

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES

FACULTE DES SCIENCES

SIDI BEL ABBÈS



**THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE DOCTORAT**  
**3<sup>ème</sup> CYCLE (LMD)**

*Présentée par* M<sup>lle</sup> LARBI DAOUADJI Kelthoum

*Spécialité : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie Moléculaire Et Protéomique*



Intitulé

---

**ISOLEMENT ET**  
**CARACTERISATION DES SOUCHES**  
**PRODUCTRICES DE LIPASE**

---



*Soutenue le :*

*Devant le jury composé de :*

*Président :* BENALI Mohamed ..... (Professeur UDL SBA)

*Examineurs :* BELABID Lakhdar ..... (Professeur Univ- Mascara)

BACHIR RAHOU Ghalem ..... (MCA Univ Mascara)

HARIR Noria.....(MCA UDL SBA)

*Directeur de thèse :* ABBOUNI Bouziane ..... (ProfesseurUDL SBA)

**Année universitaire 2014 / 2015**

## Remerciements

*Avant toute je remercie ALLAH, le tous puissant qui ma donné, la foi, la patience et la santé durant toutes mes études et surtout en accomplissant cette modeste thèse.*

*Je remercie chaleureusement mon promoteur Monsieur Professeur ABBOUNI Bouziane, pour la confiance qu'il m'a accordé, et de son soutien scientifique et moral tout au long du travail, et surtout pour la grande motivation qu'il a su m'insuffler durant mon parcours.*

*Je tiens aussi à remercier mon enseignant Monsieur professeur BENALI Mohamed pour avoir accepté de Présider les membres du Jury. Votre largesse d'esprit m'a été d'un aide précieuse.*

*Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté la présidence et l'examinations de ce travail.*

*Je remercie Monsieur BENATTOUCHE Zouaoui, maitre assistant chargé de cours à l'institut de science de la nature et de la vie de l'université de mascara pour son aide et ces précieux conseils.*

*Je tien a remercier tout particulièrement monsieur SELOUNI Mustapha Mohamed el Amine ingénieur de laboratoire de microbiologie générale qui nous a consacrer de son précieux temps et fourni locaux et matériels.*

*Je remercie ainsi Le personnel du Bureau Communal d'hygiène de Bâb eldaya de sidi bel abbes pour l'aide précieuse qu'ils m'apporté à la réalisation de ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont, également à tout le personnel de laboratoire d'analyse médical précisément Monsieur le chef service de Mazouna (Relizane) pour leurs aides et surtout pour leurs gentilleses.*

**Mlle : LARBI DAOUADJI Kelthoum.**

## *Dédicaces*

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront ma devise.*

*Je dédie ce travail à mes chers parents que j'aime tant, sans lesquels je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.*

*A mes frères et mes charmantes sœurs et toute ma famille dont le soutien et les encouragements m'ont été salutaires.*

*A ma chère RAHMANI Soraya, pour leur soutien et leur encouragement, et avec laquelle j'ai partagé des moments inoubliables, je t'aime beaucoup ma chère.*

*A tous mes amies*

*A tous mes collègues de promotion*

*A tous ceux que j'aime.*

*Mlle Larbi Daouadji Keltoum*

# Liste des abréviations

---

**A** :Absorbance  
**ADH** : Arginine Dihydrolase  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**AG** :Acide Gras  
**ARA** :Arabinose  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ATP** : Adénosine Triphosphate  
**B** : *Bacillus*  
**C** : Cytosine  
**CE** : Enzyme Commission  
**DEAE** : Diéthyl Amino Athyl  
**CRL**:Lipase de *Condida rugosa*  
**DO** : Densité Optique  
**G** : Guanine  
**GEL**:Gélatine  
**GLU**:Glucose  
**HPI** :Lipase pancréatique humaine  
**HSI** :Hormone sensitive lipase  
**Kb** : Kilobase  
**kDa** :killo Dalton  
**LDC**: Lysine Décarboxylase  
**MAL**:Maltose  
**MAN** : Mannitol  
**ODC** : Ornithine Décarboxylase  
**ONPG**: Orto-nitro-phényl- $\beta$ -D- galactopyranoside  
**P** : *Pseudomonas*  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**TSI** : Triple Sugar Iron  
**Tween** :Polyxethylene sorbitane monooléate  
**UI** :Unité international

# RESUME

La demande en thermo-enzymes pour des applications biotechnologiques est de forte croissance. Les lipases sont, parmi les enzymes thermophiles, les plus recherchées dans divers secteurs industriels. Les objectifs de ce travail étaient l'isolement et l'identification des souches thermophiles productrices de la lipase à partir des sources thermales de différentes wilayas d'Algérie, L'optimisation des conditions impliquées dans la production de la lipase par ces souches, leur purification et l'étude des propriétés catalytique de la lipase sont mise en évidence.

Le criblage primaire des souches productrices de la lipase sur milieu minimal contenant une concentration de 1% de l'huile d'olive et de tween 80 comme seul source de carbone a permis l'isolement de 59 souches bactériennes thermophiles aérobies.

Le criblage secondaire a permis la sélection de 5 souches productrices de la lipase très performantes.

L'utilisation des galeries API (20E, 20NE) et l'interprétation probalistique des résultats obtenus a permis l'identification des souches sélectionnées comme étant : GH5 : *Geobacillus*, S5 : *Bacillus subtilis*, HB5 : *Pseudomonas fluorescens*, WO4 : *Bacillus licheniformis*, HR2 : *Bacillus cereus*.

Différents paramètres impliqués dans la production de lipase et la biomasse tels que la température, la source de carbone et d'azote, la durée d'incubation, la concentration de l'inoculum, la valeur de pH ont été optimisés. Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation des souches sélectionnés (WO4, GH5, HB5, HR2, S5) sur milieu de culture minimal, incubées à une température de 50°C pendant un temps d'incubation 72 heures a donné une production maximale (35000, 33000, 2 9000, 26000, 24000 $\mu$ mol/ml/min).

La purification partielle de la lipase chez les souches sélectionnées productrices a été effectuée en étapes successives : Dans un premier temps, les protéines sont fractionnées par précipitation au sulfate d'ammonium, ensuite dialysées dans une solution tampon de phosphate de potassium pendant une heure. Dans un second temps, la fraction protéique active est ensuite soumise à une purification partielle sur chromatographie d'échange d'anion (DEAE de cellulose).

L'activité enzymatique des lipases produites chez les cinq souches sélectionnées est maximale à des valeurs de pH comprise entre 7-10 et une température de 50-70°C.

La purification de la lipase produite chez les souches (S5, HR2, HB5, GH5, WO4) par précipitation au sulfate d'ammonium (40% et 60%) et la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, a donné les rendements respectifs (19,4, 19,38, 18,1, 17,4, 19,4 %). L'activité enzymatique de la lipase se manifeste stable à des valeurs de pH comprise entre 5-10 et à des températures situées entre 60-90°C pendant un intervalle de temps d'une heure.

Par ailleurs, L'activité enzymatique de la lipase est fortement stimulée en présence des ions de  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$  à une concentration de 1mM. Cependant, la présence de certains métaux tels que le  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  et  $\text{Mn}^{+2}$  à une concentration de 1mM a manifesté un effet d'inhibition.

**Mots clés:** lipase, criblage, thermophiles, optimisation, caractérisation, stabilité, cinétique de croissance

# ABSTRACT

Thermophilous micro-organisms autochtones of the hot environments such as the terrestrial thermal springs have capacities of interesting molecular adaptations and thus constitute a significant source of bioactives molecules not very conventional outlets of biochemical and molecular mechanisms single. The demand for thermozyms for biotechnologiques applications is of strong growth. Lipases are, among the thermophilous enzymes, most required in various industrial sectors. The objectives of this work were the insulation and the identification of the thermophilous stocks having a lipolytic activity starting from the thermal springs different wilayas from Algeria, the optimization of the conditions implied in the production of lipase by these stocks, the purification of this last as well as the catalytic study of the properties of lipase, For that 59 aerobic thermophilous bacterial stocks were isolated with several geothermal sites. A phenetic characterization was carried out, and made it possible to have access to certain morphological, biochemical and physiological properties of these micro-organisms. The bacterial stocks form sticks with positive Gram, primarily, they thermophilous are moderated, aerobic and neutrophiles the product engineering of lipase was carried out, in batch, on minimal culture medium liquid added with the olive oil at a rate of 1 %. the preliminary characterization of the lipolytic activities of the stocks was made per proportioning titrimetric of the fatty acids released. Five stocks expressed a maximum production of lipase are selected for optimization. The optimization of the conditions of fermentation such as the incubation period, the pH, the substrates lipidic, their concentrations, the source of nitrogen and the source of carbon for an excellent production of lipase was examined. After having optimized the environmental conditions as well as the needs nutritional for growth, of the specific culture media for each stock, are prepared in order to obtain a better production of the lipase. (Les results obtained showed than the maximum production of lipase in the optimal minimal medium is of 35000  $\mu\text{mol/ml/min}$  (WO4), 33000  $\mu\text{mol/ml/min}$  (GH5), 29000  $\mu\text{mol/ml/min}$  (HB5), 26000  $\mu\text{mol/ml/min}$  (HR2) et 24000  $\mu\text{mol/ml/min}$  (S5), after 72 hours of incubation at a temperature of 50C). Then, these mediums are used to follow the kinetics of cell multiplication of each bacterium. A partial purification was planned in order to increase the output of the lipolytic activity. The catalytic properties of purified lipases

were studied in order to determine the maximum enzymatic activity under certain conditions such as the change of the temperature, the pH, the addition of organic solvents, surfactant, the metal ions. The stability of these lipases was highlighted, very by testing the thermostability.

***Key words:*** lipase, Screening, thermophilous, optimization, characterization, stability, kinetics of growth.



# المخلص

ينمو الطلب على الانزيمات الحرارية بوتيرة متسارعة نظرا لتطبيقاتها في التكنولوجيا الحيوية. ويعتبر الليباز من بين هذه الإنزيمات الحرارية، والأكثر شعبية في مختلف القطاعات الصناعية. وكانت أهداف هذا العمل عزل وتحديد السلالات المنتجة لليباز من الينابيع الحرارية من ولايات مختلفة في الجزائر وتوفير الظروف الأمثل والمشاركة في إنتاج الليباز بواسطة هذه السلالات وتنقيتها وإبراز الخصائص التحفيزية في إنتاج الليباز.

وقد أدى الفحص الأول للسلالات في وسط تحضين أدنى يحتوي على 1٪ من زيت الزيتون وتوين 80 كمصدر وحيد للكربون في عزل 59 سلالة من البكتيريا الهوائية المحبة للحرارة. وأسفر الفحص الثانوي في اختيار 5 سلالات إنتاج الليباز عالية الأداء.

وأدى استخدام شرائط API (20E,20NE) وتفسير النتائج التي تم الحصول عليها في تحديد السلالات المختارة على النحو التالي: GH5 : *Geobacillus* ، S5 : *Bacillus subtilis* ، HB5 : *Pseudomonas fluorescens* ، HR2 : *Bacillus cereus* ، WO4 : *Bacillus licheniformis* .

العوامل المختلفة المشاركة في إنتاج الليباز والكتلة الحيوية مثل درجة الحرارة، ومصدر الكربون والنيتروجين، وفترة حضانة، وتركيز من اللقاح، ودرجة الحموضة المفضلة. وأظهرت النتائج أن التلقيح من سلالات مختارة (WO4، GH5، HB5، HR2، S5) في الحد الأدنى من وسط التحضين، والتي حضنت عند درجة حرارة 50 درجة مئوية لفترة حضانة 72 ساعة أعطى أقصى عائد - على الترتيب - ( 24000، 26000 ، 29000 ، 33000، 35000 ) ميكرومول / مل / دقيقة )

تنقية الليباز المنتج من قبل الخمس سلالات المختارة تمت عبر المراحل التالية: في خطوة أولى، كانت تجزئة البروتينات عن طريق الترسيب مع كبريتات الأمونيوم، ثم فلتر في محلول متعادل لفوسفات البوتاسيوم لمدة ساعة واحدة. ثانياً، ثم يتم إخضاع جزء من البروتين النشط إلى تنقية جزئية على تبادل الشحنة السالبة (DEAE سليلوز).

النشاط الأنزيمي المنتج في خمس سلالات محدد بقيمة قصوى في قيم درجة حموضة بين 7-10 ودرجة حرارة 50-70 درجة مئوية.

تنقية الليباز المنتجة في سلالات (S5، HR2، HB5، GH5، WO4) عن طريق الترسيب مع كبريتات الأمونيوم (40٪ و60٪) والفصل اللوني على عمود DEAE السليلوز، أعطى على الترتيب القيم التالية : (19.4، 19.38، 18.1، 17.4، 19.4٪). ويتجلى النشاط الأنزيمي للليباز مستقرا عند قيم درجة الحموضة بين 5-10 وعند درجات حرارة بين 60-90 درجة مئوية خلال فترة زمنية من ساعة واحدة.

وعلاوة على ذلك، يتم تحفيز النشاط الأنزيمي للليباز بشدة بوجود أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم عند تركيز 1ملي مول. ومع ذلك، أظهر وجود بعض المعادن مثل النحاس، الزنك والمغنيز في تركيز 1 ملي مول أن لها تأثير مثبط.

**الكلمات المفتاحية:** الليباز، الفرز، أليف للحرارة، التحسين، الخصائص، الاستقرار والنمو.

# Table des matières

---

|  |          |
|--|----------|
| <b>INTRODUCTION GENARALE .....</b>                               | <b>1</b> |
| <b>CHAPITRE I : SYNTHSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>                | <b>3</b> |
| <b>PARTIE I :LES LIPIDES .....</b>                               | <b>4</b> |
| <b>I. Les lipides.....</b>                                       | <b>4</b> |
| I.1. Définition.....   | 4        |
| I.2. Classification des lipides .....                            | 4        |
| I.2.1. Lipides apolaires .....                                   | 4        |
| I.2.2. Lipides polaires.....                                     | 4        |
| I.3. Auto-organisation des lipides en présence d'eau .....       | 6        |
| I.3.1. Les films mono-moléculaires.....                          | 6        |
| I.3.2. Les émulsions .....                                       | 6        |
| I.3.3. Les liposomes .....                                       | 6        |
| I.3.4. Les micelles .....  | 7        |
| I.3.5. Les cristaux liquides .....                               | 8        |
| <b>PARTIE II : GENERALITES SUR LES LIPASES.....</b>              | <b>9</b> |
| <b>II. Généralité sur les lipases .....</b>                      | <b>9</b> |
| II.1. Définitions et caractéristiques .....                      | 9        |
| II.2. Origines des lipases .....                                 | 11       |
| II.2.1. Les lipases microbiennes .....                           | 11       |
| II.2.2. Les cutinases.....                                       | 11       |
| II.3. Lipases comme biocatalyseurs .....                         | 12       |
| II.3.1. Réaction d'hydrolyse.....                                | 12       |
| II.3.2. Réaction de synthèse .....                               | 12       |
| II.3.3. La transestérification .....                             | 12       |
| II.4. Séquence, structure et mécanismes d'hydrolyse .....        | 14       |
| II.4.1. Les $\alpha/\beta$ hydrolases .....                      | 14       |
| II.4.2. La triade catalytique .....                              | 16       |
| II.4.3. Le pentapeptide G-X-S-X-G .....                          | 16       |
| II.4.4. La présence d'un volet amphiphile.....                   | 17       |
| II.4.5. Etude des changements conformationnels des lipases ..... | 18       |

|  |           |
|--|-----------|
| II.4.5.1. Méthodes cristallographiques .....                                   | 18        |
| II.5. Caractéristiques cinétiques .....  | 20        |
| II.5.1. Spécificité des lipases .....  | 20        |
| II.5.1.1. La typosélectivité .....   | 20        |
| II.5.1.2. La régiosélectivité .....  | 21        |
| II.5.1.3. Enantiosélectivité .....   | 21        |
| II.6. Classification des enzymes lipolytiques .....                            | 22        |
| II.7. Les lipases microbiennes .....   | 23        |
| II.7.1. Microorganismes producteurs de lipases .....                           | 23        |
| II.7.2. Classification des lipases bactériennes .....                          | 25        |
| II.8. Applications industrielles des enzymes lipolytiques .....                | 27        |
| II.8.1. Les lipases en tant qu'hydrolases .....                                | 28        |
| II.8.2. Applications en synthèse chimique .....                                | 31        |
| II.8.3. Applications en bioremédiation .....                                   | 32        |
| II.8.4. Applications en tannerie .....   | 32        |
| <b>PARTIE III : LES BACTERIES THERMOPHILES.....</b>                            | <b>35</b> |
| <b>III. Les extrêmophiles .....</b>  | <b>35</b> |
| III.1. Définitions .....   | 35        |
| III.2. Diversité des milieux extrêmes .....                                    | 36        |
| III.2.1. Les environnements à hautes températures .....                        | 36        |
| III.2.2. Les environnements à pH alcalin .....                                 | 37        |
| III.2.3. Les milieux à pH acide .....  | 38        |
| III.3. Les bactéries thermophiles .....  | 39        |
| III.3.1. Définition .....  | 40        |
| III.3.2. Phylogénie des thermophiles .....                                     | 41        |
| III.3.3. Les principales bactéries thermophiles .....                          | 42        |
| III.3.4. Besoins nutritifs des bactéries thermophiles .....                    | 42        |
| III.3.5. Enzymes .....   | 43        |
| III.3.5.1. Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides ..... | 43        |
| III.3.5.2. Protéases .....   | 44        |
| III.3.5.3. Lipases et estérases .....  | 44        |
| III.3.5.4. Autres enzymes .....  | 45        |
| <b><u>CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES.....</u></b>                          | <b>46</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. Matériels et méthodes .....</b>                                       | <b>47</b> |
| I.1. Objectif .....   | 47        |
| I.2. PRELEVEMENTS ET ECHANTILLONNAGES .....                                 | 47        |
| I.2.1. Sources thermales étudiées .....                                     | 47        |
| I.2.1.1. Hammam Debagh (Meskhoutine) .....                                  | 47        |
| I.2.1.2. Hammam Bouhnifia (Mascara) .....                                   | 48        |
| I.2.1.3. Hammam Bouhdjar (Temouchent) .....                                 | 48        |
| I.2.1.4. Hammam Rabi (Saida) .....  | 48        |
| I.2.1.5. Station d'hydrocarbure (Bechar) .....                              | 49        |
| I.2.1.6. Hammam Righa (Aïn Defla) .....                                     | 49        |
| I.2.2. Echantillonnage .....  | 51        |
| I.3. Stratégie d'isolement .....  | 51        |
| I.3.1. Screening primaire .....   | 51        |
| I.3.2. Identification des isolats lipolytiques .....                        | 52        |
| I.3.3. Caractérisations culturelle et morphologique .....                   | 52        |
| I.3.4. Caractérisation physiologique et biochimique .....                   | 52        |
| I.3.5. Température, pH et NaCl .....  | 52        |
| I.3.6. Utilisation de substrats carbonés .....                              | 53        |
| I.3.7. Utilisation du citrate .....   | 53        |
| I.3.8. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron. ....            | 53        |
| I.3.9. Test Mannitol-Mobilité .....   | 53        |
| I.3.10. Mise en évidence des enzymes respiratoires .....                    | 53        |
| I.3.11. Caractérisation du type fermentaire .....                           | 54        |
| I.3.12. Recherche de la $\beta$ -galactosidase .....                        | 54        |
| I.3.13. Recherche de l'uréase .....   | 55        |
| I.3.14. Dégradation des acides aminés .....                                 | 55        |
| I.3.15. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires .....   | 55        |
| I.3.16. Type respiratoire .....   | 56        |
| I.3.17. Identification des espèces par analytical profile index (API) ..... | 57        |
| I.4. Conservation des souches lipolytiques .....                            | 57        |
| I.5. Screening secondaires des souches lipolytiques .....                   | 58        |
| I.5.1. Mesure de la zone d'hydrolyse .....                                  | 58        |
| I.5.2. Détermination de l'activité enzymatique par titration .....          | 58        |

|   |    |
|---|----|
| I.5.2.1. Préparation de l'inoculum .....  | 58 |
| I.5.2.2. La culture en batch .....  | 59 |
| I.5.2.3. Détermination de l'activité lipolytique .....  | 59 |
| I.6. Détermination de la biomasse.....  | 60 |
| I.7. La sélection des souches les plus performantes.....  | 60 |
| I.8. Interprétation probabilistique des profils biochimique par le Bacterial identification program ..... | 60 |
| I.9. Optimisation de la production de lipase .....  | 61 |
| I.9.1. Effet de la période d'incubation.....  | 61 |
| I.9.2. Effet de substrat lipidique .....  | 61 |
| I.9.3. Effet de la source d'azote.....  | 61 |
| I.9.4. Effet du pH.....   | 61 |
| I.9.5. Effet des sources de carbone.....  | 62 |
| I.9.6. Influence de la concentration des substrats.....   | 62 |
| I.9.7. Optimisation de l'inoculum .....   | 62 |
| I.9.8. La production de la lipase dans le milieu optimisé.....  | 62 |
| I.9.9. Suivre de la cinétique de croissance .....   | 62 |
| I.9.10. Dosage des protéines .....  | 63 |
| I.9.11. Purification de la lipase.....  | 64 |
| I.9.11.1. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium.....   | 64 |
| I.9.12. Chromatographie .....   | 64 |
| I.10. Etude des propriétés catalytiques de lipase purifiée .....  | 65 |
| I.10.1. Effet de pH.....  | 65 |
| I.10.2. Effet de la température.....  | 65 |
| I.10.3. Etude de la thermostabilité .....   | 65 |
| I.10.4. Effet du pH sur la stabilité .....  | 65 |
| I.10.5. Effet des effecteurs chimiques sur l'activité lipolytique .....                                   | 65 |

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....** **66**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Résultats .....</b>  | <b>67</b> |
| I.1. Analyse physico-chimique des échantillons.....                | 67        |
| I.2. Isolement et purification des isolats .....                   | 68        |
| I.3. Caractérisation phénétique des isolats .....                  | 68        |
| I.3.1. Caractérisations culturelle et cellulaire des isolats ..... | 68        |

|   |     |
|---|-----|
| I.3.1.1. Aspect macroscopique .....   | 69  |
| I.3.1.2. Aspect microscopique .....   | 72  |
| I.3.2. Caractérisation physiologique des isolats .....                                  | 76  |
| I.3.2.1. Température de croissance .....  | 76  |
| I.3.2.2. Tolérance au NaCl et spectre de pH.....  | 76  |
| I.3.2.3. Utilisation des substrats carbonés .....                                       | 77  |
| I.3.3. Caractérisation biochimique des isolats.....                                     | 77  |
| I.3.3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires.....                                | 77  |
| I.3.3.2. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron.....                       | 78  |
| I.3.3.3. Test Mannitol-Mobilité .....   | 80  |
| I.3.3.4. Caractérisation du type fermentaire .....                                      | 80  |
| I.3.3.5. Recherche de la $\beta$ -galactosidase.....                                    | 80  |
| I.3.3.6. Recherche de l'uréase .....  | 80  |
| I.3.3.7. Utilisation du tryptophane.....  | 80  |
| I.3.3.8. Production de décarboxylases (LDC, ODC) et ariginine dihydrolase (ADH).....    | 80  |
| I.4. Screening secondaire des souches productrices de la lipase .....                   | 87  |
| I.4.1. Mesure de la zone d'hydrolyse .....  | 87  |
| I.4.2. MESURE DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE PAR TITRATION .....                             | 91  |
| I.5. Identification des souches lipolytiques par la galerie API 20 E et API 20 NE ..... | 92  |
| I.6. L'optimisation des paramètres de culture pour la production de la lipase .....     | 97  |
| I.6.1. Effet de la période d'incubation.....  | 97  |
| I.6.2. Effet des substrats lipidiques .....   | 97  |
| I.6.3. Effet de la source d'azote.....  | 98  |
| I.6.4. Effet du pH.....   | 99  |
| I.6.5. Effet de la source de carbone .....  | 100 |
| I.6.6. Influence de la concentration des substrats.....                                 | 100 |
| I.6.7. La concentration de l'inoculum .....   | 101 |
| I.6.8. La production de la lipase dans le milieu optimisé.....                          | 102 |
| I.6.9. La cinétique de croissance .....   | 102 |
| I.7. Purification de la lipase .....  | 103 |
| I.8. Propriétés catalytiques de la lipase purifiée .....                                | 105 |
| I.8.1. Effet du pH sur l'activité de la lipase .....                                    | 105 |
| I.8.2. L'effet de la température sur l'activité de la lipase .....                      | 105 |

|  |            |
|--|------------|
| I.8.3. Effet des solvants organiques .....       | 106        |
| I.8.4. Effet des surfactants sur l'activité..... | 107        |
| I.8.5. Effet des ions métalliques .....          | 107        |
| I.8.6. La stabilité enzymatique .....            | 108        |
| I.8.6.1. La thermostabilité.....                 | 108        |
| <b>II. Discussions.....</b>                      | <b>109</b> |

## **CONCLUSION GENERALE**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **WEBOGRAPHIE**

## **ANNAXES**

# Liste des figures

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Présentation de la réaction enzymatique, qui catalyse l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride (Jaeger et al., 1994 ; Benjamin et Pandey, 1998). .....                  | 10 |
| <b>Figure 2</b> : Présentation de la diversité des réactions catalysées par les estérases .....   | 14 |
| <b>Figure 3</b> : Présentation de la structure secondaire du repliement $\alpha/\beta$ des hydrolases .....   | 15 |
| <b>Figure 4</b> : Structure tridimensionnelle de la carboxylestérase monomérique du kiwi <i>Actinidiaeriantha</i> PDB 2o7r) (Ileperuma et al., 2007).....                                   | 16 |
| <b>Figure 5</b> : Conformations fermée (ruban bleu) et ouverte (ruban jaune) du volet chez différentes lipases.   | 20 |
| <b>Figure 6</b> : Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température et du pH (Morozkina et al , 2010) .....  | 38 |
| <b>Figure 7</b> : Classification des bactéries, selon leurs températures optimales de croissance (Vieille et Zeikus, 2001 ; Demirjian et al., 2001). .....                                  | 40 |
| <b>Figure 8</b> : Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA (Patrick, 2007).  | 41 |
| <b>Figure 9</b> : Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA (Patrick, 2007). .  | 42 |
| <b>Figure 10</b> : Localisation des Sources hydrothermales. A. Bouhnia; B. Rabi; .....  | 49 |
| <b>Figure 11</b> : Localisation des Sources hydrothermales. C. Bouhdjar; D. Debagh; E. Righa.....   | 50 |
| <b>Figure 12</b> : Présentation de la galerie API 20NE. ....  | 57 |
| <b>Figure 13</b> : Présentation de la galerie API 20E. ....   | 57 |
| <b>Figure 14</b> : Illustration de la culture en batch. ....  | 59 |
| <b>Figure 15</b> : Présentation de la méthode titrimétrique. ....   | 60 |
| <b>Figure 16</b> : Aspects macroscopique des souches isolées cultivées sur le milieu minimal à base de tween 80 et l'huile d'olive. ....  | 70 |
| <b>Figure 17</b> : (suite) Aspects macroscopique des souches isolées cultivées sur le milieu minimal à base de tween80 et l'huile d'olive. ....   | 71 |
| <b>Figure 18</b> : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). A. Coloration de Gram des souche souches.....  | 73 |
| <b>Figure 19</b> : La mise en évidence du test de catalase chez les souches : MO1,SH2-2,GH5 .....   | 78 |
| <b>Figure 20</b> : La formation des zones d'hydrolyse de l'huile d'olive et de tween 80 après 72 heures d'incubation à une température de 37°C chez certaines souches isolées.....          | 88 |
| <b>Figure 21</b> : (suite) La formation des zones d'hydrolyse de l'huile d'olive et de tween 80 après 72 heures d'incubation à une température de 37°C chez certaines souches isolées. .... | 89 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 22</b> : Illustration de l'activité enzymatique en présence de l'huile d'olive comme substrat chez les souches GH5,WO4,HR2,HB5,S5. ....            | 91  |
| <b>Figure 23</b> : Aspect de la galerie API 20E, inoculée par les souches :WO4, GH5, S5 après l'incubation à une température 30°C pendant 24 heures .....    | 92  |
| <b>Figure 24</b> : Aspect de la galerie API 20NE, inoculée par les souches : HB5, HR2, incubée à une température 30°C pendant 24 heures. ....                | 93  |
| <b>Figure 25</b> : Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche HB5 et la souche S5 Par le Bacterial Identification Program..... | 93  |
| <b>Figure 26</b> : Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche BH1Par le Bacterial Identification Program .....                 | 94  |
| <b>Figure 27</b> : : Capture d'écran du programme d'identification en ligne.....   | 95  |
| <b>Figure 28</b> : L'effet de la période d'incubation sur la production de la lipase chez les souches GH5 ,S5, WO4, HR2, HB5.....                            | 97  |
| <b>Figure 29</b> : L'effet de la source de carbone sur la production de la lipase chez les souches HR2, WO4, HB5, S5, GH5 .....                              | 98  |
| <b>Figure 30</b> : l'effet de la source d'azote sur la production de la lipase chez les souches performantes. ....   | 99  |
| <b>Figure 31</b> : L'effet du pH sur la production de la lipase chez les cinq souches performantes. ....   | 99  |
| <b>Figure 32</b> : l'effet de la source de carbone sur la production de la lipase chez les souches performantes .....  | 100 |
| <b>Figure 33</b> : L'effet de la concentration des substrats sur la production de la lipase chez les cinq souches .....                                      | 101 |
| <b>Figure 34</b> : L'effet de la concentration de l'inoculum sur la production de la Lipase chez les cinq souches (GH5, WO4, HR2, HB5, S5) .....             | 101 |
| <b>Figure 35</b> : La production de la lipase dans les milieux de cultures optimisés chez les cinq souches performantes .....                                | 102 |
| <b>Figure 36</b> : L'étude de la Croissance des cinq souches lipolytiques dans les milieux de culture optimisés. ....  | 103 |
| <b>Figure 37</b> : L'effet du pH sur l'activité de la lipase .....   | 105 |
| <b>Figure 38</b> : L'effet de la température sur l'activité de la lipase .....   | 106 |
| <b>Figure 39</b> : L'effet des solvants organiques sur l'activité de la lipase. ....   | 106 |
| <b>Figure 40</b> : L'effet des surfactants sur l'activité de la lipase. ....   | 107 |
| <b>Figure 41</b> : L'effet des ions métalliques sur l'activité de la lipase.....   | 108 |
| <b>Figure 42</b> : illustration de La thermostabilité de la lipase .....   | 108 |

# Liste des tableaux

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 1</b> : Présentation des microorganismes et des enzymes impliquées dans l'industrie alimentaire<br>(Duckworth et al., 1996) .....   | 25  |
| <b>Tableau 2</b> : Présentation de quelques applications biotechnologiques de lipases (Verger et al., 1985) ....   | 34  |
| <b>Tableau 3</b> : Les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés (Kristjansson<br>et hreggevidsson, 1995) .....  | 36  |
| <b>Tableau 4</b> : Présentation du code et d'échantillonnage.....  | 47  |
| <b>Tableau 5</b> : Valeurs de température et de pH enregistrées au niveau des points de prélèvements d'eau ..  | 68  |
| <b>Tableau 6</b> : Caractérisations culturale et cellulaire des isolats.....   | 74  |
| <b>Tableau 7</b> : Caractérisation physiologique des isolats .....   | 79  |
| <b>Tableau 8</b> : Utilisation des substances organiques.....  | 81  |
| <b>Tableau 9</b> : Caractérisation biochimique des isolats.....  | 84  |
| <b>Tableau 10</b> : Le criblage des souches productrices de la lipase par la formation de la zone d'hydrolyse<br>d'huile d'olive autour des colonies isolées, incubées à 37°C, pendant 72 h..... | 90  |
| <b>Tableau 11</b> : Identification probable des 59 souches isolées .....   | 96  |
| <b>Tableau 12</b> : illustration des étapes de la purification de lipase chez les cinq souches .....   | 104 |

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'accélération du développement des sociétés humaines et par conséquent des demandes en matières premières, en produits et biens de consommation a accentué cette exigence exercée sur les chercheurs afin d'innover de nouveaux procédés de production et d'améliorer les processus déjà existant. La biotechnologie a apporté à cette problématique des outils de développement indispensables aujourd'hui pour l'industrie et la recherche fondamentale là où les méthodes de chimie seules peinent à satisfaire les exigences environnementales et à assurer la rentabilité des procédés.

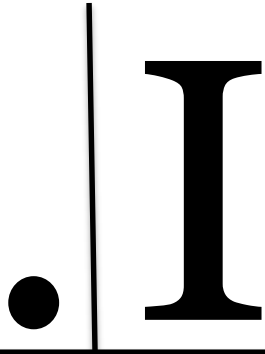
L'intérêt grandissant porté aux organismes extrêmophiles et aux applications biotechnologiques qu'ils recèlent tient beaucoup au fait qu'il s'agit d'une nouvelle frontière à explorer. En outre, les extrêmophiles nous amènent à réviser les connaissances de base en biologie. Ceci explique pourquoi le nombre d'études sur les microorganismes extrêmophiles ne cesse d'augmenter. Ces organismes « exotiques » se sont adaptés à vivre à des températures de plus de 100°C, à de basses températures au fond des mers polaires froides, à des pressions allant jusqu'à 110 MPa en mer profonde, à des valeurs très basses ou élevées de pH (pH 0-1 ou pH 10-11), ou à des concentrations très élevées en NaCl (35 %, p/v). Des récents développements prouvent clairement que les composants cellulaires des archées et des bactéries extrêmophiles sont uniques et fournissent une source valable de nouveaux biocatalyseurs et composés. Beaucoup d'enzymes industrielles sont exigées pour fonctionner dans des conditions extrêmes, il y a également une demande de plus en plus croissante en biocatalyseurs stables, utilisables en biotechnologie moderne. On s'attend à ce que les extrêmophiles et donc leurs composants cellulaires, jouent un rôle important dans les industries de produits chimiques, alimentaires, pharmaceutiques, de papier et de textiles mais aussi en biotechnologie environnementale (**Horvath et Horvath, 2002**).

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe ainsi des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sols désertiques et surtout les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment

qu'on a commencé à s'intéresser aux microorganismes habitants ces environnements locaux et les publications concernant le sujet sont encore très rares (**Kecha *et al.*, 2007 ; Bouanane-Darenfed *et al.*, 2011**). Pourtant l'étude des microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles indigènes à ces milieux hostiles à la vie peut aider à mieux exploiter cette importante source de molécules bioactives à des températures nettement plus élevées que celles d'organismes conventionnels, en particulier leurs enzymes. Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles aérobies hétérotrophes ont été isolées de plusieurs environnements et jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique (**Pinzón-Martínez *et al.*, 2010**). Les enzymes produites par ces organismes sont, extrêmement thermoactives, rigoureusement thermostables ayant même des activités à des températures dépassant les températures maximales de croissance de leurs organismes. Elles résistent souvent aux dénaturants chimiques tels que les détergents, les solvants organiques et les valeurs extrêmes de pH (**Antranikian *et al.*, 2005**). Les lipases sont des enzymes hydrosolubles capables d'effectuer l'hydrolyse des fonctions esters et sont spécialisées dans la transformation de triglycérides en glycérol et en acides gras (**Fickers *et al.*, 2004**). Elles sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par les bactéries Gram positive que par les bactéries Gram négative. L'intérêt des lipases microbiennes pour des applications en biotechnologie a pris un essor fulgurant dans les dernières années. Par conséquent, l'industrie nécessite des enzymes qui répondent aux critères d'utilisation, notamment au niveau de la thermostabilité et de la capacité à catalyser des réactions en conditions alcalines

Le principal objectif de ce travail est l'isolement, identification et caractérisation des bactéries thermophiles aérobies isolées à partir de sources thermales chaudes terrestres Algériennes et l'optimisation des paramètres impliqués dans la production de la biomasse et de la lipase extracellulaire chez les souches sélectionnées productrices de la lipase.

Ensuite, la purification de la lipase par précipitation au sulfate d'ammonium avec la chromatographie d'échange d'anion sur colonne DEAE de cellulose afin de caractériser quelques paramètres catalytiques de la lipase purifiée.



**CHAPITRE I : SYNTHSE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## PARTIE I :LES LIPIDES

### **I. LES LIPIDES**

#### **I.1. DEFINITION**

Le terme « lipide » sert à désigner une famille hétérogène de substances biologiques qui partagent la propriété d'être insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques comme le chloroforme, les hydrocarbures ou les alcools (**Gurr and James, 1971**).

#### **I.2. CLASSIFICATION DES LIPIDES**

En se basant sur leurs propriétés physico-chimiques en présence d'eau, les lipides sont classés en deux groupes « polaires » ou « apolaires » par **Small (1968)**.

##### **I.2.1. Lipides apolaires**

Les lipides apolaires sont totalement insolubles dans l'eau et ne s'étalent pas pour former des couches monomoléculaires stables à la surface de l'eau. On trouve dans cette catégorie les hydrocarbures, en particulier ceux à chaînes ramifiées ou insaturées ainsi que les composés terpéniques (comme par exemple le carotène, le limonène ou encore le squalène).

##### **I.2.2. Lipides polaires**

Les lipides polaires s'étalent à la surface de l'eau et forment des couches monomoléculaires. **Small** a subdivisé ce groupe en trois classes :

###### **➤ Lipides de classe I**

Il s'agit des lipides qui forment des films monomoléculaires stables à l'interface eau/air, mais ne présentent pas de phénomène de gonflement « swelling » (triglycérides, diglycérides, phytols, rétinols, vitamines A, K, et E, les cires et les stérols). Parce qu'ils ne sont pas chargés électriquement, les glycérides ainsi que le cholestérol et ses esters sont appelés lipides neutres.

###### **➤ Lipides de classe II**

Ce sont les lipides qui forment des films monomoléculaires stables à l'interface eau/air mais qui s'hydratent et gonflent pour former des phases lyotropes (cristallines liquides) bien définies (phospholipides, monoglycérides, acides gras). Ils peuvent former des bicouches lipidiques closes, sphériques concentriques séparées les unes des autres par

des couches d'eau, appelées liposomes. Ces liposomes sont visibles au microscope électronique.

➤ **Lipides de classe III**

Il s'agit des lipides polaires qui sont partiellement solubles dans l'eau et qui forment des films monomoléculaires instables à l'interface air/eau en équilibre avec des molécules à l'état monomérique dans la phase aqueuse. Lorsque leur concentration dépasse la concentration micellaire critique (CMC), ils s'organisent de manière à minimiser le contact entre leurs parties apolaires et le milieu aqueux, formant des micelles. On trouve dans cette catégorie les détergents cationiques, anioniques, non ioniques, ainsi que les lysophospholipides, les acides gras ionisés et les sels biliaires.

Une autre classification des lipides basée sur leurs structures divise les lipides en lipides simples, complexes, ou protéolipides. Les lipides simples sont composés d'acides gras et d'alcools (les acylglycérols, les éthers de glycérols, les stérols, les esters de stérols et les esters de cire). Les lipides complexes donnent trois produits ou plus quand ils sont hydrolysés (phospholipides, glycolipides, et sphingolipides). Des informations supplémentaires peuvent être trouvées dans la banque de données CYBERLIPID (<http://www.cyberlipid.org>).

