité de <i>Pseudomonas fragi</i>	10
2.6.Effets des enzymes bactériennes sur les aliments	10
Matériel et Méthodes.....	
1.Récupération de la séquence protéique requête :	12
2.Analyse de propriétés physico-chimiques.....	12
3.Localisation subcellulaire	13
4.Prédiction de signal peptide.....	13
5.Prédiction de structure secondaire	13
6.Analyse de la structure tertiaire	13
6.1.Prédiction de la structure tertiaire.....	13
6.2.Raffinement	14
6.3.Validation	14
7.Analyse fonctionnelle.....	14
7.1.Recherche de motifs protéique	14
7.2.Analyse du site actif.....	15
Résultats et discussion.....	
1.Récupération de séquence protéique.....	16
2.Analyse de propriétés physico-chimiques.....	16
3.Localisation subcellulaire	17
4.Prédiction de signal peptide.....	18

5.Prédiction de la structure secondaire	19
6.Analyse de la structure tertiaire	21
6.1.Prédiction de la structure tertiaire.....	21
6.2.Raffinement	21
6.3.Validation	22
7.Analyse fonctionnelle.....	24
7.1.Recherche de motif protéique.....	24
7.2.Analyse du site actif.....	25
Conclusion et perspectives	26
Références Bibliographiques	27

Liste des abréviations

GA : glucoamylase

CAZy : Carbohydrate Active Enzyme (Enzymes actives glucidiques)

GH : glucoside hydrolase

DC : domaine catalytique

RMN : résonance magnétique nucléaire

NCBI: National Center for Biotechnology Information

GRAVY: Grand Average of Hydropathy

AI: Aliphatic index

PI : Point isoélectrique

CE : Coefficient d'extinction

II: Instability index

SOPMA: Self Optimized Prediction Method with Alignment

PPI: Interaction Proteine-Proteine

Aa: acide amine

PDB: Protéine Data Bank

3D: tridimensionnelle

°C: Degré Celsius

FSAL : flavonoïde dans sedum aizoon L

PH : Potentiel hydrogène

CELLO: Subcellular Localization Predictor

Da: Dalton

Glu: glutamine

Arg: arginine

Lys: lysine

Asp: aspartate

Liste des figures

Figure 01 :Différentes unités trouve dans la glucoamylase de différentes espèces	3
Figure 02 :Schéma montrant différentes applications des Glucoamylase	5
Figure 03 :Processus d'hydrolyse de l'amidon et utilisations biotechnologiques du glucose produit.....	5
Figure 04 :Effet du FSAL sur la formation de biofilm de <i>P.fragi</i>	8
Figure05 : Nombre de cellules des pathogènes <i>Listeria monocytogenes</i> (A) et <i>Compylobacter jejuni</i> (B) dans le biofilm préformé de <i>Pseudomonas fragi</i> – pathogène.	9
Figure06 :Identification morphologique et biologique moléculaire de <i>Pseudomonas fragi</i> D12.	10
Figure07 :Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la glucoamylase de <i>P.fragi</i>	18
Figure08 :Analyse de prédiction de signal peptide de la glucoamylase de <i>P. fragi</i>	18
Figure09 :Résultats de la prédiction de la structure secondaire de la glucoamylase de <i>P. fragi</i> par le serveur PSIPRED 4.0.	20
Figure10 :Structure 3D prédite de la glucoamylase de <i>P. fragi</i> produite par SWISS-MODEL	22
Figure11 :diagramme Ramachandran du model initial de glucoamylase de <i>P. fragi</i> de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).....	23
Figure12 :diagramme Ramachandran du model raffiné de glucoamylase de <i>P. fragi</i> de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).....	23
Figure13 :Résultat du MOTIF finder montrant le motif fonctionnel de la glucoamylase de <i>P. fragi</i>	24
Figure14 :Site actif de la glucoamylase de <i>P. fragi</i> avec son ligand. Prédit par COFACTOR et visualisé par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.5.4.....	25

Liste des tableaux

Tableau 01 :Les propriétés de la séquence récupère de la glucoamylase de <i>P. fragi</i>	16
Tableau 02 :Lacaractérisation de la séquence protéique de glucoamylase de <i>P. fragi</i>	16
Tableau 03 :La prédiction de la structure secondaire de glucoamylase de <i>P. fragi</i> par SOPMA.....	19
Tableau 04 :La prédiction de la structure tertiaire de glucoamylase de <i>P. fragi</i> par SWISS-MODEL	21
Tableau 05 :La validation de la prédiction de structure tertiaire initiale et raffinée de <i>P. fragi</i> par le diagramme de Ramachandran.	24

Introduction

Introduction

Introduction

Les enzymes sont des biocatalyseurs dans les réactions métaboliques. Les micro-organismes constituent une source majeure d'enzymes car ils peuvent se développer en grande quantité en peu de temps et leurs cellules bactériennes peuvent être génétiquement manipulées pour augmenter la production d'enzymes. De plus, les enzymes microbiennes ont attiré plus d'attention que les enzymes végétales et animales en raison de leur activité et de leur stabilité (Anbu *et al.*, 2017). Parmi ces enzymes, les amylases jouent un rôle crucial dans la dégradation enzymatique de l'amidon. Elles sont divisées en trois catégories : l'alpha-amylase, la bêta-amylase et la gamma-amylase, ainsi que la glucoamylase (Farooq *et al.*, 2021).

La glucoamylase (GA) (1,4- α -D-glucane glucohydrolase) catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1,4- et α -1,6-glucosidiques pour produire du β -D-glucose (Sauer *et al.*, 2000). Les GA étaient attribués comme EC 3.2.1.3 par la Commission des Enzymes. Ces enzymes appartiennent aux familles de glycosides hydrolase GH15 et GH97 (Wayllace *et al.*, 2023).

La glucoamylase est utilisée dans la biotechnologie de nombreuses applications industrielles et de bioéthanol (production d'amidon et gestion des déchets alimentaires, production de sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS), production de bioéthanol, aide digestive et la production de bioplastique) (Marín-Navarro and Polaina, 2011). De plus, l'alpha-amylase est largement utilisée dans les industries agroalimentaires (Rharrabe *et al.*, 2018).

Les *Pseudomonas* sont des bactéries que l'on rencontre communément dans l'eau, dans les sols et, en particulier au niveau des rhizosphères. *Pseudomonas fragi* est un psychrophile aérobie à Gram négatif, en forme de bâtonnet. Il est largement distribué dans la nature et communément associé à la détérioration de la viande et des produits laitiers (Awolope *et al.*, 2021).

Cependant, lorsque les structures tridimensionnelles de certaines protéines ne sont pas disponibles, l'analyse bioinformatique et la modélisation protéique à partir de la séquence primaire représentent des méthodes efficaces pour étudier les aspects structurels et fonctionnels des protéines d'intérêt (Bakli *et al.*, 2020). Dans cette étude, une analyse *in silico* a été utilisée pour prédire les paramètres physicochimiques, la structure secondaire et tertiaire de la glucoamylase, sa localisation subcellulaire, et l'analyse fonctionnelle, y compris la recherche des motifs fonctionnels ainsi que le site actif de cette enzyme glucoamylase de *P. fragi*.

Revue bibliographique

1. Glucoamylase

1.1. Définition

Glucoamylase (GA), également connue sous le nom d'amyloglucosidase ou alpha-1,4-glucosidase, est une hydrolase catalytique qui hydrolyse les liaisons alpha-1,4-glucosidiques dans l'amidon et les oligosaccharides associés, libérant des unités de glucose. GA présente également une activité alpha-1,6-glucosidase, bien que son rapport soit nettement inférieur à celui de l'activité alpha-1,4-glucosidase. L'activité alpha-1,6-glucosidase permet à GA d'agir sur les points de ramification de l'amidon, provoquant l'hydrolyse des polysaccharides en fonction de la réaction spécifique qu'elle catalyse. GA est désignée selon la classification des enzymes par le code EC 3.2.1.3 (Wayllace *et al.*, 2023).

La principale application commerciale de l'enzyme glucoamylase est la production de sirops à haute teneur en glucose à partir d'amidon. Cette enzyme est généralement de nature acide et sensible à la température. Il est utilisé pour la saccharification des dextrines en sirops riches en glucose dans l'industrie (Xia *et al.*, 2021).

1.2. Classification de glucoamylase

Les GA sont largement distribués dans la nature et sont produits par divers organismes, principalement des bactéries, des champignons et les levures jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides et la production d'énergie (Wayllace *et al.*, 2023). Structurellement, elles sont classées dans la famille GH15 (Glycosides Hydrolases 15) et caractérisées par la présence invariable d'un domaine catalytique avec (α/α) 6 fois, souvent lié à un domaine non catalytique domaine d'origine et de fonction diverses. La classification de la famille des enzymes actives sur les glucides (CAZymes) et l'annotation des modules constitutifs des séquences primaires sont désormais principalement utilisées pour analyser, comprendre et comparer la capacité d'un organisme à assembler et à hydrolyser des glucides complexes (Drula *et al.*, 2022).

Selon la base de données Carbohydrate Active Enzymes (CAZy) (<http://www.cazy.org>), les glucoamylase appartiennent aux familles GH15 et GH97. En général, les membres de chaque famille GH partagent des caractéristiques communes et les résidus clés impliqués dans la catalyse et la stabilité structurelle sont conservés au sein de chaque famille (Wu and Xia, 2023).

1.3. Propriétés structural de glucoamylase

La structure tridimensionnelle de la glucoamylase de différentes sources : les champignons filamenteux, les levures et les bactéries ont été identifiées. Elle présente un élément essentiel commun : un domaine catalytique, souvent lié à un domaine non catalytique d'origine et de fonction variables. Les différents types structuraux de glucoamylase qui ont été caractérisés sont schématisés sur la figure 01 (Marín-Navarro and Polaina, 2011).