Une classification plus récente des lipides basée sur leurs natures chimiques a été proposée par le groupe d'Edward Dennis. Cette classification divise les lipides en 8 sous-groupes : les acides gras (FA), les glycérolipides (GL), les glycérophospholipides (GP), les sphingolipides (SP), les stéroïdes (ST), les prénoïdes (PR) les saccharolipides (SL) et les polyketides (PK). Le but de cette classification est de faciliter la gestion des banques de données et de faciliter la communication entre les scientifiques. De nombreux lipides et leurs métabolites sont répertoriés dans la banque de données LIPIDMAPS (<http://www.lipidmaps.org>).

### I.3. AUTO-ORGANISATION DES LIPIDES EN PRESENCE D'EAU

Au contact avec l'eau, les lipides adoptent spontanément différentes organisations moléculaires dépendant de leur nature. On distingue :

#### I.3.1. Les films mono-moléculaires

Lors du dépôt à l'interface air-eau un lipide polaire, dissous dans un solvant organique volatil, il se forme, après évaporation du solvant, une monocouche de lipide. Les parties hydrophobes sont orientées côté air et les parties hydrophiles côté eau. Durant la compression isothermique d'un tel film, différentes phases lipidiques peuvent être observées. On distingue ainsi les films gazeux, les liquides expansés, les liquides condensés et les films solides. La pression de surface à partir de laquelle le lipide ne peut plus être comprimé est appelée pression d'affaissement ou « pression de collapse ». Au-delà de cette pression, le film n'est plus monomoléculaire, les molécules peuvent se chevaucher car la surface est saturée.

#### I.3.2. Les émulsions

L'émulsification en milieu aqueux d'un lipide de la classe I est un processus physicochimique qui provoque une augmentation considérable de la surface de contact lipide-eau. Ainsi, la surface d'une goutte d'huile initiale de 1 cm de diamètre est augmentée d'un facteur 10<sup>4</sup> au cours de l'émulsification en particules de 1 µm de diamètre. La vitesse d'hydrolyse des TG par les lipases dépend entre autre de leur degré d'émulsification. Les émulsions de TG purs dans l'eau ne sont en général pas stables et une coalescence est rapidement observée si une agitation mécanique n'est pas maintenue. Divers émulsifiants (ex. la gomme arabique) peuvent être utilisés pour stabiliser les émulsions. *In vivo*, les émulsions de TG sont stabilisées principalement grâce à la présence de phospholipides et de protéines amphiphiles.

#### I.3.3. Les liposomes

Les lipides de la classe II, qui présentent un phénomène de gonflement en phase aqueuse, forment des structures en bicouches lipidiques closes, sphériques et concentriques appelées liposomes. On distingue différentes formes de liposomes qui sont (**Lichtenberg et al., 1983**) :



(i) *Les liposomes multi-lamellaires « Multilamellar Large Vesicles » (MLV)*, obtenus par simple agitation de phospholipides en phase aqueuse. Ces structures, dont le diamètre est supérieur à 200 nm, renferment un volume important d'eau et sont utilisées pour piéger différents composés tels que les substances médicamenteuses qui seront véhiculées à travers le système circulatoire et dirigées, de manière plus ou moins spécifique, vers leur cible.

(ii) *Les liposomes uni-lamellaires de grande taille « Large Unilamellar Vesicles » (LUV)*, qui sont des macrovésicules de diamètre variant de 200 nm à 1000 nm. Les LUV sont préparées à partir d'une fine couche de phospholipides qui est lentement hydratée par une solution aqueuse dépourvue d'électrolytes.

(iii) *Les liposomes uni-lamellaires de petite taille « Small Unilamellar Vesicles » (SUV)*, qui constituent des microvésicules de phospholipides d'environ 25 nm de diamètre. Les SUV s'obtiennent par exemple par traitement aux ultra sons à partir des MLV.

#### **I.3.4. Les micelles**

Lorsque la concentration en lipides polaires de la classe III excède la CMC, ces lipides s'organisent de manière à minimiser le contact entre leurs parties apolaires et le milieu aqueux : ils forment alors des micelles. Les parties polaires s'orientent à la périphérie, du côté de la phase aqueuse, et les parties hydrophobes s'agrègent vers l'intérieur. Les solutions micellaires sont isotropes vis à vis de la lumière. Lorsque la concentration en lipide augmente, une anisotropie vis-à-vis de la lumière apparaît, suite à l'apparition de nouvelles phases appelées cristaux liquides (voir plus bas).

Lorsque les lipides polaires sont mis en suspension, en présence d'une faible quantité d'eau et d'un excès de solvant organique, ils forment des micelles dites « inverses » : les parties hydrophobes sont orientées en direction du solvant organique et les parties polaires vers la phase aqueuse piégeant ainsi dans le cœur de la micelle un microenvironnement aqueux. Les micelles sont en équilibre dynamique permanent, c'est-à-dire qu'il existe des échanges rapides des molécules amphiphiles d'une micelle à l'autre ainsi qu'avec les monomères présents dans le solvant environnant.

Les détergents peuvent former des micelles mixtes avec certains lipides polaires, comme les phospholipides et les produits d'hydrolyse des TG (MG et AG ionisés). C'est

ainsi qu'ils peuvent participer à la solubilisation micellaire des produits de lipolyse générés par les lipases digestives. *In vitro*, des micelles mixtes phospholipides-détergents (ex. Triton X-100)(**Dennis, 1973**) sont souvent utilisées comme substrat des phospholipases.

### **I.3.5. Les cristaux liquides**

Les cristaux liquides existent en équilibre avec les monomères libres en solution et les structures micellaires décrites précédemment. Dans certains cristaux liquides, on observe par exemple des structures hexagonales (la partie polaire des lipides tapisse de longs cylindres disposés suivant une symétrie hexagonale), cubiques ou lamellaires. Ces dernières sont composées de bicouches lipidiques planes (ressemblant aux membranes biologiques), intercalées entre différentes épaisseurs d'eau. Ces structures lamellaires peuvent se restructurer en vésicules ou liposomes (**Machy and Leserman, 1987**). Lorsque la concentration en lipides augmente encore plus, il peut se former un solide cristallin.

## PARTIE II : GENERALITES SUR LES LIPASES

### II. GENERALITE SUR LES LIPASES

#### II.1. DEFINITIONS ET CARACTERISTIQUES

Les carboxylestérases (Carboxyl ester hydrolase) comprennent deux groupes d'enzymes, à savoir non spécifiques estérases (E C 3.1.1.1) et les lipases (E C 3.1.1.3), différenciés sur la base de leur spécificité de substrat. Les estérases hydrolysent les solutions d'esters de chaîne acyl courte soluble dans l'eau et inactifs contre les triacylglycérols à longue chaîne insoluble dans l'eau (**Chahinian and Sarda, 2009**). Elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique, le cytosol de différents tissus et abondantes dans le foie. Elles manifestent une large spécificité en substrat tels que amides, esters, thioesters, hydrolysent un grand nombre de composés de différentes structures et jouent un rôle très important dans l'élimination des produits toxiques et xénobiotiques (**Gilhamand Lehner, 2005**).

Les lipases font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques, largement présentes chez les plantes et chez les animaux ainsi que chez les microorganismes (**Pabai, 1997**). Ces enzymes appartiennent au groupe des sérines hydrolases et exigent la présence d'aucun cofacteur pour leur activité (**Gargouri et al., 2008**).

**Jaeger** et ses collaborateurs (**2002**) ont rapporté que les lipases sont définies comme étant des carboxyle estérases qui catalysent l'hydrolyse et la synthèse d'esters formés de glycérine et des acides gras de longues chaînes.

Ces enzymes présentent une grande spécificité au substrat et dégradent souvent des esters du *p*-nitrophenyl de l'acyle, Tweens et phospholipides avec une sélectivité vis-à-vis de la position stéréo de la longueur de chaîne. Les lipases ressemblent aux estérases, se différencient par leur capacité d'agir sur les esters insolubles dans l'eau (**Bornsheur et al., 2002 ; Petersen and Daniel, 2006**).

Contrairement, aux estérases qui présentent un comportement cinétique de Michaelis, les lipases sont faiblement actives en présence d'une solution monomérique vraie d'esters. Lors de l'augmentation de la concentration du substrat, l'activité de la lipase est considérablement accrue avec un substrat insoluble (comme l'émulsion).

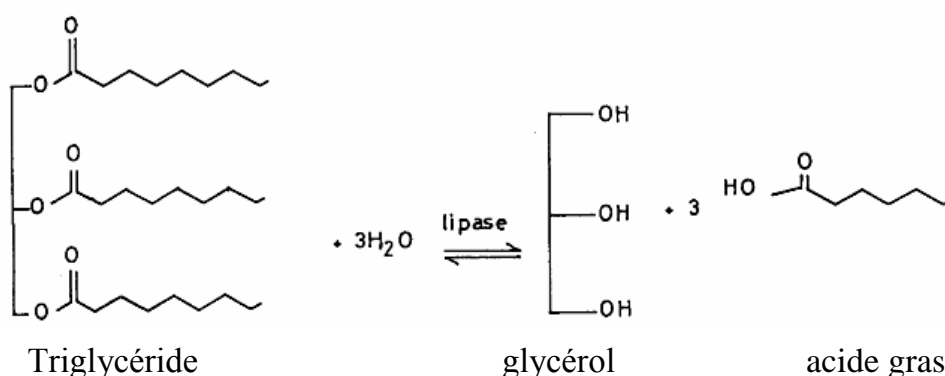
Les lipases ont été définies également comme une catégorie spéciale d'estérases efficaces dans l'hydrolyse de molécules agrégées (**Fickers *et al.*, 2008**).

Les lipases catalysent l'hydrolyse des liaisons esters formées par les acides gras et du glycérol (**Reis *et al.*, 2008**).

Les lipases sont également capables dans un milieu eau-solvant organique immiscible de catalyser dans une réaction réversible la synthèse, échangeuse de groupes d'esters et résolution de mélange racémique en alcools et acides optiquement actifs (**Figure 1**). Par ailleurs, certaines lipases sont capables d'hydrolyser les phospholipides, les esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques (**Pabai, 1997 ; Fickers *et al.*, 2008**). Au contraire, l'estérase est incapable d'attaquer les esters émulsifiés et agit au contraire sur les esters dissous (**Gilhamet Lehner, 2005**).

L'étude de cette classe d'enzyme a contribué à l'élaboration d'une enzymologie interfaciale, dont la réaction est produite en milieu hétérogène à l'interface huile-eau.

Les propriétés biochimiques de cette classe d'enzymes dépendent particulièrement de certains paramètres tels que le pH ou la force ionique (**Verger *et al.*, 1985**). Les lipases et les estérases caractérisées par leur stabilité et leur activité dans des solvants organiques sont des biocatalyseurs importants, particulièrement adaptés pour des applications industrielles (**Schmidt *et al.*, 2004**).



**Figure 1** : Présentation de la réaction enzymatique, qui catalyse l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride (Jaeger *et al.*, 1994 ; Benjamin et Pandey, 1998).

## II.2. ORIGINES DES LIPASES

Les lipases sont largement répandues dans la nature et jouent un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. Les lipases trouvées chez les invertébrés et les vertébrés sont rencontrées également chez de nombreux microorganismes, sous forme de protéines extracellulaires (Gilham et Lehner, 2005 ; Fickers *et al.*, 2008).

### II.2.1. Les lipases microbiennes

Les lipases microbiennes sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram (+) telles que celles de genres *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries Gram (-) telles que *Pseudomonas*. Elles sont également produites chez les levures appartenant au genre *Candida*, *Geotricum* et les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces* (Lawrence *et al.*, 1967).

Ces dernières années, les lipases microbiennes revêtent un intérêt particulier en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans de nombreux domaines (Sharma *et al.*, 2001). Les lipases microbiennes présentent de nombreuses avantages suite aux procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animal et se manifestent une grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont utilisées dans la production de nombreux produits commerciaux (Jaeger *et al.*, 1994 ; Jaeger et Eggert, 2002).

### II.2.2. Les cutinases

Les cutinases sont des enzymes produites par différents champignons pathogènes et phytopathogènes tels que *Fusarium solani*, l'agent responsable de la formation de mycétome chez l'homme et *Fusarium oxysporumradicis-lycopersici*, responsable de la pourriture de la racine et du collet chez de tomate et certaines céréales. Les cutinases sont des enzymes apparentes aux lipases et estérases avec une différence celle de l'absence d'activation interfaciale afin d'être efficaces. Les cutinases sont en quelque sorte le lien entre estérases et lipases (Fickers *et al.*, 2008).

Les cutinases sont capables de dégrader la cuticule des végétaux par clivage des liaisons esters des polymères de cutine et hydrolysent les triglycérides à courtes chaînes

d'acides gras avec une efficacité comparable à celle de lipase pancréatique (**Longhi et Cambillau, 1999**).

### **II.3. LIPASES COMME BIOCATALYSEURS**

Les lipases catalysent un grand nombre de réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification et les réactions d'alcoolyse et d'acidolyse. Cette particularité catalytique des lipases de diverses réactions en fonction le microenvironnement, leurs spécificités et leurs conditions de réactions, rend cette classe d'enzyme intéressante de point de vue industriel (**Fickers *et al.*, 2008 ; Reis *et al.*, 2008**).

Les lipases manifestent des capacités de réalisation de certaines réactions de synthèse telle que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que les réactions du transfert de groupement acyle d'un ester sur d'autres, nucléophiles tels que des amines ou des thiols (**Figure 2**) (**Alloue, 2008**).

#### **II.3.1. Réaction d'hydrolyse**

L'hydrolyse de triglycérides en acides gras et en glycérol constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles et des graisses. Elle permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras, ou employés dans des réactions d'estérification ou de transestérification (**Jaeger *et al.*, 1999 ; Alloue *et al.*, 2008**).

#### **II.3.2. Réaction de synthèse**

En plus de leur fonction naturelle d'hydrolyse, les lipases possèdent également la capacité de synthétiser des esters : la quantité d'eau du milieu détermine le type de la réaction favorisée. Dans les réactions d'estérification à l'aide de biocatalyseurs, l'eau est un produit de la réaction. A partir d'une certaine teneur, elle affecte l'équilibre de la réaction entraînant la réaction inverse : l'hydrolyse (**Jaeger *et al.*, 1994 ; Joseph *et al.*, 2007**).

#### **II.3.3. La transestérification**

La transestérification comprend trois réactions , l'interestérification, l'alcoolyse et l'acidolyse. Elle implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse) (**Reis *et al.*, 2008 ; Alloue *et al.*, 2008**).

### A) Interestérisation

Lors de la réaction d'interestérisation, un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras (**Jaeger et al., 1994**). Certaines huiles végétales, telles que l'huile de palme et l'huile d'amande douce, présentent des limites d'applications à cause de leur teneur élevée en acides gras saturés, associés aux maladies cardio-vasculaires. Pour élargir leur utilisation commerciale ces huiles végétales peuvent être modifiées physiquement (par fractionnement) ou chimiquement, par mélange avec d'autres huiles ou par traitement enzymatique (interestérisation). De telles modifications des huiles et des matières grasses permettent également aux industries de répondre à la demande des consommateurs en produits plus sains (**Alloue, 2008**).

L'utilisation des solvants en interestérisation nécessite une désodorisation du produit final, en revanche l'interestérisation enzymatique réalisée en absence de solvants organiques, constitue une très bonne alternative. De plus l'utilisation de lipases spécifiques des positions sn 1 et sn 3 des triglycérides, permet d'obtenir des produits avec des caractéristiques qui ne pourraient pas être obtenues par interestérisation chimique (**Alloue et al., 2008**).

### B) Alcoolyse

Alcoolyse est une réaction d'un ester avec un alcool monovalent tel que l'éthanol et butanol ou un alcool polyvalent tel que la glycérine pour produire un ester avec des différents groupes d'alkyl (**Alloue, 2008**).

### C) Acidolyse

Acidolyse est une réaction d'un ester avec un acide qui mène à un changement de groupe acyle (un groupe acyle est transféré à un acide gras) (**Gunstone F. D, 1999**).

|                     |  |               |  |
|---------------------|--|---------------|--|
| Hydrolyse           | $R_1\text{-COOR}_2 + \text{H}_2\text{O}$ | $\rightarrow$ | $R_1\text{-COOH} + R_2\text{-OH}$        |
| Estérification      | $R_1\text{-OH} + R_2\text{-COOH}$        | $\rightarrow$ | $\text{H}_2\text{O} + R_2\text{-COOR}_1$ |
| Acidolyse           | $R_1\text{-COOH} + R_2\text{-COOR}_3$    | $\rightarrow$ | $R_2\text{-COOH} + R_1\text{-COOR}_3$    |
| Alcoolyse           | $R_1\text{-OH} + R_2\text{-COOR}_3$      | $\rightarrow$ | $R_3\text{-OH} + R_2\text{-COOR}_1$      |
| Interestérification | $R_1\text{-COOR}_2 + R_3\text{-COOR}_4$  | $\rightarrow$ | $R_1\text{-COOR}_4 + R_3\text{-COOR}_2$  |

**Figure 2:** Présentation de la diversité des réactions catalysées par les estérases

## II.4. SEQUENCE, STRUCTURE ET MECANISMES D'HYDROLYSE

Au début des années 1980, les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées au point de vue biochimique (**Sexena *et al.*, 2003**).

Les lipases sont des enzymes très variables par leurs origines et leurs spécificités de substrats. Les lipases de faible poids moléculaires ont des tailles de 20-25 KDa tandis que celles de grands tailles ont des masses moléculaires de 60-65 KDa. Les premières structures cristallographiques publiées sont de lipases des champignon filamenteux *Rhizomucor miehei* et de lipase pancréatique humaine (**Fickers *et al.*, 2008 ; Winkler *et al.*, 1990**).

Bien que les séquences peptidiques montrent très peu des similitudes entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leur origine, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure tridimensionnelle (**Fickers *et al.*, 2008**).

### II.4.1. Les $\alpha$ / $\beta$ hydrolases

Le repliement  $\alpha$  /  $\beta$  est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases, l'acétyl choline estérase, la carboxypeptidase, la diène lactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase. Ces enzymes possèdent en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins  $\beta$  connectés par 6 hélices  $\alpha$  formant un repliement dit :  $\alpha$  /  $\beta$  (**Figure 3**).

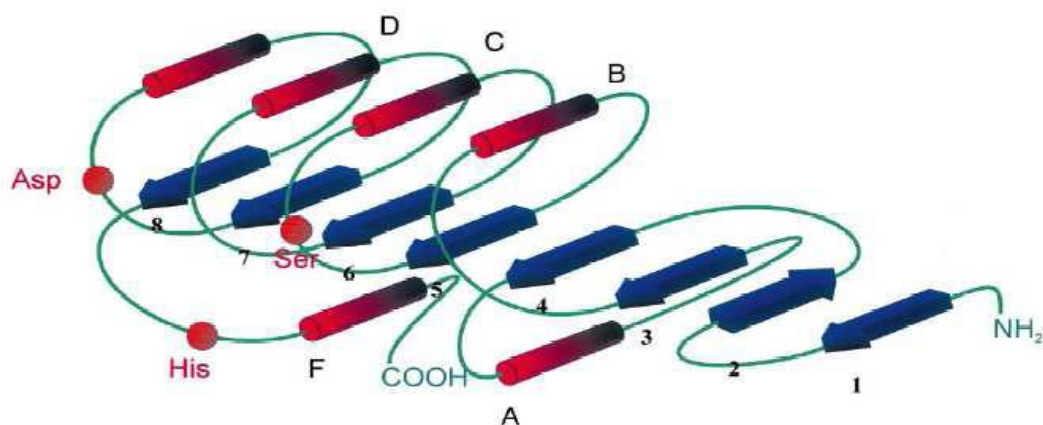
Autour de ce domaine central, se greffent diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme et de la spécificité de substrats. Le site catalytique des lipases est constitué d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (Asp, Glu), dont l'ordre d'apparition dans la séquence primaire est : SerAsp/Glu-His (**Garde, 2000 ; Lotti et Alberghina, 2002**).



De plus, la sérine catalytique est généralement incluse dans la penta peptide Gly-X1-Ser-X2-Gly où X1 et X2 représentent un acide aminé variable. Ce penta peptide est, en général, la seule portion de séquence peptidique conservée chez les lipases. La sérine catalytique est toujours située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C-terminale du 5<sup>ème</sup> brin $\beta$  et immédiatement suivi d'une hélice  $\alpha$ .

L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxyle-terminale du dernier brin de feuillet constituant le repliement  $\alpha/\beta$  tandis que l'acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7<sup>ème</sup> brin, sauf pour la lipase pancréatique où il est situé à l'extrémité du 6<sup>ème</sup> brin (Lotti et Alberghina, 2002 ; Fickers *et al.*, 2008).

Les feuillets  $\beta$  sont représentés par des flèches, les hélices  $\alpha$  par des cylindres et les traits correspondent aux boucles.

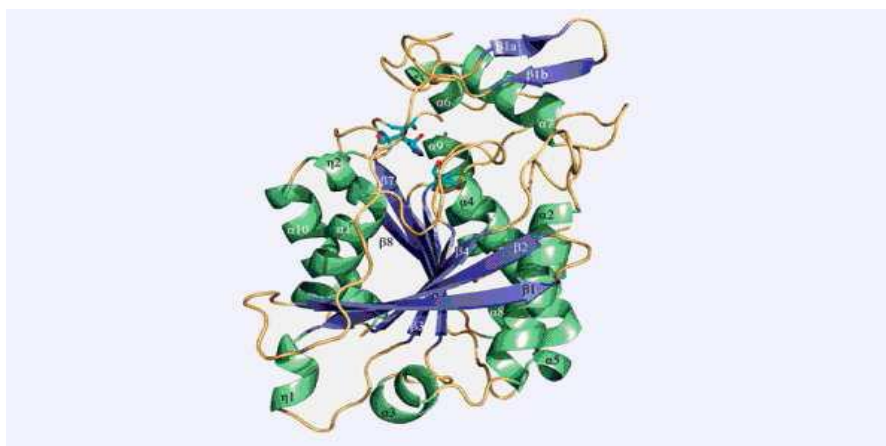


**Figure 3** : Présentation de la structure secondaire du repliement  $\alpha/\beta$  des hydrolases

Les brins (1 à 8) sont représentés par des flèches bleues et les hélices (A à F) par des cylindres rouges. Le positionnement relatif des acides aminés de la triade catalytique est indiqué par des points rouges.

L'utilisation des banques de donnée Data Bank (PDB) permet le recensement des protéines, dont les structures tridimensionnelles ont été élucidées. Les lipases, les carboxyl estérases comptabilisent respectivement 67 et 28 entrées. Il s'agit principalement d'enzymes d'origine microbienne ou animale. Les lipases, carboxyl estérases sont formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques: elles peuvent être monomériques, dimériques ou tétramériques. La Figure 4 illustre la structure tridimensionnelle récemment résolue de

la carboxylestérase du kiwi (**Ileperuma et al., 2007**). Les feuillets  $\beta$  sont représentés par des flèches bleues et les hélices  $\alpha$  par des formes hélicoïdales de couleur verte.



**Figure 4:** Structure tridimensionnelle de la carboxylestérase monomérique du kiwi (*Actinidia chinensis* PDB 2o7r) (Ileperuma et al., 2007).

#### II.4.2. La triade catalytique

Le site catalytique apparaît toujours sous la forme d'une triade hautement conservée : sérine /acide aspartique / histidine (Ser/Asp/His ou S/D/H). Pour chaque sous-famille d'hydrolases, l'ordre d'apparition de ces résidus aminés dans la séquence peptidique est fixe : le résidu nucléophile, *i.e.* la sérine, précède les deux autres résidus et se positionne après le feuillet  $\beta 5$ . Le résidu acide, l'acide aspartique, apparaît très souvent après le feuillet  $\beta 7$  et enfin, l'histidine se place toujours après le dernier feuillet (**Nardini et Dijkstra, 1999**). L'acide aspartique est parfois remplacé par un acide glutamique. C'est le cas pour les lipases de *Geotrichum candidum* (**Schrag et al., 1991**) et de *Candida rugosa* (**Grochulski et al., 1993; Mancheno et al., 2003**).

L'emplacement des résidus de la triade catalytique est précisé sur la Figure 5 par des ronds noirs, avec, dans l'ordre, de l'extrémité amine à l'extrémité carboxylique, le résidu nucléophile (sérine), le résidu acide (acide aspartique ou glutamique) et le résidu basique, l'histidine.

#### II.4.3. Le pentapeptide G-X-S-X-G

La sérine catalytique se situe au centre d'un penta peptide consensus Gly-X-Ser-X-Gly, où les résidus X correspondent à des acides aminés quelconques (**Ollis et al., 1992**). Ce pentapeptide, toujours intercalé entre un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ , se situe au niveau

d'une jonction anguleuse formant un « coude nucléophile » très réactif, situé à peu près au milieu de la chaîne peptidique. La sérine s'y trouve dans une conformation énergétiquement défavorable ( $\epsilon$ ) lui permettant de faire pointer sa chaîne latérale vers l'extérieur. On parle de conformation  $\beta$ - $\epsilon$ Ser- $\alpha$  (**Derewenda, 1991; Ollis *et al.*, 1992; Cygler *et al.*, 1993**). Cet emplacement fait de la sérine un résidu accessible au substrat et aux molécules d'eau. La région autour du pentapeptide présente une relative conservation. D'après la base de données PROSITE qui répertorie les motifs fonctionnels significatifs des protéines, la sérine catalytique (en gras souligné) des carboxylestérases est incluse dans la séquence consensus F-[GR]-G-X(4)-[LIVM]-X-[LIV]-X-G-X-S-[STAG]-G. Le même résidu chez les lipases figure au sein de la séquence consensus suivante : [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-**S**-XG-[GSTAC].

#### **II.4.4. La présence d'un volet amphiphile**

La triade catalytique des lipases est souvent non accessible au solvant, à tout substrat potentiel. Elle est protégée par une structure amphiphile appelée lid ou volet constituée d'une dizaine à une quarantaine de résidus. Cette conformation structurale de la protéine en solution est appelée « conformation fermée de l'enzyme », supposée par conséquent « inactive ». Dans cette conformation, les chaînes latérales hydrophobes des résidus acides aminés sont dirigées vers la cavité catalytique et les chaînes latérales hydrophiles sont au contact du solvant. Suite au contact avec une interface lipidique, des changements conformationnels profonds ont lieu. Le substrat aura alors accès au site actif et le trou de l'oxyanion est formé. La face hydrophobe du volet amphiphile, orientée auparavant vers l'intérieur du site actif, s'expose au solvant, créant une surface non polaire à l'entrée du site actif dont on suppose qu'elle interagit avec l'interface huile/eau. Cette forme de la protéine est alors dite « ouverte » ou « active » de l'enzyme. Les changements conformationnels majeurs concernent principalement le volet amphiphile mais aussi parfois des boucles voisines et quelques résidus particuliers, impliqués notamment dans le trou de l'oxyanion. Certaines enzymes sont capables d'hydrolyser les TG à chaînes longues, mais ne possèdent pas de volet.

Le volet joue divers rôles dans le mode d'action des lipases. Son implication dans l'adsorption des lipases aux interfaces lipidiques a été étudiée par mutagenèse dirigée. Le changement conformationnel de la lipase vers sa forme ouverte permet non seulement de

libérer le site actif, mais aussi d'exposer une surface hydrophobe autour de ce site actif favorable aux interactions avec l'interface lipidique (**van et al., 2001**). En plus, le volet joue parfois un rôle dans le mécanisme catalytique des lipases. Dans la structure ouverte de la TIL, le résidu Trp 89 qui fait partie du volet s'est avéré en contact direct avec la chaîne acyle de l'analogue de substrat lié au site actif (**Martinelle et al., 1996**). Suite à une délétion du volet par mutagenèse, cette lipase devient inactive, indiquant que ce dernier est essentiel dans la catalyse (**Svendsen, 2000**). Par contre, une substitution du lid de la HPL par un mini-lid (18 résidus sont délétés du lid) ne supprime pas son activité sur trioctanoïne et ne modifie pas son adsorption à l'interface. L'addition du volet de 23 acides aminés de la HPL chez GPLRP2 qui possède une courte boucle de 5 acides aminés à la place permet cependant de moduler la spécificité du substrat : GPLRP2 perd son activité PLA1 mais conserve son activité lipase (**Carrière et al., 1997**).

#### **II.4.5. Etude des changements conformationnels des lipases**

Les changements conformationnels sont étudiés par des méthodes cristallographiques et spectroscopiques.

##### **II.4.5.1. Méthodes cristallographiques**

Les changements conformationnels des lipases sont mis en évidence par cristallisation des lipases sous leur forme fermée, et sous leur forme ouverte, en présence d'inhibiteur, d'analogue de substrat ou de détergent. L'utilisation d'inhibiteurs de lipases capables de se lier de façon covalente à la sérine catalytique permet de mimer l'intermédiaire tétraédrique formé pendant la réaction enzymatique par la répartition de ses charges, et d'obtenir la lipase sous une conformation ouverte.

##### **➤ Types de mouvement du volet**

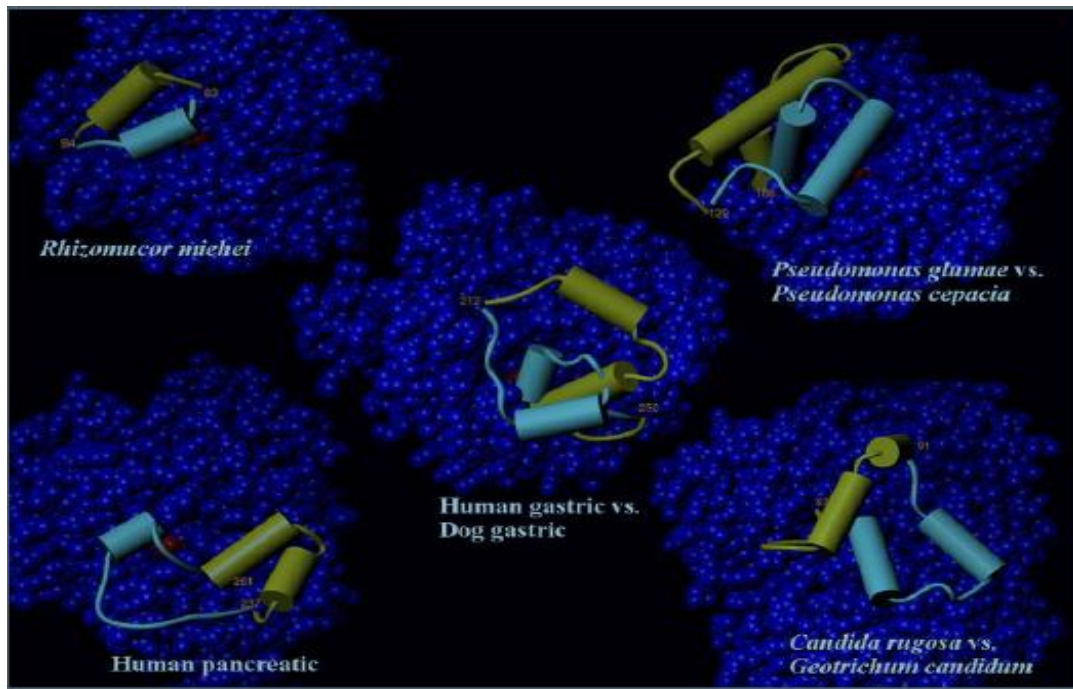
Les modifications de la structure de lipases cristallisées sous formes fermée et ouverte sont très variables. Ce mouvement qui se fait autour de zones charnières plus ou moins bien définies peut être :

- ☞ Un mouvement simple de corps rigide (cas de la RmL et de la TLL). Les volets de ces deux lipases (31,7% d'identité de séquence en acides aminés entre les deux lipases) sont constitués chacun d'une courte hélice amphiphile maintenue au-dessus du site actif par des contacts hydrophobes. Les

structures ouvertes, obtenues avec des inhibiteurs de lipases comme l'hexyléthylchlorophosphonate et le diéthyl p-nitrophényl phosphate (E600) (Brzozowski *et al.*, 1991; Derewenda *et al.*, 1992a), montrent que l'hélice du volet bascule autour d'une région charnière, avec un déplacement de résidus de l'hélice d'une distance moyenne de 12 Å.

Le volet effectue une rotation de 167° autour d'un axe formé par les régions charnières (Résidus 83-84 du côté N-terminal et 91-95 du côté C-terminal). L'axe autour duquel se fait la rotation est parallèle à celui de l'hélice du volet (Figure 5).

- ☞ Un mouvement complexe qui s'accompagne d'une réorganisation des structures secondaires au niveau du volet (cas de la HPL, de la lipase gastrique, de la lipase de *Pseudomonas cepacia* « PcL » et de la lipase de *Candida rugosa* « CrL »). La structure ouverte de la CrL a été comparée à la structure fermée de la lipase de *Geotrichium candidum* (40% d'identité de séquences en acides aminés entre les deux lipases). Le mouvement du volet de la CrL s'effectue autour de deux résidus charnières Glu66 et Pro92 et se caractérise par une isomérisation cis-trans de la liaison peptidique Tyr91-Pro92 (Costas *et al.*, 2004). Dans le cas de la lipase pancréatique, le volet contient dans sa conformation fermée une courte hélice flanquée par deux fragments étendus. Lorsque le volet est ouvert, il est formé de deux petites hélices séparées par des boucles courtes (Figure 5).



**Figure 5 :** Conformations fermée (ruban bleu) et ouverte (ruban jaune) du volet chez différentes lipases.

Dans le cas des lipases de *Pseudomonas*, les conformations fermées et ouvertes du volet sont obtenues avec les lipases de *Pseudomonas glumae* et de *Pseudomonas cepacia*, respectivement. Dans le cas des lipases fongiques homologues de *Geotrichum* et de *Candida*, les conformations fermée et ouverte du volet sont obtenues avec les lipases de *Geotrichum candidum* et de *Candida rugosa*, respectivement. Dans le cas de la lipase gastrique, les conformations fermée et ouverte sont obtenues avec la HGL et la rDGL, respectivement. La sérine catalytique est montrée en rouge (Aloulou *et al.*, 2006).

## II.5. CARACTERISTIQUES CINÉTIQUES

### II.5.1. Spécificité des lipases

La spécificité d'action des lipases par rapport aux triacylglycérols fait appel à trois notions différentes :

#### II.5.1.1. La typosélectivité

La typosélectivité ou spécificité par rapport à un type d'acide gras donné, les lipases peuvent être également spécifiques vis-à-vis de l'acide gras. La lipase de *Geotrichum candidum* est spécifique des acides cis-9 insaturés, et ceci quelque soit leur position sur le

glycérol. et celle de *Penicillium requeforti* est spécifique des acides gras à courte chaîne (Schrag et Cygler, 1993 ; Davranov et Khalameiser, 1997 ; Najar, 2010 ; Fickers *et al.*, 2008).

### II.5.1.2. La régiosélectivité

La régiosélectivité ou spécificité de position ; qui représente le pouvoir d'hydrolyser préférentiellement les esters primaires (en position externe sn-1 ou sn-3) ou secondaires (en position interne sn-2) des triacylglycérols (Muralider *et al.*, 2002). La lipase pancréatique humaine (HPL), la lipase pancréatique porcine (PPL) et la lipase de *Rhizopus arrhizus* (RAL) sont ainsi régiosélectives vis-à-vis des esters d'alcools primaires en position sn-1 et sn-3 des triglycérides (Demirjian , 1999). Les lipases de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus acnes* et de *Chromobacterium viscosum* hydrolysent indifféremment les positions sn-1, sn-2, sn-3 tandis que celles de *Pseudomonas geniculata* et de *P. fragi* sont spécifiques de la position sn-1 et sn-2. Les lipases de *Pseudomonas glumae* et de *Pseudomonas fluorescens* semble quant à elles être spécifiques de la position sn-2 (Fickers *et al.*, 2008). L'hydrolyse de groupements esters en position sn-2 est catalysée par très peu d'enzymes et seule la lipase de *Candida antarctica* a montré une préférence nette pour cette position (Schrag et Cygler, 1993).

Certaines lipases hydrolysent indifféremment tous types de liaisons esters des triglycérides, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. Ce sont par exemple les lipases de *Penicillium expansum* et de *P. cepacia* ( Alloue *et al.*, 2008 ; Fickers *et al.*, 2008).

### II.5.1.3. Enantiosélectivité

L'énantiosélectivité c'est la capacité d'une lipase à discriminer entre deux énantiomères d'un mélange racémique, dans le cas d'une molécule chirale (par exemple des triacylglycérols comportant trois acides gras différents) (Bornsheur *et al.*, 2002). Dans le cas de molécules prochirales (triacylglycerols comportant trois acides gras identiques), la stéréosélectivité représente la capacité de discriminer un groupement stéréo hétérotopique mais homomorphique par rapport à l'autre (positions sn-1 contre sn-3) (Vergier et de Haas, 1976 ).

## II.6. CLASSIFICATION DES ENZYMES LIPOLYTIQUES

Les enzymes sont généralement classées en fonction de leurs propriétés biochimiques (spécificité de substrat, stéréosélectivité, pH optimal, température optimale, stabilité dans les solvants). L'inconvénient de cette approche est qu'elle ne permet pas de tenir compte de toutes les protéines figurant dans les bases de données, en raison du temps que requiert la validation expérimentale. Les enzymes peuvent aussi être classées d'après les homologues de séquences établies par des alignements et des analyses phylogénétiques. L'intérêt de cette seconde approche est qu'elle peut être appliquée à l'ensemble des données.

La classification des enzymes lipolytiques a toujours été complexe en raison des particularités de ces enzymes. En effet, les estérases se singularisent par leur diversité fonctionnelle, par l'étendue de leur spécificité de substrat et leur faible homologie de séquence. Les lipases, par exemple, partagent quatre signes distinctifs : une triade de résidus formant le site actif, un mécanisme d'activation interfaciale, un volet amphiphile et la capacité de catalyser l'hydrolyse des acylglycérols à longues chaînes. Mais toutes les lipases ne possèdent pas ces quatre caractéristiques simultanément. De surcroît, aucune de ces caractéristiques ne constitue à elle seule un critère suffisant pour classer une enzyme dans la famille des lipases.

D'autres enzymes, comme les protéases à sérine (**Kraut, 1977; Craik *et al.*, 1987**) et les cutinases (**Martinez *et al.*, 1994; Longhi et Cambillau, 1999**), possèdent également la triadecatalytique S/D/H. La cutinase de *Fusarium solani* peut hydrolyser des triacylglycérols à courtes et longues chaînes (**Mannesse *et al.*, 1995**).