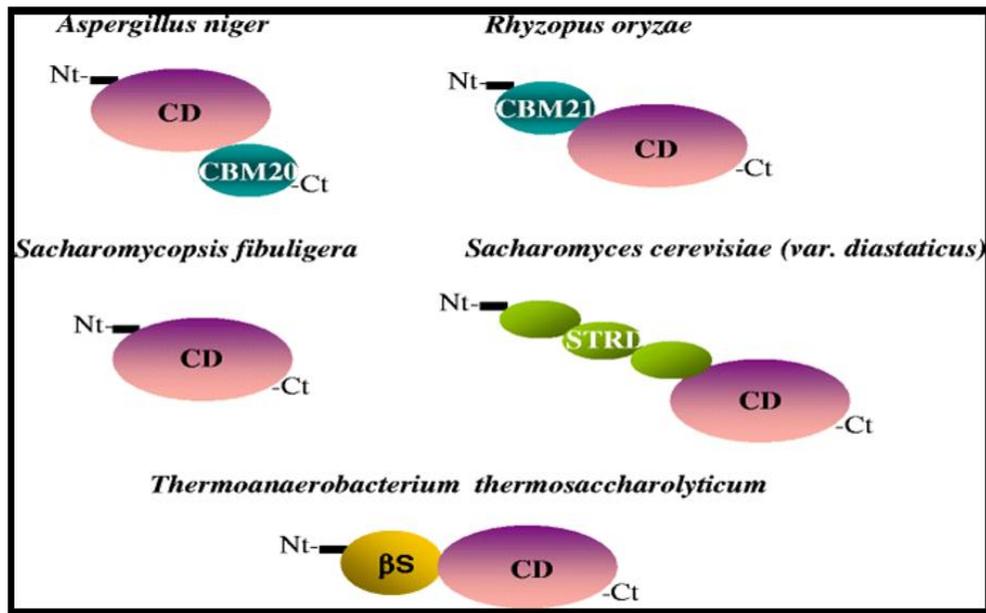


Figure 01 : Différentes unités trouve dans la glucoamylase de différentes espèces (Marín-Navarro and Polaina, 2011).

1.3.1. Glucoamylase fongique

Aspergillus niger

Selon l'analyse de la séquence des acides aminés, la glucoamylase GA possède deux domaines fonctionnels : un domaine catalytique amino-terminal de 471 acides aminés et un domaine carboxy-terminal de 115 acides aminés, qui a la capacité de se lier à l'amidon (Marín-Navarro and Polaina, 2011).

Rhizopus oryzae

Ce type possède un domaine de liaison à l'amidon classé dans la famille CBM21 (Classification de CAZy) en position amino-terminale, lié au domaine catalytique via un site glycosyle, tel que déterminé par spectroscopie RMN (Marín-Navarro and Polaina, 2011). La structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'amidon de la protéine glucoamylase de *Rhizopus oryzae* complexée à l'isomaltrose. a été obtenue auprès de la banque de données sur les protéines (PDB) avec le code d'identification (4BFO) (Khedr *et al.*, 2024).

1.3.2. Glucoamylase de levure

La structure unique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* GA est un cas intéressant dans la famille de GA GH15, Il s'agit d'une GA qui présente la CD classique des GA fongiques, mais qui possède également un domaine N-terminal attaché à une structure inconnue, riche en acides aminés sérine. La modélisation de ce domaine N-terminal a été tentée à l'aide de divers serveurs ou méthodes de calcul. Toutefois, les modèles protéiques obtenus ont démontré une qualité médiocre, ce qui suggère que la prédiction précise de sa structure est difficile (Wayllace *et al.* 2023).

1.4. Biotechnologie de la glucoamylase

La glucoamylase est l'un des types de produits industriels les plus importants enzymes produites suite à son utilisation, un acide aminé à chaîne latérale ramifiée est un acide aminé dont la chaîne latérale est un groupe alpha-bêta ramifié. La leucine, l'isoleucine et la valine sont les trois acides aminés ramifiés protogènes. La glucoamylase produit des sucres solubles lors de la saccharification de l'amidon et est largement utilisée dans de nombreux aliments Production industrielle et de bioéthanol (Marín-Navarro and Polaina, 2011). Diverses les applications biotechnologies GA sont résumées dans la figure 02.

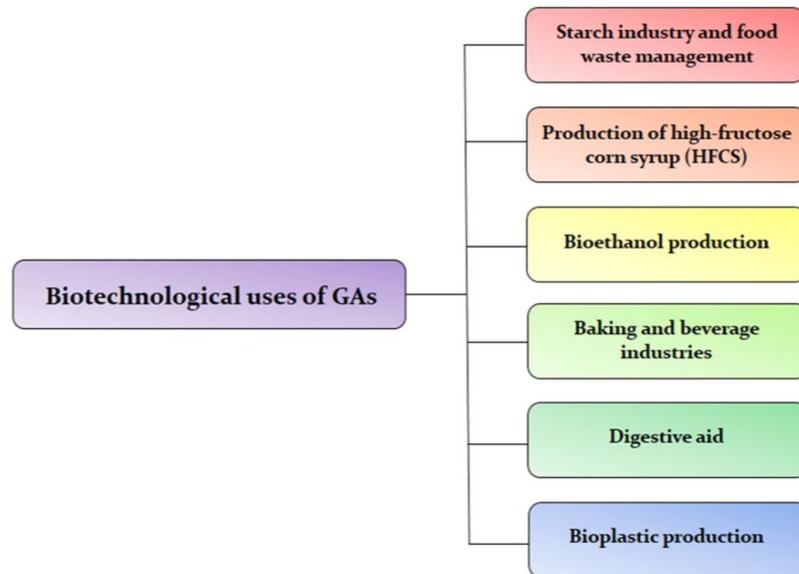


Figure 02 :Schéma montrant différentes applications des Glucoamylase(Wayllace *et al.*, 2023).

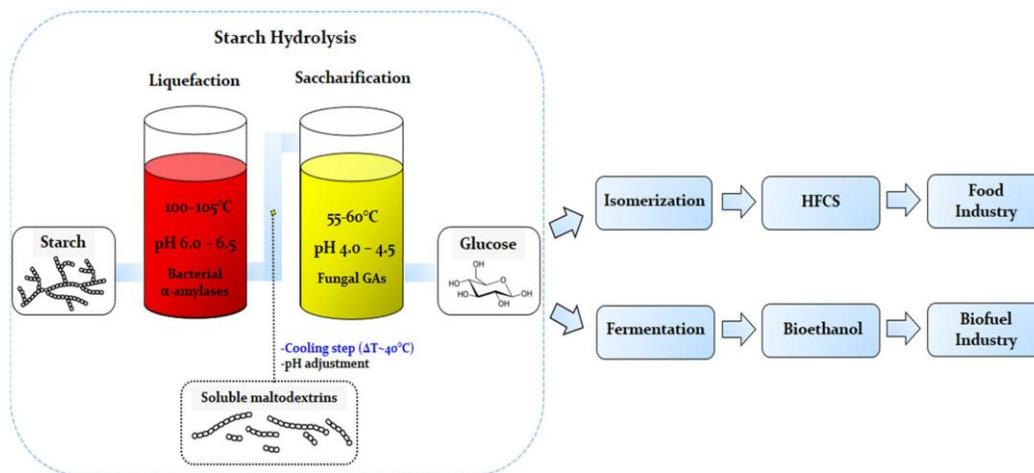


Figure 03 : Processus d'hydrolyse de l'amidon et utilisations biotechnologiques du glucose produit (Wayllace *et al.*, 2023).

Le processus d'hydrolyse de l'amidon est marqué en pointillés, avec l'étape de liquéfaction en rouge et l'étape de saccharification en jaune. Entre liquéfaction et saccharification une étape de refroidissement et un ajustement du pH est nécessaire. Le glucose libéré peut être isomère en fructose par la glucose isomérase pour produire des sirops de maïs à haute teneur en fructose(HFCS) pour l'industrie alimentaire ou il peut être fermenté par des levures pour obtenir bioéthanol pour l'industrie des biocarburants (voir la figure 03) (Wayllace *et al.*, 2023).

1.4.1. Production d'amidon et gestion des déchets alimentaires

L'une des utilisations les plus répandues des GA est dans l'industrie alimentaire. Les principales applications commerciales de ces enzymes se trouvent à l'industrie de l'amidon. GA catalyse la saccharification de l'amidon (et de certains oligosaccharides associés) pour produire du glucose et de la maltodextrine, utilisés dans la transformation des aliments et de nombreux processus de fermentation. Cependant, pour une hydrolyse efficace nécessaire à la production de glucose à partir de l'amidon, une synergie est nécessaire non seulement avec GA mais aussi avec d'autres amylases et la glucose isomérase (Zong *et al.*, 2022).

1.4.2. Production de sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS)

Le sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS) est une alternative commerciale au saccharose comme édulcorant dans les produits alimentaires. Différents HFCS sont fabriqués à partir de diverses concentrations de glucose et de fructose, offrant une douceur double comparée à celle du saccharose. Le HFCS est principalement produit par conversion enzymatique de l'amidon de maïs en glucose, puis par isomérisation du glucose en fructose grâce à une isomérase, ce qui permet d'obtenir une solution riche en fructose (Kognou *et al.*, 2022).

1.4.3. Production de bioéthanol

La fermentation microbienne est un processus naturel qui joue un rôle important dans la décomposition de molécules organiques complexes en petits monomères. Le bioéthanol est généralement produit par fermentation microbienne de sucres fermentescibles (tels que le glucose) en éthanol. Les matières premières traditionnelles (par exemple les matières premières de première génération) comprennent les céréales, la canne à sucre et la betterave sucrière (Tse *et al.*, 2021). La fermentation alcoolique nécessite souvent la réalisation de processus de prétraitement pour préparer la biomasse à l'extraction et à la fermentation (Bušić *et al.*, 2018).

1.4.4. Aide digestive

La digestion de l'amidon dépend d'une combinaison d'amylase pancréatique et salivaire et d'enzymes de bordure en brosse intestinale, la glucoamylase et la sucrase-isomaltase. La glucoamylase clive les molécules de glucose successives de l'extrémité non réductrice de la molécule d'amidon, ce qui est particulièrement important chez les nourrissons relativement déficients en amylase pancréatique (Lee *et al.*, 2004).

1.4.5. Production de bioplastique

Comme mentionné précédemment, les amidons font l'objet d'une attention particulière en raison de leurs propriétés respectueuses de l'environnement, de leur capacité de fonctionnalisation de surface, de leur reproductibilité, de leur abondance relative, de leur non-toxicité et de leur biodégradabilité. Dans la nature, l'amidon est l'un des polymères biodégradables les plus courants et est largement utilisé dans diverses industries, notamment la production de bioplastiques (Ogunsona *et al.*, 2018).

2. *Pseudomonas fragi*

2.1. Historique

Pseudomonas a été observé dès les débuts de l'histoire de la microbiologie en raison de sa présence répandue dans l'eau et dans les graines de plantes telles que les dicotylédones. En 1894, Migula a créé le nom du genre *Pseudomonas* pour ces organismes en des termes plutôt vagues, le définissant comme un genre de bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnet avec des flagelles polaires. Peu de temps après, *Pseudomonas* a été isolé dans de nombreuses niches écologiques naturelles et un grand nombre de noms d'espèces ont été initialement attribués au genre (Kheira, 2011).

2.2. Définition

Les bactéries Psychotropes facultatives ou *psychrophiles* sont des micro-organismes qui se développent à basse température (de 25°C à 5°C), même si ce n'est pas leur température optimale. Ces bactéries sont responsables de la détérioration des aliments réfrigérés. L'application de la réfrigération peut prolonger la durée de conservation de la viande, ralentir le taux de prolifération des micro-organismes, ainsi que les processus d'altération intrinsèques et extrinsèques, tout en préservant les propriétés sensorielles et nutritionnelles des aliments. *Pseudomonas* n'est pas très virulent et plusieurs souches sont des agents pathogènes opportunistes chez l'homme, responsables de la détérioration de la viande, du poisson et des produits laitiers (Atika *et al.*, 2023).

Revue bibliographique

Une des bactéries aérobies psychrophiles à Gram négatif est *Pseudomonas fragi*. Elle se présente sous forme de bâtonnets et est très répandue dans la nature, étant fréquemment associée à la détérioration de la viande et des produits laitiers (Awolope *et al.*, 2021).

2.3. Isolement et caractérisation de *Pseudomonas fragi*

Le genre *Pseudomonas* est le plus hétérogène et groupe écologiquement important de bactéries connues, grâce à la présence d'un complexe système enzymatique. Les besoins nutritionnels de *Pseudomonas spp.* Sont très simples, et le genre se trouve dans les habitats naturels comme le sol, l'eau douce, les environnements marins etc., mais il a également été isolé des instruments cliniques, solutions aseptiques, cosmétiques et produits médicaux (Franzetti and Scarpellini, 2007).

L'étude l'effet du FSAL sur la formation de biofilm de *P. fragi* afin de mieux appliquer le FSAL à la transformation et à la conservation des produits carnés. Le violet cristallin est un pigment alcalin. Expériences sur la quantité de formation de biofilm lorsqu'il est combiné avec du sucre et des acides nucléiques (Wang *et al.*, 2023) (Voir figure 04).

Après 24 heures d'incubation, les bactéries se sont accumulées et ont été observé. Après 48 heures, les bactéries se sont regroupées plus étroitement et reliés les uns aux autres, formant progressivement une structure multicouche. Après 72 heures de culture, les agrégats sont devenus plus compacts et connectés, il existe des agrégats bactériens évidents en groupes (Wang *et al.*, 2023).

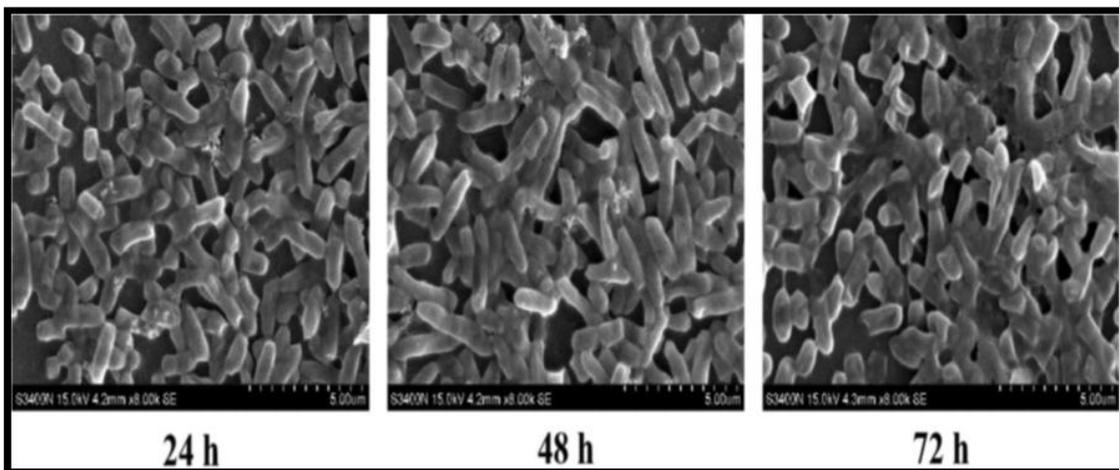


Figure 04 : Effet du FSAL sur la formation de biofilm de *P.fragi* (Wang *et al.*, 2023).

Dans une autre recherche, effets des biofilms de *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 sur *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 et *Compylobacter* spp. Jejuni NCTC 11168 a été testé dans des bouillons et des homogénats alimentaires sur acier inoxydable à 5°C et 15°C (Sterniša *et al.*, 2023).

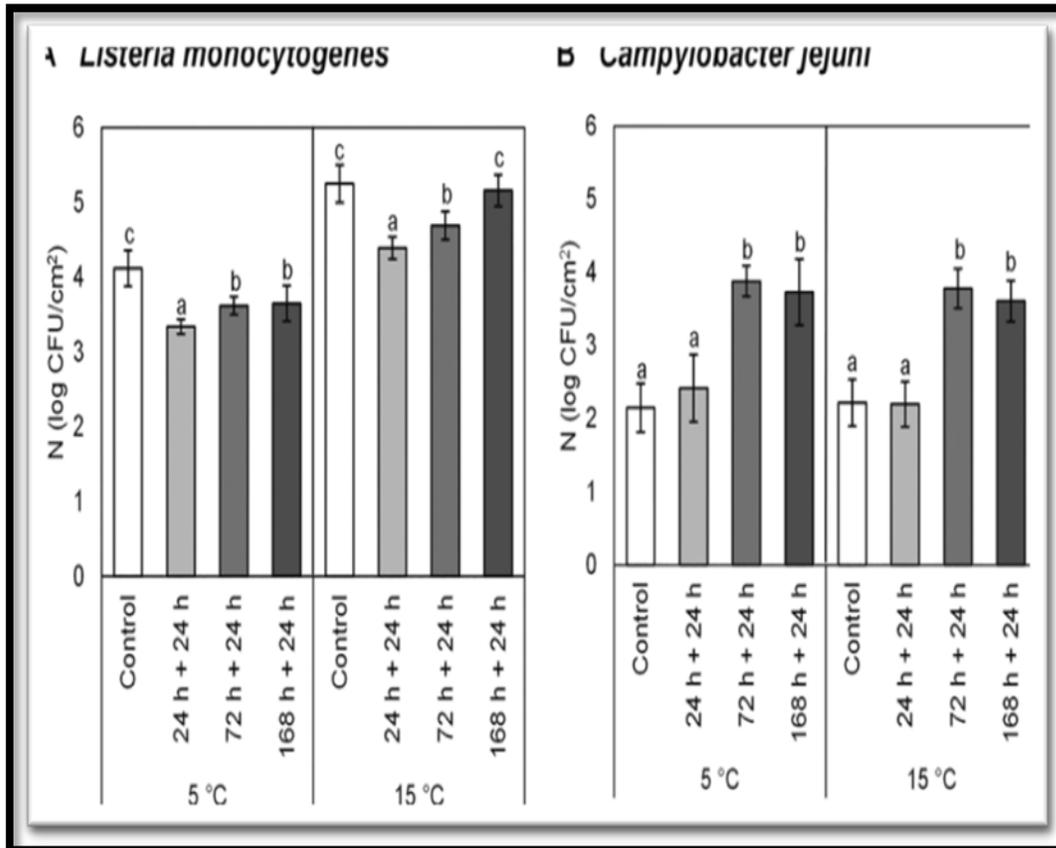


Figure 05 : Nombre de cellules des pathogènes *Listeria monocytogenes* (A) et *Compylobacter jejuni* (B) dans le biofilm préformé de *Pseudomonas fragi* – pathogène. Le biofilm de *P. fragi* s'est formé à 5 °C et 15 °C pendant 24 h, 72 h et 168 h sur des coupons en acier inoxydable. Un inoculum de *L. monocytogenes* ou *C.jejuni* a été ajouté à ce biofilm préformé pendant 24 h (Sterniša *et al.*, 2023).

2.4. Morphologie de *Pseudomonas fragi*

Dans une étude menée sur des souches de *Pseudomonas* à basse température isolées du sol, les gènes de la *p. fragi* étaient présents, des colonies blanches et opaques de *p. fragi* les cellules étaient Gram négatif, courts, en forme de bâtonnet et environ 0,5um X 2um (Bao *et al.*, 2023). L'identification morphologique et biologique moléculaire de *Pseudomonas fragi* D12 est présentée dans la figure 06.