En 1998, Schmid et Verger suggèrent qu'il est plus approprié de classer une enzyme parmi les lipases selon qu'elle hydrolyse ou non des acylglycérols à longues chaînes (**Schmid et Verger, 1998**). La lipase de *Bacillus subtilis* est une enzyme de 19,3 kDa, qui ne possède pas de volet amphiphile et ne montre pas d'activation interfaciale aux interfaces eau/lipides. Cette enzyme exerce un maximum d'activité hydrolytique sur les esters de glycérol et d'acides gras à chaîne de longueur moyenne (C8). Néanmoins cette enzyme se classe au sein de la famille des lipases car elle catalyse aussi l'hydrolyse d'esters de glycérol et d'acides gras à longues chaînes (**Van Pouderooyen *et al.*, 2001**).



Toutes ces exceptions rendent la classification des lipases délicate et aujourd'hui, un certain nombre de classifications repose essentiellement sur les homologies de séquences. En 1999, **Arpigny** et **Jaeger** ont réparti en huit familles les enzymes lipolytiques bactériennes sur la base d'homologies de séquence (**Arpigny et Jaeger, 1999**).

## II.7. LES LIPASES MICROBIENNES

### II.7.1. Microorganismes producteurs de lipases

De nombreux microorganismes sécrètent des lipases dans le milieu de culture. **Janda et ses collaborateurs (2005)** ont criblés 1229 bactéries, levures, actinomycètes et champignons sur des plaques d'agar contenant de l'huile de Soja et de la rhodamine B et ils ont trouvé qu'environ 25 % de ces microorganismes présentent une activité lipolytique. La présence de lipases chez de nombreux micro-organismes leur permet d'utiliser des «sources non-conventionnelles » de carbone comme les triglycérides ou d'autres lipides contenant des liaisons ester (**Sharma et al., 2001 ; Najjar, 2010**). Quelques exemples de microorganismes lipolytiques sont rassemblés et regroupés dans le **Tableau 1**. *Yarrowia lipolytica* est généralement considérée comme l'espèce de levure la plus lipolytique. Trois lipases ont été isolées chez cette espèce ; Une est exocellulaire et deux sont liées à la paroi. La production de ces trois lipases est induite par l'acide oléique. Elles ont une activité optimale à pH 8 et à 37°C suivant les levures ces systèmes enzymatiques sont capables d'hydrolyser spécifiquement des acides gras de longueurs différentes (**Garde, 2000 ; Alloue, 2008**). La production de lipases extracellulaires peut être constitutive comme pour *Calvatia gigantea*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger* et *Rhodotorula aglutinis*, mais elle peut aussi être induite par des substrats lipidiques comme chez *Candida rugosa*, *Geotrichium candidum* et *Yarrowia lipolytica* (**Najjar, 2010**).

Dans le passé, la sélection et l'isolement des microorganismes producteurs de lipases à partir des échantillons du sol ou d'autres matières biologiques a été portée le plus fréquemment dans un milieu solide contenant des triglycérides simples comme substrat, L'activité lipasique a été détectée par des zones claires due à l'hydrolyse de triglycérides (**Pabai, 1997**).

D'autres méthodes de criblages font l'usage des méthodes titrimétriques (**Loperena et al., 2008**). Screening de l'activité lipasique utilisant milieu solide qui contient le tween

80 en combinaison avec Nile-bleu a aussi été décrit (**Sharma *et al.*, 2001**). Récemment, le système de criblage utilisant des substrats chromogènes a été décrit (**Sentaniello *et al.*, 2006**). Cependant, ces systèmes de screening ne détectent pas toujours des lipases à partir de consortiums. De plus, quelques-uns de ces substrats ne sont pas convenables de détecter les lipases vrais parce qu'ils sont aussi hydrolysés par des estérases. La Rhodamine B a été employée pour le criblage des lipases bactériennes par UV (**Koukeret Jaeger, 1987**).

Le nom des lipases microbiennes est généralement identique à celui du microorganisme qui produit la lipase en question. Vu que la classification des microorganismes peut changer à l'issue de nouvelles découvertes taxonomiques, le nom des lipases microbiennes a souvent été modifié. A titre d'exemple, la lipase de *Pseudomonas fluorescens* est devenue lipase de *Pseudomonas cepacia*. La lipase d'*Humicolalanuginosa* est devenue lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Celle de *Candida cylindracea* est devenue lipase de *Candida rugosa*. Les lipases de la famille *Rhizopusniveus*, *delemar* et *javanicusse* sont avérés être les mêmes et sont maintenant renommées *Rhizopus oryzae* vu leur identité de séquence, à un acide aminé près.

**Tableau 1** : Présentation des microorganismes et des enzymes impliquées dans l'industrie alimentaire (Duckworth et al., 1996)

| <i>Bactéries</i>                   | <i>Enzymes</i>                             |
|------------------------------------|--|
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>  | Amylase                                    |
| <i>Licheniformis</i>               | Glucanase                                  |
|                                    | Protéase                                   |
| <i>Coagulans</i>                   | Glucose isomérase (E) Glucose isomérase(E) |
| <i>Actinomycetesactinoplanessp</i> | Glucose isomérase(E)                       |
| <i>Streptomycessp</i>              | Pénicilline acylase(E)                     |
| <i>Escherichia coli</i>            | Amylase                                    |
| <b>Champignons filamenteux</b>     | Protéase acide                             |
| <i>Aspergillus oryzae</i>          | Lactase                                    |
|                                    | Glucanase                                  |
|                                    | Cellulase                                  |
| <i>niger</i>                       | Amyloglucosidase                           |
|                                    | Glucose oxydase                            |
|                                    | Pectinase                                  |
|                                    | Catalase                                   |
|                                    | Lipase                                     |
|                                    | Amyloglucosidase                           |
| <i>Rhizopus</i>                    | Protéase acide                             |
|                                    | Protéase acide                             |
|                                    | Estérase                                   |
| <i>Mucor pusillus</i>              | Invertase(E)                               |
| <i>Miehei</i>                      | Lactase (E)                                |
| <b>Levure</b>                      | Lactase (E)                                |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    |  |
| <i>Kluyveromyceslactis</i>         |  |
| <i>Kluyveromycesfragilis</i>       |  |

### II.7.2. Classification des lipases bactériennes

Les lipases microbiennes ont été regroupées en plusieurs sous-familles sur la base de leurs séquences en acides aminés ainsi que des propriétés biologiques fondamentales (Kanwar et al., 2006). Cette classification permet de prédire les caractéristiques structurales comme les résidus du site catalytique ou la présence de ponts disulfures, le mécanisme de sécrétion et l'exigence d'une protéine chaperonne spécifique à certaines lipases, et les relations potentielles avec d'autres familles d'enzymes (Lotti et Alberghina, 2002). Elle permet aussi une identification plus facile et plus rapide de nouvelles enzymes

lipolytiques microbiennes (**Najjar, 2010**). Cependant la découverte constante de nouvelles lipases ainsi que leurs caractérisations conduiront à l'évolution de cette classification. Récemment, l'analyse de la relation séquence structure fonction de 1367 séquences protéiques correspondant aux 806 lipases répertoriées dans la base de données *LED (lipase Engineering Database)* à permis de les classer en 16 super familles et 38 familles homologues (**Lotti et Alberghina, 2002 ; Fickers et al., 2008**). Dans cette banque de données sont intégrées des informations sur la séquence, la structure et la fonction des lipases, des estérases et des protéines apparentées (**Jaeger et al., 1999 ; Najjar, 2010**) (**Tableau 2**).

➤ **La famille I** : elle comprend un total de 22 membres divisé en 7 sous-familles (**Jaeger et Eggert, 2002**).

Les sous familles :

- **I-1 et I-2** : les lipases de *Pseudomonas* de groupe I et II sont codées ensemble dans un opéron avec leur analogue chaperonne intra moléculaire qui ont été désignés *Lif (lipase spécifique foldases)* (**Jaeger et al., 1994**).

Ces lipases sont secrétées via le chemin de type II tandis que ceux appartenant à la sous-famille I-3 utilisent le chemin de sécrétion de type I (**Arpigny et Jaeger , 1999**).

Les lipases de *Bacillus* regroupées en sous-famille I-4 sont les plus petites connues avec une masse moléculaire de 19.6 KDa. Elles semblent être bien adaptées pour les applications de la biotechnologie c'est comme la lipase de *B. thermocatenulatus* appartenant à la sous-famille I-5 (**Castro-ochoa et al., 2005**). La lipase de *Staphylococcus hyicus* et *S. aureus* appartiennent aux meilleures lipases provenant des bactéries Gram positives (**Jaeger et al., 1999**).

➤ **La famille II** : elle a été décrite auparavant comme une nouvelle famille des enzymes lipolytiques avec une fonction inconnue. **Jaeger et al., 1993** ont ajouté à cette famille l'estérase qui est située dans la membrane externe de *P. aeruginosa*.

➤ **La famille III** : Les membres de famille III contiennent les lipases extracellulaires de *Streptomyces* sp. et la souche psychrophile de *Moraxella* sp. (**Sommer et Bormann, 1997**).

➤ **La famille IV** : Les membres de cette famille appartiennent au groupe de lipases de bactéries psychrophiles adaptées au froid (*Moraxella sp*, *Pseudomonas sp*) (**Young et Fielding, 1992**). Leurs lipases montrent une similitude aux lipases de mammifères sensibles aux hormones.

➤ **La famille V** : présente des analogies structurelles aux : déhalogénases, haloperoxydases et époxydes hydrolases, qui exprime probablement le pli  $\alpha/\beta$  hydrolases comme une caractéristique de structure tertiaire .

➤ **La famille VI** : Elle classe les estérases qui ont été identifiées à partir de séquences génomiques (*Synevhocystissp*, *chlamydia trachomatis*). Ces petites protéines sont probablement situées dans le cytoplasme bactérien avec une similarité au lysophospholipases de mammalien (**Jaeger et al., 1999**).

## II.8. APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES ENZYMES LIPOLYTIQUES

Les lipases sont classées après les protéases et les glycosidases dans le commerce des enzymes et occupent **5 %** de ce marché. Les développements dans la purification, l'identification, la caractérisation, et la classification des lipases, ainsi que dans le domaine de l'expression de protéines, ont rendu possible la production de quantités élevées de lipase et leur utilisation comme biocatalyseurs dans des applications biotechnologiques modernes, comme dans l'industrie pharmaceutique (biosenseurs, substituants d'enzymes endogènes) l'industrie chimique (cosmétique, cuir, papier, détergents, oléochimie, production de monoglycérides), les sciences biomédicales, la bioremédiation, l'industrie alimentaire et laitière (**Bornscheuer et al., 2002b**). Cependant, il reste toujours difficile de définir le biocatalyseur le plus adéquat et le plus efficace pour chaque application. Ainsi, certaines applications des lipases restent limitées par rapport au potentiel d'implication biotechnologique de ces lipases, à cause du manque de stratégies d'optimisation des réactions, du manque de stratégies coût-bénéfice de production d'enzymes, de l'hétérogénéité des préparations de lipases et l'absence de lipases ayant des propriétés particulières demandées pour certaines applications (**Priest et al., 1988**). Les stratégies d'optimisation adaptées pour une lipase ne peuvent pas la plupart du temps être appliquées pour d'autres lipases ou d'autres réactions (**Bornscheuer et al., 2002b**). Parmi ces stratégies, l'immobilisation (**Alloue et al., 2008**), l'optimisation des conditions de la réaction et la mutagenèse dirigée, permettent d'améliorer la stabilité et/ou la spécificité de

l'enzyme. White et White ont listé 34 lipases commerciales de 34 sources différentes, dont 18 sont d'origine fongique et 7 d'origine bactérienne. Parmi ces lipases, celles de *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*), *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Burkholderia cepacia*, (*Pseudomonas cepacia*), *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, and *Candida rugosa* sont les plus utilisées en biotechnologie. Certaines lipases ont été commercialisées par plusieurs companies comme la lipase de *C. rugosa* commercialisée par Amano, BDH, Biocatalysts, Roche (Boehringer Mannheim), Fluka, Genzyme, Meyto-Sangyo et Sigma.

Les lipases microbiennes sont souvent perçues comme une des plus importantes classes d'enzymes pour le monde industriel. Cet intérêt provient principalement du fait d'une part, que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypique, et que d'autre part les technologies à mettre en œuvre pour les produire sont relativement simple (**Singh et Mukhopadhyay, 2012**). Elles présentent une large gamme de spécificité de substrat et une grande énantio sélectivité. Leurs domaines d'applications sont donc très vastes et variés. Quelques applications de l'utilisation des lipases sont résumées dans le **Tableau 2**.

### II.8.1. Les lipases en tant qu'hydrolases

#### ❖ Applications dans l'industrie agro-alimentaire

Un grand nombre d'applications hydrolytiques additionnelles ont été décrites pour les lipases microbiennes, y compris le développement de saveur pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat du lait et bonbons), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acides gras ; ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur (**Najjar, 2010**). Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie et dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries (saucissons, salamis) (**Hasan et al., 2006**).

Un des domaines d'application concerne le développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré-gastrique ou microbienne) qui accélèrent le développement d'arômes lors de la maturation de fromages. L'hydrolyse de la matière grasse conduit, en fonction

de la spécificité de l'enzyme utilisé, à la libération d'acides gras à courte chaîne (C4-C6) ou à plus longue chaîne (C12-C14), ce qui donne des arômes plus au moins forts au produit. Les lipases sont également utilisées dans l'inter estérification d'huile et de graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés de synthèse chimique conventionnels (**Sharma et al., 2001 ; Fickers et al, 2008**).

#### ❖ Applications dans les détergents

Les taches d'huile et de graisse ont toujours été difficiles à enlever. Souvent, on n'y parvenait qu'en cuisant le linge. Mais bon nombre de textiles modernes doivent être lavés à températures modérées, ce qui rend la tâche plus ardue encore. Les lipases apportent une aide précieuse dans ce domaine. Leur utilisation dans les détergents (Lessives ménagères) est le champ d'application le plus important des lipases (**Jaeger et Reetz, 1998 ; Najjar, 2010**). Elles sont capables, en effet, de fragmenter en petites particules les taches de graisse, par exemple de rouge à lèvres, de beurre, d'huile et des produits de beauté. Le bain de lessive pourra ensuite évacuer ces particules (**Sharma et al., 2001 ; Fickers et al., 2008**).

L'utilisation des lipases dans les détergents (e.g. lessives ménagères) est le champ d'application le plus important des lipases. La vente d'enzymes a dépassé les deux milliards de dollars (**Krishna, 2005**) et environ 30 % de cette somme provient de la vente d'enzymes utilisés pour la fabrication des détergents. Les protéases représentent la plus grande partie de ce marché mais la vente de lipases est en augmentation constante. La lipase de *T. lanuginosus*, la Lipolase<sup>TM</sup>, fut la première lipase recombinante commercialisée par Novo Nordisk en 1988. En 1995, deux autres lipases ont fait leur apparition : Lumafast<sup>TM</sup>, produite par *Pseudomonas mendocina*, et Lipomax<sup>TM</sup>, provenant de *Pseudomonas alcaligenes*, toutes les deux commercialisées par Genencor International. Les lipases utilisées dans les détergents doivent posséder un large spectre de substrats (être peu sélectives) et être capables de tolérer les conditions de lavage telles que des valeurs de pH entre 10 et 11, ainsi qu'une température oscillant entre 30°C et 60°C. Ces enzymes doivent également résister aux effets dénaturants et/ ou inhibiteurs des composés chimiques (e.g. détergents) constituant les lessives, et à la dégradation protéolytique par les protéases contenue dans la formulation de celles-ci. Une fois que les lipides sont partiellement ou totalement hydrolysés par l'enzyme, il devient plus facile de les extraire du tissu lavé. Pour

la plupart des lipases utilisées dans les lessives, l'effet de l'enzyme est plus important après plusieurs cycles de lavage. La raison est que, dans le cas de la Lipolase<sup>TM</sup>, l'enzyme devient plus active à une certaine étape du séchage et atteint un optimum d'activité quand le contenu du tissu en eau est compris entre 10 et 40 % (**Gordone et al., 1973**). L'utilisation de l'ingénierie des protéines a permis d'améliorer les performances de la TLL pour qu'elle résiste aux conditions sévères des lessives (pH très alcalin, température élevée, présence d'oxydants, de protéases, et de détergents anioniques et non ioniques). Différents mutants de TLL ont été produits, essentiellement au niveau :

- (i) Des résidus en contact avec la surface lipidique. Les performances de lavage de la Lipolase<sup>TM</sup> sont améliorées par un facteur 5 dans un multicycle de lavage, en remplaçant les résidus chargés négativement (D96, E210, E87, D254 et E56), par des résidus hydrophobes (L, I) ou basiques (R, K). Le meilleur résultat a été obtenu avec le mutant D96L nommé LipolaseUltra<sup>TM</sup>. Ce mutant est plus hydrophobe et plus tensioactif grâce à la répulsion entre les charges négatives de l'enzyme et les charges négatives accumulées à l'interface (AG, détergents).
- (ii) Des régions sensibles aux protéases. La résistance aux protéases du variant de la TLL utilisé dans les lessives est réalisée en remplaçant des boucles potentiellement clivables de la TLL (les résidus 162-165 et/ou 209-212) par des boucles non-clivables (**Pencreac & Baratti, 1997**).

#### ❖ Applications en l'oléochimie

Environ soixante millions de tonnes de graisse et d'huile sont produites par an dans le monde entier. Les applications potentielles des lipases dans l'industrie oléochimique (biotransformation des corps gras) sont nombreuses avec une partie de cette production (plusque deux millions de tonnes par an) devant être transformée. Cette transformation est encore majoritairement réalisée par des procédés chimiques consommant beaucoup d'énergie comme l'hydrolyse, la glycérolyse et l'alcoololyse (**Volkl et al., 1993**). Les procédés chimiques d'hydrolyse des graisses et de glycérolyse des huiles demandent des conditions sévères de température (240-260°C) et de pression (60 bar). De surcroît, ces procédés entraînent en même temps, des effets collatéraux indésirables comme la coloration du produit et la dégradation de certains AG. D'où le besoin d'une redistillation visant à éliminer ces impuretés. De nombreux procédés utilisant des lipases ont été



développés pour pouvoir travailler dans des conditions moins drastiques et plus spécifiques. De nos jours, ces applications des lipases ne sont économiquement compétitives que dans des cas particuliers tels qu'un procédé enzymatique pour la préparation des AG insaturés hautement purs (oléique, linoléique, linoléique) en utilisant la lipase produite par *Candida rugosa* (NipponOils and Fats, Tokyo) ou la synthèse de TG analogues à ceux du beurre de cacao par transesterification à l'aide de la lipase de *Rhizomucormihei* (RmL, Lipozyme ®) (LodersCroklaan, Pays-bas).

#### ❖ Applications dans l'industrie du papier

A l'heure actuelle, le premier ennemi dans l'industrie du papier est la poix. Ce mélange mouet collant, à base de résine et de goudrons végétaux, produit durant la fabrication de la pâte de bois, nuit à la qualité du papier. Ce sont en majorité les TG, le sitostérol et les esters des istostérol qui posent des problèmes dans la fabrication mécanique de la pâte à papier à partir des résineux. L'entreprise japonaise Nihon Seishi Co. A développé un procédé d'hydrolyse de ces esters par addition de lipases, ce qui constitue un moyen facile et efficace pour le contrôle de la poix et donc pour améliorer la qualité du papier. Ce procédé est utilisé à une échelle de plusieurs centaines de tonnes de bois par jour. Actuellement, deux autres entreprises japonaises ont adopté ce même procédé (**Fujita et al., 1992**).

#### II.8.2. Applications en synthèse chimique

Les lipases font partie des biocatalyseurs les plus utilisés en synthèse organique pour des raisons différentes (**Kazlauskas and Weber, 1998**) :

- ☑ Les lipases peuvent accepter une grande variété des substrats synthétiques tout en gardant une régiosélectivité ainsi qu'une reconnaissance des molécules chirales.
- ☑ Les lipases possèdent en général une structure très stable qui leur permet de résister aux effets des solvants organiques.
- ☑ La réaction d'hydrolyse catalysée dans l'eau peut facilement être inversée dans un milieu non-aqueux pour permettre la synthèse d'esters ou la transestérification.
- ☑ Les lipases peuvent être utilisées comme des agents acylants des différents groupes nucléophiles tels que les groupes hydroxyle, hydroxy-péroxyde, amine et thiol. Les lipases sont capables d'acyler de façon régiosélective ces nucléophiles. Les sucres

sont à ce propos un exemple important des composés polyhydroxylés qui peuvent être acylsrégio-sélectivement à l'aide des lipases (**Bashir et al., 1995**). La plupart des études concernent la protection et la déprotection des fonctions hydroxyles dans la chimie des carbohydrates et la préparation d'esters de sucres utilisés comme détergents.

- ☑ Parmi les enzymes hydrolytiques, les lipases sont les plus couramment utilisées pour la résolution des mélanges racémiques visant à obtenir des molécules de haute pureté optique (**Ghanem and Aboul-Enein, 2005**). Les lipases sont ainsi impliquées dans un nombre croissant d'étapes de synthèse et concurrencent diverses techniques plus classiques parmi les quelles nous pouvons citer la recristallisation fractionnée avec des sels chiraux, la résolution chimique par condensation de réactifs asymétriques ou la séparation sur des colonnes de chromatographie préparative chirale.

### **II.8.3. Applications en bioremédiation**

Les milieux aquatiques d'eau douce ou d'eau salée, ainsi que les sols, sont fréquemment contaminés par les huiles minérales. Ces contaminations constituent un problème environnemental et écologique majeur (**Najjar, 2010**). Les lipases sont utilisées en environnement et en bioremédiation. Les effluents des industries agroalimentaires sont souvent riches en lipides et en graisses, ce qui peut entraîner le colmatage des canalisations. L'addition de lipases ou la culture dans ces effluents, permet d'en réduire la charge en lipide. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures. La bioremédiation est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués (**Gallagher & Wiley, 2008 ; Hasan et al., 2006**).

### **II.8.4. Applications en tannerie**

Les lipases sont également couramment utilisées en tannerie. Avant le tannage, les peaux sont lavées dans des bains alcalins (pH 8-13) en présence de lipases de façon à pouvoir éliminer les graisses sous cutanées. L'utilisation de lipases permet de diminuer la quantité de surfactant et de détergent à utiliser dans les bains de lavage, ce qui contribue à l'obtention de peaux plus souples et plus élastiques (**Fickers et al., 2008**).

### **I.2.8.5. En synthèse organique**

Les lipases sont devenues un des groupes les plus importants d'enzymes pour ses applications dans les synthèses organiques (**Lotti et Alberghina, 2002**).

De nombreuses applications industrielles de la transestérification par la lipase, telles que laproduction des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras poly insaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorifique. L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final. Un exemple de transestérification réalisée dans le but de produire un ester gras (octyllaurate) est utilisé en industries cosmétiques (**Sharma et al., 2001**).

#### **❖ Les lipases en industries cosmétique**

Dans l'industrie des cosmétiques et de la parfumerie, les lipases sont utilisées dans la synthèse d'arôme soit par réactions de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7-octadien-1-ol qui présentent un arôme de rose ou soit par estérification directe. En effet, de nombreux esters de faibles masses moléculaires tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle sont des constituants d'arôme. Ils sont obtenus à partir de l'alcool et de l'acide correspondant en système non aqueux en présence de lipases de *C. antarctica* ou de *R. miehei* sous forme immobilisée. Les rétinoïdes (vitamine A et dérivés) sont de grand potentiel commercial dans les produits de beauté et de médicaments tels que produits du soin de la peau. Les dérivés du rétinol solubles dans l'eau ont été préparés par réaction catalytique de lipase immobilisée (**Jaeger et Eggert, 2002 ; Hasan et al., 2006**).

#### **❖ Application médicale et pharmaceutique**

Les lipases sont largement mises en œuvre dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse des médicaments ou dans la préparation d'intermédiaire homochiral optiquement actif. C'est le cas de lanikkomycin-B, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, de certains agents antimoraux, de certains antibiotiques ou vitamines. Par exemple, le naproxène est un anti-inflammatoire non stéroïdien dont l'énantiomère (S) est 28 fois plus actif que l'énantiomère (**Jaeger et Eggert, 2002**). Les Lipases de *Candida rugosa* ont été utilisées pour synthétiser lovastatin, une drogue qui diminue le taux de cholestérol du sérum.

L'hydrolyse asymétrique de 3-phenylglycidic ester acide qui est une clef intermédiaire dans la synthèse d'hydrochloride du diltiazem, un vasodilatateur coronaire largement utilisé, a été emportée avec *S. marcescens* (Hasan *et al.*, 2006). Les lipases de *Burkholderia plantarii* et de *Serratia marcescens* sont utilisées aussi pour la production de (2R, 3S)-3-(4-méthoxyphényle) méthyle glycidate employés dans la synthèse d'un antagoniste du calcium: le Diltiazem TM (Alloue, 2008).

### ➤ Production de polymères biodégradables

Lipases peut être utilisé comme biocatalyseur dans la production des composés biodégradables utiles. L'oléate du butyle a été produit par estérification direct de butanol et d'acide oléique pour diminuer la viscosité de biodiesel dans l'usage hivernal. Les esters Trimethylol propane ont aussi été synthétisés de la même façon comme lubrifiants. Lipases peut catalyser des synthèses d'ester et des transestérifications. Les polyesters aromatiques peuvent être synthétisés par des biocatalyseurs de lipases (Sharma *et al.*, 2001 ; Jaeger et Eggert, 2002 ; Hasan *et al.*, 2006).

**Tableau 2** : Présentation de quelques applications biotechnologiques de lipases (Verger *et al.*, 1985)

| Domaine d'application | Action                    | Principale Utilisation                      | Domaine d'application  |
|-----------------------|---------------------------|---|--|
| Alimentation          | Laiterie et boulangerie.  | Hydrolyse des lipides.                      | Modification de la saveur et conservation.   |
|                       | Brasserie.                | Hydrolyse des lipides.                      | Modification de l'arôme et accélération de la fermentation.  |
|                       | Boucherie, poissonnerie.  | Hydrolyse des lipides                       | Développement de la saveur et l'élimination de l'excès de graisse.   |
|                       | Huilerie.                 | Inter estérification des huiles naturelles. | Formulation des huiles, margarines et beurres  |
| Chimie fine           | Corps gras.               | Hydrolyse.<br>Estérification                | Production d'acides gras, mono et di glycérides.<br>Production d'esters et résolution de mélanges racémiques.  |
|                       | Chimie analytique.        | Hydrolyse des lipides.                      | Dosage des glycérides et analyse de la distribution des acides gras.   |
|                       | Détergents ; dépollution. | Hydrolyse des lipides.                      | Elimination des tâches, traitement des eaux grasses et dégraissage des cuirs.  |
|                       | Cosmétique.               | Hydrolyse des lipides.                      | Elimination de graisses et formulation.  |
|                       | Médecine et pharmacie     | Hydrolyse des lipides.                      | Traitement d'insuffisance pancréatique (malabsorption des graisses).<br>Analyse des triglycérides plasmatiques.<br>Synthèse stéréospécifique de produits pharmacologiquement actifs. |

## PARTIE III : LES BACTERIES THERMOPHILES

### III. LES EXTREMOPHILES

#### III.1. DEFINITIONS

Les microbiologistes utilisent le terme « extrêmophile » pour décrire les microorganismes qui vivent dans des conditions extrêmes dans les quelles d'autres formes de vie ne peuvent pas résister, tandis que **Wainwright (2003)** a proposé le terme « extrêmodure » pour décrire les microorganismes qui peuvent survivre, mais ne croient pas dans ces environnements.

Un organisme est dit extrêmophile, ou extrémophile, lorsque ses conditions de vie normales sont mortelles pour la plupart des autres organismes : températures proches ou supérieures à 100 °C (hyper thermophiles) ou inférieures à 0 °C (psychrophiles), pressions exceptionnelles, milieux très chargés en sel (halophiles), milieux très acides (acidophiles) ou hyper alcalins (alcalophiles), milieux radioactifs ou anoxique (sans dioxygène).

Les premiers microorganismes extrêmophiles isolés font partie des halophiles (du grec *halo*, sel), découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom : la mer morte. Ils vivent dans des concentrations en sels très élevées.

Le terme extrêmophile est le plus souvent employé pour rapporter des microorganismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des *Archaea*. Les bactéries, elles aussi sont présentes dans ces milieux extrêmes. *Thermus aquaticus* fut la première bactérie extrêmophile isolée à partir des sources d'eau chaude du Parc national de Yellowstone aux Etats- Unis (**Kristjansson et Hreggvidsson, 1995 ; Albers et al., 2001 ; Brock, 1965**).

La découverte de ces microorganismes dans ces environnements particuliers a dès lors déclenché une sorte de chasse aux extrêmophiles. Après quelques années, cette chasse a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue, de microorganismes qui ne sont pas seulement contestés par un extrême, mais par plusieurs, et ils sont donc nommés « polyextrêmophiles » et qui ont été retrouvés dans des milieux supposés hostiles à la vie (**Mesbah et Wiegel, 2008**).

### III.2. DIVERSITE DES MILIEUX EXTREMES

Il en existe différents groupes de milieux extrêmes. Tous sont répartis en fonction des paramètres physiques (pression, température...) ou chimiques (acidité, salinité ...). Température, pH et salinité interagissent très fortement dans un biotope extrême. Au moins, sept principaux biotopes naturels peuvent être reconnus quand un de ces trois facteurs se trouve dans l'extrême de la gamme comme le montre le **tableau 3 (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995)**. Les habitats extrêmes les mieux étudiés sont ceux qui sont caractérisés par une forte température, pH élevé ou faible et une forte salinité.

**Tableau 3** : Les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés (Kristjansson et hreggevidsson, 1995)

| <i>Habitat</i>                              | <i>Température (°C)</i> | <i>pH</i> | <i>Salinité (% w/v)</i> |
|---|-------------------------|-----------|-------------------------|
| Eau douce alcaline de sources chaudes       | > 60                    | > 7       | < 6                     |
| Champs acides sulfatares                    | > 60                    | < 3       | < 6                     |
| Les boues anaérobies et le sol géothermique | > 60                    | 5 à 7     | < 6                     |
| Zones acides riches en soufre et pyrite     | < 50                    | < 3       | < 6                     |
| Milieus alcalins carbonatés                 | < 50                    | > 8       | < 6                     |
| Les lacs de sodes                           | < 50                    | > 9       | > 10                    |
| Les lacs hypersalins                        | < 50                    | 5 à 8     | > 10                    |

#### III.2.1. Les environnements à hautes températures

La température est une variable importante dans chaque écosystème. La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles sont des microorganismes qui se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C. Les hyperthermophiles sont des thermophiles particulièrement extrêmes pour les quelles les températures optimales sont au-dessus de 80°C (**Madigan et Martino, 2006**). Les zones géothermiques les plus connues et bien étudiées sont en Amérique du Nord (Parc national de Yellowstone), l'Islande, la Nouvelle-Zélande, le Japon, l'Italie et l'ex-Union soviétique (**Lund et John, 2007**). Ces endroits sont généralement riches en produits chimiques réduits de l'intérieur de la Terre, et donc, de nombreuses bactéries thermophiles sont des chimiolithotrophes, réagissant avec l'hydrogène et le fer ferreux (**Amend et al., 2003**). En conséquence, l'extraction de l'énergie par oxydation des composés de soufre produit de l'acide sulfurique, ce qui rend

souvent les eaux géothermiques très acides. De ce fait, de nombreuses bactéries hyperthermophiles sont également adaptées à l'acidité. En effet, les hyperthermophiles acidophiles extrêmes, avec un pH optimum de croissance égal ou inférieur à 3, produisent de l'acide sulfurique à partir de l'oxydation des minerais sulfurés (**figure 6**). Une grande majorité des isolats thermophiles issus de ces eaux profondes sont des anaérobies chimiolithotrophes (**Satyanarayana et al., 2005**).

À des températures élevées, des biomolécules, telles que les enzymes se dénaturent et perdent leur fonction et, par conséquent, l'arrêt du métabolisme. En outre, la fluidité des membranes augmente de façon significative, ce qui perturbe la cellule. Pour éviter la dénaturation et la dégradation, les thermophiles présentent une variété d'adaptations cellulaires. Leurs lipides membranaires contiennent des acides gras saturés et linéaires ce qui n'est pas le cas pour les mésophiles. Cela permet aux thermophiles de croître à des températures plus élevées en fournissant le bon degré de fluidité nécessaire pour le fonctionnement des membranes (**Ulrih et al., 2009**).

### **III.2.2. Les environnements à pH alcalin**

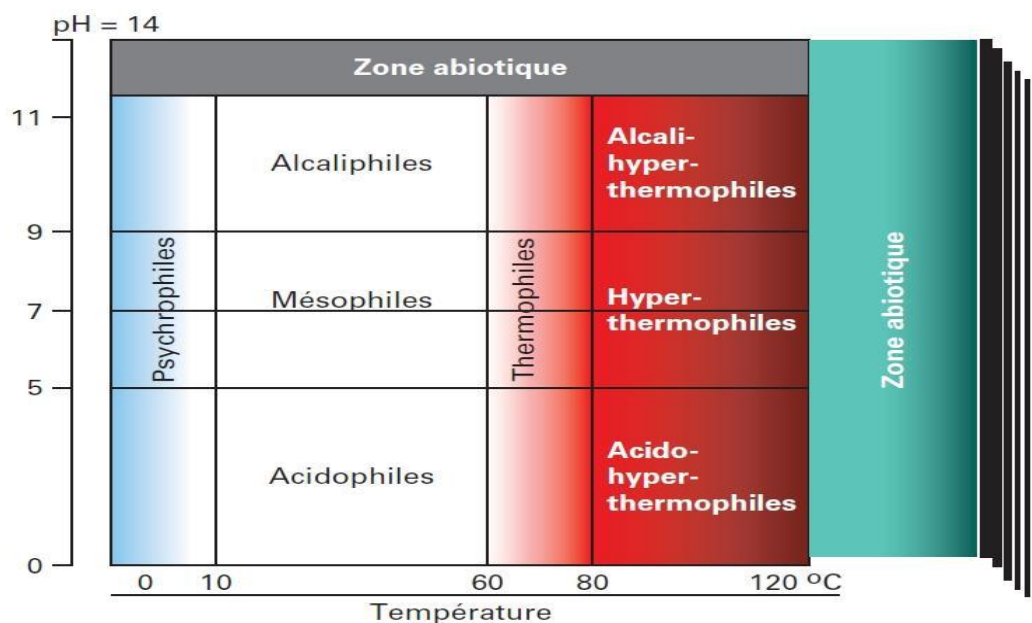
Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à pH supérieur à 9,0, souvent avec un pH optimum autour de 10, tout en montrant la croissance peu ou pas près des valeurs de pH neutres (**Horikoshi, 1999**). Une diversité de microorganismes peut croître à un pH de 10,5 (**Martins et al., 2001**). Des communautés microbiennes vivent à un pH de 12,9 dans les lacs de soude de Maqarin, en Jordanie (**Pedersen et al., 2004**). Les alcalophiles sont souvent isolés de milieux naturels qui ont également tendance à avoir des concentrations élevées en chlorure de sodium (NaCl) ; ceux-ci sont ainsi appelés haloalcalophiles (**Gareeb et Setati, 2009**). Dans des conditions alcalines, les concentrations des ions d'hydrogène sont très faibles et les cellules ont des difficultés à utiliser l'ATP-synthase pour produire de l'énergie. Pour contourner ces problèmes, les microorganismes pompent ces ions et exportent d'autres afin de maintenir leur intérieur à proximité de la neutralité. En outre, la paroi cellulaire des alcalophiles agit comme une barrière de défense contre les conditions environnementales extrêmes (**Horikoshi, 2006**).

### III.2.3. Les milieux à pH acide

Les environnements acides sont particulièrement intéressants car, en général, le faible pH de l'habitat est la conséquence du métabolisme microbien, et non pas une condition imposée par l'écosystème, comme c'est le cas pour d'autres environnements extrêmes. Les acidophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à un pH de 2 (Morozkina *et al.*, 2010).

Les acidophiles oxydent le soufre élémentaire (dans les zones volcaniques) ou les minéraux sulfurés (en drainage) pour obtenir de l'énergie, générant ainsi des milieux acides extrêmes (Rohwerder et Sand, 2007). En effet, la plupart des microorganismes caractérisés comme acidophiles strictes ont été isolés à partir des zones volcaniques ou de drainage minier acide.

Les environnements avec des conditions de pH bas sont un défi à la biochimie cellulaire car l'acidité extrême conduit à la dénaturation des protéines. Les acidophiles protègent leurs protéines en incluant les acides aminés neutres et par pompage active des protons hors de la cellule pour maintenir les niveaux de pH intracellulaire constants (Baker-Austin et Dopson, 2007).



**Figure 6 :** Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température et du pH (Morozkina *et al.*, 2010)



### III.3. LES BACTERIES THERMOPHILES

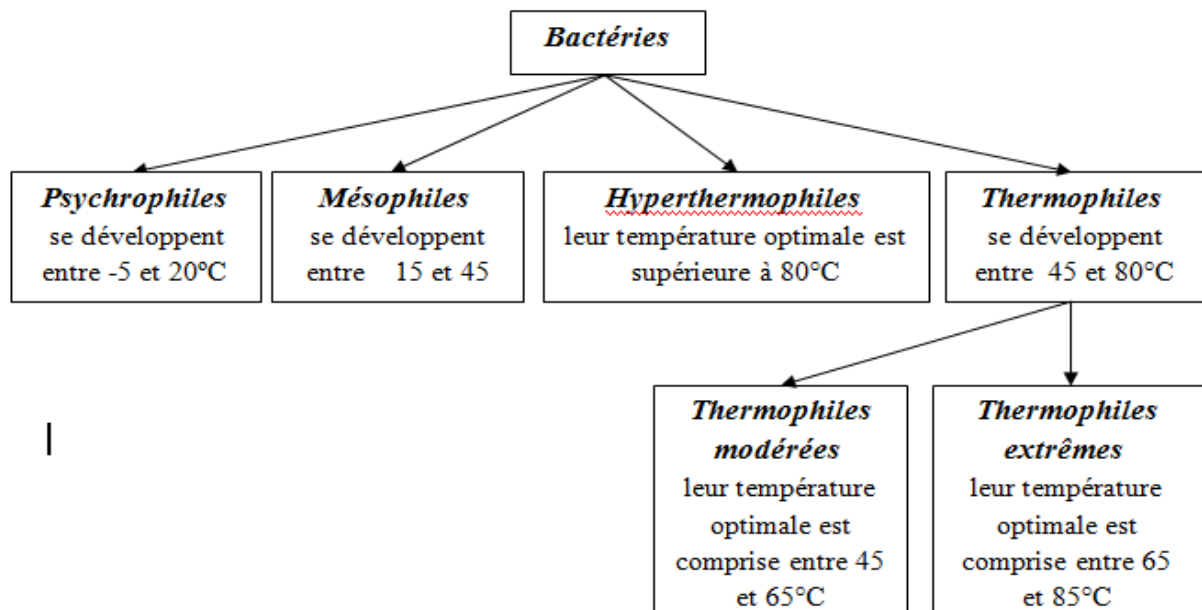
Les bactéries peuvent être classées en quatre groupes, selon leurs température optimales de croissance : les psychrophiles (-5 à 20°C), les mésophiles (15 à 45°C), les thermophiles (45 à 80°C) et les hyperthermophiles ( $\geq 80^\circ\text{C}$ ) (Vieille et Zeikus, 2001). Certains subdivisent même les thermophiles en deux avec les thermophiles modérés (45 à 65°C) et les thermophiles à proprement dit (65 à 85°C) (Demirjian *et al.*, 2001). Mise à part l'élément température, il existe des bactéries pouvant croître dans toutes sortes de conditions environnementales : il y a les microaérophiles qui ne poussent qu'en présence d'une moins grande quantité d'oxygène dans l'air ( $< 21\% \text{ O}_2$ ), sans oublier les anaérobies strictes qui ne tolèrent pas l'oxygène.