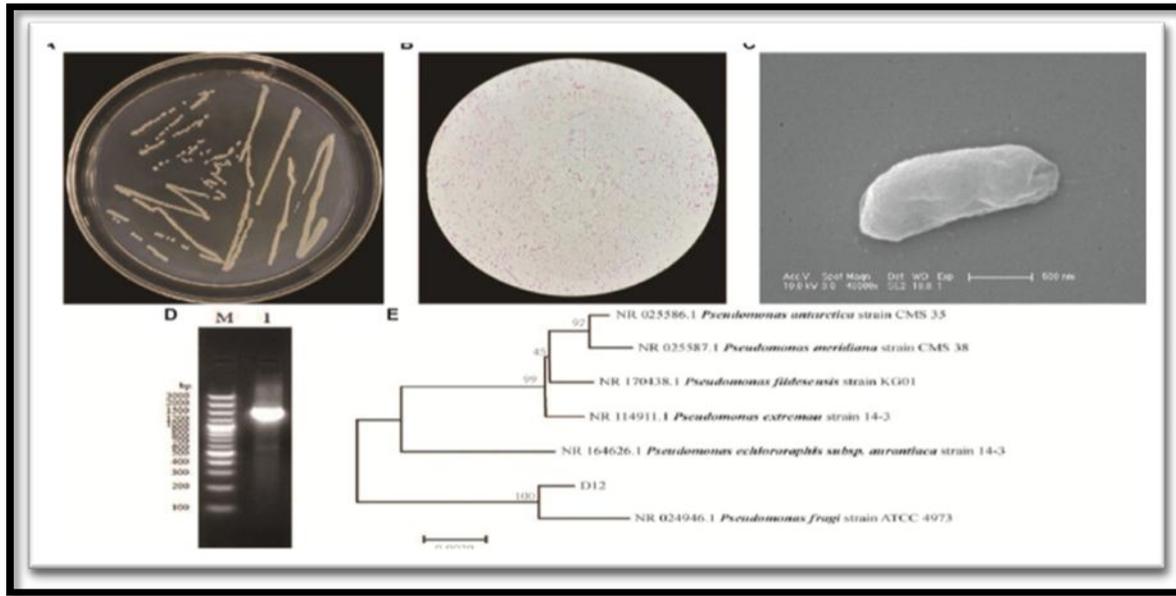


Figure 06 : Identification morphologique et biologique moléculaire de *Pseudomonas fragi* D12.(A) Morphologie des colonies ; (B) Coloration de Gram (microscope optique 400 ×); (C) micrographie électronique à balayage (40 000 ×) ; (D) Électrophérogramme et séquence d'ADN 16 s ; (E) Dendrogramme de jonction de voisins pour le gène de l'ARN 16S des souches de *Pseudomonas* (Bao *et al.*, 2023).

2.5. Écologie et pathogénicité de *Pseudomonas fragi*

P. fragi joue un rôle important dans l'écologie microbienne et les effets de la viande, ainsi que des sources de fer liées à la viande, sur le comportement de croissance de nombreuses souches bactériennes différentes, suggérant que la viande pourrait constituer une niche écologique pour *p. fragi*, indépendamment de ses capacités protéolytiques et lipolytiques. Des expériences *in vitro* montrent que différents types de molécules de viande peuvent libérer des molécules volatiles odorantes et jouer un rôle dont l'effet global est similaire à celui d'un agent d'altération de la viande (Ercolini *et al.*, 2010).

2.6. Effets des enzymes bactériennes sur les aliments

La détérioration des aliments est causée par la propagation d'agents infectieux ou pathogènes tels que des bactéries, des virus, des champignons et des protozoaires, qui contaminent les aliments et provoquent des maladies d'origine alimentaire chez les humains. Des études antérieures menées par plusieurs chercheurs ont révélé que le micro-organisme spécifique responsable de la détérioration de la viande de volaille est *Pseudomonas* (Shaik *et al.*, 2022). Par ailleurs, la détérioration enzymatique implique également différents types de détérioration des aliments, avec l'action d'enzymes hydrolytiques (impliquant l'eau) et d'oxydoréductases

Revue bibliographique

(impliquant l'oxygène) dans les aliments, conduisant à des réactions d'hydrolyse et à des réactions redox de décomposition qui rompent les liaisons chimiques dans les ingrédients alimentaires.

Les enzymes hydrolytiques telles que l' α -amylase, la β -amylase et la glucoamylase peuvent hydrolyser les liaisons α -1,4-glycosidiques, les liaisons β -1,4-glycosidiques et les deux types de liaisons (α -1,4 et β -1,4-glycosidiques).

Ces liaisons sont individuellement extraites du glycogène de la viande pour produire des molécules plus simples telles que le glucose, le maltose, les dextrans et le maltotriose. La présence de glucose peut entraîner la détérioration des aliments car il constitue une source d'énergie importante pour la croissance microbienne (Shaik *et al.*, 2022).

Matériel et Méthodes

1. Récupération de la séquence protéique requête

La séquence protéique de la Glucoamylase de la bactérie *Pseudomonas fragia* été extraite au format FASTA à partir de la base de données UniProt (<https://www.uniprot.org>). Le numéro d'accèsion de la séquence est : A0A0X8EZM1 a été utilisé pour toutes les analyses bioinformatiques.

2. Analyse de propriétés physico-chimiques

Nous avons utilisé le serveur ExPASy ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) (Gasteiger *et al.*, 2005) pour estimer les différentes propriétés physico-chimiques de séquences de glucoamylase de *Pseudomonas fragi*, à savoir :

- La composition en acides aminés, l'indice aliphatique (AI), le point isoélectrique (PI), l'indice d'instabilité (II), le nombre de résidus chargés positifs et négatifs, la grande moyenne d'hydropathie (GRAVY) et le coefficient d'extinction (CE) ;
- L'hydrophile ou l'hydrophobie d'une protéine est déterminée par la grande moyenne d'hydrophile GRAVY, C'est-à-dire le rapport entre la somme des valeurs d'hydrophile de tous les acides aminés et le nombre total de résidus dans la séquence (Umang *et al.*, 2012) ;
- Le coefficient d'extinction (CE) peut être utilisé pour estimer la concentration molaire d'une solution en mesurant l'absorbance (Scientific, 2012) ;
- La charge nette d'une protéine /peptide est égal à zéro au point pH (PI), ce qui signifie qu'elle ne migrera pas dans un champ électrique (Smoluch *et al.*, 2016) ;
- La stabilité thermique de la protéine est affectée par l'indice aliphatique (AI), qui mesure le taux d'occupation des chaînes latérales aliphatiques, d'une protéine (Panda and Chandra, 2012) ;
- La stabilité de la protéine est calculée à partir de son indice d'instabilité (II), les protéines sont considérées comme stables lorsque la valeur de l'indice d'instabilité est inférieure 40, mais lorsque la valeur de l'indice d'instabilité est supérieur à 40, elles sont considérées comme instables (Guruprasad *et al.*, 1990). L'indice aliphatique détermine la thermostabilité d'une protéine globulaire en déterminant le volume occupé

Matériel et Méthodes

par la chaîne latérale des acides aminés aliphatiques (Alanine, Valine, Leucine et isoleucine) par rapport au volume total occupé (Walker, 2005).

3. Localisation subcellulaire

La localisation subcellulaire des protéines glucoamylase de la bactérie *Pseudomonas fragi* a été prédite par le logiciel CELLO 2.5 (Subcellular Localization Predictor) (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu *et al.*, 2006). La composition en acides aminés, la composition de N-peptide, la composition de séquence voisine et la composition de séquence partitionnée de la protéine sont prédites par cet outil.

4. Prédiction de signal peptide

SignalP-5.0 est un logiciel en ligne (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Almagro Armenteros *et al.*, 2019). Il a été utilisé pour identifier la présence de peptide signal et localiser la protéine cible glucoamylase de *P. fragi*.

5. Analyse de la structure secondaire

Pour prédire l'arrangement des éléments de la structure secondaire de la séquence d'acide aminés de glucoamylase de *Pseudomonas fragi*, deux outils bioinformatiques : le programme en ligne Sel-Optimized Prédiction Méthode with Alignement (SOPMA) (Geourjon and Deleage, 1995) accessible sur le serveur Network Protein Séquence Analysis (NPS@) (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) a été utilisé.

Le deuxième logiciel en ligne utilisé est PSI-BLAST-based secondary structure PREDiction, PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (McGuffin *et al.*, 2000). Il est basé sur une méthode qui intègre deux réseaux à réaction neutre, qui effectuent une analyse de sortie acquise à partir de PSI-BLAST (Buchan *et al.*, 2013).

6. Analyse de la structure tertiaire :

6.1. Prédiction de la structure tertiaire

Utilisation du logiciel en ligne SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse *et al.*, 2018) pour la modélisation par homologie de la structure tridimensionnelle de la glucoamylase de *Pseudomonas fragi*,

En effet, selon la disponibilité de modèles structuraux pour une séquence protéique donnée, la modélisation peut être réalisée par modélisation comparative ou par homologie ou par des

Matériel et Méthodes

indices impliquant l'identification de replis protéiques et l'adéquation structurelle entre séquences spécifiques (Singh *et al.*, 2016).

La modélisation moléculaire d'homologie est une méthode de prédiction de la structure tridimensionnelle d'une protéine à l'aide de séquences similaires à celles de protéine dont les structures ont été déterminées expérimentalement par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) et est répertoriée dans les données sur les protéines. Protéine data base (PDB), (<https://www.rcsb.org/>) (Pellequer, 1999).

La modélisation d'homologie est une méthode très précise conçue pour produire des modèles fiables de structure protéique et est largement utilisée dans de nombreuses applications biologiques (Bordoli *et al.*, 2009).

6.2. Raffinement

Le serveur de raffinement de structure protéique à haute résolution ModRefiner (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) a été utilisé pour améliorer la qualité physique de la structure tridimensionnelle prévue de la glucoamylase de *Pseudomonas fragi* (Xu and Zhang, 2011).

6.3. Validation

Le serveur d'analyse et de validation structurelle SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu>) et l'outil d'analyse PROCHECK prédisent et affinent la stéréochimie des modèles structurels tridimensionnels du diagramme de Ramachandran produits par la glucoamylase de *p. fragi*, il a été utile pour évaluer la qualité du produit.

Après raffinement et validation, le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL version 2.5.4 (DeLano, 2002), a été utilisé pour visualiser et optimiser les modèles structurels tridimensionnels de la protéine glucoamylase de *Pseudomonas fragi*.

7. Analyse fonctionnelle

7.1. Recherche de motifs protéique

Une requête de la séquence de la protéine d'intérêt a été soumise à l'outil de recherche MOTIF finder (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) en sélectionnant la base de données d'annotation Pfam, afin d'analyser les motifs fonctionnels communs et de déterminer les familles auxquelles appartient la glucoamylase de *Pseudomonas fragi*.

7.2. Analyse du site actif

La prédiction des sites potentiels de liaison du ligand actif dans le site actif de l'enzyme glucoamylase de *Pseudomonas fragi* a été réalisée l'aide du serveur COFACTOR (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>) (Roy *et al.*, 2012). Ce serveur prédit la fonction biologique d'une protéine cible en fonction de sa structure.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Récupération de séquence protéique

Après avoir recherché dans la base de données UniProt, la séquence protéique glucoamylase de *Pseudomonas fragi* a été extraite au format Fasta. Les propriétés des protéines extraites sont indiquées dans le tableau 01.

Tableau01 : Les propriétés de la séquence protéique récupérée de la glucoamylase de *p. fragi*

Nom	Numéro d'accèsion	Nombre d'acides aminés (aa)	Poids moléculaire (Da)
Glucoamylase	UniProt : A0A0X8EZM1 NCBI : gi 984706454	608	68653.87

2. Analyse de propriétés physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques telles que le nombre de résidus d'acide amine (AA), le poids moléculaire, le nombre de résidus charges négativement (Asp+Glu), le nombre de résidu charges positivement (Arg+Lys), le coefficient d'extinction (EC), le point isoélectrique, l'indice d'instabilité (II), l'indice aliphatique (IA), la demi-vie et la grand moyenne d'hydrophatie (GRAVY) ont été évaluées pour l'enzyme glucoamylase de *Pseudomonas fragi* et sont donnée dans le (tableau 02).

Tableau02 : Caractérisation de la séquence protéique de glucoamylase de *P. fragi*.

Propriété	Valeur
Le point isoélectrique (PI)	5,31
Nombre total de résidus charges négativement (Asp+Glu)	80
Nombre total de résidus charges positivement (Arg+Lys)	60
Coefficient d'extinction (CE)	124955
La demi-vie	30 heures
Indice d'instabilité (II)	40,83
Indice aliphatique (AI)	90,71
Grande moyenne d'hydrophatie (GRAVY)	-0,203

Résultats et discussion

La protéine glucoamylase a une séquence de 608 acides aminés et un poids moléculaire de 68,65 kDa, la valeur théorique de point isoélectrique (PI) est de 5,31 suggérant que la protéine cible est de nature acide (inférieur à 7).

Le nombre total de résidus chargés négativement (Asp+Glu) ; 80 acides aminés, le nombre total de résidus chargés positivement (Arg+Lys) ; 60 acides aminés, c'est-à-dire que le nombre total de résidus chargés négativement de glucoamylase est plus élevé que nombre total de résidus chargés positivement.

Le coefficient d'extinction molaire ou coefficient d'absorption molaire (CE) est une mesure de la capacité d'une protéine à absorber la lumière (McNaught and Wilkinson, 1997), sa valeur pour la protéine est de 0,00012 nm. La valeur de l'indice d'instabilité (II) de la glucoamylase est de 40,83 (>40), classant cette glucoamylase comme une protéine légèrement instable. De plus, l'indice aliphatique (AI) détermine la stabilité thermique des protéines globulaires; un indice aliphatique (AI) plus élevé indique la résistance thermique. Par conséquent, la valeur AI de la glucoamylase de *P. fragi* est de 90,71, ce qui est relativement élevé et, indique que l'enzyme est thermostable, La valeur moyenne globale de l'hydrophobicité (GRAVY) représente l'interaction de la protéine avec l'eau. La valeur GRAVY pour la glucoamylase de *P. fragi* est négative (-0,203), indiquant la nature polaire (hydrophile) de cette protéine.

3. Localisation subcellulaire

Le programme CELLO a prédit que la composition en acides aminés, la composition en peptide N, la composition de la séquence de partition, la composition physique et chimique et les valeurs de composition de la séquence adjacente de la protéine gi|984706454| *P. fragi* étaient respectivement de 0,865, 0,423, 0,761, 0,374 et 0,558 (Figure 07).

De plus, la fiabilité du programme CELLO pour prédire la localisation subcellulaire de la protéine gi|984706454| de *P. fragi*, y compris la membrane externe, le périplasma, la membrane interne, le cytoplasme et la localisation extracellulaire, est (grande valeur, petite valeur) 2.632, 1.440, 0.606, 0.173, 0.150 respectivement.

Résultats et discussion

CELLO RESULTS

SeqID: 1086005|Genbank|Outer membrane/Extracellular (Autotransporter)|major ring-forming surface protein precursor

Analysis Report:

SVM	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	Extracellular	0.865
N-peptide Comp.	Extracellular	0.423
Partitioned seq. Comp.	Extracellular	0.761
Physico-chemical Comp.	InnerMembrane	0.374
Neighboring seq. Comp.	OuterMembrane	0.558

CELLO Prediction:

Extracellular	2.632 *
OuterMembrane	1.440
InnerMembrane	0.606
Periplasmic	0.173
Cytoplasmic	0.150

Figure 07 : Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la glucoamylase de *P. fragi*.CELLO a prédit que la localisation subcellulaire de la protéine était extracellulaire.

4. Prédiction de signal peptide :

Le serveur SignalP n'indique la présence d'aucun peptide signal dans la glucoamylase de *P. fragi* (voir la figure 08).

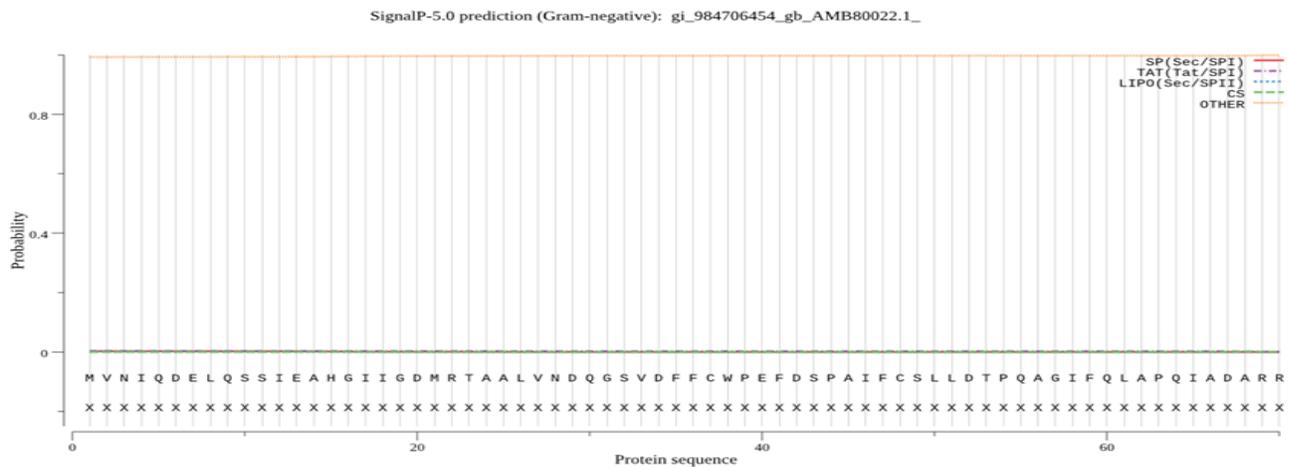


Figure 08 : Analyse de prédiction de signal peptide de la glucoamylase de *P. fragi*.

Résultats et discussion

5. Prédiction de la structure secondaire :

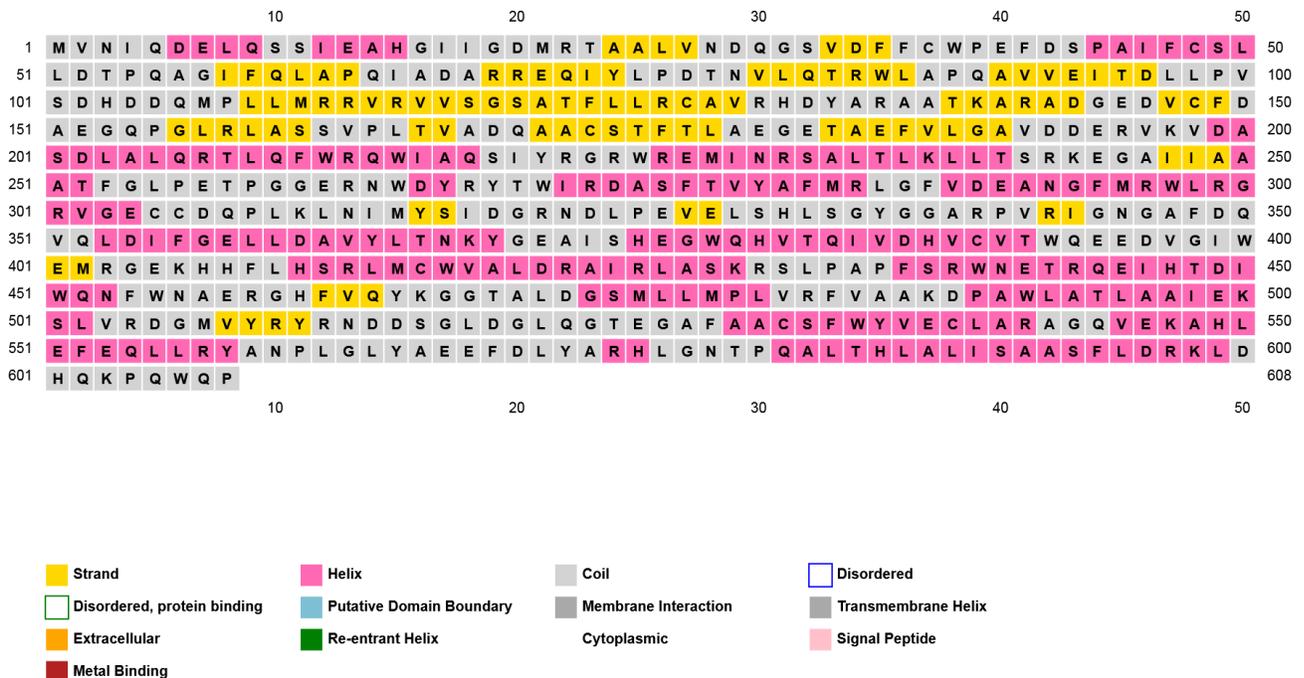
Le serveur de prédiction de structure secondaire SOPMA montre que la structure de la glucoamylase gi|984706454| *Pseudomonas fragi* est principalement constituée d'hélices α (hélice α), puis de boucles (Random coils), et de brins β (Extended strand) (tableau 03).