Il y a aussi les acidophiles (faibles pH), les piezophiles (forte pression) et les métalophiles (forte concentration de métaux) pour ne donner que ces exemples. En raison de la vaste distribution géographique et des divers habitats possibles pour les thermophiles, il est fréquent de retrouver des bactéries qui répondent à un autre ou plusieurs autres critères extrêmes mise à part la température (figure 7).

Généralement, on s'attend à ce que les microorganismes thermophiles croissent dans des environnements chauds, comme les sources géothermales et les failles océaniques hydrothermales, par exemple (McMullan *et al.*, 2004). Beaucoup des thermophiles qui ont été isolés et caractérisés font partie de la famille des Archaea et sont anaérobies.

Considérant que la solubilité de l'oxygène diminue avec l'augmentation de la température, il n'est pas surprenant que les bactéries isolées des sources géothermiques et des failles océaniques hydrothermales soient anaérobies. Toutefois, Marchant *et al* (2002a ; 2002b) ont rapporté qu'il était aussi possible d'isoler des bactéries thermophiles provenant des environnements froids (par opposition aux conditions thermophiles,  $< 45^\circ\text{C}$ ). Ils ont isolé cinq souches bactériennes à partir d'échantillons de sols récoltés à 50 mm de profondeur et dont la température du sol ne dépassait jamais 25°C. Les cinq souches ont démontré leur capacité à croître dans un intervalle de température variant de 40 à 80°C et toutes ces souches étaient aérobies strictes. Des analyses du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S ont démontré que trois des cinq souches avaient une forte similarité de séquence avec *Bacillus kaustophilus* (maintenant classé comme *Géobacillus Kaustophilus*)

et que les deux autres se rapprochaient de *Bacillus thermoglucosidasius* (maintenant classé comme *Géobacillus thermoglucosidasius* (Nazina *et al.*, 2001).



**Figure 7** : Classification des bactéries, selon leurs températures optimales de croissance (Vieille et Zeikus, 2001 ; Demirjian *et al.*, 2001).

### III.3.1. Définition

Les organismes thermophiles (du grec thermê, chaleur et philein, aimer) sont des organismes ayant besoin d'une température élevée vivre. Ils font partie des organismes extrémophiles. Les premiers ont été découverts à la fin des années 1960 par Thomas D. Brock dans le parc national de Yellowstone (**Figure 8**).

Plusieurs définitions ont été proposées pour définir la thermophilie. La plus reconnue est celle qui a été proposée par Thomas Brock, le microbiologiste à l'origine de la découverte des micro-organismes thermophiles. Selon cette définition, un thermophile est un être vivant dont température optimale de croissance se situe au-dessus de 60°C



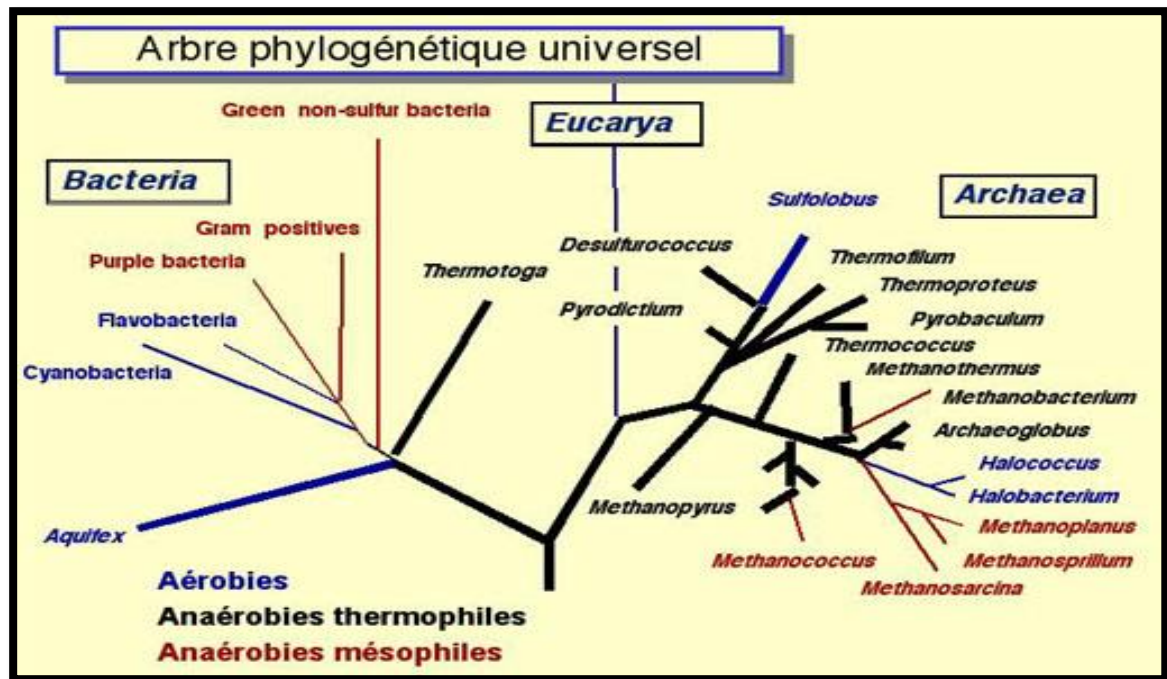
**Figure 8** : Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA (Patrick, 2007).

### III.3.2. Phylogénie des thermophiles

Les microorganismes ont été traditionnellement classés selon des caractères tels que la morphologie et la physiologie, ce qui ne permettait pas d'établir des relations d'évolution entre les différents groupes microbiens. L'introduction de la phylogénie basée sur l'analyse de séquences d'acides nucléiques en systématique microbienne a permis une classification des microorganismes en terme d'évolution et une clarification des lignées phylogénétiques entre elles et des niveaux taxonomiques (espèces, genres, familles ) (Patrick, 2007).

De plus, les travaux de phylogénie moléculaire sont à l'origine d'une avancée scientifique majeure datant de la fin des années 1970 : la découverte par Carl Woese des Archaea, troisième domaine du vivant avec les Eukarya et Bacteria (Figure 9) (Woese et Fox, 1977 ; Woese *et al.*, 1990).

Les microorganismes thermophiles sont présents dans les branches les plus profondes de l'arbre du vivant tel qu'il a été proposé par Woese *et al.*, 1990. Ils se situent près du dernier ancêtre commun ou progénote à partir duquel trois lignées ont divergé, correspondant aux trois domaines. Ceci a conduit à l'hypothèse selon laquelle la vie aurait émergé d'environnements chauds.



**Figure 9** : Eruption d'un geyser dans le parc national de Yellowstone, Wyoming, USA (Patrick, 2007).

### III.3.3. Les principales bactéries thermophiles

Bacillus (Bacillus stearothermophilus, Geobacillus stearothermophilus, Bacillus coagulans), Thermus, Thermomicrobium, symbiobacterium, Clostridium (Clostridium thermocellum)(Patrick, 2007).

### III.3.4. Besoins nutritifs des bactéries thermophiles

Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles sont différents à ceux des bactéries mésophiles. En effet plusieurs auteurs ont noté un besoin particulier de vitamines tel que la vitamine B1 (thiamine) et B2 (riboflavine), d'acides aminés tels l'histidine et la méthionine et aussi de calcium et de magnésium pour stimuler ou permettre la croissance des bactéries (Surucu, 1999).

L'identification de facteurs physiologiques et environnementaux qui peuvent limiter une croissance appropriée des bactéries thermophiles est importante pour le développement d'applications industrielles (par exemple les enzymes, les métabolites) à partir de ces microorganismes. En effet plusieurs réactions secondaires peuvent survenir à des températures élevées.

C'est le cas de la formation accélérée des produits de la réaction de brunissement de Maillard à de telles températures. La réaction de Maillard est la réaction entre des sucres réducteurs (par exemple le glucose) et des composés amino (par exemple les acides aminés). **Kim et Lee (2003)** ont rapporté que la croissance de *L'Archaea Aeropyrum pernix* est fortement inhibée par les produits de cette réaction. Cette conclusion n'est toutefois pas un absolu, car **Einarsson et al. (1983)** mentionnent des études où les auteurs affirment que les produits de la réaction de Maillard stimulent la croissance microbienne alors que d'autres auteurs soutiennent le contraire. Un autre exemple de réaction secondaire est la conversion du L-glutamate en L-pyroglutamate, ce dernier inhibant significativement la croissance de *l'Archaea Sulfolobus solfataricus* (**Park et al., 2001**). Ces données supportent l'idée que la formation chimique des milieux de culture à des températures élevées soit un facteur déterminant pour la croissance efficace des thermophiles.

### **III.3.5. Enzymes**

Les avantages que rapporte la conduite des processus industriels à températures élevées (solubilité des substrats augmentée, viscosité diminuée, disponibilité biologique importante, vitesses de transfert et de réaction plus élevées, risque de contamination microbienne diminué..) ont poussé les recherches vers l'exploitation des enzymes des thermophiles (**Gomes et Steiner, 2004 ; Ferrera et Reysenbach, 2007**).

#### **III.3.5.1. Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides**

##### **➤ Enzymes dégradant la lignocellulose**

La cellulose est le biopolymère organique le plus abondant dans la nature. Elle est contenue dans la paroi des cellules végétales et est accessible à faible coût dans les résidus d'exploitation forestière, les chaumes de céréales, et autres déchets agricoles.

Plusieurs enzymes dégradant la cellulose sont issues d'organismes thermophiles comprenant des archées et des bactéries.

##### **➤ Enzymes modifiant l'amidon**

L'amidon, composé par l'amylose et l'amylopectine, est le polymère d'origine végétale qui a l'application la plus commune et la plus durable en biotechnologie.

L'industrie de la transformation de l'amidon en produits plus précieux tels que les dextrines, le glucose, le fructose, le maltose, et le tréhalose, utilise les enzymes thermostables microbiennes. Dans tous les processus de conversion de l'amidon, des températures élevées sont requises pour liquéfier l'amidon et le rendre accessible à l'hydrolyse enzymatique (**Antranikian, 2009**).

#### ➤ **Enzymes dégradant la chitine**

La chitine est l'élément structural principal de la plupart des mycètes et de quelques invertébrés (crustacées, insectes) (**Antranikian et al., 2005**). C'est un homopolymère linéaire de N-acétyl-D-glucosamine à liaison  $\beta$  (1-4).

### **III.3.5.2. Protéases**

Comparées aux autres enzymes utilisées en biotechnologie, les protéases sont les plus quantitativement produites et employées. Les protéases sont impliquées dans la conversion des protéines en acides aminés et en peptides. Elles sont classées selon la nature de leur site catalytique en trois groupes : sérine, cystéine, aspartique ou metalloprotéases. La plupart des protéases des archées et des bactéries thermophiles appartiennent au type sérine, et sont stables à températures élevées et en présence de concentrations élevées de détergents et d'agents dénaturants (**Antranikian, 2009**).

### **III.3.5.3. Lipases et estérases**

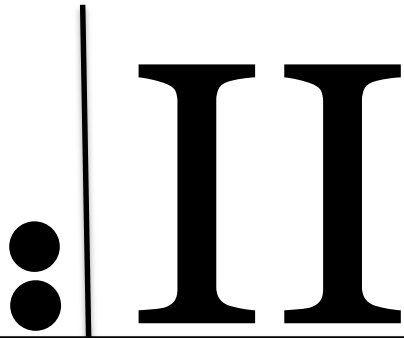
Les lipases hydrolysent des triglycérides en glycérol et en acides gras et peuvent également catalyser la réaction inverse en présence de solvants organiques. Les lipases sont un groupe d'enzymes important d'un point de vue biotechnologique et elles trouvent leurs applications dans l'industrie alimentaire, les détergents, et les industries pharmaceutiques. Les estérases sont utilisées dans la biosynthèse organique. Dans une solution aqueuse, les estérases catalysent l'hydrolyse des esters pour former des acides et des alcools constitutifs, tandis que dans les solutions organiques, la réaction de transestérification est favorisée. Plusieurs gènes codant des estérases archéennes et bactériennes thermophiles sont clonés et exprimés dans des hôtes mésophiles.

### III.3.5.4. Autres enzymes

De nombreuses autres enzymes issues des thermophiles présentent un intérêt biotechnologique potentiel :

- L'alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1) utilisée dans les réductions énantiométriques ; oxydation des alcools secondaires.
- Les décarboxylases (EC 4.1.1) catalysent la formation et le clivage des liaisons C-C ; réaction clé dans la production de blocs chiraux dans la synthèse de produits pharmaceutiques.
- Les cytochromes P450 oxydoréductases (EC 1.6.2.4) effectuent le transfert d'électrons aux cathodes dans les piles à combustibles.

Les hydroxylases aromatiques (EC 1.14.13.) produisent des composés phénoliques réactifs à partir de substances aromatiques.



**CHAPITRE II: MATERIELS ET  
METHODES**

---



## I. MATERIELS ET METHODES

### I.1. OBJECTIF

Les principales objectives de ce travail sont

- Screening de l'activité lipolytique extracellulaire chez des bactéries thermophiles aérobies isolées de sources chaudes terrestres algériennes.
- Identification des souches présentant une activité lipolytique.
- Optimisation des différents paramètres impliqués dans le processus de production des lipases.
- Purification partielle de la lipase produite par les souches les plus performantes
- Caractérisation catalytique de l'enzyme purifiée

### I.2. .PRELEVEMENTS ET ECHANTILLONNAGES

**Tableau 4** : Présentation du code et d'échantillonnage

| <i>L'origine de prélèvements</i>                 | <i>Codification</i> | <i>Nombre des prélèvements</i> |
|--|---------------------|--------------------------------|
| <i>Hammam Debagh (Guelma)</i>                    | GH                  | 3                              |
| <i>Hammam Bouhnifia (Mascara)</i>                | S                   | 11                             |
| <i>Hammam Bouhdjar (Temouchent)</i>              | HB                  | 10                             |
| <i>Hammam Rabi (Saida)</i>                       | HR                  | 2                              |
| <i>Hammam Righa (Aïn Defla)</i>                  | WO                  | 2                              |
| <i>Sol de la Station d'hydrocarbure (Bechar)</i> | SH/BH/MO            | 4                              |

#### I.2.1. Sources thermales étudiées

Les échantillons d'eau et de sédiments étudiés ont été prélevés sur des sites répartis entre les sources thermales situées dans les Wilayas de Guelma, de Mascara, Tmouchent, Bechar, Saida et Relizane.

##### I.2.1.1. Hammam Debagh (Meskhoutine)

Est situé à 20 km au Sud du Chef-lieu de la Wilaya de Guelma (36°27'N, 7°16'E) et à 320m d'altitude. Le site comprend neuf sources d'eaux hyperthermales, les plus chaudes d'Algérie, atteignant jusqu'à 98°C au point d'émergence de l'eau. Elles sont de nature saline, bicarbonatée calcique et chlorurée sodique, avec dégagement d'hydrogène sulfuré. Ces eaux sont exploitées par les stations thermales environnantes (**Boughlali, 2003**).

### **I.2.1.2. Hammam Bouhnifia (Mascara)**

Situe a une vingtaine km de Mascara, Hammam Bouhnifia, ancienne capitale thermale de l'Afrique du nord, est une importante station thermale dont les vertus médicinales des eaux sont réputées .des vestiges situés au sud de la station actuelle et datant de l'époque romaine témoignent que ce lieu privilégié fut déjà très apprécié.

### **I.2.1.3. Hammam Bouhdjar (Temouchent)**

La station thermale de Hammam Bouhadjar, située à 28 km du chef-lieu de la wilaya d'Aïn Témouchent, sera érigée en ville thermale, a-t-on appris jeudi du responsable de cet établissement de soins et de remise en forme. Cette station, une des plus fréquentées du pays, s'étendra au-delà des 15 hectares qu'elle occupe actuellement pour augmenter ses capacités d'accueil au profit de curistes, a-t-il indiqué. La station de Hammam Bouhadjar jouit d'une position stratégique, au carrefour de trois grandes villes de l'Ouest du pays, à savoir Oran, Sidi Bel-Abbés et Tlemcen. Ouverte en 1974, cet établissement prodigue des prestations de soins et de remise en forme, en tirant avantage des propriétés médicinales des eaux thermales émergeant à une température de 72 degrés, recommandées pour le traitement des affections rhumatismales, dermatologiques, neurologiques et gynécologiques. Ces eaux sont aussi tout indiquées pour le traitement des séquelles de traumatismes articulaires, pour les affections ORL et celles de l'appareil respiratoire, a-t-on indiqué.

### **I.2.1.4. Hammam Rabi (Saida)**

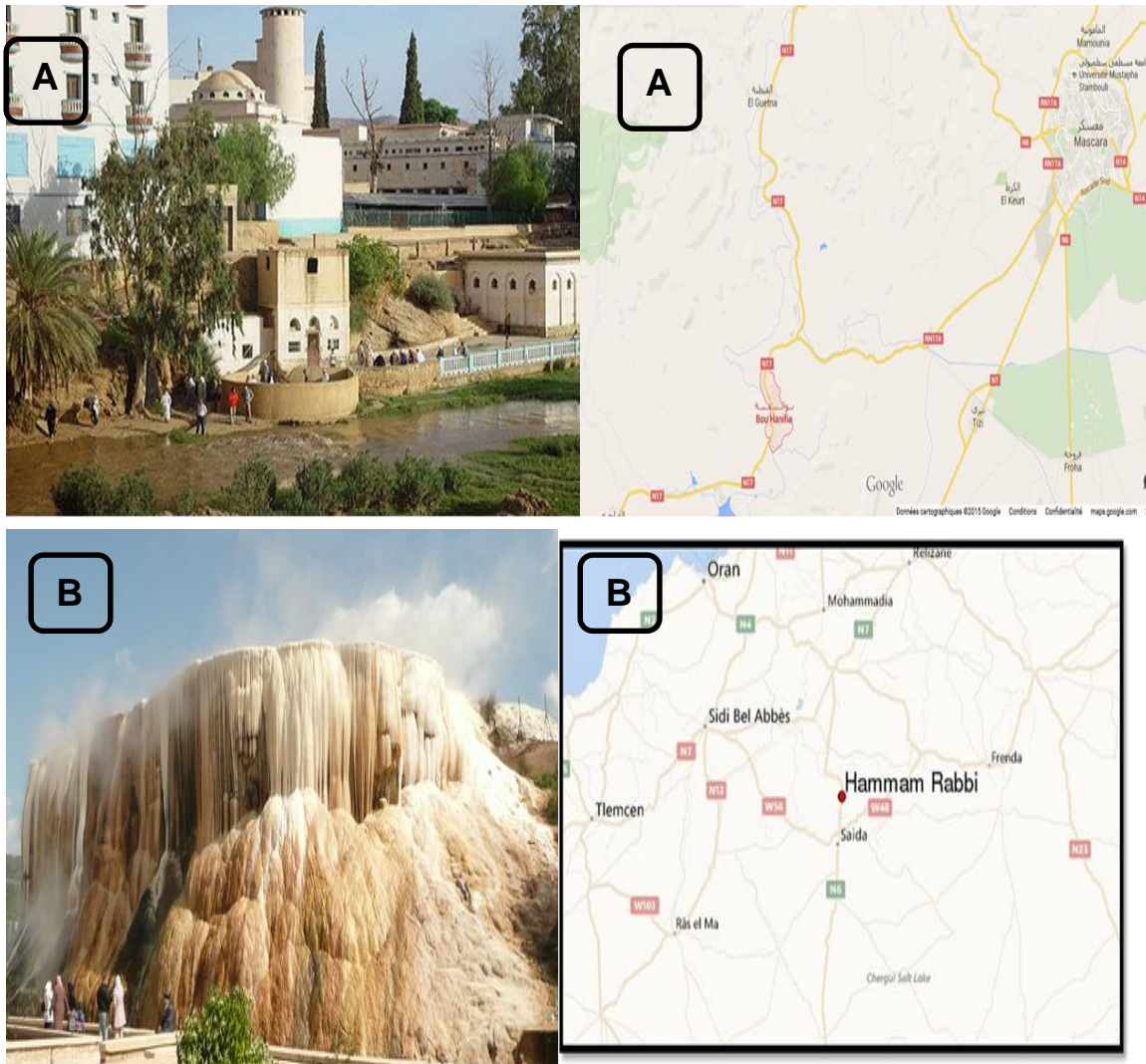
La station thermale de Hammam Rabbi est située à 20 Km de la ville de Saïda sur l'axe Saida – Oran, logé dans un site d'une beauté saisissante, la station thermale de Hammam Rabbi est mise en exploitation en 1970, son eau a des origines profondes et arrive en surface sous pression à une température moyenne de 40°C et un débit moyen de 8 l/s.

### I.2.1.5. Station d'hydrocarbure (Bechar)

Elle se situe à la wilaya de Bechar

### I.2.1.6. Hammam Righa (Aïn Defla)

Située à 100 Km à l'Ouest d'Alger, Wilaya d'Aïn Defla. Par son eau Thermale riche en sels minéraux, la station thermale de hammam Righa est un haut lieu de santé intégrale, adaptée à différentes orientations thérapeutiques.



**Figure 10** : Localisation des Sources hydrothermales. A.Bouhnia; B.Rabi;

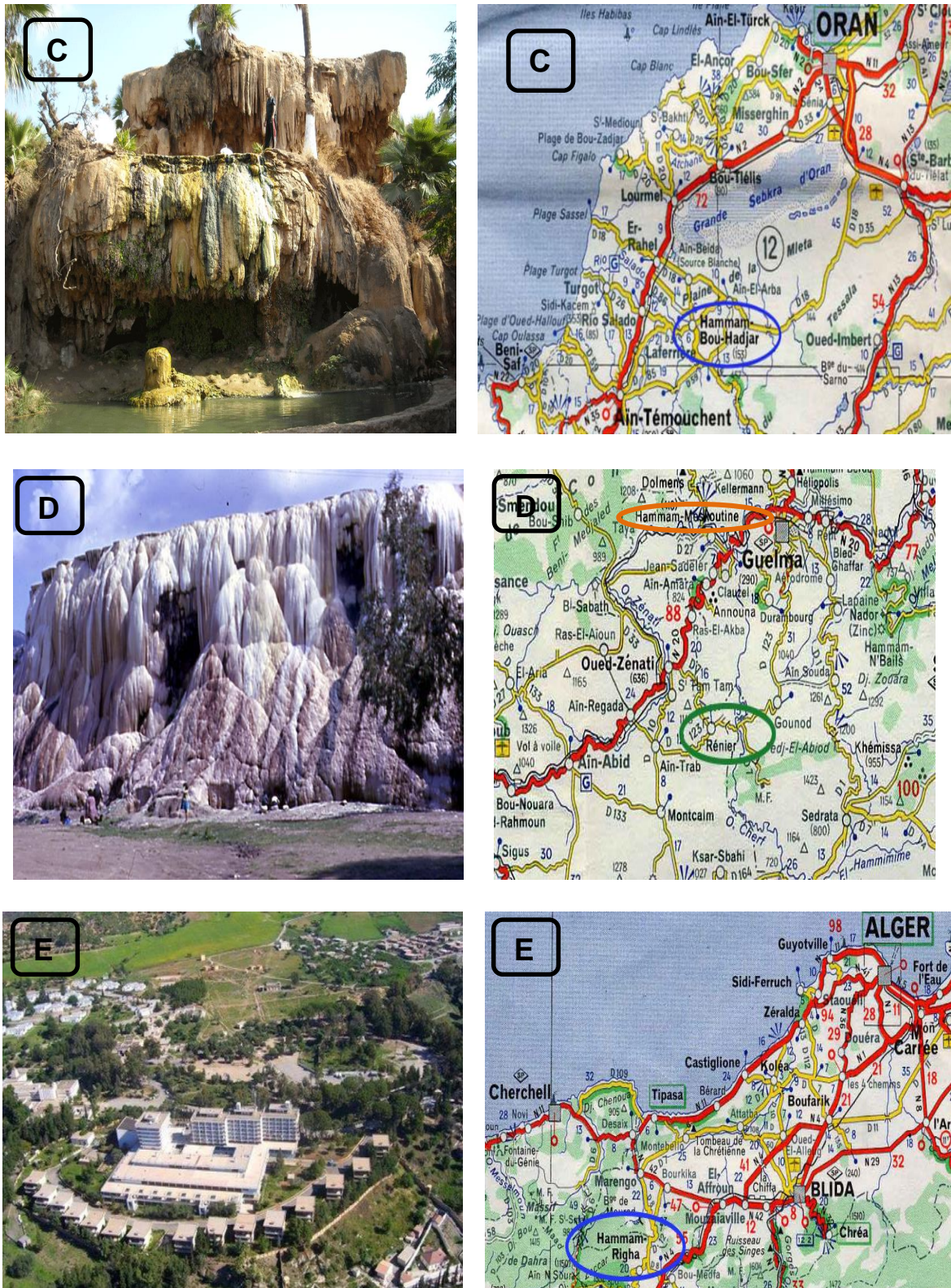


Figure 11 ::Localisation des Sources hydrothermales. C.Bouhdjar; D. Debagh; E. Righa.

### **I.2.2. Echantillonnage**

Les échantillons d'eaux et de sédiments ont été prélevés entre janvier et mai 2014 à partir de 6 points, répartis entre les sources thermales de Hammam Debagh (3 prélèvements), de Hammam Bouhnifia (11 prélèvements) de hammam Bouhdjar (10 prélèvements) et de la station d'hydrocarbures (4 prélèvements), de Hammam Rabi (2 prélèvements), de Hammam Righa (2 prélèvements). Le choix des échantillons à traiter est réalisé de façon à varier la nature et le lieu de prélèvement de ces derniers. Les échantillons d'eaux sont prélevés à 10-20 cm de la surface dans des flacons stériles de 250ml. Ceux des sédiments sont récupérés depuis le fond de la source ou des alentours puis emballés dans du papier d'aluminium stérile.

Des mesures *in situ* de la température et du pH sont réalisées, respectivement à l'aide d'un thermomètre à immersion totale avec mercure et d'un pH mètre portatif (Lutron pH-201). La mesure du pH est vérifiée au laboratoire par un pH mètre Jenway 3505. Les prélèvements sont transportés dans une glacière à 4°C.

La partie expérimentale a été effectuée au niveau du laboratoire d'hygiène de l'APC de Beb Dhaya de sidi bel Abbes (isolement et purification des souches), la deuxième partie c'était au niveau de laboratoire de bactériologie à l'hôpital de Mazouna wilaya de Relizane (le test d'activité par la zone d'hydrolyse et les tests d'identifications des souches purifiées)

La troisième partie le screening des souches les plus performants par la méthode de dosage de l'activité lipolytique par titration et l'optimisation des paramètres de production de lipase, ainsi que la purification et l'étude des propriétés catalytiques de l'enzyme sont effectuées au niveau de laboratoire de microbiologie générale à la faculté des sciences de la nature et de la vie de sidi bel Abbes

## **I.3. STRATEGIE D'ISOLEMENT**

### **I.3.1. Screening primaire**

Dans le but d'isoler des bactéries capable de produire des lipases, des dilutions décimales ont été préparées à partir de chaque échantillon jusqu'à la dilution  $10^{-5}$ . La seconde étape consiste àensemencer un milieu minimal contenant l'huile d'olive et tween 80 comme seule source d'énergie (voir Annexe) . Les boîtes de Pétri inoculées sont ensuite incubées à une température de 37°C à un intervalle de temps de 3 jours. Une lecture positive

de la production de lipase chez les bactéries se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (**Loo et al., 2006**).

### **I.3.2. Identification des isolats lipolytiques**

L'identification des isolats est faite en suivant les méthodes citées par **Tindall et al., (2007)** et également sur la base des tests proposés pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales* (**Logan et al., 2009a**) et des recommandations faites par **Tindall et al. (2010)** pour la caractérisation de nouvelles souches procaryotes.

### **I.3.3. Caractérisations culturelle et morphologique**

L'aspect macroscopique des colonies (forme, pigmentation, taille, etc.) est déterminé après croissance sur milieu solide après une incubation de 24 à 48 heures à l'aide d'une loupe binoculaire.

La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram des isolats sont déterminés sur des cultures de 24 heures par la technique de coloration différentielle décrite par **Gram (1884)** à l'aide d'un microscope photonique (modèle Motic phase contrast microscope).

### **I.3.4. Caractérisation physiologique et biochimique**

La composition chimique des milieux de culture pour l'analyse biochimique est rapportée dans l'Annexe.

### **I.3.5. Température, pH et NaCl**

L'influence sur la croissance de la température, du pH et de la concentration en NaCl est déterminée sur milieu solide en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants. La croissance est contrôlée périodiquement entre 24 et 72 heures d'incubation.

Les milieux solidesensemencés sont incubés à 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ou 70°C. La tolérance au NaCl est étudiée en faisant varier la concentration finale de ce paramètre à 0 ; 0,5 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7,5 ; 8,5 ; 10 ; 12,5 et 15% (p/v) (**Nazina et al., 2001**). L'intervalle de pH permettant la croissance est déterminé en variant ce dernier de 5 à 10 (**Harley et Prescott, 2002**).

### **I.3.6. Utilisation de substrats carbonés**

L'utilisation des substrats-tests comme source unique de carbone, d'énergie et/ou d'azote a été testée sur le milieu un dépourvu de toute source organique et additionné de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,5 g.l-1), et de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,005 g.l-1). Les substrats sont rajoutés à une concentration finale de 1 % pour les sucres et de 0,1 % pour les alcools, les acides organiques et l'acide aminé (**Gordon *et al.*, 1973**).

Les substrats testés sont : le glucose, le fructose, le galactose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le saccharose, le mannitol, le glycérol, l'oxalate, l'acétate, le lactate et la glycine.

### **I.3.7. Utilisation du citrate**

L'habilité des souches à utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie est testée sur le milieu au citrate de Simmons. Le virage au bleu du milieu indique une réaction positive (**Harley et Prescott, 2002**).

### **I.3.8. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron.**

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d' $\text{H}_2\text{S}$  et de  $\text{CO}_2$  sont appréciées sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)(**Harley et Prescott, 2002**).

### **I.3.9. Test Mannitol-Mobilité**

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu semi-solide Mannitol-Mobilité. La mobilité de l'isolat est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la piqure d'inoculation et la fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (**Harley et Prescott, 2002**).

### **I.3.10. Mise en évidence des enzymes respiratoires**

#### **➤ Cytochrome oxydase**

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne respiratoire pour catalyser la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Sa production est mise en évidence par des disques « Ox » imprégnés d'oxalate N-N-diméthyl paraphénylène.

Une quantité suffisante de culture est déposée sur le disque imbibé d'eau distillée. Une couleur bleu violacée se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive (**Joffin et Leyral, 2006**).

➤ **Catalase**

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et enoxygène, constitue un bon élément de différenciation utilisé en systématique bactérienne. La technique consiste à réaliser un frottis bactérien à partir des colonies prélevées avec soin sur gélose King B, sur lequel on dépose quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles instantanément (**Harley et Prescott, 2002**).

### **I.3.11. Caractérisation du type fermentaire**

➤ **Réaction au rouge de méthyle (RM)**

La production d'acides mixtes par les souches est mise en évidence par ensemencement du bouillon glucosé de Clark et Lubs. La lecture se fait par addition de quelques gouttes de réactif au rouge de méthyle et le virage de la couleur du bouillon au rouge indique la production d'acides mixtes (**Harley et Prescott, 2002**).

➤ **Réaction de Vogues Proskauer (VP)**

La production d'acétylméthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer) par les isolats est révélée par l'apparition d'une coloration rose du bouillon de Clark et Lubs après l'addition de 0,5 ml d' $\alpha$ -naphthol et le même volume de soude à 40% (p/v) (réaction de Barrit) (**Harley et Prescott, 2002**).

### **I.3.12. Recherche de la $\beta$ -galactosidase**

A une suspension dense des bactéries testées en eau distillée stérile, un disque imprégné d'Ortho-Nitro-phényl- $\beta$ -Galactoside (ONPG) est ajouté puis incubée à 55°C pendant 30 à 60 minutes. L'apparition d'une couleur jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et donc la présence d'une  $\beta$ -galactosidase (**Joffin et Leyral, 2006**).



### **I.3.13. Recherche de l'uréase**

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur une gélose à l'urée de Christensen. La production de l'uréase libère le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu d'où virage de l'indicateur coloré de l'orange en rose ou en rouge-violacé (**Harley et Prescott, 2002**).

### **I.3.14. Dégradation des acides aminés**

#### **➤ Utilisation du tryptophane**

La recherche de la tryptophanase, complexe enzymatique permettant la production d'indole à partir du tryptophane, est réalisée par inoculation d'un tube d'eau peptonée exempte d'indole. La production d'indole est mise en évidence par ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs (para-diméthyl-aminobenzaldéhyde/N-amyl ou isoamyl alcool/HCl pur) et une réaction positive est interprétée par l'apparition d'un anneau rouge à la surface (**Joffin et Leyral, 2006**).

#### **➤ Production de décarboxylases et de l'arginine dihydrolase**

Les activités enzymatiques de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) sont examinées en aérobiose, sur le bouillon de Moeller à partir d'une suspension dense de culture. Une activité positive est interprétée par une couleur violette (alcalinisation du milieu) et l'absence d'enzyme est exprimée par un virage au jaune (acidification du milieu) (**Joffin et Leyral, 2006**).

### **I.3.15. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires**

Les isolats sont soumis à une recherche qualitative d'hydrolases extracellulaires à 55°C. Le milieu 1 solide est modifié par réduction de la source organique (milieu de base) et l'addition du polymère-test (**Demirjian et al., 1999 ; Tholey et Heinzle, 2002**).

#### **➤ Amylase**

L'activité amylolytique est examinée en ajoutant 1% (p/v) d'amidon soluble au milieu de base. L'incubation est effectuée pendant 1 à 3 jours et la lecture se fait par inondation des boîtes avec une solution de lugol. La présence de zones claires autour de l'ensemencement témoigne de la production d'amylases (**Gordon et al., 1973**).

### ➤ **Protéases**

#### ➤ **Hydrolyse de la gélatine**

Le milieu de base est additionné de 0,4% (p/v) de gélatine. L'incubation est effectuée pendant 1 à 2 jours et la lecture se fait en rinçant les boîtes avec le réactif de Frazier. L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par l'apparition de zones claires autour des stries (**Frazier, 1926**).

#### ➤ **Hydrolyse de la caséine**

Le milieu de base est modifié par addition de 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les souches testées sont incubées pendant 1 à 2 jours. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies suite à l'hydrolyse de ce polymère (**Priest et al., 1988**).

#### ➤ **Cellulase**

Le milieu de base est supplémenté par 0,5% (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC). Après incubation, les boîtes de Pétri sont remplies d'une solution de rouge congo à 0,1% (p/v) et placées pendant 15 à 30 minutes à 55°C. La solution de rouge congo est remplacée par une solution à 1M de NaCl et les boîtes sont laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production de cellulase ou de xylanase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Bragger et al., 1989**).

### **I.3.16. Type respiratoire**

Ce test a été effectué selon les recommandations de **Guiraud, (1998)**. La gélose viande foie répartie en tube et régénérée par un chauffage durant 30 minutes au bain-marie bouillon. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spirale, de façon à ensemercer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Après refroidissement, le milieu est mis en incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

### I.3.17. Identification des espèces par analytical profile index (API)

A l'issue des examens macroscopiques (caractères culturels) et microscopiques (gram, et morphologie), et biochimiques, l'ensemble des souches bactériennes ayant révélé une activité lipolytiques ont été soigneusement purifiées par repiquages successifs sur gélose nutritive pour une éventuelle identification biochimique des espèces purifiées. Celle-ci a été menée à l'aide de galeries biochimiques miniaturisées : Api 20E (figure 12) et Api 20 NE (figure 13) (biométrieux, France) (Leyral *et al.*, 1998).



**Figure 13** : Présentation de la galerie API 20E.



**Figure 12** : Présentation de la galerie API 20NE.

## I.4. CONSERVATION DES SOUCHES LIPOLYTIQUES

Les souches bactériennes purifiées, sélectionnées productrices de lipase sont inoculées dans le bouillon nutritif contenant une concentration de glycérol à 20% à partir d'une pré-culture dans un bouillon de BHIB (Annexe A), incubées pendant de 24 heures (Gallagher et Wiley, 2008). Les souches sont ensuite conservées par congélation à une

température -20°C. La pureté de la colonie est assurée par des repiquages successifs toutes les quatre semaines.

## **I.5. SCREENING SECONDAIRES DES SOUCHES LIPOLYTIQUES**

Le criblage secondaire des bactéries productrices de lipase est procédé par la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse sur un milieu de culture solide et par le dosage de l'activité lipolytique en milieu liquide (Akram *et al.*, 2006).

### **I.5.1. Mesure de la zone d'hydrolyse**

Pour la détermination de l'activité lipolytique, une colonie isolée âgée de 24 heures de la souche testée a été utilisée pour faire deux tests : le premier par la réalisation de deux stries à travers la boîte de Pétri contenant un milieu de culture gélosé minimal à base de l'huile d'olive et tween 80 comme seule source de carbone et inducteurs de la lipase, et le deuxième par la réalisation d'un puits de 0,5 cm au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu minimal gélosé pour l'addition d'huile d'olive ou tween. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 3 jours (Jahir *et al.*, 2011). L'activité lipolytique du microorganisme a été indiquée comme étant la zone claire autour de la strie. La mesure de l'activité lipolytique a été quantifiée en mesurant la largeur de la zone claire autour de la colonie. Les cultures montrant les zones maximales d'hydrolyse sont sélectionnées pour suite les études (Wisdomkofi *et al.*, 2006).

### **I.5.2. Détermination de l'activité enzymatique par titration**

De nombreuses méthodes destinées à mesurer l'activité de la lipase ont été décrites dans la littérature. La plupart sont basées, soit sur la disparition des triglycérides ou bien sur la production des acides gras (AG) (Pabai, 1997 ; Sugihara *et al.*, 1991).

#### **I.5.2.1. Préparation de l'inoculum**

Dans le but de sélectionner la souche bactérienne productrice de la lipase la plus performante, une pré-culture est préparée par l'ensemencement de milieu de culture avec des colonies bactériennes prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile, incubé à une température de 30°C pendant 18 heures. Des suspensions bactériennes ont été préparées pour mesurer leurs densités optiques à une longueur d'onde 600 nm ajustées au 0.5Mc Farland qui correspond à une population bactérienne de  $10^6$  à  $10^8$  dont l'absorption à une longueur d'onde de 600 nm se situe entre 0,08 et 0,10.