Tableau 03 : Prédiction de la structure secondaire de glucoamylase de *P. fragi* par SOPMA

Alpha hélix	Extended strand	Random coils
43,26%	13,82%	42,93 %

Les prédictions de structure secondaire PSIPRED pour la glucoamylase de *P. fragi* semblent être cohérentes avec les résultats de SOPMA, et les valeurs de confiance des prédictions sont élevées (voir Figure 09).

(A)



(B)

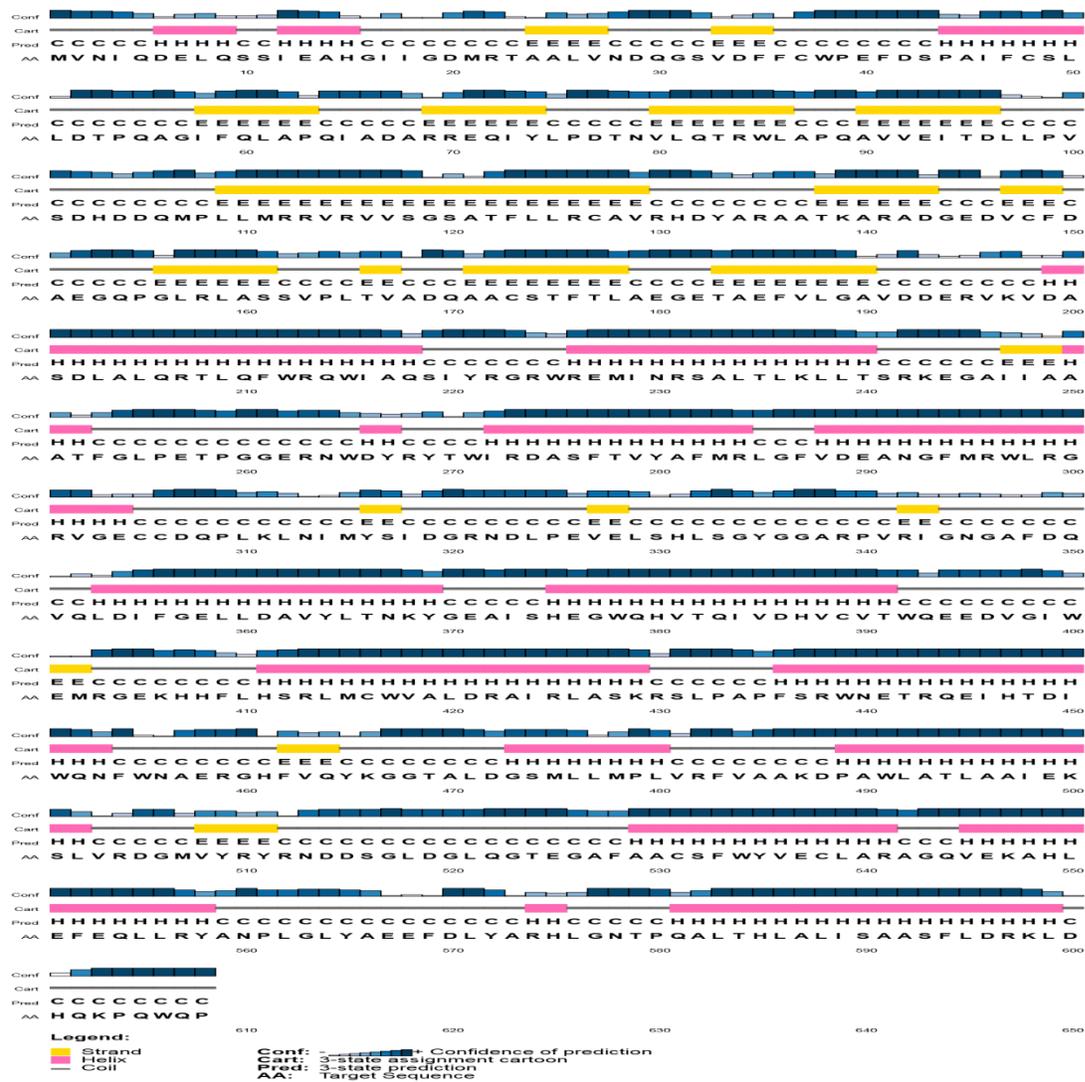


Figure 09 : Résultats de la prédiction de la structure secondaire de la glucoamylase de *P. fragi* par le serveur PSIPRED 4.0. (A) Diagramme d'annotation de séquence, (B) Représentation graphique.

Les couleurs représentent les éléments de structure secondaire des protéines (jaune pour les brins β , rose pour les hélices α et gris pour les boucles). La confiance de la prédiction observée dans toute la structure secondaire prédite était élevée, indiquant une grande fiabilité de cette prédiction.

6. Analyse de la structure tertiaire

6.1. Prédiction de la structure tertiaire

Puisqu'il n'existe aucune structure pour cette protéine dans la base de données PDB, la structure tridimensionnelle de la glucoamylase de *Pseudomonas fragi* a été prédite à l'aide d'un modèle d'homologie. Dans ce cas, le serveur SWISS-MODEL est utilisé pour générer un modèle tridimensionnel de la protéine. Les résultats de cette prédiction de structure sont présentés dans le tableau 05. Le meilleur modèle pour la protéine glucoamylase de *P. fragi* proposé par SWISS-MODEL (alignement du modèle) était celui d'AlphaFold DB model of A0A7Y1C1G9.1.A avec une identité de 82,73 % et une couverture de 100 %.

Tableau04 : Prédiction de la structure tertiaire de glucoamylase de *P. fragi* par SWISS-MODEL.

Model	A0A7Y1C1G9.1.A
Identité (%)	82,73
Couverture (%)	100

6.2. Raffinement

Le raffinement du modèle est une étape importante pour améliorer la qualité des modèles structurels prédits et se rapprocher de la précision expérimentale des études informatiques ultérieures. Pour la protéine glucoamylase de *P. fragi*, le modèle 3D prédit par SWISS-MODEL a été amélioré à l'aide du programme en ligne ModRefiner (Adiyaman and McGuffin, 2019). Après raffinement, les structures tridimensionnelles prédites ont été visualisées et optimisées à l'aide du logiciel de visualisation moléculaire PyMOL (figure 10). Il s'agit d'une étape cruciale dans la validation et l'interprétation des résultats des analyses de structure et de fonction des protéines.

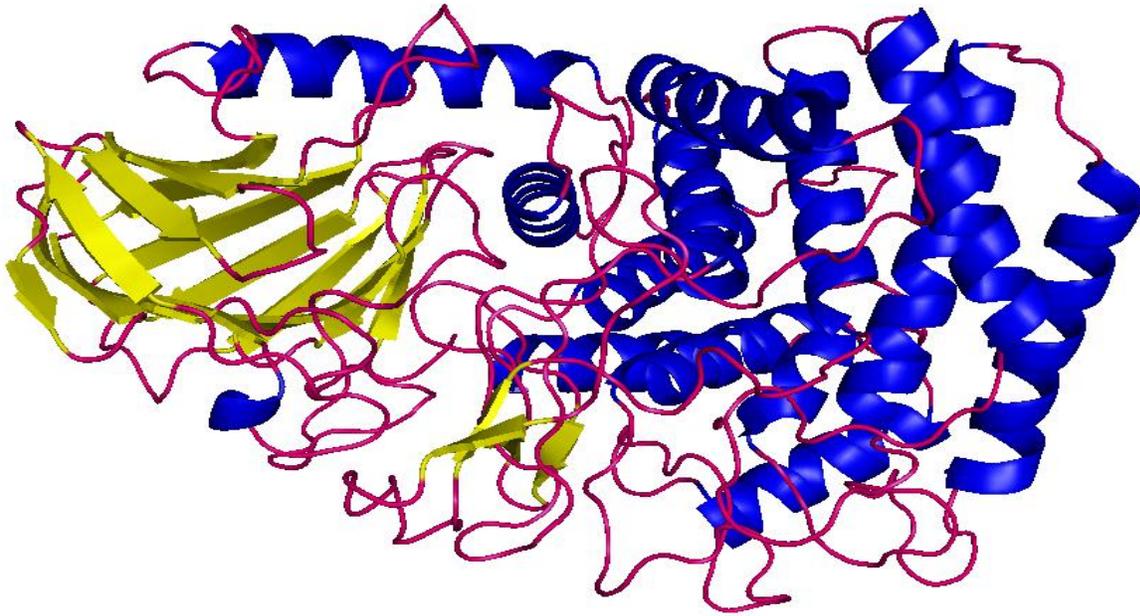


Figure 10 : Structure 3D prédite de la glucoamylase de *P. fragi* produite par SWISS-MODEL, raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.5.4. Prédiction de la structure secondaire de la glucoamylase montrant les hélices α (Bleu), les feuillets β (flèches jaunes) et les boucles (rose).