### I.5.2.2. La culture en batch

Une suspension bactérienne d'un 1ml de chaque pré-culture est inoculée dans 100ml de milieu de culture de fermentation contenant l'huile d'olive comme seul source de carbone, répartis dans des Fiole Erlenmeyer d'un volume de 250ml. Les cultures sont ensuite incubées à une température de 30°C avec une vitesse d'agitation de 100 rpm à un intervalle de temps de 72 heures (**figure 14**).



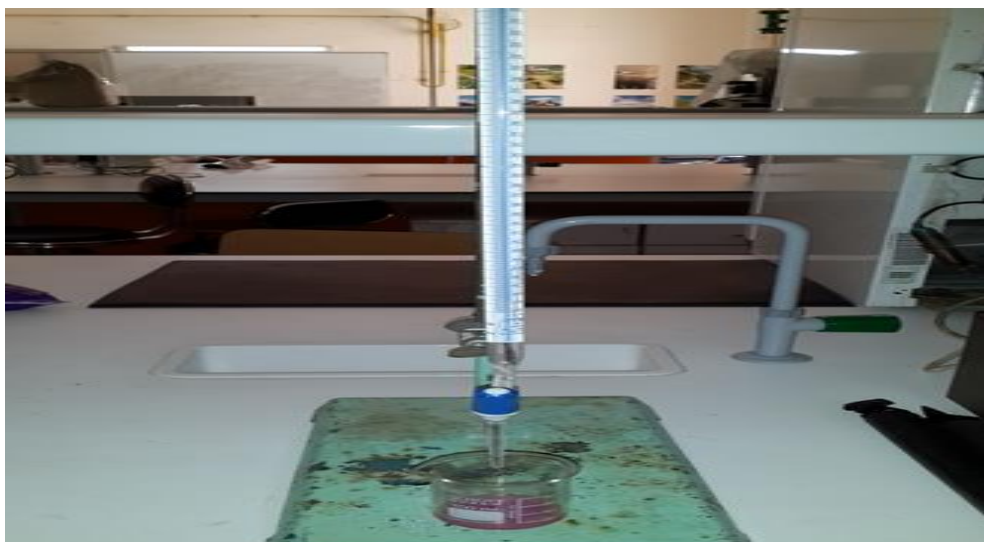
**Figure 14** : Illustration de la culture en batch.

### I.5.2.3. Détermination de l'activité lipolytique

Au cours de cette présente étude, l'activité de la lipase a été mesurée, à l'aide du test quantitatif de titration des acides gras libérés par l'enzyme au sein d'une émulsion d'huile d'olive. L'activité enzymatique lipolytique des souches est mesurée par la méthode titrimétrique. Une unité (U) de l'activité de la lipase est définie comme la quantité d'enzyme qui produit 1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  de produit (acides gras libres) (**Gargouri et al., 1986**). 2 gouttes de phénolphtaléines sont ajoutées à un volume de culture issu de la fermentation. En suite le milieu est titré par une solution de 0.5N de NaOH (**figure 15**).

*La formule* : L'activité de la lipase est calculée par la formule suivante (**Selva et al., 2008**)

$$\text{L'activité de la lipase} = \frac{\text{le volume de NaOH consommé} \times \text{la normalité de NaOH}}{\text{Le temps d'incubation} \times \text{volume de l'extrait enzymatique}}$$



**Figure 15** : Présentation de la méthode titrimétrique.

### **I.6. DETERMINATION DE LA BIOMASSE**

Les cinétiques de la croissance bactériennes de la biomasse sont déterminées par la mesure de la matière sèche (g de cellules par l de culture) et la mesure de la densité optique à 600 nm (**Sidhu *et al.*, 1998**) à différents temps. Pour la détermination de la masse sèche un échantillon de 1 ml, de la culture est transféré dans un micro tube de 1,5 ml. les cellules sont par la suite centrifugées à 10000 rpm/10min à une température ambiante, lavées avec 1 ml d'eau distillée et séchées une nuit à 105°C. Après refroidissement des tubes à températures ambiante, ils sont pesés à nouveau afin de déduire la masse des cellules sèches (**Ito *et al.*, 2001**).

### **I.7. LA SELECTION DES SOUCHES LES PLUS PERFORMANTES**

Les deux tests cités si dessus (la mesure du diamètre d'hydrolyse et de l'activité lipolytique par titration) ont été appliqué pour la sélection des souches ayant un haut potentiel lipolytique. Les souches présentant une zone d'hydrolyse la plus large ainsi qu'une importante activité lipolytique seront retenue pour l'optimisation des conditions de production et la purification de l'enzyme.

### **I.8. INTERPRETATION PROBABILISTIQUE DES PROFILES BIOCHIMIQUE PAR LE BACTERIAL IDENTIFICATION PROGRAM**

Le logiciel Bacterial identification program développé durant les années 90 au niveau d'Université se Southampton (Grande-Bretagne) est destiné pour l'identification des

isolats bactériens. Les matrices d'identification utilisée dans se programme sont enregistrer sous forme de fichier Excel une fois le programme ouvert, l'emplacement de la matrice correspondante au type la galerie utilisée doit être impliqué en cliquant deux fois sur la matrice, le programme l'utilise directement.

## **I.9. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE LIPASE**

Dans le but d'optimiser la production de la lipase chez les souches les plus performantes et pour explorer l'influence des différents paramètres sur l'activité lipolytique, l'effet de la source d'azote et la source de carbone et l'effet de certains sucres et d'autres paramètres sont étudiés.

### **I.9.1. Effet de la période d'incubation**

L'étude de l'effet de la période d'incubation sur La production de la lipase à été réalisées sur milieu minimal avec une incubation à 37 °C pendant 72 heures. Des échantillons sont collectés après 18, 24, 48 et 72 heures pour vérifier la production maximale de la lipase. (**Hasan et Hameed., 2001**).

### **I.9.2. Effet de substrat lipidique**

Pour trouver les conditions optimales pour une haute production de la lipase, l'huile d'olive est substitué par : l'huile de sésame, huile d'argan huile des hydrocarbures, le glycérol et le tween 80. Les souches bactériennes sont cultivées dans des milieux minimaux contiennent les différents substrats lipidiques à une température de 37 °C pendant 72 heures. (**Neerupma et al., 2006**).

### **I.9.3. Effet de la source d'azote**

L'étude de la source d'azote sur la production de la lipase é été étudié des milieux minimaux par l'utilisation des différentes sources d'azote telles que l'extrait de levure, l'extrait de viande, l'extrait de Malt, la caséine et la peptone, puis une incubation à une température de 37 °C pendant 72 heures (**Selva et al., 2008**).

### **I.9.4. Effet du pH**

La production de l'enzyme et la croissance bactérienne sont observées sur un milieu minéral à différent pH : 4, 6, 8, 10 et 12, après une incubation à une température de 37 °C pendant 72 heures (**Balakrishnan et al., 2011**).

### **I.9.5. Effet des sources de carbone**

Afin d'évaluer l'influence de la source de carbone sur la production de la lipase et en présence des sources de carbone lipidiques, Les souches bactériennes ont été cultivées dans des milieux minimaux contenant les sucres suivants : le galactose, le saccharose, l'amidon, le maltose et le glucose à 1% puis incubées à une température de 37 °C pendant 72 heures (**Vargas *et al.*, 2004 ; Haider *et al.*, 2007**).

### **I.9.6. Influence de la concentration des substrats**

Différents essais ont été réalisés afin de vérifier l'influence de la concentration des substrats lipidique sur la production de l'enzyme et la croissance des bactéries. Ainsi, en plus de l'essai à 1% de substrat effectué au cours de la série d'expériences précédente, des essais ont été réalisés par l'ajout des substrats lipidiques à des concentrations différentes telles que 0.5, 2, 3, 4 et 5 %, puis une incubation à une température de 37 °C pendant 72 heures (**Ghori *et al.*, 2011**)

### **I.9.7. Optimisation de l'inoculum**

Afin d'explorer l'influence de la quantité d'inoculum sur la production des lipases, une suspension bactérienne d'une densité de 0,5 Mc Farland préparée à partir d'une pré-culture âgée de 24 heures, à été inoculée dans 100 ml de milieu de culture optimisé pour la production de lipases. Les concentrations d'inoculum (0.2, 0.3, 0.4, 0.5) ont été testées. Ensuite, les culturesensemencées avec les différentes concentrations de la biomasse bactérienne sont incubées à une température de 37 °C, avec une agitation de 100 rpm à des intervalles de temps réguliers (24, 28, 72h. L'activité lipolytique est mesurée par la méthode titrimétrique). (**Shah *et al.*, 2007**)

### **I.9.8. La production de la lipase dans le milieu optimisé**

Après l'optimisation des conditions de culture pour la production de la lipase ainsi que les besoins nutritionnelles de croissance, l'activité lipolytique est déterminée dans un milieu de culture minimal après une incubation à température de 37 °C pendant 72 heures

### **I.9.9. Suivre de la cinétique de croissance**

L'étude de la croissance des souches bactériennes a été réalisée dans le but de révéler le comportement de ces souches isolées à partir des sources thermales et de quantifier la production de lipases en fonction des différentes phases de croissance dans le milieu



optimisé. Les cinétiques de croissance de la biomasse sont déterminées par la mesure de la masse sèche (g de cellules / L de culture) et la mesure de la densité optique à 600 nm à différents temps. Pour la détermination de la masse sèche, un échantillon de 1 ml de la culture est transféré dans un microtube de 1,5 ml. Les cellules sont par la suite séparées du surnageant par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min à température ambiante, lavées deux fois avec 1 ml d'une solution NaCl 0,85 % et séchées pendant une nuit à 90°C. Après refroidissement des tubes à la température ambiante, ils sont pesés de nouveau afin de déduire la masse des cellules sèches.

Pour les mesures de la densité optique, à l'aide d'un spectrophotomètre, 1 ml de culture de fermentation est prélevé, pendant un intervalle de temps donné, pour les mesures des densités optiques à 600 nm (Najjar, 2010).

### **I.9.10. Dosage des protéines**

Le dosage des protéines contenues dans le surnageant de la culture bactérienne est effectuée selon la méthode décrite par Bradford (1976), qui se repose sur la fixation des protéines à l'aide de l'acide bleu de coomassie. La lecture est procédée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde 595 nm de la coloration formée. La courbe étalon est établi avec une solution standard de sérum albumine bovine (BSA), préparé à des concentrations variées de 100-500 mg/l.

La courbe d'étalonnage est obtenue par la mesure de l'absorbance des concentrations préparées de sérum albumine bovine (BSA) .

Un volume de 2 ml de bleu de coomassie G-250 est ajouté à un volume de 0,1 ml d'échantillon (extrait enzymatique et enzyme purifiée), est homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes est ensuite est incubé dans l'obscurité pendant un intervalle de temps de 30 min pour le développement de la coloration . la lecture s'effectué par la mesure de l'absorbance de la coloration formé à une longueur d'onde de 595 nm.

### **I.9.11. Purification de la lipase**

Après l'optimisation des différents paramètres favorisant une production optimale de la lipase, le surnageant contenant les lipases est récupéré par l'élimination des cellules productrices de la lipase à l'aide d'une centrifugation à une vitesse 10000 g, à une température de 4°C pendant 20 min. Le surnageant est utilisé comme étant un extrait brut (Camacho *et al.*, 2009)

#### **I.9.11.1. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium**

La précipitation des protéines au sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a été réalisée à l'aide d'un essai pilote afin de déterminer la gamme de fractionnement maximal des enzymes ciblées la quantité de sulfate d'ammonium nécessaire pour apporter un volume de 1 ml d'extrait à X % de saturation à 0°C. Des concentrations graduelles en sulfate d'ammonium allant de 0 à 100% (10% d'intervalle) ont été réalisées avec 1 ml de l'extrait brut dans des tubes de centrifugation de type ependorffs (1,5 ml de volume) à une température de 0°C. Le mélange est agité légèrement afin de dissoudre le sel, puis laissé au repos pendant 30 min, à 0°C. Le mélange est ensuite centrifugé à la même température, à une vitesse de 10000 g pendant 10 min. L'activité enzymatique et la concentration en protéines sont déterminées sur le précipité de chaque fraction.

La comparaison entre les activités spécifiques des précipités obtenues de chaque tube, permet de déterminer la fraction du précipité au sulfate d'ammonium la plus importante pour la purification de l'enzyme testée. Ainsi, les fractions comprises entre 40-60 (p/v) de saturation en sulfate d'ammonium ont été retenues respectivement, pour la purification d'enzyme. Les fractions enzymatiques retenues après précipitations au sulfate d'ammonium sont dessalées par la dialyse contre une solution tampon de phosphate de sodium à une concentration de 50 mM, pH 7,2. Elles sont ensuite conservées à une température de -40°C pour une purification plus approfondie.

### **I.9.12. Chromatographie**

La purification a été effectuée par l'utilisation de la chromatographie d'échange d'ion avec des colonnes d'échanges d'anions (DEAE de cellulose). L'élution des protéines à travers des colonnes chromatographiques a été suivie à une longueur d'onde de 254nm. Les colonnes sont préalablement équilibrées par une solution tampon de phosphate de sodium

pH 7,2. Les fractions protéiques fractionnées à 40% et 60% sont rassemblées et injectées dans les colonnes, après une étape de lavage, un gradient linéaire de concentration en NaCl allant de 0-1mM est utilisée pour éluer l'enzyme décroché avec un débit de 1 ml/min. les fractions contenant un volume de 3 ml sont recueillies dans les tubes à essais et leurs activités enzymatiques sont déterminées. les fractions actives sont rassemblées, et leurs degrés de pureté sont déterminés.

## **I.10. ETUDE DES PROPRIETES CATALYTIQUES DE LIPASE PURIFIEE**

### **I.10.1. Effet de pH**

Le pH optimum est déterminé par l'emploi d'une gamme de tampons variant de 3 à 10 (avec des variations de 1 unité). l'enzyme purifiée est incubée dans un pH, à une température de 35°C pendant un intervalle de temps de 10 min. L'activité lipolytique est mesurée en présence d'huile d'olive comme substrat.

### **I.10.2. Effet de la température**

Dans le but de déterminer l'effet de la température sur l'activité de la lipase, un volume de 0,1 ml d'échantillon de l'enzyme purifiée est incubé en présence de l'huile d'olive à différentes température de 20 à 80°C et à pH 7 pendant un intervalle de temps de 10 min.

### **I.10.3. Etude de la thermostabilité**


L'étude de la stabilité thermique est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique résiduelle, après incubation de l'enzyme purifiée à différentes températures (20°C, 30°C, 40°C, et 50°C) et à pH 7, sur une période allant jusqu'à 60 min.

### **I.10.4. Effet du pH sur la stabilité**

Le pH de stabilité à été déterminé par préincubation de l'enzyme dans des tampons de pH variant de 3 à 10 (une unité de variation) pendant 60min, à 30°C. Après cela les pH sont réajustés à pH 7. L'activité enzymatique résiduelle est ensuite déterminée.

### **I.10.5. Effet des effecteurs chimiques sur l'activité lipolytique**

L'effet des ions métalliques sur l'activité lipasique est mis en évidence par la mesure de l'activité résiduelle, qui consiste à inoculer l'enzyme purifiée avec une concentration de 1 mM de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> pendant un intervalle de temps de 60 min .



# III

---

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

## I. RESULTATS

### I.1. ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES ECHANTILLONS

Les valeurs de température et de pH enregistrées pour les eaux des sources thermales étudiées sont notées dans le (**Tableau 5**).

Les eaux thermales de Guelma et Bouhdjar, possèdent un pH légèrement acide à neutre (pH 6,45 à 7,11), alors que celles des sources de hamam Rabi, de Bouhnifia et de hamam Righa tendent légèrement vers l'alcalinité (pH 7,60 à 7,74). La nature chimique chloruro-calcique de ces eaux accompagnée d'une salinité relativement élevée due probablement à la composition lithologique des sites étudiés, peut expliquer ces valeurs de pH. Une étude sur la caractérisation et la classification de 41 sources thermales algériennes réparties sur 14 zones géographiques, comprenant les sites de la présente étude, a révélé des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 8,8 et une salinité relativement élevée (550 mg/l à 5500 mg/l) comparée à celle de l'eau potable (**Bahri *et al.*, 2010**).

Des températures comprises entre 34°C et 40°C ont été enregistrées aux points de Prélèvement de Hammam Rabi, de 50 jusqu'au 65°C aux points de prélèvements de Hammam Bouhanifia, celle de hammam Righa est 60 jusqu'au 65°C, Une présence de végétation plus ou moins dense ainsi que celle d'algues autour et au niveau de ces points a été observée ce qui suggèrerait que ces températures modérément élevées ont permis leur croissance. A l'inverse, les points de prélèvements de Hammam Bouhdjer (tpt allant jusqu'au 76°C) et Hammam Debagh (tpt de 90°C à 98°C) enregistrent des températures de 90°C et de 96°C, respectivement, avec un environnement dégagé et la présence moins évidente, de formes de vie macroscopique (Figure15). Il est évident que la température influence la biodiversité de ces biotopes.

**Tableau 5 : Valeurs de température et de pH enregistrées au niveau des points de prélèvements d'eau**

| Site de prélèvement     | Date de prélèvement | T° de source (°C) | pH          |
|-------------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| <b>Hamмам Debagh</b>    | 02/02/2014          | De 90°C - 98°C    | 6,45 à 7,11 |
| <b>Hamмам Bouhnifia</b> | 04/05/2014          | De 50°C - 65°C    | 7 à 7,74    |
| <b>Hamмам Bouhdjar</b>  | 13/01/2014          | De 60°C - 75°C    | 6,45 à 7,11 |
| <b>Hamмам Rabi</b>      | 13/05/2014          | De 35 - 40°C      | 7,60 à 7,74 |
| <b>Hamмам Righa</b>     | 18/01/2014          | De 60°C --70°C    | 7,2 à 7,74  |

## I.2. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ISOLATS

A l'issus des différentes tentatives d'isolements effectuées sur le milieu minérale gélosé à base de 1% de Tween 80 et 1% de l'huile d'olive, milieu de culture préconisé pour la sélection des souches lipolytiques. De plus d'une centaine de souches à partir des différents sites. Au final, cinquante neuf (59) isolats sont retenus pour cette étude et désignés selon un code composé de lettres et de numéros. Sur ce total, 8 isolats sont issus de la région de Hamмам Debagh (Meskhoutine), 11 isolats de la région de Hamмам Bouhnifia et 12 isolats de la station d'hydrocarbure (Bechar) ,4 isolats de la région de Hamмам Righa, 8 isolats de Hamмам Rabi, 16 isolats de hamмам Bouhdjar. Trois principaux genres ont été identifiés : *Pseudomonas* et *Bacillus*, *Aeromonas*.

## I.3. CARACTERISATION PHENETIQUE DES ISOLATS

La caractérisation phénétique des isolats a été réalisée après avoir déterminé les conditions optimales de croissance (température, pH et salinité).

### I.3.1. Caractérisations culturelle et cellulaire des isolats

Dans le **tableau 6** sont présentés les résultats des caractères cultureux et cellulaires des isolats.

### **I.3.1.1. Aspect macroscopique**

L'observation macroscopique des souches sur le milieu minimal, a permis de dégager trois aspects différents de colonies (**Figure 16 ,17**) :

➤Colonies de type lisse (L)

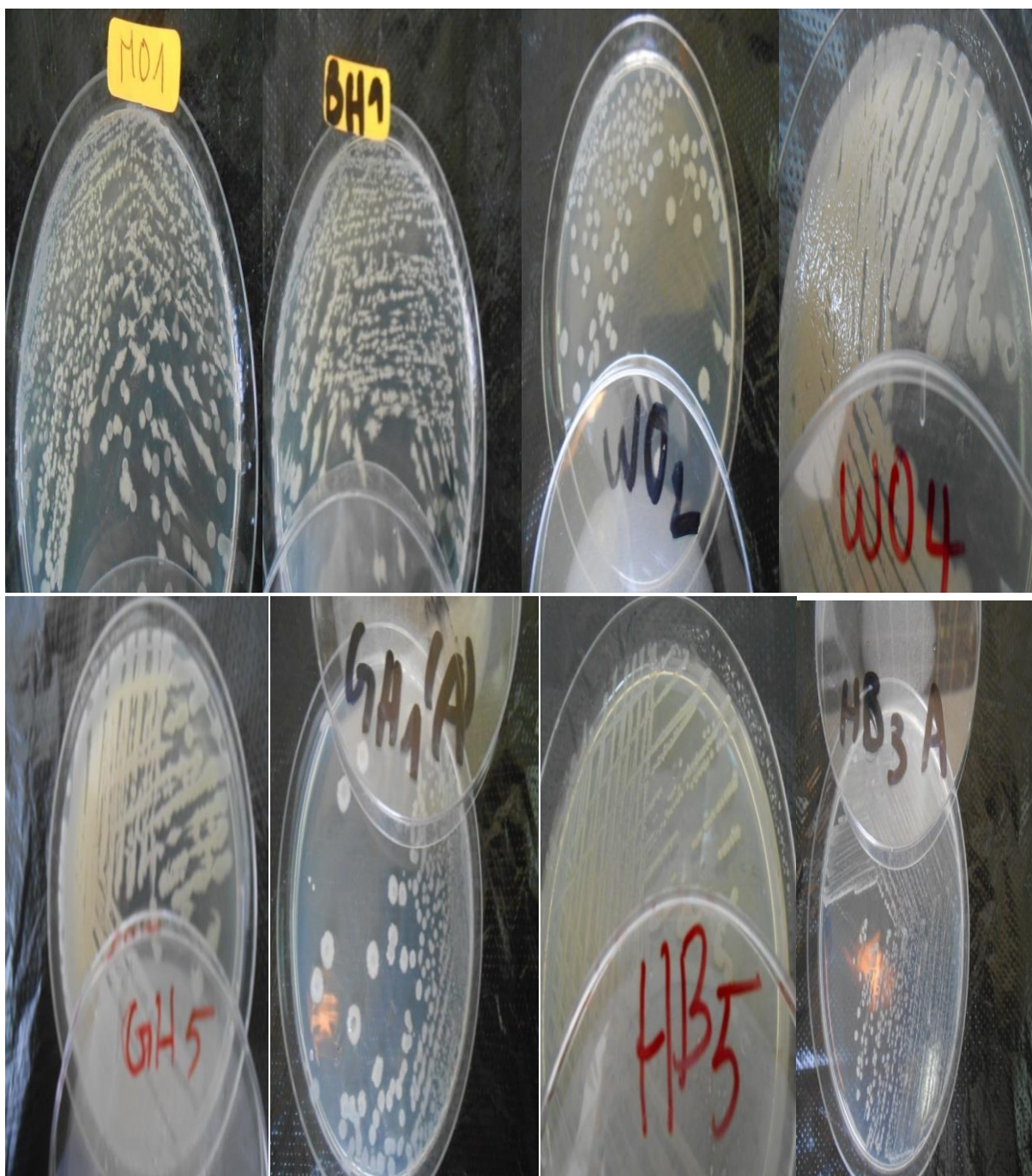
44 souches présente Ce type cultural, c'est le plus rencontré, caractérisé par des colonies de forme ombiliquée, de consistance crémeuse, translucide à opaque à la lumière, transparente dans certains cas. Leur surface est lisse, bombée et les bords sont réguliers.

➤Colonies de type rugueux (R)

9 souches présentent ce type de formation. Les colonies ont une surface rugueuse, lobée, à bords dentelés ou filamenteux, de consistance sèche, opaque à la lumière. Les colonies présentent un mycélium aérien abondant de couleur blanche poudreuse, détachable au toucher et un mycélium de substrat de la même couleur. L'observation sous une loupe binoculaire révèle des structures filamenteuses touffues.

➤Colonies de type muqueux (M)

Colonies muqueuses et bombées, translucides voir transparentes, à bords réguliers ou ondulés. 6 souches seulement présentent ce type.



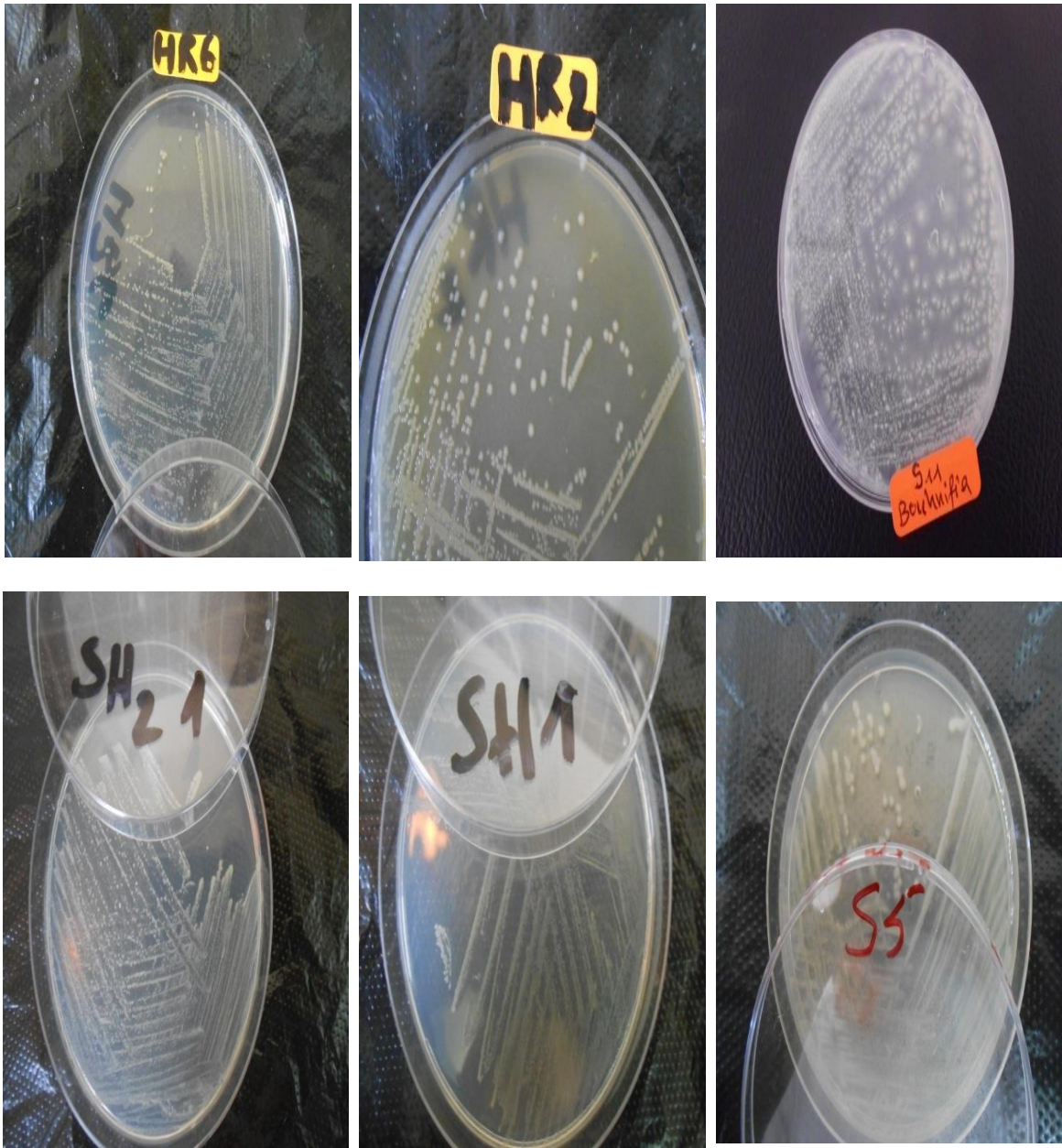
**Figure 16** :Aspects macroscopique des souches isolées cultivées sur le milieu minimal à base de tween 80 et l'huile d'olive.

**Type L**:les souches WO2,WO4,HB5,GH5,HR2,HR6,S5,MO1,BH1.

**Type R** : les souches GH1(A), HB3A.

**Type M** : les souches : S11, SH2 1, SH1. Photos prises avec un appareil photo numérique Nikon COOLPIX s 3300.





**Figure 17 :** (suite) Aspects macroscopique des souches isolées cultivées sur le milieu minimal à base de tween80 et l'huile d'olive.

**Type L:** les souches WO2, WO4, HB5, GH5, HR2, HR6, S5, MO1, BH1.

**Type R :** les souches GH1(A), HB3A.

**Type M :** les souches : S11, SH2 1, SH1. Photosprises avec un appareil photo numérique Nikon COOLPIX s 3300.

### I.3.1.2. Aspect microscopique

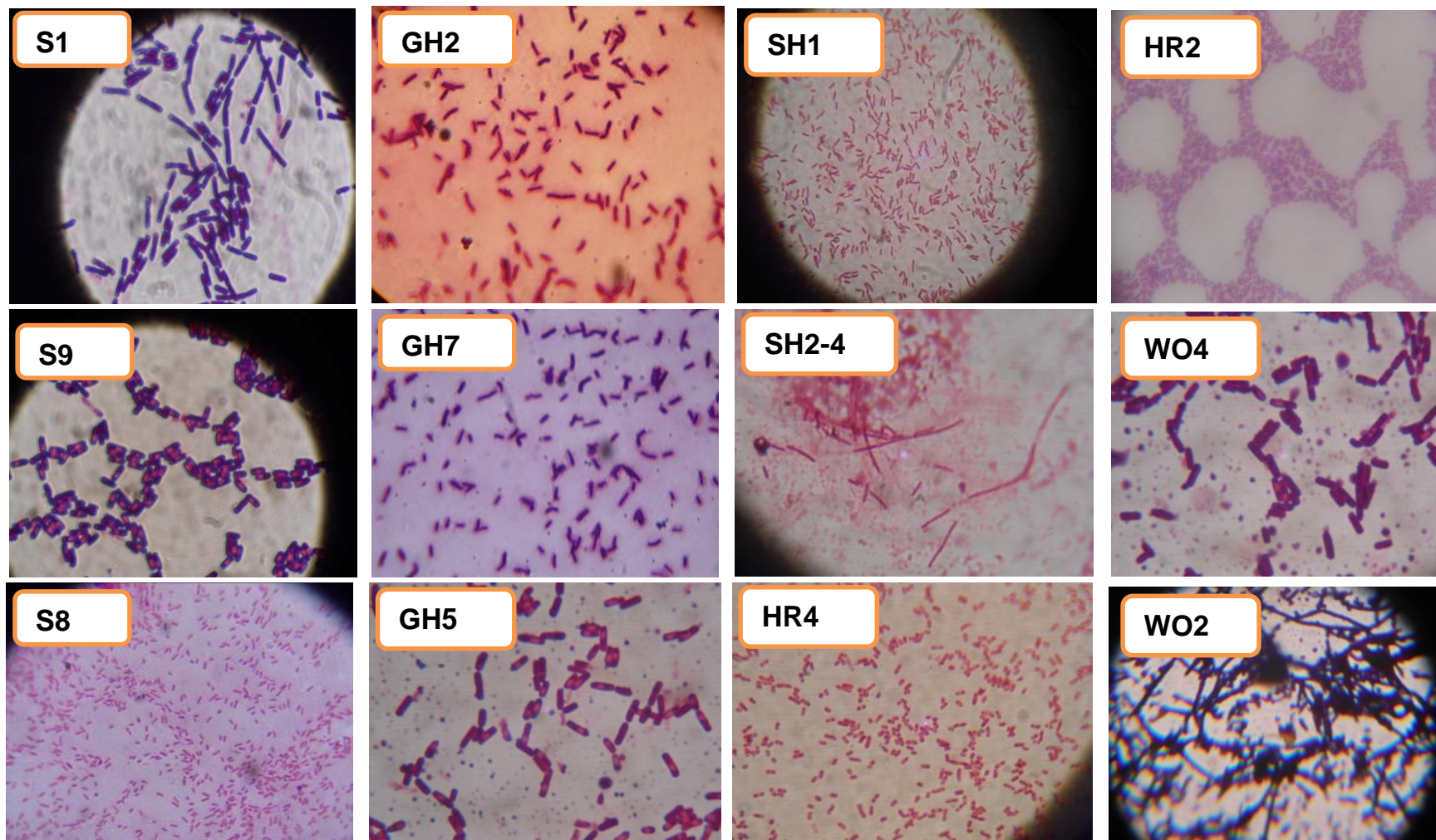
#### ➤ Souches à Gram positif

La coloration de Gram, effectuée sur des cultures jeunes sur le milieu minimal, a révélé que 44 souches sont à Gram positif. Les formes cellulaires observées en microscopie photonique sont les suivantes :

- Des bâtonnets parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangés en longues chaînes ou en chaînettes selon les isolats. Une fois âgées (cultures de 72 heures), quelques souches forment une endospore par cellule en position terminale ou subterminale (**Figure 18**, S1, S9, GH5, WO4). Ce type cellulaire a été observé avec les souches formant des colonies de types Lisse ou Muqueux.
- L'aspect coccobacille est rencontré chez la souche HR4 qui forme des chaînes plus ou moins longues alors que la forme coccoïde avec un mode de formation en grappe est observée chez la souche SH2-2.
- L'observation microscopique des mycéliums aériens des 9 souches de type Rugueux a révélé des structures filamenteuses arborescentes, avec présence de spores (**Figure 18-SH2- 4**).

#### ➤ Souches à Gram négatif

Quinze souches sont à Gram négatif. Les cellules se présentent sous forme de bâtonnets sans mode de formation particulière (S8).



**Figure 18** : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). A. Coloration de Gram des souche souches HR2, WO4, WO2, HR4, SH2-4,SH1,GH5,GH7,GH2 ,S1,S8. Photosprises avec un appareil photo numérique Nikon COOLPIX S3300.

**Tableau 6** : Caractérisations culturale et cellulaire des isolats

| <i>Souche</i> | <i>Gram</i> | <i>Forme des cellules</i> | <i>Endospore</i> | <i>Aspect colonies</i> | <i>Couleur</i> |
|---------------|-------------|---------------------------|------------------|------------------------|----------------|
| S1            | +           | Bacilles                  | +                | L                      | Jaune          |
| S2            | +           | Cocci                     | -                | M                      | Blanche        |
| S3            | +           | Bacilles en chainettes    | +                | R                      | Blanche        |
| S4            | +           | Diplocoques               | -                | L                      | Jaune          |
| S5            | +           | Coccobacilles             | -                | L                      | Transparent    |
| S6            | -           | Coccobacilles             | -                | L                      | Crème          |
| S7            | +           | Bacilles                  | -                | L                      | Blanche        |
| S8            | -           | Bacilles                  | +                | L                      | Blanche        |
| S9            | +           | Bacilles                  | +                | R                      | Transparent    |
| S10           | +           | Bacilles                  | +                | R                      | Transparent    |
| S11           | +           | Bacilles                  | -                | L                      | Crème          |
| HB1           | -           | Bacilles long fins        | -                | L                      | Blanche        |
| HB3-A         | +           | Grosses bacilles          | -                | L                      | Blanche        |
| HB3-B         | -           | Bacilles fins             | -                | L                      | Vert           |
| HB4           | +           | Coccobacille              | -                | L                      | Vert           |
| HB5           | -           | Bacilles fins             | -                | L                      | Transparent    |
| HB6           | +           | Grosse bacilles           | +                | L                      | Jaune          |
| HB7           | +           | Bacilles                  | +                | L                      | Blanc          |
| HB8-A         | -           | Cocci                     | -                | M                      | Transparent    |
| HB8-B         | +           | Grosses bacilles          | +                | L                      | Jaune          |
| HB10          | -           | Cocci                     | -                | M                      | Blanc          |
| HB10-A        | +           | Coccobacille              | +                | L                      | Transparent    |
| HB10-B        | +           | Bacille                   | -                | L                      | Crème          |
| MO1           | +           | Bacilles long             | +                | R                      | Blanche        |
| HB10-CC       | -           | Bacille fins              | -                | R                      | Vert           |
| HB10-CH       | +           | Bacille long              | -                | L                      | Blanc          |
| HB10-D        | +           | Bacilles                  | -                | L                      | Jaune          |
| GH1-A         | +           | Bacilles                  | +                | L                      | Crème          |
| GH1-B         | +           | Bacilles                  | +                | L                      | Jaune          |
| GH2           | +           | Bacilles                  | +                | L                      | Blanc          |
| GH3           | +           | Bacille                   | +                | M                      | Transparent    |
| GH5           | +           | Bacilles en chainettes    | +                | L                      | Blanc          |
| GH6           | +           | Bacille long              | +                | L                      | Transparent    |

|  |   |                        |   |   |              |
|--|---|------------------------|---|---|--------------|
| GH6-A  | + | Bacille                | + | L | Jaune        |
| GH7  | + | Grosse bacilles        | - | M | Blanc        |
| WO1  | + | Bacille                | + | L | Transparent  |
| WO2  | + | Bacilles               | - | R | Blanc        |
| WO3  | + | Bacille long           | - | L | Jaune        |
| WO4  | + | Bacille                | + | R | Blanc        |
| BH1  | + | Bacille                | + | L | Transparent  |
| BH2  | + | Bacille                | + | L | Blanc        |
| BH3  | + | Bacille                | + | R | Blanc        |
| SH1  | - | Bacille                | - | L | Blanc        |
| SH2- 1   | - | Cocci                  | - | L | Blanc        |
| SH2- 2   | + | Coccobacille           | + | L | Jaune        |
| SH2- 4A  | + | Bacilles en chainettes | + | L | Blanc        |
| SH2 -4B  | + | Bacilles               | - | L | Crème        |
| SH2- 5   | + | Bacille                | + | L | Transparent  |
| SH2- 5A  | + | Bacille                | - | M | Blanc        |
| SH2- 5-B   | + | Bacille                | - | R | Crème        |
| HR1- A   | + | Bacille                | + | L | Blanc        |
| HR1- B   | + | Cocci                  | - | L | Transparente |
| HR3  | + | Coccobacille           | - | L | Blanc        |
| HR4  | + | Bacille                | + | L | Crème        |
| HR4- A   | + | Grosse bacilles        | + | L | Crème        |
| HR4- B   | - | Bacille                | - | L | Transparent  |
| HR5  | + | Bacille                | + | L | Blanc        |
| HR6  | - | Bacille long           | + | L | Transparent  |
| HR7  | + | Bacille                | + | L | Jaune        |
| <b>L</b> : Type lisse. <b>M</b> : Type muqueux. <b>R</b> : Type rugueux. +: Gram positif. -: Gram négatif ou absence |   |                        |   |   |              |

## I.3.2. Caractérisation physiologique des isolats

### I.3.2.1. Température de croissance

La gamme de températures explorée varie de 30 à 70°C. Au-delà de 70°C l'agar devient instable et l'évaporation de l'eau est très importante ce qui rend la culture impossible, d'autres polymères plus thermostables comme la Gelrite (gellan gum) ou bien le poly silicate devraient être utilisés (Volkl *et al.*, 1993). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 7**. Généralement, la croissance de l'ensemble des souches est optimale entre 55°C et 60°C, ce qui correspondait à la température initiale de l'isolement de la plus part des souches. Selon les intervalles de croissance obtenus, 3 groupes différents peuvent être dégagés. Le premier groupe correspond aux souches ayant une température minimale comprise entre 40 et 55°C et pouvant se développer à 70°C, le deuxième est celui des souches qui ont une température maximale de croissance de 65°C et un minimum variant entre 35°C et 45°C voir même 50°C. Enfin le dernier groupe, numériquement le plus important, inclue les souches possédant un intervalle de température plus large (de 30 à 70°C). Il comprend toutes les souches isolées des sources de Hammam Debagh. Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont désormais classés surtout selon leur optimum de température de croissance, et les classifications précédentes, basées sur le concept de thermophilie, de thermotolérance et des intervalles minimal et maximal de croissance étant trop restrictives, ont été écartées (Mesbah et Wiegel 2008 ; Wagner et Wiegel 2008). Ils sont ainsi classés en thermophiles modérés ( $T_{opt}$  de 50° à 70°C), thermophiles extrêmes ( $T_{opt}$  de 70°C à 80°C) et hyperthermophiles ( $T_{opt} > 80^\circ\text{C}$ ) (Stetter, 1996). En se basant sur cette définition, nos souches dont l'optimum de croissance est situé entre 55 et 60°C, sont qualifiées de thermophiles modérées. Généralement, c'est le cas de la majorité des bactéries hétérotrophes aérobies isolées jusqu'à maintenant (Logan et Halket, 2011).

### I.3.2.2. Tolérance au NaCl et spectre de pH

Les spectres de salinité et de pH enregistrés figurent dans le **tableau 7**. Toutes les souches étudiées peuvent se développer en absence de NaCl et la plupart sont incapables de croître au-delà de 5% (p/v) de NaCl et présentent une gamme de pH de croissance relativement réduite (pH 6 à pH 8). Cependant, un groupe formé de 20 souches a pu se développer au-delà de ces limites. En effet, les souches S11, HB3-B, HB3-B, HB5, HB6

, HB7, HB10-A , HB10-B, croissent (mais faiblement) à des concentrations en NaCl de 12 allant jusqu'au 14% (p/v) et possèdent un intervalle de pH plus considérable que les autres isolats et tolèrent ainsi des variations de pH de 5,5 à 10 avec un optimum autour de 7,5. Ce sont des neutrophiles mais qui peuvent être qualifiées également d'halotolérantes et d'alcalitolérantes selon **Larsen (1986) et Krulwich et Guffanati (1989)**, respectivement. Ces deux caractères sont souvent conjugués et il a été prouvé que l'alcali-résistance voir même l'alcaliphilie exigeait la présence intracellulaires d'ions sodium pour le métabolisme et la régulation, c'est la raison pour laquelle la plupart des organismes alcaliphiles sont au moins halotolérants. Cette tolérance peut s'étendre sur de larges intervalles de pH, ce qui signifie qu'elles peuvent se développer également à des pH acides grâce à d'autres mécanismes, d'acidotolérance cette fois-ci (accumulation de solutions compatibles et de protons H<sup>+</sup>) (**Lewinson et al., 2004**). Par ailleurs, de nombreux polyextrêmophiles « alcali-thermophiles et halophiles » ont été déjà isolés (**Mesbah et Wiegel 2008 ; Canganella et Wiegel, 2011**). A l'image de cette espèce del'ordre des *Thermotogales* (*Thermopallium natronophilum*), thermophile extrême, halophile et alcaliphile (**Duckworth et al., 1996**).

### **I.3.2.3. Utilisation des substrats carbonés**

Les résultats de croissance sur les différents substrats testés comme unique source de carbone, d'énergie et/ou d'azote sont présentés dans le **tableau 8**. Les sucres sont les plus assimilés par les isolats et il en ait de même du mannitol. Alors que le glycérol et la glycine le sont faiblement. Le citrate est le seul acide organique assimilé par quelques isolats.

### **I.3.3. Caractérisation biochimique des isolats**

Les résultats de la caractérisation biochimique des souches sont représentés dans le **tableau 9**.

#### **I.3.3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires**

Toutes les souches bactériennes étudiées possèdent au moins l'une des deux enzymes respiratoires recherchées, et 21 d'entre elles sont oxydase et catalase positives. La plupart des microorganismes aérobies possèdent ces enzymes y compris les bactéries thermophiles (**figure 19**).



**Figure 19** :: La mise en évidence du test de catalase chez les souches : MO1,SH2-2,GH5

### **I.3.3.2. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron**

Le milieu Triple Sugar Iron (TSI) renseigne sur la capacité à dégrader le glucose, le lactose et/ou le saccharose. L'oxydation du lactose et/ou du saccharose est observée chez plus de souches que la fermentation du glucose. Par ailleurs, cette fermentation n'est pas accompagnée d'une production de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>S.



**Tableau 7 : Caractérisation physiologique des isolats**

| Souche  | T (°C)<br>[min-max] | NaCl (%)<br>[min-max] | pH [min-<br>max] | Souche  | T (°C)<br>[min-max] | NaCl (%)<br>[min-max] | pH [min-<br>max] |
|---------|---------------------|-----------------------|------------------|---------|---------------------|-----------------------|------------------|
| S1      | 40-80               | 0-1                   | 7-8              | GH3     | 45-60               | 0-5                   | 7-9              |
| S2      | 40-50               | 0-1                   | 7-10             | GH5     | 35-70               | 0-6                   | 6-10             |
| S3      | 45-60               | 0-1                   | 6-7              | GH6     | 45-75               | 0-1                   | 6-8              |
| S4      | 35-50               | 0-5                   | 7-9              | GH6-A   | 60-70               | 0-5                   | 5-8              |
| S5      | 40-50               | 0-1                   | 6-8              | GH7     | 50-70               | 0-3                   | 6-8              |
| S6      | 45-65               | 0-5                   | 7-8              | WO1     | 30-45               | 0-7                   | 6-8              |
| S7      | 30-50               | 0-2                   | 7-8              | WO2     | 35-50               | 0-1                   | 6-7              |
| S8      | 35-60               | 0-5                   | 6-8              | WO3     | 30-60               | 0-10                  | 7-10             |
| S9      | 40-60               | 0-2                   | 7-8              | WO4     | 50-60               | 0-9                   | 5-10             |
| S10     | 45-60               | 0-1                   | 6-7              | BH1     | 40-60               | 0-1                   | 6-8              |
| S11     | 50-60               | 0-12                  | 7-10             | BH2     | 35-60               | 0-8                   | 7-10             |
| HB1     | 45-65               | 0-10                  | 5-10             | BH3     | 30-50               | 0-1                   | 7-8              |
| HB3-A   | 50-65               | 0-10                  | 5-10             | SH1     | 30-40               | 0-10                  | 7-10             |
| HB3-B   | 35-60               | 0-12.5                | 5-10             | SH2- 1  | 40-65               | 0-5                   | 6-8              |
| HB4     | 40-70               | 0-10                  | 7-9              | SH2- 2  | 30-40               | 0-1                   | 6-8              |
| HB5     | 50-65               | 0-12                  | 6-10             | SH2- 4A | 30-40               | 0-8                   | 6-10             |
| HB6     | 50-70               | 0-13                  | 5-10             | SH2 -4B | 50-60               | 0-1                   | 6-8              |
| HB7     | 35-60               | 0-13                  | 6-10             | SH2- 5  | 45-60               | 0-8                   | 5-10             |
| HB8-A   | 30-60               | 0-5                   | 6-8              | SH2- 5A | 50-65               | 0-6                   | 6-9              |
| HB8-B   | 50-70               | 0-7                   | 5-9              | SH2- 5B | 30-45               | 0-1                   | 5-8              |
| HB10    | 50-65               | 0-10                  | 7-10             | HR1- A  | 30-40               | 0-8                   | 7-9              |
| HB10-A  | 40-60               | 0-12                  | 6-10             | HR1- B  | 30-45               | 0-2                   | 7-8              |
| HB10-B  | 45-70               | 0-14                  | 5-10             | HR3     | 35-45               | 0-1                   | 6-8              |
| MO1     | 40-70               | 0-1                   | 6-8              | HR4     | 30-50               | 0-2                   | 7-8              |
| HB10-CC | 50-70               | 0-1                   | 7-8              | HR4- A  | 35-45               | 0-1                   | 7-8              |
| HB10-CH | 35-50               | 0-2                   | 6-8              | HR4- B  | 30-50               | 0-5                   | 7-9              |
| HB10-D  | 30-45               | 0-10                  | 7-10             | HR5     | 35-50               | 0-3                   | 6-8              |
| GH1-A   | 40-65               | 0-1                   | 6-7              | HR6     | 40-55               | 0-1                   | 6-8              |
| GH1-B   | 50-60               | 0-10                  | 5-9              | HR7     | 30-40               | 0-6                   | 7-8              |
| GH2     | 60-70               | 0-7                   | 7-10             |         |                     |                       |                  |

### **I.3.3.3. Test Mannitol-Mobilité**

La fermentation du mannitol a été observée chez 33 souches. Un virage faible de l'indicateur au jaune a également été noté. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est, en général insuffisante face à l'importance du pouvoir tampon du milieu (Joffin et Leyral, 2006).

La plupart des souches sont mobiles. En effet, 19 souches seulement ont donné un résultat négatif pour ce caractère sur le milieu mannitol-mobilité.

### **I.3.3.4. Caractérisation du type fermentaire**

Seules quelques souches ont réagi positivement au test au rouge de méthyle, indicateur de la production d'acides mixtes, et au test du Voges-Proskauer, indicateur de la production d'acétoïne par fermentation du glucose. Il faut noter que 9 isolats sont positifs aux deux tests.

### **I.3.3.5. Recherche de la $\beta$ -galactosidase**

Sur les souches testées pour l'hydrolyse de l'ONPG, 12 possèdent une  $\beta$ -galactosidase. 14 isolats peuvent aussi utiliser le lactose comme unique source de carbone et d'énergie. L'absence d'une  $\beta$ -galactoside-perméase responsable du transport du lactose à l'intérieur de la cellule serait responsable parfois du résultat négatif de la  $\beta$ -galactosidase (Joffin et Leyral, 2006).

### **I.3.3.6. Recherche de l'uréase**

Vint et sept souches se sont révélées uréase positives en se basant sur l'alcalinisation plus ou moins importante du milieu de Christensen.

### **I.3.3.7. Utilisation du tryptophane**

La mise en évidence de l'indole, et donc de la tryptophanase, a été positive pour vingt et trois souches de cette étude.

### **I.3.3.8. Production de décarboxylases (LDC, ODC) et arginine dihydrolase (ADH)**

Les résultats de la recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et de l'arginine dihydrolase sont donnés dans le **tableau 9**. Sur l'ensemble des souches, 22 sont ADH positive, 25 sont ODC positive et 14 sont LDC positive.

**Tableau 8 : Utilisation des substances organiques**

| <i>Souche</i> | <i>Glc</i> | <i>Fru</i> | <i>Gal</i> | <i>Mél</i> | <i>Mal</i> | <i>Sac</i> | <i>Lac</i> | <i>Man</i> | <i>Gly</i> | <i>Acétate</i> | <i>Oxalate</i> | <i>Lactate</i> | <i>Glycérol</i> | <i>Citrate</i> |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| S1            | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| S2            | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | -          | -              | -              | -              | +               | -              |
| S3            | -          | -          | +          | -          | +          | +          | +          | -          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| S4            | -          | -          | -          | -          | +          | +          | +          | +          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| S5            | +          | -          | -          | -          | +          | -          | -          | -          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| S6            | +          | -          | -          | -          | +          | -          | -          | +          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| S7            | +          | -          | -          | +          | +          | -          | +          | -          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| S8            | +          | -          | -          | +          | -          | -          | -          | +          | -          | -              | -              | -              | +               | -              |
| S9            | +          | +          | -          | +          | -          | -          | +          | +          | -          | -              | -              | -              | +               | -              |
| S10           | +          | +          | +          | -          | +          | +          | -          | +          | +          | -              | -              | -              | -               | -              |
| S11           | -          | +          | +          | -          | -          | -          | +          | -          | +          | -              | -              | -              | +               | -              |
| HB1           | -          | +          | +          | +          | +          | +          | -          | -          | +          | -              | -              | -              | +               | -              |
| HB3A          | -          | -          | +          | +          | +          | -          | +          | +          | +          | -              | -              | -              | +               | -              |
| HB3B          | +          | -          | +          | +          | -          | -          | -          | +          | -          | -              | -              | -              | +               | -              |
| HB4           | -          | -          | +          | -          | +          | +          | -          | +          | -          | -              | -              | -              | -               | +              |
| HB5           | +          | +          | -          | -          | +          | -          | -          | -          | +          | -              | -              | -              | -               | +              |
| HB6           | -          | +          | -          | +          | +          | +          | -          | -          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| HB7           | +          | +          | +          | -          | +          | +          | -          | +          | -          | -              | -              | -              | -               | +              |
| HB8A          | -          | +          | +          | +          | +          | +          | -          | +          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| HB8B          | -          | +          | -          | -          | +          | +          | -          | +          | -          | -              | -              | -              | -               | -              |
| HB10          | -          | +          | -          | +          | +          | -          | +          | +          | +          | -              | -              | -              | -               | -              |

|        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HB10A  | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - |
| HB10B  | - | + | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | + |
| MO1    | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + |
| HB10CC | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| HB10CH | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| HB10D  | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - |
| GH1A   | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| GH1B   | - | - | - | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| GH2    | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| GH3    | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| GH5    | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | + | - |
| GH6    | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| GH6A   | + | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| GH7    | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| WO1    | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| WO2    | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - |
| WO3    | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + |
| WO4    | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| BH1    | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| BH2    | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| BH3    | - | - | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + |
| SH1    | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| SH2- 1 | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - |

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SH2- 2  | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| SH <sub>2</sub> 4A  | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| SH <sub>2</sub> 4B  | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| SH <sub>2</sub> 5   | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| SH <sub>2</sub> 5A  | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| SH <sub>2</sub> 5B  | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - |
| HR1A  | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| HR1B  | - | - | + | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| HR3   | - | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| HR4   | - | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| HR4A  | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| HR4B  | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - |
| HR5   | + | - | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + |
| HR6   | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| HR7   | + | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| + : Présence de croissance. - : Absence de croissance. Glc: glucose. Fru: fructose. Gal: galactose. Mél : mélibiose. Sac : saccharose. Lac : lactose. Man : mannitol. Gly : glycine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**Tableau 9** : Caractérisation biochimique des isolats

| <i>Souche</i> | <i>H<sub>2</sub>S</i> | <i>Gaz</i> | <i>Mob</i> | <i>Catalase</i> | <i>Oxydase</i> | <i>RM</i> | <i>VP</i> | <i>Urée</i> | <i>Indole</i> | <i>ADH</i> | <i>ODC</i> | <i>LDC</i> | <i>B-gal</i> |
|---------------|-----------------------|------------|------------|-----------------|----------------|-----------|-----------|-------------|---------------|------------|------------|------------|--------------|
| S1            | -                     | +          | +          | -               | -              | -         | -         | -           | +             | -          | +          | -          | -            |
| S2            | -                     | +          | -          | -               | -              | -         | -         | +           | -             | +          | -          | -          | -            |
| S3            | -                     | +          | -          | -               | -              | -         | -         | +           | -             | -          | +          | -          | -            |
| S4            | -                     | -          | -          | -               | +              | -         | +         | -           | +             | +          | +          | -          | -            |
| S5            | -                     | -          | +          | +               | +              | +         | +         | +           | -             | -          | +          | -          | -            |
| S6            | -                     | +          | -          | +               | -              | +         | -         | -           | +             | +          | +          | -          | +            |
| S7            | -                     | +          | -          | +               | +              | -         | +         | -           | -             | -          | -          | -          | -            |
| S8            | -                     | -          | +          | +               | -              | -         | -         | -           | +             | -          | -          | -          | -            |
| S9            | +                     | +          | +          | +               | +              | -         | -         | -           | -             | -          | -          | -          | -            |
| S10           | +                     | -          | +          | +               | +              | +         | +         | -           | +             | -          | -          | +          | -            |
| S11           | -                     | +          | +          | +               | +              | -         | +         | -           | -             | +          | +          | +          | -            |
| HB1           | +                     | -          | -          | +               | -              | -         | -         | -           | +             | -          | +          | -          | +            |
| HB3A          | +                     | +          | -          | +               | +              | +         | -         | +           | +             | +          | +          | -          | -            |
| HB3B          | +                     | -          | -          | +               | -              | -         | +         | +           | -             | -          | +          | -          | -            |
| HB4           | -                     | -          | -          | -               | +              | +         | -         | -           | +             | +          | -          | -          | -            |
| HB5           | -                     | -          | +          | -               | -              | -         | +         | +           | -             | -          | -          | -          | +            |
| HB6           | -                     | -          | +          | +               | -              | +         | -         | -           | +             | -          | -          | +          | -            |
| HB7           | -                     | -          | +          | +               | +              | -         | -         | +           | -             | -          | +          | -          | +            |
| HB8A          | -                     | -          | +          | +               | +              | -         | -         | -           | -             | -          | -          | +          | -            |
| HB8B          | -                     | +          | +          | +               | -              | -         | +         | +           | -             | +          | -          | +          | -            |
| HB10          | -                     | -          | +          | +               | -              | -         | -         | -           | -             | +          | -          | +          | -            |

|                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HB <sub>10</sub> A  | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | - |
| HB <sub>10</sub> B  | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - |
| MO1                 | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| HB <sub>10</sub> CC | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | + |
| HB <sub>10</sub> CH | + | + | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - |
| HB <sub>10</sub> D  | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| GH1A                | + | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + |
| GH1B                | + | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | - | - |
| GH2                 | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - |
| GH3                 | - | - | + | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - |
| GH5                 | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| GH6                 | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| GH6-A               | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - |
| GH7                 | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| WO1                 | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - |
| WO2                 | - | + | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| WO3                 | + | + | + | + | - | + | - | + | + | - | - | + | - |
| WO4                 | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + |
| BH1                 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| BH2                 | - | - | + | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - |
| BH3                 | + | - | + | + | - | + | - | + | - | + | + | - | - |
| SH1                 | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| SH2- 1              | - | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - |

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SH2- 2  | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| SH <sub>2</sub> 4A  | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | - | - |
| SH <sub>2</sub> 4B  | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + |
| SH <sub>2</sub> - 5   | - | + | + | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - |
| SH <sub>2</sub> 5A  | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| SH <sub>2</sub> 5B  | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| HR1A  | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| HR1B  | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + |
| HR3   | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| HR4   | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | + | - | - |
| HR4A  | - | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| HR4 B   | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - | + | + | + |
| HR5   | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| HR6   | - | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| HR7   | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - |
| <b>+ : Réaction positive. - : Réaction négative. <math>\beta</math> -gal :<math>\beta</math>-galactosidase. Mob : Mobilité. RM : Rouge de Méthyl. VP : Vosges-Proskauer</b> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |



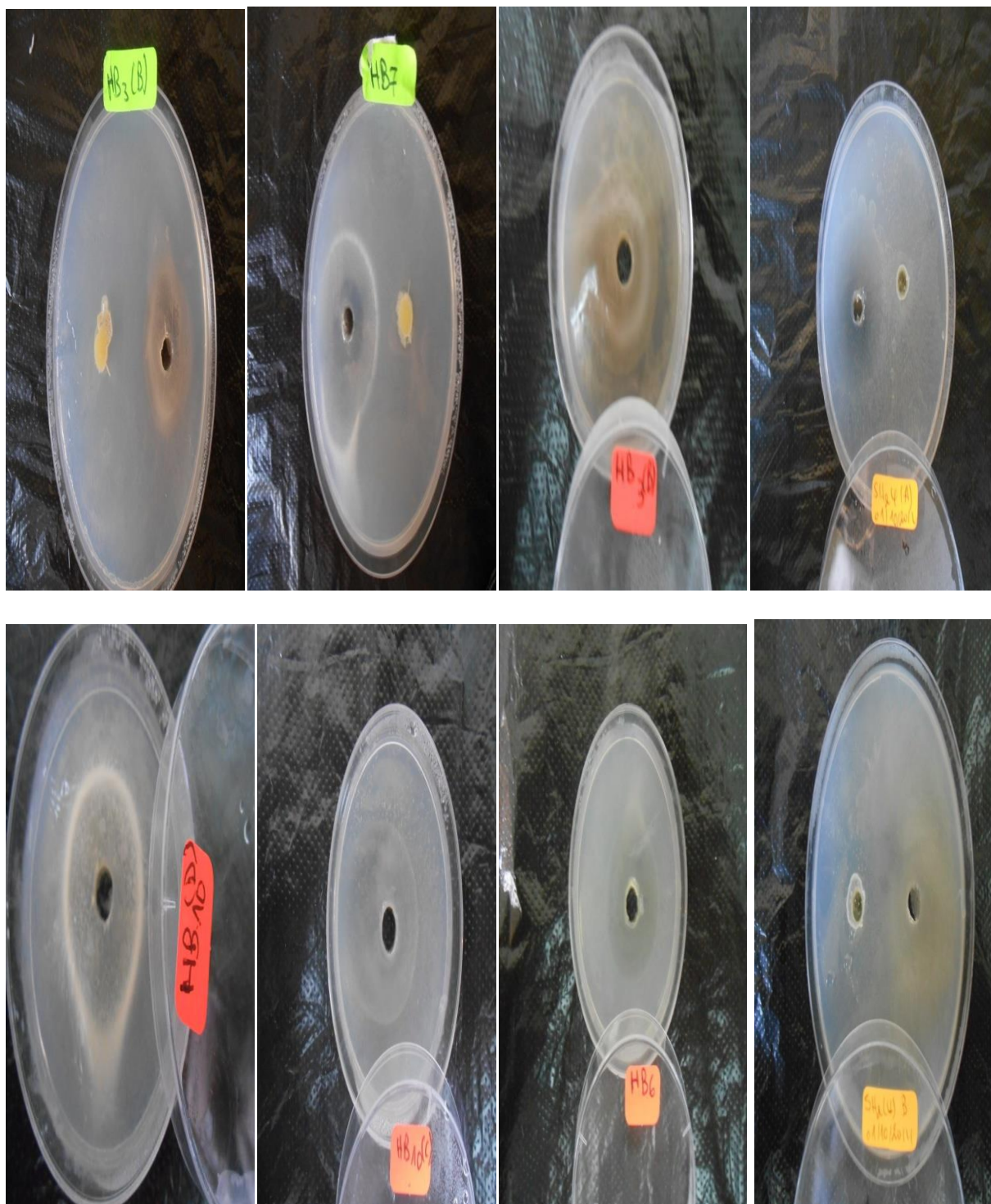
## **I.4. SCREENING SECONDAIRE DES SOUCHES PRODUCTRICES DE LA LIPASE**

Dans le but de sélectionner les souches productrices de la lipase les plus performants, deux tests de sélection sont mis en œuvre, le test de la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse des substrats utilisés sur milieu de culture minimal gélosé et le dosage de l'activité lipolytique par titration.

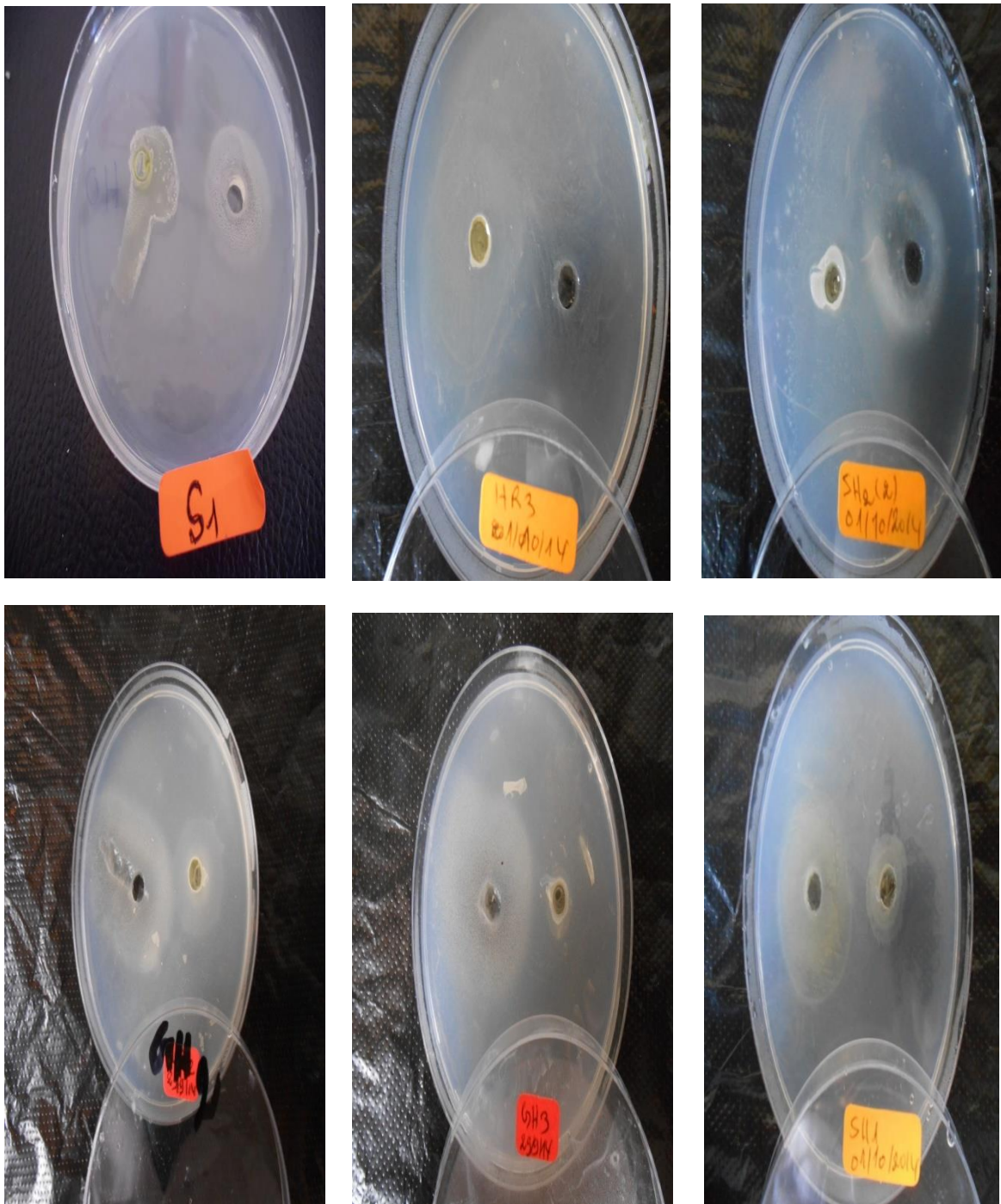
### **I.4.1. Mesure de la zone d'hydrolyse**

Les 59 souches isolées, sont ensemencées sur un milieu minimal gélosé en présence de deux inducteurs impliquées dans la production de la lipase (huile d'olive et tween 80), incubées à une température de 37°C pendant un intervalle de temps 24-72 heures. Une lecture positive se manifeste par la formation d'une zone d'hydrolyse des substrats utilisées et la mesure de diamètre des zones formées (**figure20 ,21** )

L'utilisation de cette méthode , a permis de classer les souches productrices de la lipase en deux groupes : des souches fortement productrices et faiblement productrices de la lipase. Sur les 59 souches ,5 souches (S5, HR2, GH5, HB5, WO4) ont manifesté des zones d'hydrolyse de substrats très important avec des diamètres (de 20 à 34 mm) et une activité lipolytique maximale (**tableau 10**).



**Figure 20** : La formation des zones d'hydrolyse de l'huile d'olive et de tween 80 après 72 heures d'incubation à une température de 37°C chez certaines souches isolées



**Figure 21 :** (suite) La formation des zones d'hydrolyse de l'huile d'olive et de tween 80 après 72 heures d'incubation à une température de 37°C chez certaines souches isolées.

**Tableau 10** : Le criblage des souches productrices de la lipase par la formation de la zone d'hydrolyse d'huile d'olive autour des colonies isolées, incubées à 37°C, pendant 72 h.

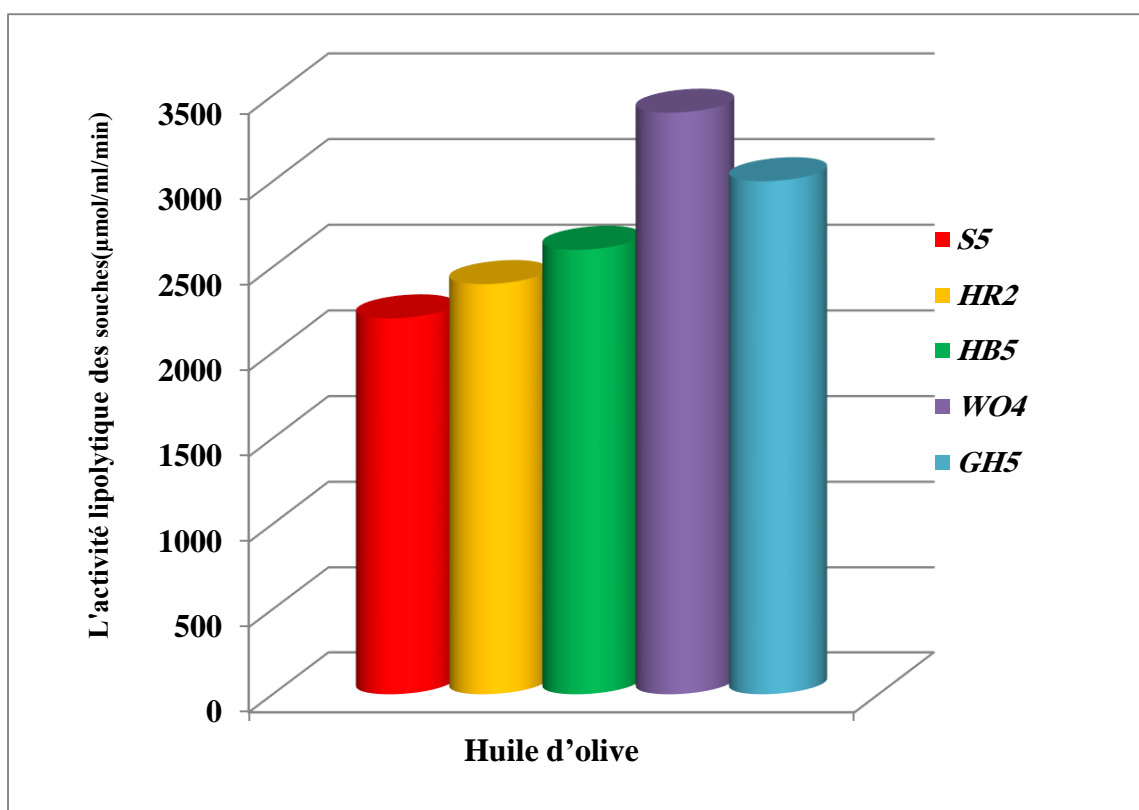
| <i>Souches</i>      | <i>Diamètre des zones d'hydrolyse (mm)</i> | <i>Souches</i>      | <i>Diamètre des zones d'hydrolyse (mm)</i> |
|---------------------|--|---------------------|--|
| S1                  | 20   | GH3                 | 28   |
| S2                  | 21   | GH5                 | <b>43</b>                                  |
| S3                  | 24   | <b>GH6</b>          | 28   |
| S4                  | 20   | GH6-A               | 25   |
| <b>S5</b>           | <b>40</b>                                  | GH7                 | 25   |
| S6                  | 23   | WO1                 | 26   |
| S7                  | 24   | WO2                 | 22   |
| S8                  | 20   | WO3                 | 23   |
| S9                  | 28   | <b>WO4</b>          | <b>42</b>                                  |
| S10                 | 20   | BH1                 | 24   |
| S11                 | 22   | BH2                 | 20   |
| HB1                 | 20   | BH3                 | 22   |
| HB3A                | 22   | SH1                 | 24   |
| HB3B                | 28   | SH2- 1              | 24   |
| HB4                 | 23   | SH2- 2              | 23   |
| <b>HB5</b>          | <b>39</b>                                  | SH <sub>2</sub> 4A  | 26   |
| HB6                 | 28   | SH <sub>2</sub> 4B  | 27   |
| HB7                 | 22   | SH <sub>2</sub> - 5 | 20   |
| HB8A                | 20   | SH <sub>2</sub> 5A  | 24   |
| HB8B                | 22   | SH <sub>2</sub> 5B  | 21   |
| HB10                | 21   | HR1A                | 20   |
| HB <sub>10</sub> A  | 20   | HR1B                | 20   |
| HB <sub>10</sub> B  | 20   | <b>HR2</b>          | <b>41</b>                                  |
| MO1                 | 27   | HR4                 | 22   |
| HB <sub>10</sub> CC | 26   | HR4A                | 24   |
| HB <sub>10</sub> CH | 22   | HR4 B               | 22   |
| HB <sub>10</sub> D  | 28   | HR5                 | 22   |
| GH1A                | 25   | HR6                 | 23   |
| GH1B                | 21   | HR7                 | 20   |

### I.4.2. MESURE DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE PAR TITRATION

La biosynthèse de la lipase chez les bactéries thermophiles est fait par une culture en batch. Ces bactéries ont été cultivées dans un milieu minéral à base de l'huile d'olive à raison de 1% avec agitation orbitale (100 rpm) à 37° C pendant 72 heures.

L'activité lipolytique des surnageant des différentes cultures bactériennes a été détectée après augmentation des concentrations des acides gras libres présents dans le milieu de fermentation.

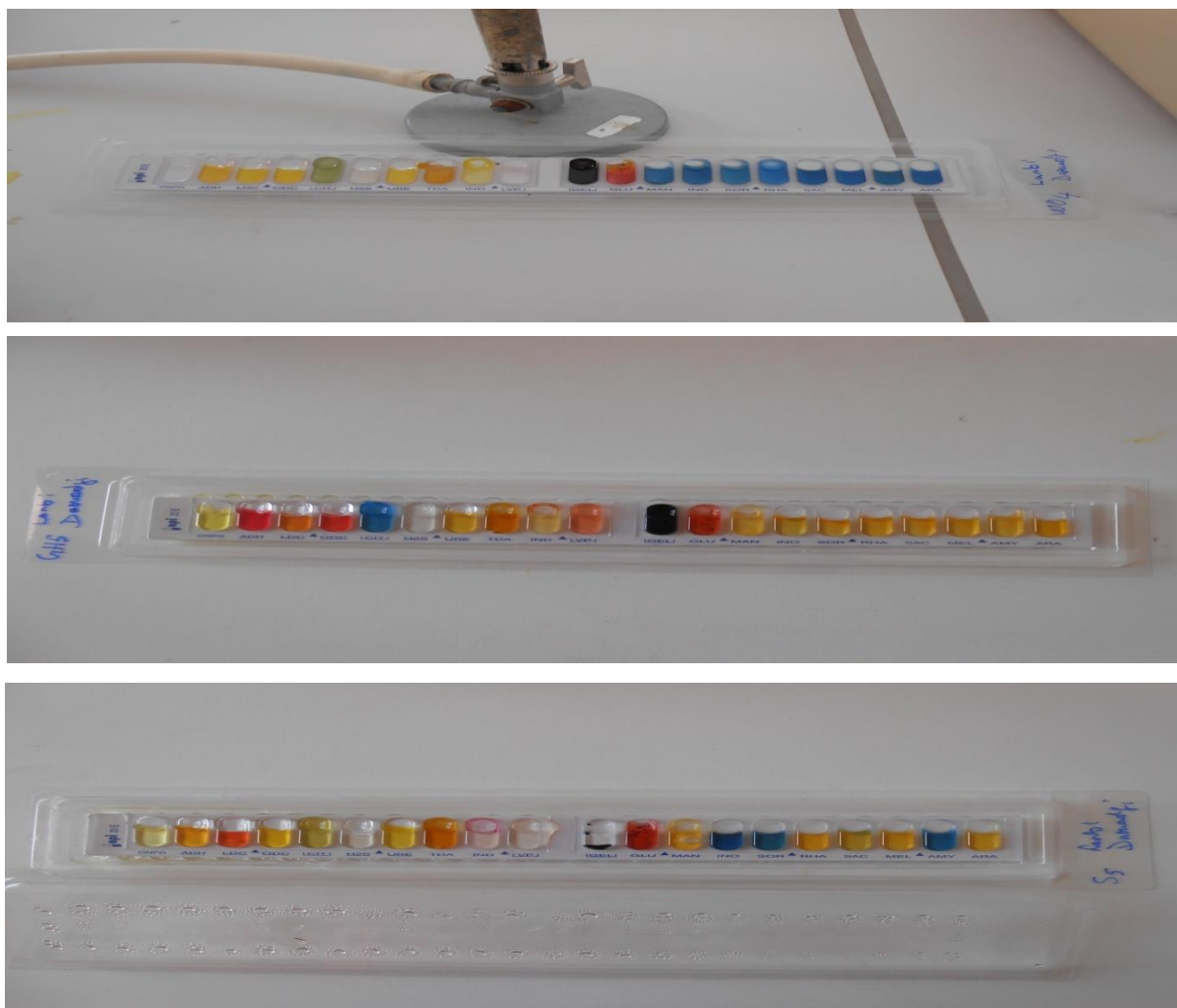
L'étude de l'activité lipolytique des différents isolats a montré que les souches (S5, HR2, GH5, HB5, WO4) ont manifesté un potentiel de production des lipases très élevé par rapport aux autres souches (**figure 22**).



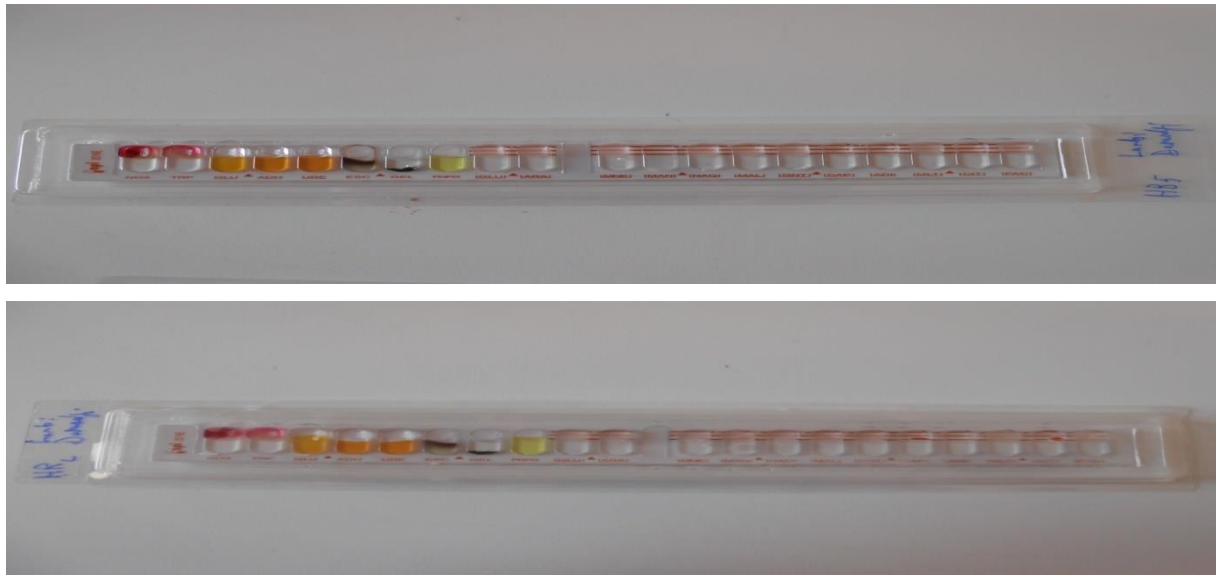
**Figure 22** : Illustration de l'activité enzymatique en présence de l'huile d'olive comme substrat chez les souches GH5,WO4,HR2,HB5,S5.