6.2. Validation:

Après un processus de raffinement de la structure, la qualité stéréochimique du modèle initial et modèle raffiné de glucoamylase de *P. fragi* a été évaluée à l'aide de diagramme de Ramachandran. L'évaluation a été réalisée à l'aide du programme PROCHECK sur le serveur SAVES v6.0, qui analyse et vérifie la qualité structurale des modèles protéiques (figure 11, Figure 12).

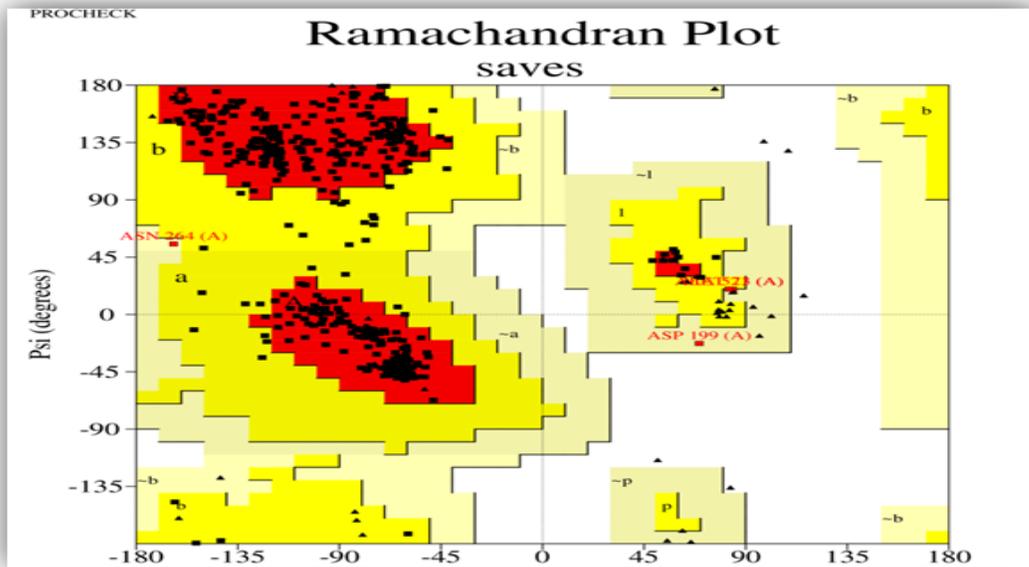
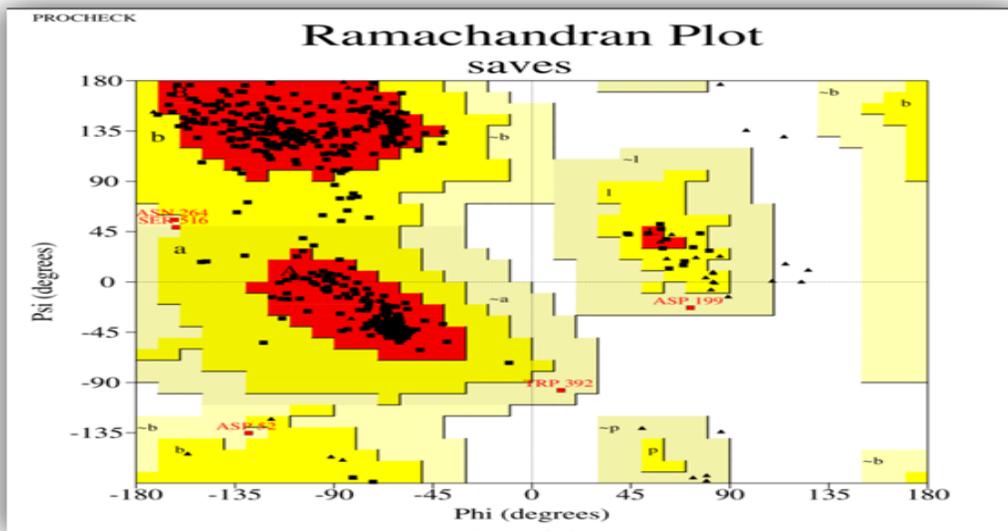


Figure 11 : Diagramme Ramachandran du model initial de glucoamylase de *P. fragi* de PROCHECK (serveur SAVE)



v6.0).

Figure 12 : Diagramme Ramachandran du model raffiné de glucoamylase de *P. fragi* de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).

Résultats et discussion

Le pourcentage de résidus présent dans la région de diagramme Ramachandran du modèle protéique prédit (initial et raffiné) de la glucoamylase de *p. fragi a* été rapporté dans le tableau 05.

La structure de modèle 3D raffinée de cette protéine a été validée par le diagramme de Ramachandran de glucoamylase de *Pseudomonas fragi*, car ils suivent les angles dièdres du diagramme de Ramachandran occupés dans les régions favorables.

Table 05 : Validation de la prédiction de structure tertiaire initiale et raffinée de *p. fragi* par le diagramme de Ramachandran.

Type de modèle	Région favorisée (%)	Région autorisée supplémentaire (%)	Région généreusement autorisée (%)	Région non autorisée (%)
Initial	92,1	7,0	0,9	0,0
Raffiné	92,4	6,8	0,7	0,0

7. Analyse fonctionnelle

7.1. Recherche de motif protéique

À partir d'une étude fonctionnelle de la glucoamylase de *Pseudomonas fragi* gi|984706454|, le serveur de recherche MOTIF finder a détecté deux motifs fonctionnels, comprenant la glycosyle hydrolases de la famille 15 (PF00723) et Trealase-like, N-terminal (PF19291) (Figure 13).

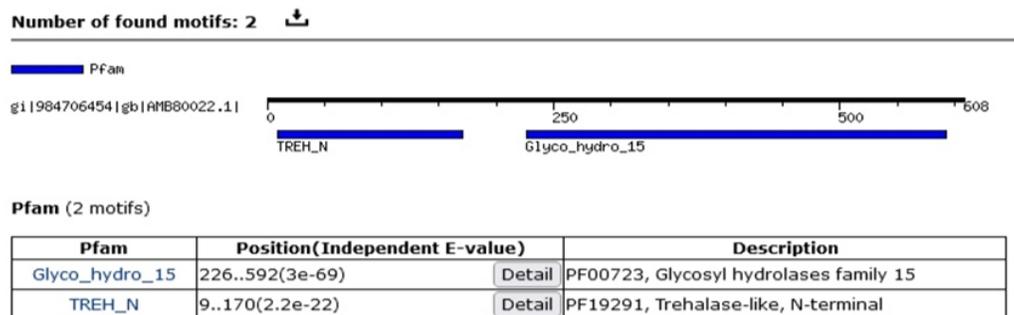


Figure 13 : Résultat du MOTIF finder montrant le motif fonctionnel de la glucoamylase de *P. fragi*.

7.2. Analyse du site actif

Les résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme glucoamylase de *Pseudomonas fragi* déterminés par le serveur COFACTOR sont ; Tryptophane 271, Arginine 273, Aspartate 274, Isoleucine 399, Tryptophane 400, Glutamate 401.

Le « score BS » est une mesure de la similarité locale (séquence et structure) entre le site de liaison du modèle et le site de liaison prédit dans la structure de requête et est de 1 (> 0,5) pour cette protéine, représentant le site de liaison prédit et la liaison du modèle (voir la figure 14).

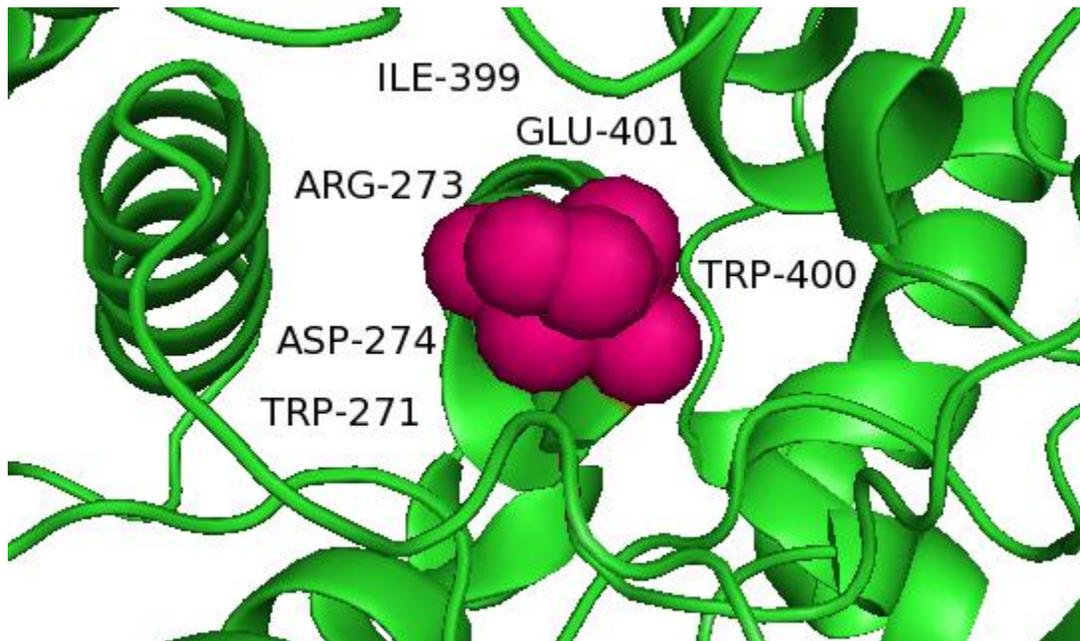


Figure 14 : Site actif de la glucoamylase de *P. fragi* avec son ligand. Prédit par COFACTOR et visualisé par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.5.4 montrant les sites de liaison avec le ligand (Trp-271, Arg-273, Asp-274, Ile-399, Trp-400, Glu-401).