### I.5. IDENTIFICATION DES SOUCHES LIPOLYTIQUES PAR LA GALERIE API 20 E ET API 20 NE

La lecture des résultats de l'inoculation des galeries API 20E et API 20NE par la (Figure 23,24) est procédée en se référant au Tableau de lecture de ces galeries.

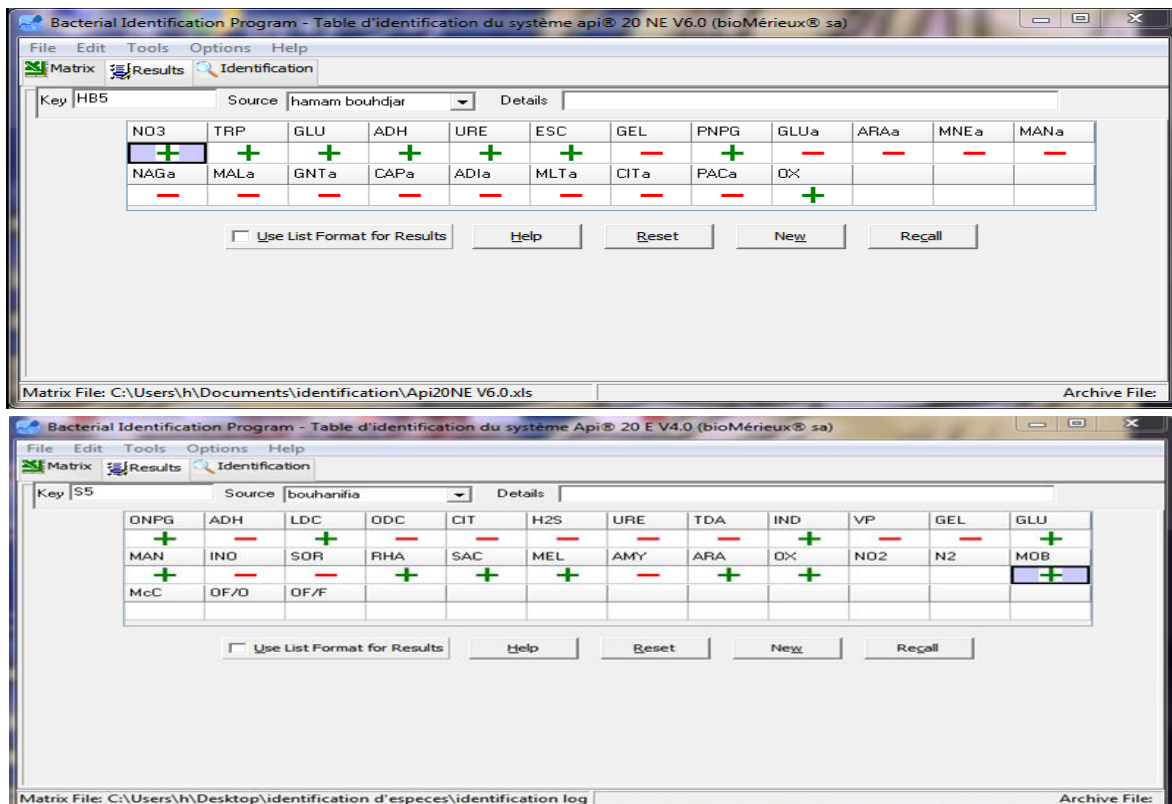


**Figure 23** : Aspect de la galerie API 20E, inoculée par les souches :WO4, GH5, S5 après l'incubation à une température 30°C pendant 24 heures



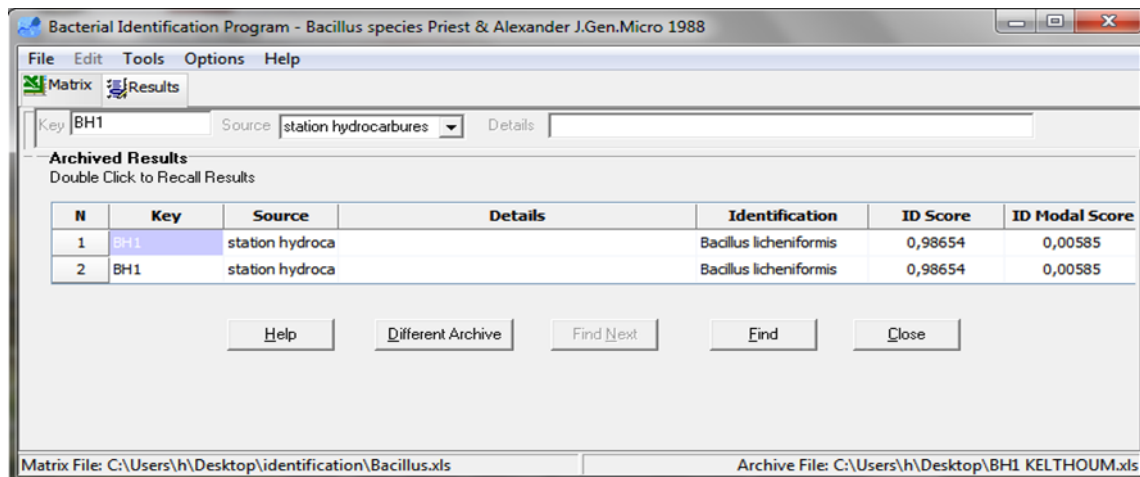
**Figure 254** : Aspect de la galerie API 20NE, inoculée par les souches : HB5, HR2, incubée à une température 30°C pendant 24 heures.

Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l’inoculation de galerie API 20 E et API 20NE avec les 59 souches ont été remplis dans la grille des résultats du Bacterial identification Program (**Figure 25**).



**Figure 245** : Capture d’écran de l’affichage de l’onglet d’identification de la souche HB5 et la souche S5 Par le Bacterial Identification Program

Une fois que le gille d'identification est rempli, en cliquant sur l'onglet : le programme engendre une comparaison entre les résultats de la souche obtenus avec la matrice des autres souches similaires dont le même genre. Par la suite un affichage des résultats obtenus du profile biochimique de l'isolat. Le programme suggère dans le cas de BH1 que la souche est une *Bacillus licheniformis* avec un score d'identification de 0,98554 (Figure 26).



**Figure 26** : Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche BH1 Par le Bacterial Identification Program

Dans d'autres souches on a travaillé avec un autre programme d'identification en ligne (figure27), dont le principe est pareille comme le bactériel identification programme mais il est un un peut spécialiser



**Programme d'identification microbienne**

Ce programme est la transcription "en ligne" du calcul de probabilité, à partir d'une base de données en pourcentage de positivité et du profil phénotypique obtenu dans une galerie répondant aux caractères de la galerie.

**Choix de la galerie :**

Dans un premier temps, vous allez choisir la galerie que vous souhaitez utiliser :

Identification de bactéries gram négatifs Api20E

Envoi

---

**Analyse de la galerie : api20EBacillus**

| Taxon   | Probabilité | Nombre d'exclusion(s) | Indice de typicité | Nombre d'opposition(s) | Indice de distance |
|---|-------------|-----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| <i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> | 0.7525      | 1                     |                    |                        |                    |
| <i>Bacillus sphaericus/fusififormis/badius</i>        | 0.2457      | 1                     |                    |                        |                    |

L'identification du taxon ***Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis*** est probable, mais il est exclu pour 1 caractère(s)...

**Figure 27** :: Capture d'écran du programme d'identification en ligne

Les résultats probables obtenus après l'identification sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 11** : Identification probable des 59 souches isolées

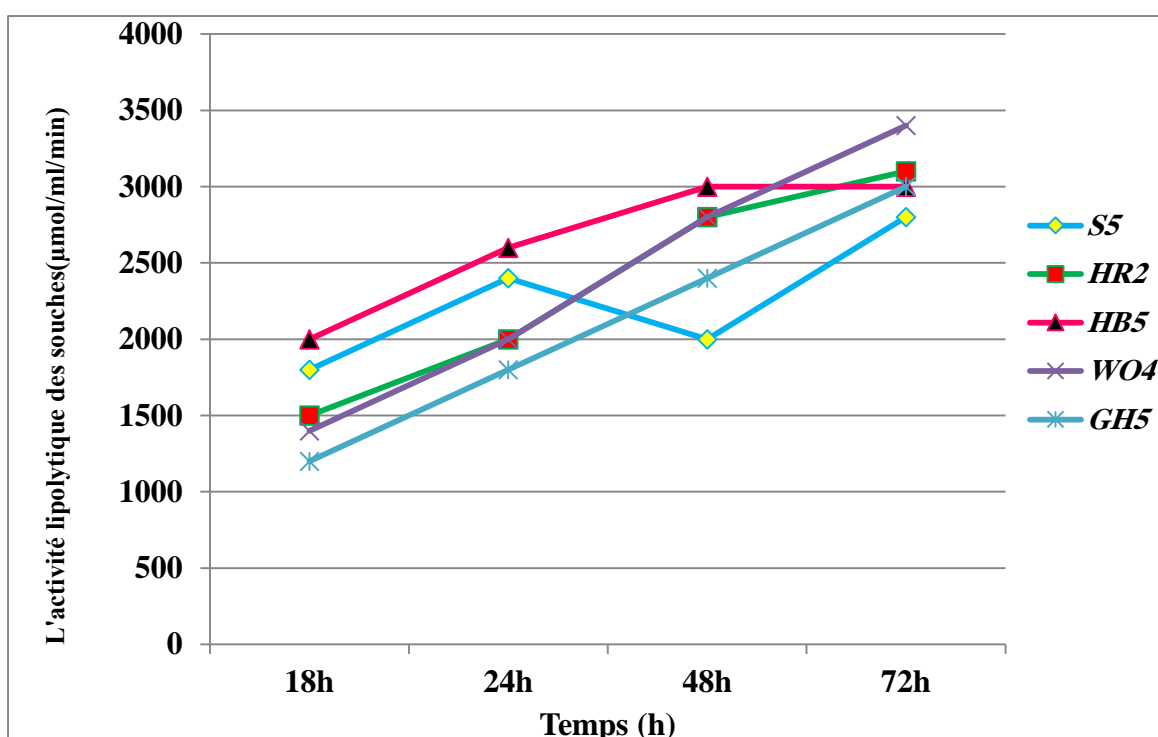
| Souche              | Identification probable du genre et/ou espèce | Souche              | Identification probable du genre et/ou espèce |
|---------------------|---|---------------------|---|
| S1                  | <i>B. subtilis</i>                            | GH3                 | <i>Bacillus pumilis</i>                       |
| S2                  | <i>Enterococcus</i>                           | <b>GH5</b>          | <b><i>Geobacillus</i></b>                     |
| S3                  | <i>B. coagulans</i>                           | GH6                 | <i>Brevibacillus</i>                          |
| S4                  | <i>St. aureus</i>                             | GH6-A               | <i>Pasteurilla pneumotropica</i>              |
| <b>S5</b>           | <b><i>Bacillus subtilis</i></b>               | GH7                 | <i>Bacillus carotarum</i>                     |
| S6                  | <i>B. coagulans</i>                           | WO1                 | <i>Bacillus licheniformis</i>                 |
| S7                  | <i>B. coagulans</i>                           | WO2                 | <i>Bacillus subtilis</i>                      |
| S8                  | <i>Ps. aeruginosa</i>                         | WO3                 | <i>Bacillus fusiformis</i>                    |
| S9                  | <i>B. cereus</i>                              | <b>WO4</b>          | <b><i>Bacillus licheniformis</i></b>          |
| S10                 | <i>Lactobacillus</i>                          | BH1                 | <i>Bacillus licheniformis</i>                 |
| S11                 | <i>Pseudomonas</i>                            | BH2                 | <i>Sporosarcina pasteurii</i>                 |
| HB1                 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>             | BH3                 | <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>           |
| HB3A                | <i>Aeromonas hydrophila</i>                   | SH1                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 |
| HB3B                | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                | SH2- 1              | <i>Bacillus sphaericus</i>                    |
| HB4                 | <i>Bacillus licheniformis</i>                 | SH2- 2              | <i>Brevibacillus</i>                          |
| <b>HB5</b>          | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                | SH <sub>2</sub> 4A  | <i>Bacillus licheniformis</i>                 |
| HB6                 | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                | SH <sub>2</sub> 4B  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 |
| HB7                 | <i>Aeromonas hydrophila</i>                   | SH <sub>2</sub> - 5 | <i>Bacillus carotarum</i>                     |
| HB8A                | <i>Bacillus subtilis</i>                      | SH <sub>2</sub> 5A  | <i>Bacillus fusiformis</i>                    |
| HB8B                | <i>Aeromonas hydrophila</i>                   | SH <sub>2</sub> 5B  | <i>Bacillus licheniformis</i>                 |
| HB10                | <i>Pasteurilla</i>                            | HR1A                | <i>Bacillus subtilis</i>                      |
| HB <sub>10</sub> A  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 | HR1B                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 |
| HB <sub>10</sub> B  | <i>Bacillus licheniformis</i>                 | <b>HR2</b>          | <b><i>Bacillus cereus</i></b>                 |
| MO1                 | <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>           | HR4                 | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                |
| HB <sub>10</sub> CC | <i>Burkholderia cepacia</i>                   | HR4A                | <i>Morganella morganii</i>                    |
| HB <sub>10</sub> CH | <i>Bacillus subtilis</i>                      | HR4 B               | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 |
| HB <sub>10</sub> D  | <i>Bacillus carotarum</i>                     | HR5                 | <i>Aeromonas hydrophila</i>                   |
| GH1A                | <i>Aeromonas hydrophila</i>                   | HR6                 | <i>Bacillus cereus</i>                        |
| GH2                 | <i>Bacillus coagulans</i>                     | HR7                 | <i>Bacillus amyloliquefasiens</i>             |

## I.6. L'OPTIMISATION DES PARAMETRES DE CULTURE POUR LA PRODUCTION DE LA LIPASE

Dans le but d'optimiser les différents paramètres impliqués dans la production de la biomasse et de la lipase, les souches (S5, HR2, GH5, HB5, WO4) ont été sélectionnées pour son potentiel lipolytique

### I.6.1. Effet de la période d'incubation

Les surnagant des cultures obtenues après 72 h d'incubation à 37 °C montrent une activité maximale de la lipase pour les cinq souches comme il est indiqué sur **la figure suivante**:

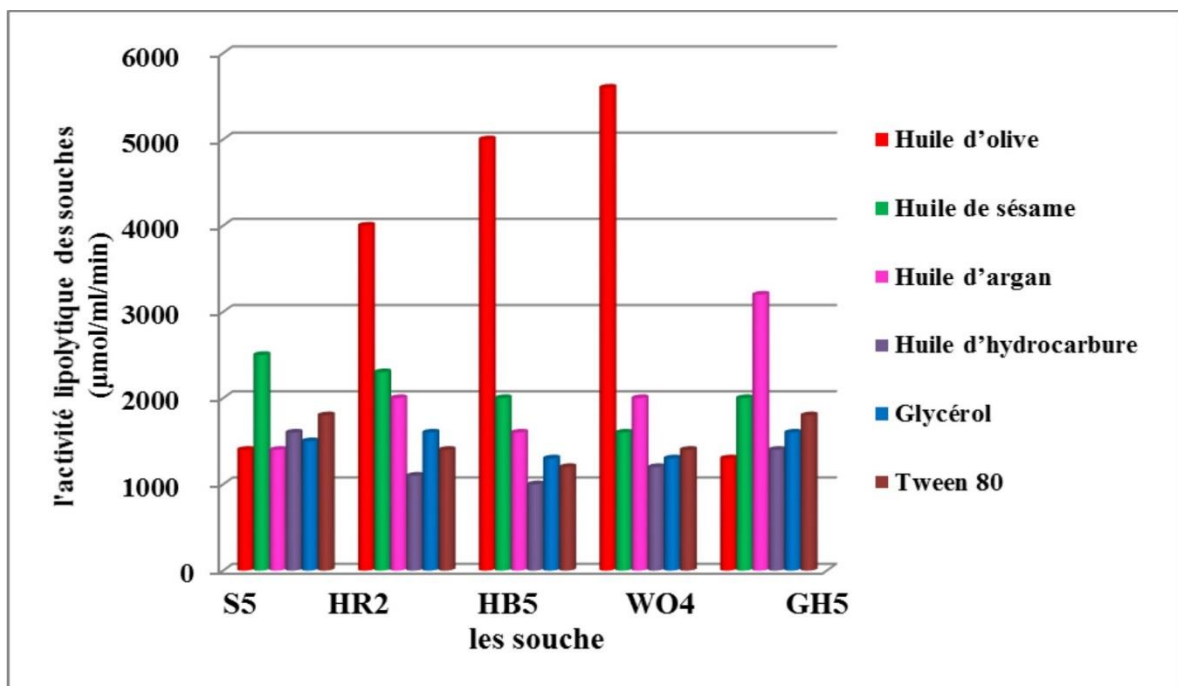


**Figure 28** : L'effet de la période d'incubation sur la production de la lipase chez les souches GH5, S5, WO4, HR2, HB5.

### I.6.2. Effet des substrats lipidiques

L'influence des différents substrats lipidiques sur la biosynthèse de la lipase est donc investiguée par son addition au milieu de culture à une concentration de 1 %. Pour sélectionner le substrat le plus puissant pour la production de la lipase, pour chaque souche, une variété des lipides naturels et artificiels sont utilisées. La production de la lipase est stimulée par l'incorporation de l'huile de sésame dans le cas de la souche S5 et de l'huile

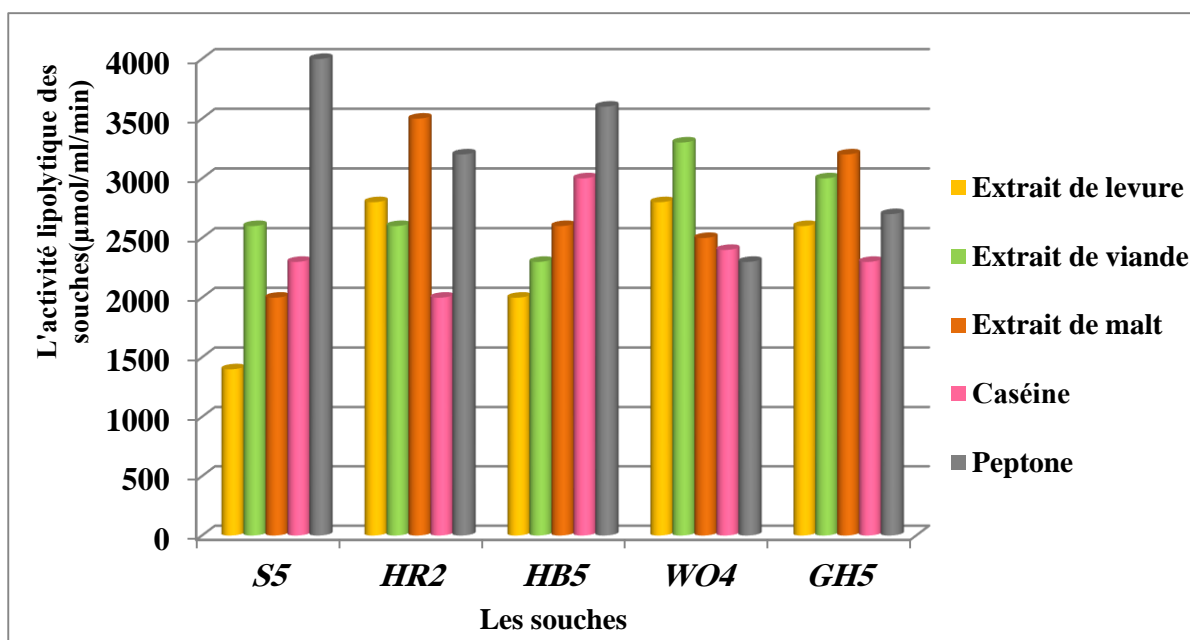
d'argan dans le cas de la souche GH5, et l'huile d'olive chez les trois d'autres souches (HR2, HB5, WO4) (**figure 29**)



**Figure 29** : L'effet de la source de carbone sur la production de la lipase chez les souches HR2, WO4, HB5, S5, GH5

### 1.6.3. Effet de la source d'azote

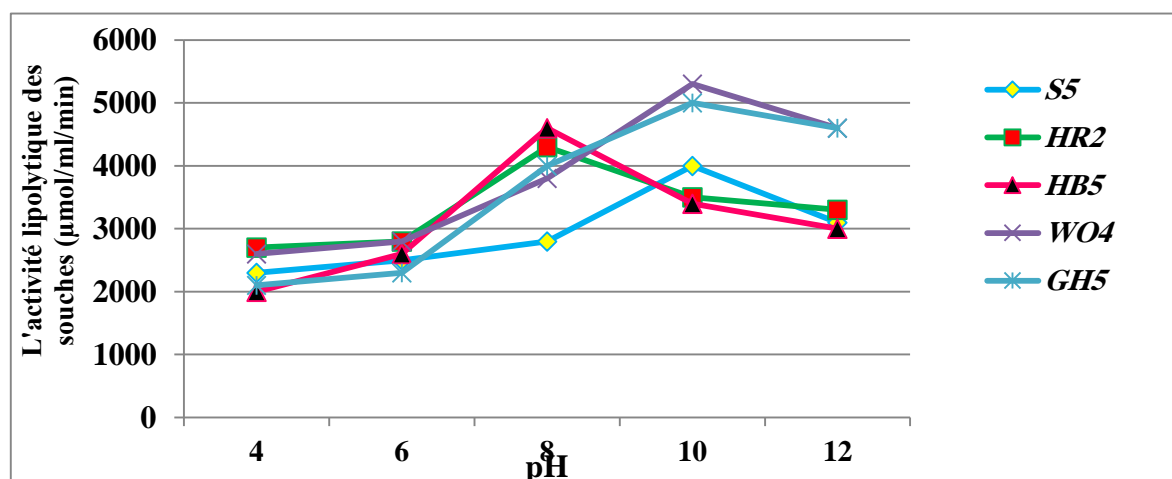
Différentes sources d'azote sont testées dans l'ordre de déterminer leurs influences sur la synthèse de la lipase. Comme il est indiqué sur la **figure 30**, parmi les sources d'azote utilisées, la production enzymatique maximale a été produite par la peptone chez S5, HB5. Tandis que chez HR2 et GH5 ont été produite par l'extrait de malt, et WO4 elle a préféré l'extrait de viande comme substrat.



**Figure 30** : l'effet de la source d'azote sur la production de la lipase chez les souches performantes.

#### 1.6.4. Effet du pH

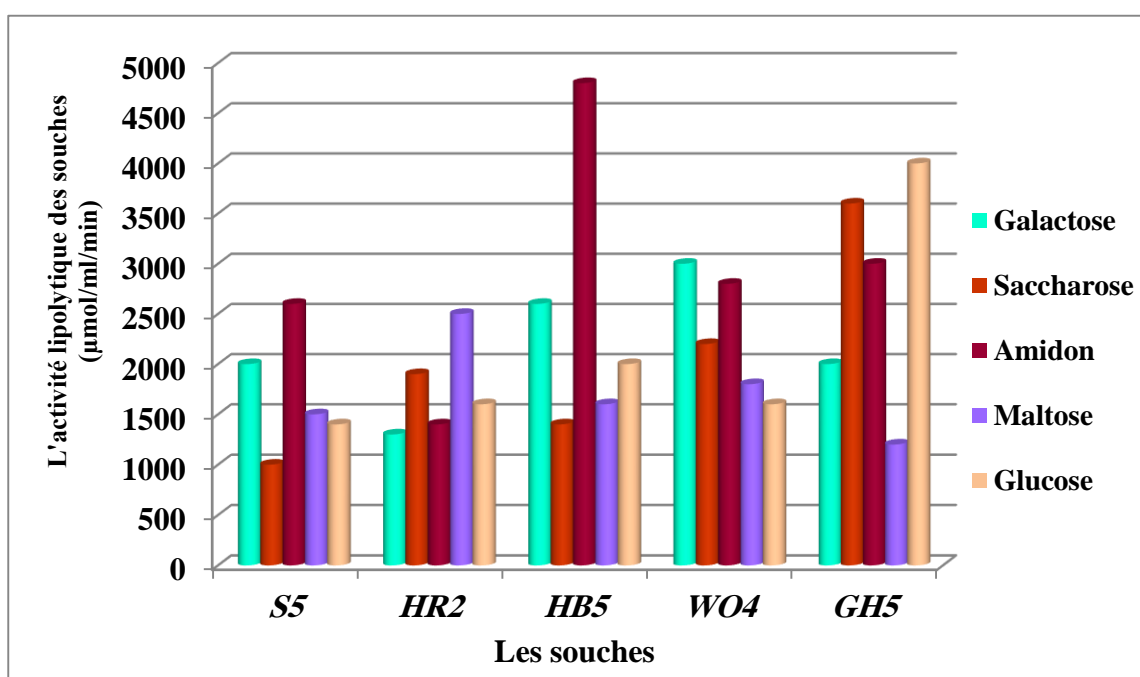
Comme le pH joue un rôle important dans tous les processus biologiques, également la production de lipase est testé dans un large intervalle de pH. L'étude de l'effet des différents pH révèle que la sécrétion de l'enzyme est grandement influencée par la variation de pH de l'environnement, l'ensemble des souches testé ont manifesté une production maximale entre pH 8-10 ( **figure 31**).



**Figure 31** : L'effet du pH sur la production de la lipase chez les cinq souches performantes.

### I.6.5. Effet de la source de carbone

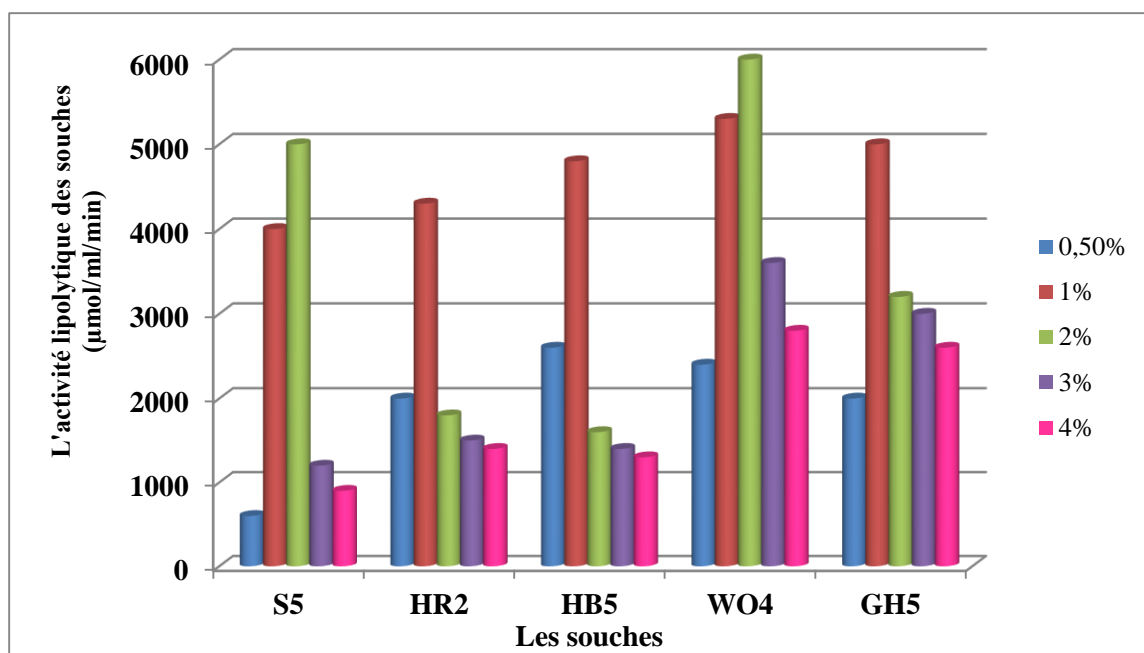
Il y a deux fonctions principales des composés de carbone : approvisionner la matière première pour la structure cellulaire et la production d'énergie. Chaque microorganisme exige des différentes sources de carbone, comme inducteurs, pour produire la lipase à des niveaux maximal. Pour sélectionner la source de carbone la plus puissante pour chaque souche, une variété des sucres (glucose, saccharose, amidon, maltose, galactose), sont testés individuellement par son addition au milieu de culture à une concentration de 1 %. Chez la souche HB5 l'addition de l'amidon stimule la production de la lipase. Tandis que chez les autres souches la production est abaissée (**figure 32**).



**Figure 32** : l'effet de la source de carbone sur la production de la lipase chez les souches performantes

### I.6.6. Influence de la concentration des substrats

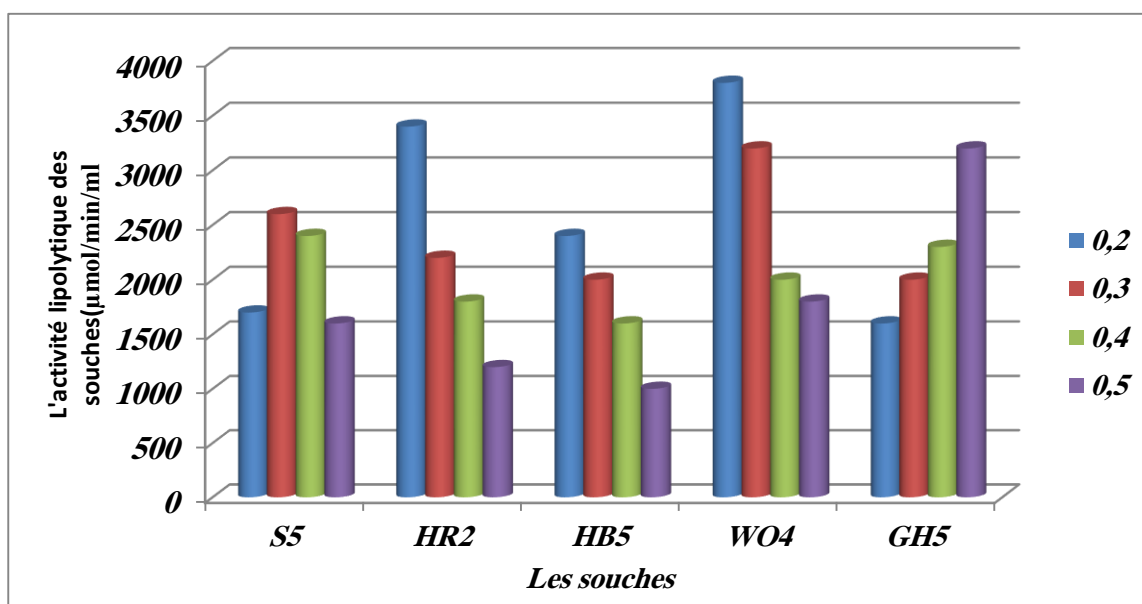
Pour optimiser la production de la lipase, la concentration de substrats a été étudiée. Ainsi, différents milieux de culture, pour chaque souche, ont été élaborés avec différentes concentrations. S5 et WO4 ont révélé une production maximale de la lipase à 2% de l'huile. D'un autre côté, HB5, HR2 et GH5 montrent une excellente activité à 1% de l'huile. **figure 33**).



**Figure 33 :** L'effet de la concentration des substrats sur la production de la lipase chez les cinq souches

### 1.6.7. La concentration de l'inoculum

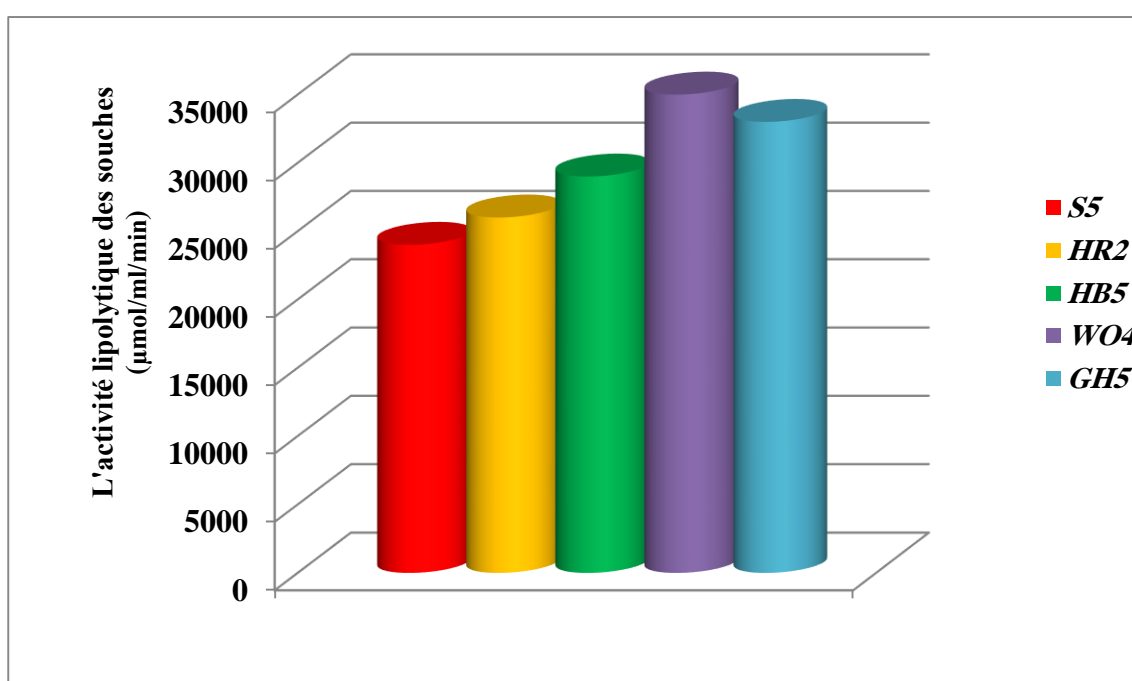
Pour maximiser la quantité de la lipase produite dans le surnageant la concentration de l'inoculum a été varié pour déterminer la concentration optimale de l'inoculum chez les cinq souches retenus. Les résultats sont présentés sur la **figure 34** ci-dessous.



**Figure 34 :** L'effet de la concentration de l'inoculum sur la production de la Lipase chez les cinq souches (GH5, WO4, HR2, HB5, S5)

### I.6.8. La production de la lipase dans le milieu optimisé

Après avoir optimisé les conditions environnementales ainsi que les besoins nutritionnelles de croissance, des milieux de culture minéral liquide, spécifique pour chaque souche, sont préparés afin d'obtenir une meilleure production de la lipase. Ces milieux sont utilisés aussi pour suivre la cinétique de croissance cellulaire de chaque bactérie. Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation des souches sélectionnés (WO4, GH5, HB5, HR2, S5) sur milieu de culture minimal optimisée, incubées à une température de 50°C pendant un temps d'incubation 72 heures a donné une production maximale (35000, 33000, 29000, 26000, 24000  $\mu\text{mol/ml/min}$ ). ( **figure 35** )



*Figure 35 : La production de la lipase dans les milieux de cultures optimisés chez les cinq souches performantes*

### I.6.9. La cinétique de croissance

Dans le but de révéler le comportement de certaines souches isolées à partir des sources thermales, l'étude de la croissance a été réalisée sur les milieux de cultures minimaux optimisés incubés à une température 37°C avec une vitesse d'agitation de 100 rpm pendant 72 heures . Des prélèvements ont été effectués à un intervalle de temps réguliers (chaque 2 heures), pour mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm.



La figure 36 révèle, une croissance cellulaire maximale après 72 h d'incubation (phase stationnaire de croissance). Par ailleurs, la phase exponentielle de croissance semble être atteinte à partir de la 4 h 6 h, 24h , 24h et la 4 h d'incubation respectivement pour les souches (S5, HR2, HB5, WO4, GH5).

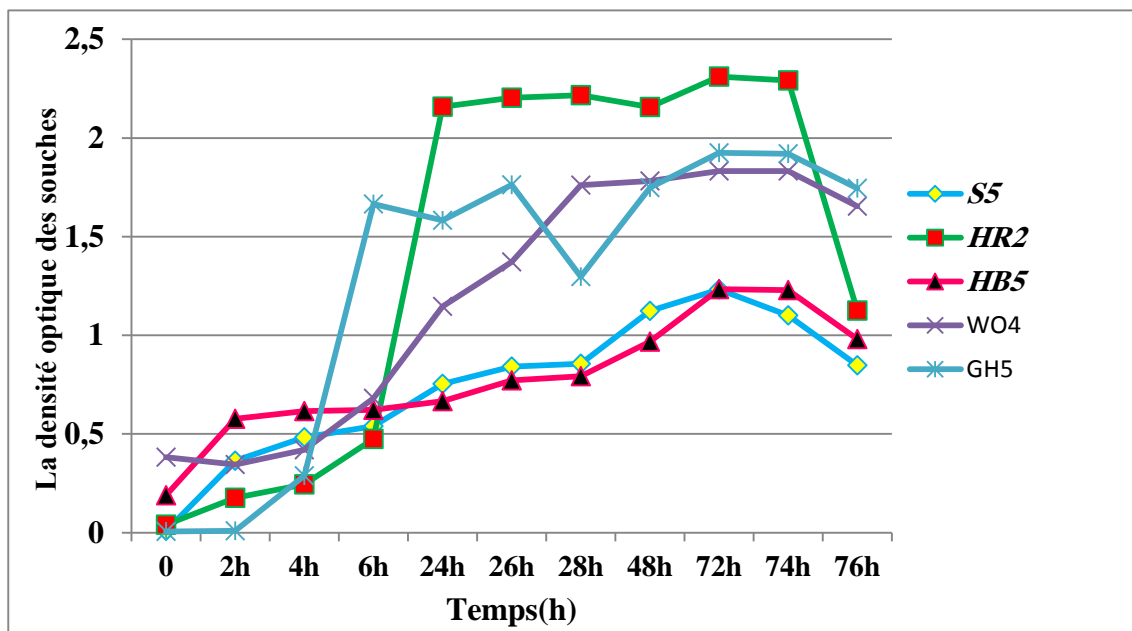


Figure 36 : L'étude de la Croissance des cinq souches lipolytiques dans les milieux de culture optimisés.