La recherche de motifs protéiques et l'analyse du site actif de la glucoamylase de *Pseudomonas fragi* montrent que les résidus tryptophane et les groupes carboxyles étaient importants pour l'activité catalytique et sont strictement conservés dans les glucoamylase d'*Aspergillus* et de *Rhizopus* (Kumar and Satyanarayana, 2009).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La glucoamylase (GA) est une hydrolase catalytique qui hydrolyse des liaisons α -1,4-glucosidique dans l'amidon, produit par différentes espèces microbiennes, notamment les champignons, les levures et les bactéries. Il existe de nombreux domaines de l'industrie notamment la production de sirop de maïs à haute teneur en fructose, la production de bioéthanol, l'aide digestive et la production de bioplastique.

Les GA ont été largement caractérisés, en utilisant des techniques d'ingénierie des protéines pour étudier les questions fondamentales liées au mécanisme et à la spécificité et pour développer davantage les applications industrielles des GA.

Cette étude représente la première caractérisation structurale et *in silico* d'une glucoamylase provenant de *Pseudomonas fragi*, fournissant ainsi des connaissances précieuses sur cette enzyme. Cette enzyme se caractérise par sa stabilité thermique.

L'analyse *in silico* de l'enzyme glucoamylase de *P. fragi* a révélé plusieurs propriétés physico-chimiques notamment la nature acide; sa thermostabilité; sa hydrophilicité et sa localisation extracellulaire, la structure secondaire de glucoamylase est principalement constituée d'hélices α (α hélix), de boucles (Random coils), et de brins β (Extended strand), nous avons réalisé aussi la prédiction de structure tertiaire de la protéine ainsi que l'analyse fonctionnelle.

Cette étude bioinformatique ouvre des perspectives prometteuses pour le développement de glucoamylase industrielles. Une production à grande échelle de cette enzyme sera nécessaire pour répondre à la demande croissante dans le secteur industriel. En effet, les outils bioinformatiques proposés pour la caractérisation de la glucoamylase de *P. fragi* sont essentiels pour prédire ses caractéristiques structurales et fonctionnelles, facilitant ainsi les futures analyses expérimentales.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- Adiyaman, R., and McGuffin, L.J. (2019). Methods for the refinement of protein structure 3D models. *International journal of molecular sciences* *20*, 2301.
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology* *37*, 420-423.
- Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Chaulagain, B.P., and Lakshmipriya, T. (2017). *Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016*. *BioMed research international* *2017*, 2195808.
- Atika, B., Baaisa, B., Yamina, M., and Imene, T. (2023). Evolution of Psychrotrophic Bacteria on Beef During Refrigeration. *Journal of Food and Nutrition Research* *11*, 286-291.
- Awolope, O.K., O'Driscoll, N.H., Di Salvo, A., and Lamb, A.J. (2021). De novo genome assembly and analysis unveil biosynthetic and metabolic potentials of *Pseudomonas fragi* A13BB. *BMC Genomic Data* *22*, 15.
- Bakli, M., Karim, L., Mokhtari-Soulimane, N., Merzouk, H., and Vincent, F. (2020). Biochemical characterization of a glycosyltransferase Gtf3 from *Mycobacterium smegmatis*: a case study of improved protein solubilization. *3 Biotech* *10*, 1-13.
- Bao, C., Li, M., Zhao, X., Shi, J., Liu, Y., Zhang, N., Zhou, Y., Ma, J., Chen, G., and Zhang, S. (2023). Mining of key genes for cold adaptation from *Pseudomonas fragi* D12 and analysis of its cold-adaptation mechanism. *Frontiers in Microbiology* *14*, 1215837.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature protocols* *4*, 1-13.
- Buchan, D.W., Minnici, F., Nugent, T.C., Bryson, K., and Jones, D.T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* *41*, W349-W357.
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., and Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food technology and biotechnology* *56*, 289-311.
- DeLano, W.L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl Protein Crystallogr* *40*, 82-92.
- Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., and Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research* *50*, D571-D577.

Références bibliographiques

- Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., Mauriello, G., and Villani, F. (2010). Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International journal of food microbiology* *142*, 120-131.
- Farooq, M.A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H.M., Mumtaz, S., and Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. *Archives of Microbiology* *203*, 1281-1292.
- Franzetti, L., and Scarpellini, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of microbiology* *57*, 39-47.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (Springer).
- Geourjon, C., and Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics* *11*, 681-684.
- Guruprasad, K., Reddy, B.B., and Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection* *4*, 155-161.
- Khedr, A.I., Mohamed, G.A., Ibrahim, S.R., Abdelhameed, R.F., Shoaib, T.H., Alzain, A.A., Yamada, K., and Refaey, M.S. (2024). Marihysin B, a new cyclic lipopeptide from culture broth of *Staphylococcus sp.*-antimicrobial and glucoamylase inhibitory activities. *Journal of Molecular Structure* *1297*, 137008.
- Kheira, B. (2011). Isolement de souches de *Pseudomonas* à partir des sols et des nécroses d'oliviers de l' Ouest Algérien: Identification et caractérisation biochimique, sérotypique et phytopathologique. Recherche de l' antibiorésistance, d' antagonisme (bactériocine) et d' ADN (université Mohamed Boudiaf des sciences et de la technologie d Oran).
- Kognou, A.L.M., Shrestha, S., Jiang, Z., Xu, C.C., Sun, F., and Qin, W. (2022). High-fructose corn syrup production and its new applications for 5-hydroxymethylfurfural and value-added furan derivatives: Promises and challenges. *Journal of Bioresources and Bioproducts* *7*, 148-160.
- Kumar, P., and Satyanarayana, T. (2009). Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* *29*, 225-255.
- Lee, P., Werlin, S., Trost, B., and Struve, M. (2004). Glucoamylase activity in infants and children: normal values and relationship to symptoms and histological findings. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* *39*, 161-165.
- Marín-Navarro, J., and Polaina, J. (2011). Glucoamylases: structural and biotechnological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* *89*, 1267-1273.

Références bibliographiques

- McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404-405.
- McNaught, A.D., and Wilkinson, A. (1997). *Compendium of chemical terminology*, Vol 1669 (Blackwell Science Oxford).
- Ogunsona, E., Ojogbo, E., and Mekonnen, T. (2018). Advanced material applications of starch and its derivatives. *European Polymer Journal* 108, 570-581.
- Panda, S., and Chandra, G. (2012). Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin proteins of other chordates. *Bioinformation* 8, 891.
- Pellequer, J.-L. (1999). *Modélisation moléculaire par homologie des protéines: ses applications en Biologie et en Bioinformatique* (Faculté des sciences de Luminy).
- Rharrabe, K., Sarroukh, Z., Benziane, W., El B, R.K., and El Barraq, A. (2018). Effet des eaux résiduaires, urbaines et industrielles, sur la germination du blé tendre *Triticum aestivum*. *SMETox Journal* 1, 157-164.
- Roy, A., Yang, J., and Zhang, Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic acids research* 40, W471-W477.
- Sauer, J., Sigurskjold, B.W., Christensen, U., Frandsen, T.P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P., and Svensson, B. (2000). Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1543, 275-293.
- Scientific, T. (2012). Extinction coefficients: A guide to understanding extinction coefficients with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration. *Tech Tip* 6.
- Shaik, M.I., Azhari, M.F., and Sarbon, N.M. (2022). Gelatin-based film as a color indicator in food-spoilage observation: A review. *Foods* 11, 3797.
- Singh, N., Upadhyay, S., Jaiswar, A., and Mishra, N. (2016). In silico analysis of protein. *J Bioinform Genomics Proteomics* 1, 1007.
- Smoluch, M., Mielczarek, P., Drabik, A., and Silberring, J. (2016). Online and offline sample fractionation. In *Proteomic profiling and analytical chemistry* (Elsevier), pp. 63-99.
- Sterniša, M., Centa, U.G., Drnovšek, A., Remškar, M., and Možina, S.S. (2023). *Pseudomonas fragi* biofilm on stainless steel (at low temperatures) affects the survival of *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* and their control by a polymer molybdenum oxide nanocomposite coating. *International journal of food microbiology* 394, 110159.
- Tse, T.J., Wiens, D.J., and Reaney, M.J. (2021). Production of bioethanol—A review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation* 7, 268.

Références bibliographiques

- Umang, M., Astha, J., Aastha, C., Neha, A., and Vibha, R. (2012). Computational structural and functional characterization of protein family: Key for the hidden mystery. *J Pharm Res* 5, 3643-3649.
- Walker, J.M. (2005). *The proteomics protocols handbook* (Springer).
- Wang, H., Ge, Q., Shao, X., Wei, Y., Zhang, X., Wang, H., and Xu, F. (2023). Influences of flavonoids from *Sedum aizoon* L. on biofilm formation of *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 107, 3687-3697.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., and Bordoli, L. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46, W296-W303.
- Wayllace, N.M., Martín, M., Busi, M.V., and Gomez-Casati, D.F. (2023). Microbial glucoamylases: structural and functional properties and biotechnological uses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39, 293.
- Wu, J., and Xia, W. (2023). *Industrial Starch Debranching Enzymes* (Springer Nature).
- Xia, W., Zhang, K., Su, L., and Wu, J. (2021). Microbial starch debranching enzymes: Developments and applications. *Biotechnology Advances* 50, 107786.
- Xu, D., and Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical journal* 101, 2525-2534.
- Yu, C.S., Chen, Y.C., Lu, C.H., and Hwang, J.K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 64, 643-651.
- Zong, X., Wen, L., Wang, Y., and Li, L. (2022). Research progress of glucoamylase with industrial potential. *Journal of Food Biochemistry* 46, e14099.