## I.7. PURIFICATION DE LA LIPASE

Dans le but d'explorer les propriétés catalytiques de la lipase, une purification des protéines est envisagée. Les étapes de la purification de lipase chez les cinq souches sont récapitulées dans le tableau 13. l'essai pilote de la précipitation des protéines contenues dans l'extrait enzymatique, a permis de choisir une gamme de concentration en sulfate d'ammonium comprise entre (40-60%) de saturation, Les résultats obtenues ont montré que la totalité de la lipase est récupérée lors d'utilisation du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec une saturation de 40-60% pour les cinq souches bactériennes. Ce fractionnement a permis d'augmenter l'activité spécifique de l'extrait brut et les rendements respectivement (tableau13). les fractions de 40-60% ont été rassemblées, dialysées dans une solution d'éluion, ensuite injectées dans la colonne de l'échangeur anionique. Les protéines sont fractionnées avec un gradient de concentration d'une solution d'NaCl (0-1mM). L'éluion des protéines est suivie à une longueur d'onde de 254 nm et l'activité enzymatique est déterminée

Dans un second temps, l'élution des protéines sur une colonne d'échange d'anion DEAE de cellulose donne un facteur de purification élevée de la lipase pour les souches testées. L'activité enzymatique spécifique pour chaque souche testée est de valeur (22.4, 19.7, 19.8, 20, 21.2) respectivement pour les cinq souches ( S5, HR2, HB5, GH5, WO4).

**Tableau 12** : illustration des étapes de la purification de lipase chez les cinq souches

| Etapes de purification                                  |            | Taux de protéines (mg/ml) | Activité enzymatique (UI/mg) | Activité spécifique (U/mg) | Taux de purification | Rendement de purification % |
|---|------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| <i>Extrait brut</i>                                     | <i>S5</i>  | 0,98                      | 37                           | 37,75                      | -                    | -                           |
|   | <i>HR2</i> | 0,90                      | 40                           | 30                         | -                    | -                           |
|   | <i>HB5</i> | 0,97                      | 33                           | 29,4                       | -                    | -                           |
|   | <i>GH5</i> | 0,99                      | 38                           | 40,2                       | -                    | -                           |
|   | <i>WO4</i> | 0,87                      | 50                           | 32,7                       | -                    | -                           |
| <i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0-40%</i> | <i>S5</i>  | 0,78                      | 22,5                         | 28,84                      | 0,76                 | 60,81                       |
|   | <i>HR2</i> | 0,70                      | 31                           | 21                         | 0,71                 | 60,1                        |
|   | <i>HB5</i> | 0,72                      | 25,2                         | 25                         | 0,68                 | 56                          |
|   | <i>GH5</i> | 0,80                      | 26,6                         | 29,2                       | 0,8                  | 62,4                        |
|   | <i>WO4</i> | 0,69                      | 20                           | 24,8                       | 0,7                  | 58,9                        |
| <i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0-60%</i> | <i>S5</i>  | 0,75                      | 16,8                         | 22,4                       | 0,59                 | 45,4                        |
|   | <i>HR2</i> | 0,56                      | 25,2                         | 19,7                       | 0,50                 | 40                          |
|   | <i>HB5</i> | 0,70                      | 15,8                         | 19,8                       | 0,48                 | 38,3                        |
|   | <i>GH5</i> | 0,71                      | 16,1                         | 20                         | 0,60                 | 43,1                        |
|   | <i>WO4</i> | 0,60                      | 14,2                         | 21,2                       | 0,52                 | 41,4                        |
| <i>DEAE</i>   | <i>S5</i>  | 0,048                     | 7,2                          | 150                        | 3,97                 | 19,45                       |
|   | <i>HR2</i> | 0,035                     | 8,4                          | 180                        | 3,12                 | 19,38                       |
|   | <i>HB5</i> | 0,041                     | 7                            | 198                        | 2,1                  | 18,1                        |
|   | <i>GH5</i> | 0,050                     | 7,8                          | 200                        | 3,1                  | 17,4                        |
|   | <i>WO4</i> | 0,045                     | 7,1                          | 181                        | 2,8                  | 19,4                        |

## I.8. PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA LIPASE PURIFIEE

L'étude des propriétés catalytiques enzymatique de la lipase est remportée pour déterminer l'activité enzymatique maximale dans les conditions optimales. Principalement, l'effet de la température, du pH, des solvants organiques, des surfactants et des ions métalliques ont été étudié

### I.8.1. Effet du pH sur l'activité de la lipase

L'effet du pH sur l'activité enzymatique des souches bactériennes est examiné à des valeurs de pH variées de 5 à 12 comme il est montré sur la figure 37. L'activité enzymatique de la lipase se manifeste stable à des valeurs de pH comprise entre 5-10 pour les 5 souches.

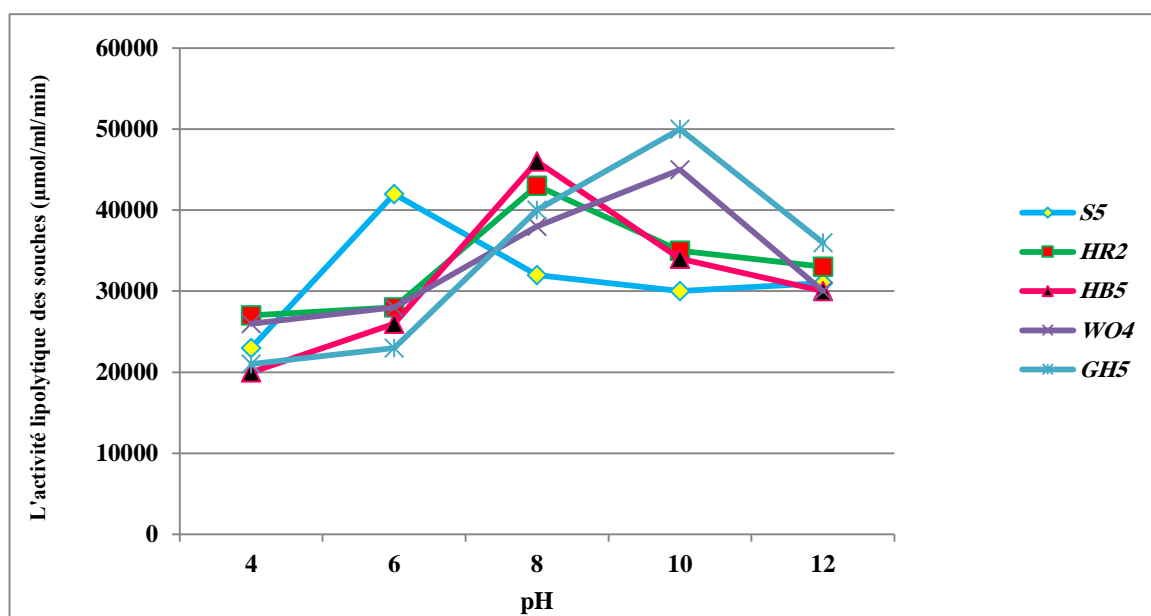


Figure 37 : L'effet du pH sur l'activité de la lipase

### I.8.2. L'effet de la température sur l'activité de la lipase

L'effet de la température sur l'activité enzymatique est déterminé à des valeurs de température de 40-100°C à pH optimal pour chaque souche (figure 38). L'activité enzymatique de la lipase se manifeste stable à des températures situées entre 60-90°C pendant un intervalle de temps d'une heure.

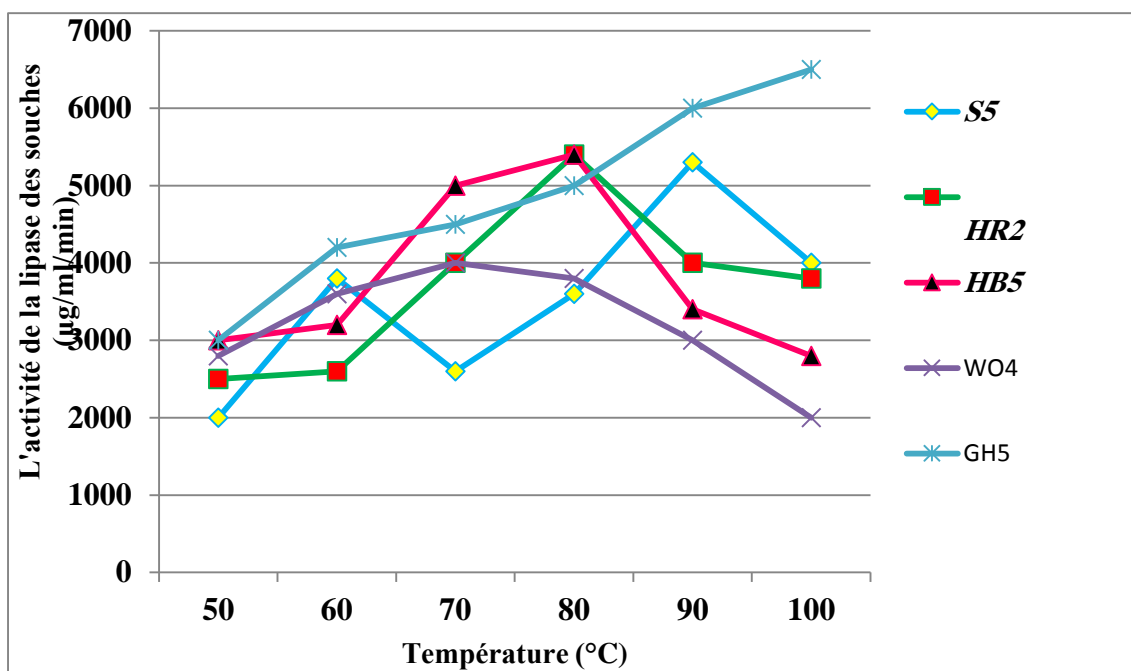


Figure 38 : L'effet de la température sur l'activité de la lipase

### I.8.3. Effet des solvants organiques

L'incubation de l'enzyme dans des solvants forts, comme l'acétone, le méthanol et l'éthanol, ne cause pas beaucoup de perte de son activité (figure 39).

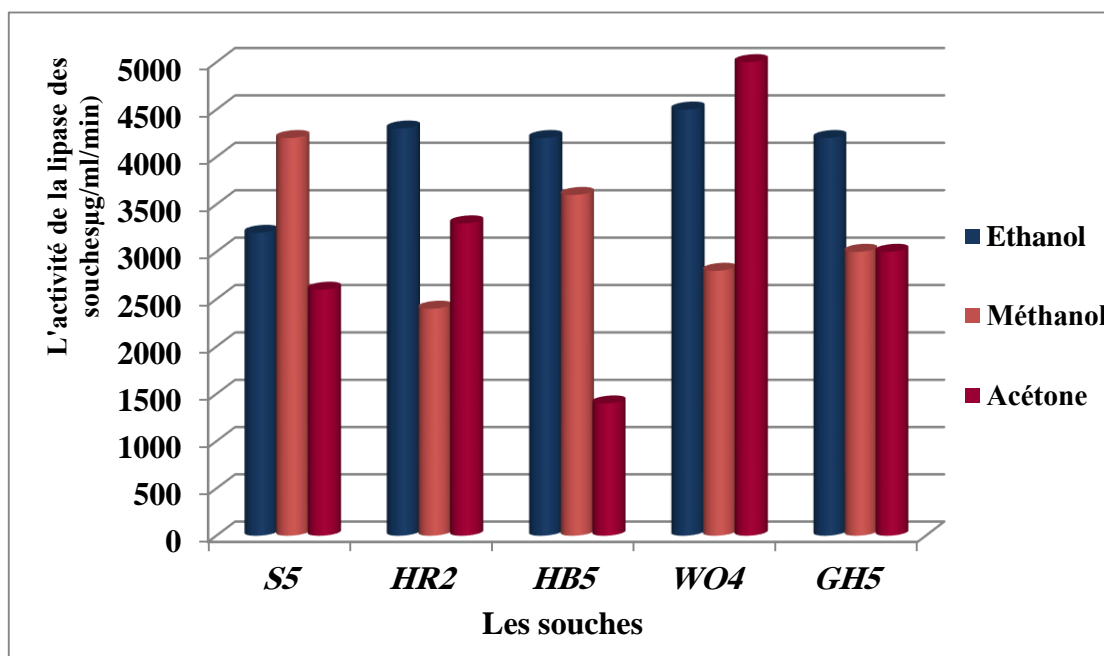
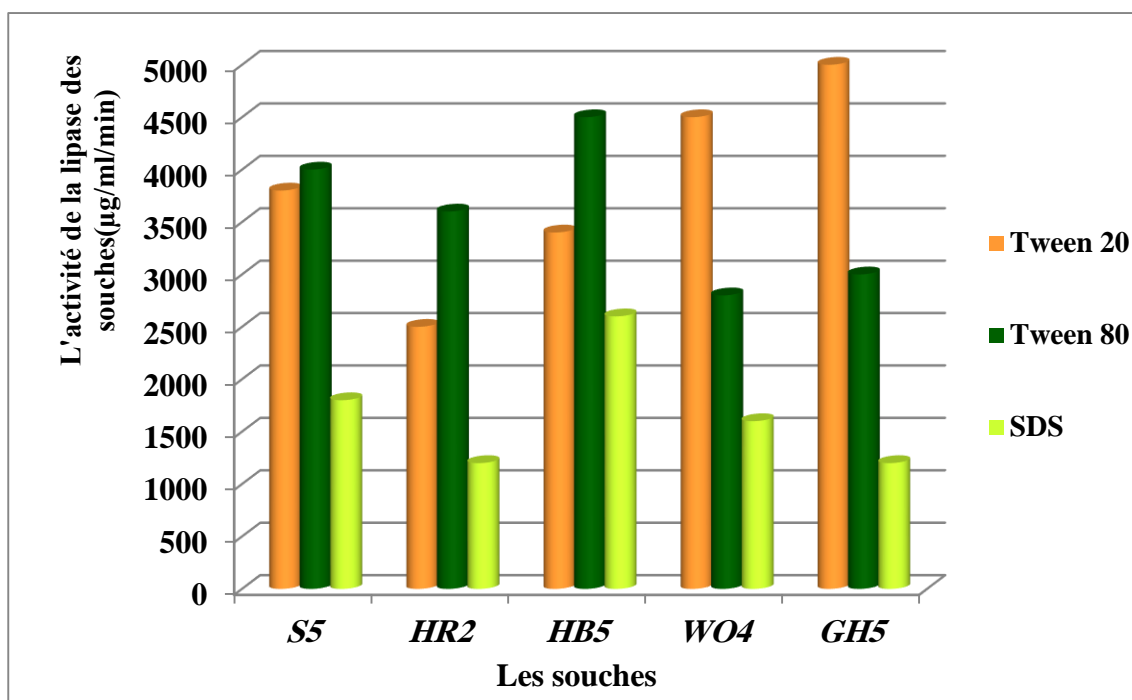


Figure 39 : L'effet des solvants organiques sur l'activité de la lipase.

#### I.8.4. Effet des surfactants sur l'activité

L'activité enzymatique est inhibée par l'ajout du SDS (surfactant anionique) pour l'ensemble des souches testées. Tandis que Tween 20 et Tween 80 (surfactants cationique) enrichi sensiblement l'activité de la lipase ( **figure 40**).



*Figure 40 : L'effet des surfactants sur l'activité de la lipase.*

#### I.8.5. Effet des ions métalliques

L'activité enzymatique de la lipase est fortement stimulée en présence des ions de  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$  à une concentration de 1mM. Cependant, la présence de certains métaux tels que le  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  et  $\text{Mn}^{+2}$  à une concentration de 1mM a manifesté un effet d'inhibition. ( **figure 41**).

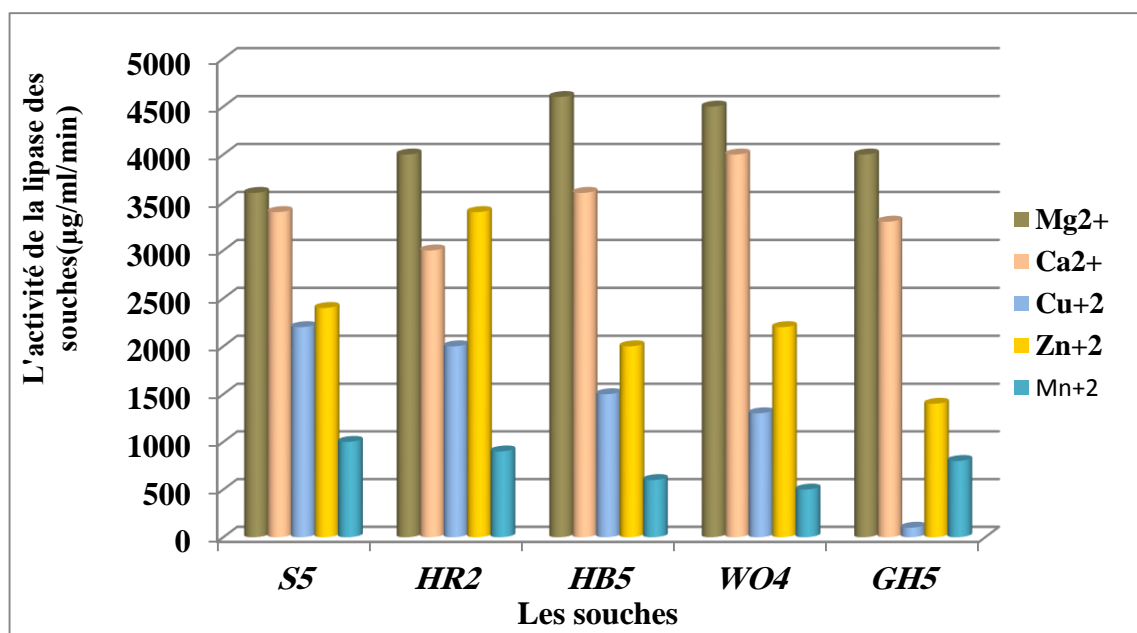


Figure 41 : L'effet des ions métalliques sur l'activité de la lipase.

### I.8.6. La stabilité enzymatique

#### I.8.6.1. La thermostabilité

Après l'incubation des lipases des souches à un intervalle de temps de 30 min à 3 heures a une température de 100°C, ces lipases montrent une thermostabilité jusqu' à 1-1.30 heure d'incubation puis elles ont perdu son activités avec le temps (Figure 42).

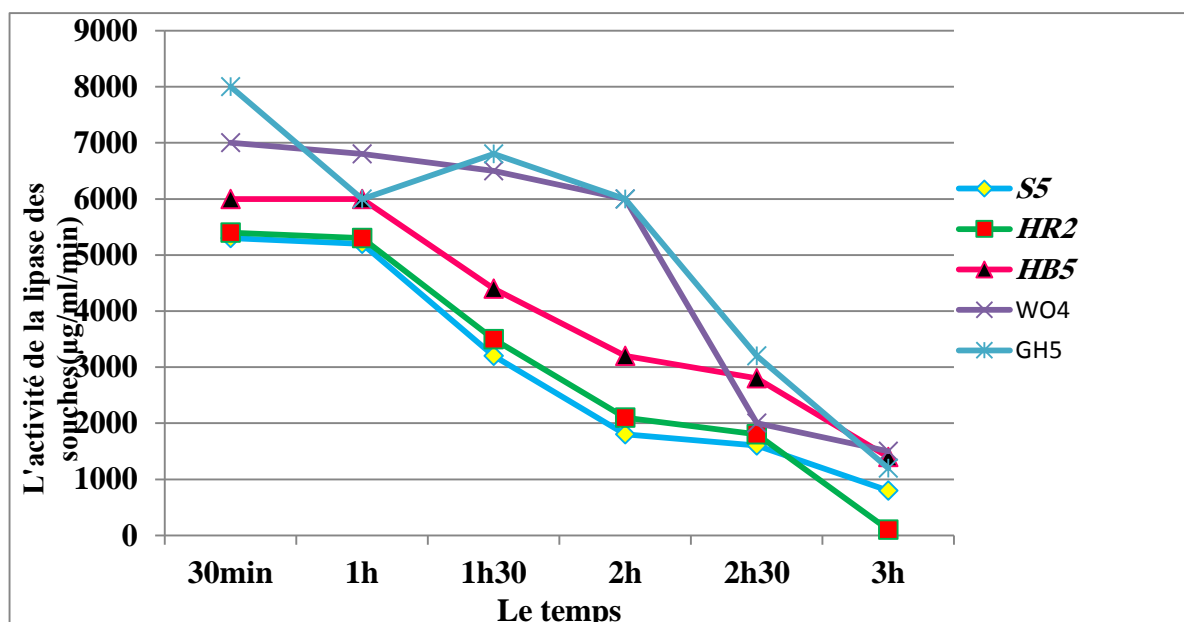


Figure 42 : illustration de La thermostabilité de la lipase

## II. DISCUSSIONS

Les lipases microbiennes sont des enzymes extrêmement polyvalents, montrant plusieurs propriétés intéressantes pour les applications industriels (**Sarkar et al., 1998**).

Dans ce présent travail, les objectifs tracés sont : Screening de l'activité lipolytique extracellulaire chez des bactéries thermophiles aérobies isolées de sources chaudes terrestres Algériennes, l'identification des souches présentant une activité lipolytique.

Optimisation des différents paramètres impliqués dans le processus de production des lipases et Purification partielle de la lipase produite par les souches les plus performantes et la caractérisation catalytique de la lipase purifiée.

La première étape de ce travail a consisté à établir une collection de 59 souches de bactéries thermophiles, aérobies et hétérotrophes à partir d'échantillons d'eau et de sédiments de sources thermales de Debegh, Bouhnifia, Bouhdjar, la station d'hydrocarbure de Bechar et hammam Righa et hammam Rabi, le milieu utilisée pour l'isolement de ces souches et tous ce présent travail c'était un milieu minimal a base de l'huile d'olive et de tween 80 à raison de 1% pour chacun (annexe).(**Thomson et al., 1999**).

Cependant les souches isolées ont montré la fiabilité de la production de la lipase sur un milieu gélosé qui est définie par la formation d'une zone claire autour des colonies après incubation (**Thomson et al., 1999**). Dans les méthodes d'observation directe la formation de zone claire ou opaque autour du puits voire ou la production de cristaux sur la surface de la gélose indique la présence d'une activité lipolytique (**Shelley et al., 1987**)

Lors du criblage primaire 59 souches témoignant d'une activité lipolytique ont été isolées, la classification du genre à été vérifier par une caractérisation phénotypique préliminaire basée sur la présence de critères suivantes ; l'aspect macroscopique des colonies et microscopique, la mobilité, la coloration de gram, la présence des spores, test de catalase et ainsi le type respiratoire (**Emanuel et al., 2009**).

Le screening primaire a permis de constater différentes genres bactériens dont les principaux genres sont les suivant : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*: cette constatation est en accord avec les études rapportées précédemment (**Godfrey et al., 1996 ; Burgess et al., 2010**).

Selon les résultats du **tableau 7**, les principaux caractères qui séparent les différents phénons sont surtout d'ordre physiologique (gamme de température et de pH, spectre salin et utilisation des substrats organiques comme unique source de carbone et d'énergie). Ce qui suggère que l'utilisation d'un plus grand nombre de tests phénétiques contribuera probablement à une meilleure distinction entre les isolats.

Sur l'ensemble des phénons, la température optimale de croissance des souches est située entre 55°C et 60°C, qu'on peut qualifier de thermophiles modérés en suivant la classification établie par **Stetter (1996)**. Cependant, beaucoup de ces souches peuvent se développer sur un intervalle de température de 40°C, cas des souches de Hammam Rabi et Bouhnia. Le terme de « thermophile-température-tolérant » a été inventé par **Wiegel (1990)**, pour désigner ce type de microorganismes. Et un exemple à cela est donné par les isolats thermophiles de l'antarctique, dont leur température optimale de croissance est de 65°C mais qui peuvent se développer aussi à 3°C (**Logan et Allan, 2008**).

Il est intéressant de signaler que parmi le soucier constitué, quelques membres proviennent de sites ayant des températures beaucoup plus élevées que leur température maximale de croissance. Il est probable que ces isolats ne peuvent pas se trouver en état actif en sachant que la température est facteur important conditionnant leur prolifération. Le même raisonnement peut expliquer l'isolement de certains organismes à des températures beaucoup plus basses que leur minimum de croissance (**Niehaus et al., 1999**). Selon **Weigel (1986)**, il est également possible d'isoler des organismes thermophiles à partir de la glace arctique. Les endospores survivent aisément au transfert d'un environnement vers un autre.

Tous les isolats sont neutrophiles (pH optimum entre 7,0 et 10) mais quelques-uns sont capables de croître sur une large gamme de pH. Les groupes taxonomiques regroupant les bactéries thermophiles hétérophiles, en plus de membres alcaliphiles et acidophiles comprennent beaucoup de membres neutrophiles, isolés principalement de sources chaudes terrestres (**Logan et al., 2009**). Le genre *Bacillus* est formé d'espèces acidophiles (*Anoxybacillus amylolyticus* ; pH optimum de 5,0), alcaliphiles (*Anoxybacillus ayderensis* ; pH de 11,0) et alcalitolérantes (**Pikuta, 2009**).



La croissance de l'ensemble des isolats ne requiert pas la présence de NaCl mais leur halotolérance est variable, et peut aller jusqu'à 12,5% (p/v) de NaCl. Ce résultat a été rapporté par d'autres auteurs et notamment pour l'espèce *Aeribacillus pallidus* qui se développe en présence de 10% (p/v) de NaCl (**Minana-Galbis et al., 2010**).

Les souches isolées lors de ce travail sont généralement oxydase et catalase positives et environ une trentaine forme des endospores ; c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et anaérobies facultatives thermophiles (**Dinsdale et al., 2001 ; Nazina et al., 2001**).

Par ailleurs, la plupart des bactéries aérobies formatrices d'endospores décrites sont chimioorganotrophes appartenant à divers groupes phylogénétiques. Elles sont capables de se développer sur des milieux usuels comme la gélose nutritive ou la gélose trypticase soja.

Cependant, certains isolats, particulièrement ceux issus des environnements pauvres en nutriments, comme les sources chaudes terrestres, ont une croissance médiocre sur ces milieux de culture « standard », en raison de l'inadaptabilité de ces milieux (pH, salinité, composition du milieu) (**Logan et Allan, 2008**). Des études antérieures ont montré la capacité des bactéries thermophiles à croître sur le glucose et/ou les sucres fermentescibles comme unique source de carbone et d'énergie, c'est le cas des espèces du genre *Geobacillus*. Les sources organiques et inorganiques d'azote (sels d'ammonium, urée et acides aminés) sont également utilisées (**Nazina et al., 2001; Marchant et al., 2002**). Cependant, l'assimilation des composés organiques par les bactéries thermophiles hétérotrophes reste médiocre, comparativement à leurs contre parties mésophiles, ce constat peut s'expliquer par les différentes adaptations provoquées par les restrictions de leurs milieux naturels.

Une étude de biodiversité menée par des techniques de biologie moléculaire sur l'eau d'une source chaude de hammam Debagh (Meskhoutine), à une température à l'émergence de 98°C, a permis la caractérisation phylogénétique de la flore indigène aérobie thermophile. Elle est composée principalement des espèces de *Geobacillus* et d'*Anoxybacillus*. Quant aux isolements menés en conditions anaérobies, ils ont mis en évidence des espèces thermophiles appartenant aux familles des *Clostridiaceae* et des *Thermoanaerobacteriaceae* (**Grégoire et al., 2009**). L'analyse de la biodiversité

bactérienne des sources thermales terrestres à travers le monde, et dont beaucoup partagent les caractères physico-chimiques des sources Algériennes permet de mettre en évidence, particulièrement, deux genres bactériens thermophiles aérobies communs à ces sources : *Thermus* et *Geobacillus* spp. Ces microorganismes apparaissent comme des représentants notoires des sources hydrothermales terrestres ou sub-terrestres, et communs aux écosystèmes chauds de la planète que ce soit sur le continent européen, américain, africain ou asiatique. Ils peuvent être considérés comme des marqueurs biologiques des sources thermales qu'elles soient terrestres ou sub-terrestres (**Adiguzel et al., 2009 ; Ferrera et Reysenbach, 2007 ; Grégoire et al., 2009**).

L'utilisation des galeries API (20E, 20NE) et l'interprétation probalistique des résultats obtenus a montré l'identification des souches sélectionnées comme étant : GH5 : *Geobacillus*, S5 : *Bacillus subtilis*, HB5 : *Pseudomonas fluorescens*, WO4 : *Bacillus licheniformis*, HR2 : *Bacillus cereus*.

La biosynthèse de la lipase chez ces bactéries est faite, après une culture en batch, sur un milieu minimale à base de l'huile d'olive à 1% (**Ko et al., 2005**) et incubation sous agitation de 100 rpm pendant 72 h à 37°C (**Vargas et al., 2004 ; Haider et Pakshirajan., 2007**). La culture bactérienne issue de la fermentation a été utilisée pour le dosage de l'activité lipolytique. Celle-ci a été déterminée par titration des acides gras libérés. (**Gargouri et al., 1984**). Qui correspond au screening secondaires et qui bute la sélection de la souche productrice de la lipase la plus performante. Les souches testées n'expriment pas l'activité lipolytique en présence du substrat (l'huile d'olive) de la même façon.

Les bactéries thermophiles ont développé une variété de stratégies moléculaires pour survivre aux conditions environnementales extrêmes. Pour l'utilisation des substrats naturels, un nombre de bactéries thermophiles, produisent une gamme d'enzymes saccharolytiques, protéolytiques et lipolytiques (**Bertoldo et Antranikian, 2001**)(**Pinzón-Martínez et al., 2010**).

Les lipases sont produites par les espèces du genre *Geobacillus*, comme *Geobacillus thermoleovorans* qui possède des activités lipolytiques extracellulaires avec des taux de croissance élevés sur des substrats comme l'huile d'olive, l'huile de soja, la tributyrine et les tween 20, 40 et 80 (**Lee et al., 1999**). En revanche, le genre *Anoxybacillus* englobe des

espèces à activités saccharolytiques, protéolytiques et lipolytiques (**Pikuta, 2009**). En somme, les membres des genres thermophiles des *Bacillales* sont connus pour leur capacité à produire des enzymes d'hydrolyse et des biofilms (**Burgess et al., 2010**).

Les résultats obtenus ont montré que les souches GH5 : *Geobacillus*, S5 : *Bacillus subtilis*, HB5 : *Pseudomonas fluorescens*, WO4 : *Bacillus licheniformis*, HR2 : *Bacillus cereus*, sont dotées d'une excellente activité lipolytique avec un rendement respectif de (35000, 33000, 29000, 26000, 24000  $\mu\text{mol/ml/min}$ ). Ces résultats concordent avec les travaux effectués par (**Jaeger, et al. 1994**) montrant l'expression d'une activité lipolytique chez *pseudomonas* et de *Bacillus*. Les autres souches ont montré une activité lipolytique moyenne ou faible.

Après l'identification phénotypiques des souches, et afin d'augmenter le rendement de la production de la lipase, l'investigation des conditions de culture optimales pour la biosynthèse maximale de l'enzyme est vérifiée sous l'influence des différents paramètres nutritionnelles et environnementales.

Le surnageant des cultures obtenues après 72 h d'incubation, chez les cinq souches, montre une activité lipolytique maximale. **Sarkar et al., (1998)** ont trouvé que les espèces du genre *Pseudomonas* donnent le maximum rendement de lipase après 72 h d'incubation. **Handelsman et Shoham., (1994)** montrent que la production de la lipase continue durant la phase stationnaire.

La production de la lipase est considérablement influencée par la nature des substrats lipidique que ce soit naturelle ou artificielle comme l'huile d'olive, huile de sésame, huile d'argan, huile des hydrocarbures et le Tween 80. La production de la lipase est stimulée par l'incorporation de l'huile de sésame dans le cas de S5 (*Bacillus subtilis*) et de l'huile d'olive dans le cas de *P. fluorescens* (HB5), et *B. cereus* (HR2), et *B. licheniformis* (WO4), tandis que *Geobacillus* (GH5), elle a préféré l'huile d'argan comme substrat. En comparaison avec d'autres substrats **Novotny et al (1988)** ont déduit que si l'huile d'olive est utilisée comme seule source de carbone dans le milieu de croissance, l'activité enzymatique de *Candida guilliermondii* monte de quatre à cinq fois (**Nakashima et al., 1998**) ont signalé que la présence de l'huile d'olive dans le milieu de croissance améliore significativement l'activité de la lipase de *Bacillus*. Cette constatation était similaire à celle

de (Becker *et al.*, 1997) que l'huile d'olive était le meilleur inducteur de lipase par *Bacillus sp* –H-91 de *Y.lipolytica* (Ficker. P *et al.* 2004) de *Bacillus sp* ( Abdel-Fattah Y R *et al.*, 2002) et de *Aspergillus sp* (Adinarayana K *et al.*, 2004).

Le choix de l'huile d'argan comme seule source de carbone (GH5) est en accord avec Selva Mohan., (2008), qui est reporté que l'activité maximale de la lipase est observé dans l'utilisation de l'huile d'argan,. Laksmi *et al.*, (1999) rapportent que la production de lipase est grande dans un milieu additionné d'un huile naturelle chez la plupart des souches telle que *Candida guilliermondii* et *Bacillus sp*.

Différentes sources d'azote ont été utilisées dans l'ordre de déterminer leurs influences sur la synthèse de la lipase. La production enzymatique maximale a été produite par la peptone chez S5 et HB5 . Tandis que chez HR2 et GH5 ont été produite par l'extrait de malt et WO4 elle a préféré d'utiliser l'extrait de viande.

la caséine et la caséine peptone ont également produits de la lipase .Ce résultat est en accord avec Al-Saleh et Zahran (1999) qu'aucune enzyme n'a été produite en absence d'azote organique par *P. fluorescens* . Dans d'autres études, Al-Saleh et Zahran (1999) indiquent que la caséine a peu d'effet sur la production de l'enzyme par *P. fluorescens* , Piment *et al.*, (1994) ont montré que l'utilisation d'une source d'azote organique aboutit à une meilleure production enzymatique c'est le cas de *Penicillium citricum*. Song *et al.*, (2001) ont trouvé que *Candida rugosa* possède une production optimale lorsque le  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  est utilisé comme source d'azote.

L'étude de l'effet des différents pH révèle que la sécrétion de l'enzyme est grandement influencée par la variation de pH de l'environnement. Ces résultats sont supportés par la plupart des investigations (Shabtai et Daya., 1992 ; Falk *et al.*, 1991). Quoique certaines cas pourrai exceptionnés par exemple, chez *Candida rugosa*. le pH optimal pour la production de la lipase est de 6,5 (Song *et al.*, 2001).

Chaque microorganisme exige des différentes sources de carbone, comme cofacteurs, pour produire la lipase à des niveaux maximal. Une variété des sucres (glucose, saccharose, amidon, maltose, galactose), sont testés individuellement par son addition au milieu de culture à une concentration de 1 %. Chez S5. l'addition de l'amidon stimule la production de la lipase. Tandis que chez les autres souches la production est abaissée

**Benerjee *et al.*, (1985)** ont rapporté que certain microorganismes possédant une production importante lorsqu'ils sont cultivés dans un milieu contenant de glucose en présence de l'huile d'olive.

Différentes milieux de culture, pour chaque souche, ont été élaborés avec différentes concentrations du substrat. S5 et WO4 ont révélé une production maximale de la lipase à 2% de l'huile de sésame. D'une autre coté, GH5 et HB5 montrent son activité à 1% de l'huile d'olive. **Essamri *et al.*, (1998)** montre que la concentration optimale pour la croissance de la biomasse est 3% mais la production optimal de la lipase nécessite un huile à 2%.

Après avoir optimisé les conditions environnementales ainsi que les besoins nutritionnelles de croissance, des milieux de culture minéral liquide, spécifique pour chaque souche, sont préparés afin d'obtenir une meilleure production de la lipase. Ces milieux sont utilisés aussi pour suivre la cinétique de croissance cellulaire de chaque bactérie.

L'optimisation des paramètres de croissance et de la production de la lipase chez les cinq souches bactériennes a permis d'améliorer la croissance bactérienne, d'une part, et d'autre part d'augmenter le rendement de la biosynthèse de la lipase.

Dans le but d'explorer les propriétés catalytiques de la lipase, une purification des protéines est envisagée. Les étapes de la purification de lipase chez les cinq souches sont récapitulées dans le tableau 12. l'essai pilote de la précipitation des protéines contenues dans l'extrait enzymatique, a permis de choisir une gamme de concentration en sulfate d'ammonium comprise entre (40-60%) de saturation, similaire à celle rapportées par **Lambit et ces collaborateurs (2002)**.

Les résultats obtenues ont montré que la totalité de la lipase est récupérée lors d'utilisation du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec une saturation de 40-60% pour les cinq souches bactériennes. Ce fractionnement a permis d'augmenter l'activité spécifique de l'extrait brut et les rendements respectivement (tableau 12). Après le fractionnement, les fractions de 40-60% ont été rassemblées, dialysées dans une solution d'éluion, ensuite injectées dans la colonne de l'échangeur anionique. Les protéines sont fractionnées avec un gradient de

concentration d'une solution d'NaCl (0-1mM). L'élution des protéines est suivie à une longueur d'onde de 254 nm et l'activité enzymatique est déterminée.

Dans un second temps, l'élution des protéines sur une colonne d'échange d'anion DEAE de cellulose donne un facteur de purification élevée de la lipase pour les souches testées. Des travaux antérieurs réalisés par Kordel et ces collaborateurs (1991) ont rapporté le facteur de purification de la lipase chez *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 21808 inférieur de 5,2. Cependant, le rendement final de la purification de l'extrait brute est approximativement de 19,45%, comparable aux résultats rapportées par Litthauer et ces collaborateurs (2002).

L'activité enzymatique spécifique de la lipase chez *Pseudomonas aeruginosa* est de l'ordre de 150 $\mu$ /mg, est inférieur à celle annoncé par (Prita *et al.*, 2009), des études antérieures réalisées par Kanwar et ces collaborateurs (2006) sur la purification de la lipase chez *Pseudomonas aeruginosa* BTS-2 sur la colonne de DEAE de cellulose, ont révélé un facteur de purification de la lipase chez *Serratia marcescens* a donnée un facteur et un taux de purification 19,33,61,15% respectivement (Nerhaya et Sinan, 2012)

Plusieurs lipases ont été largement caractérisées dans le terme de son activité et la stabilité à des profils relatifs de pH, température, l'effet des solvants organiques, des ions métalliques et des surfactants.

L'enzyme a une large zone d'activité enzymatique (pH 6,4-8) et (pH 7.4-8) respectivement pour *Geobacillus* et *Bacillus coagulans*. Avec un pH optimal de 7,6, tandis que chez *P. fluorescens*. L'intervalle d'activité est de pH 7,4 - 8 avec un pH optimal égal à 8.

L'enzyme a montré une bonne activité entre (70-100°C) pour GH5 et S5. Respectivement, pour les trois souches qui restent (HR2, WO4, et HB5) la température optimale varie entre 60-70°C.

Les lipases thermostables ont été isolé à partir de plusieurs sources, incluant *P. fluorescens* et *P. aeruginosa*. (Kojima *et al.*, 1994), *Bacillus sp.* (wang *et al.*, 1995). *A. sobria*. (Lotrakul et Damsthiti, 1997) la demi vie de l'enzyme est 8 h à 75°C pendant 30 min (wang *et al.*, 1995).

L'incubation de l'enzyme dans des solvants forts, comme l'acétone, le méthanol et l'éthanol, ne cause pas beaucoup de perte de son activité. (Figure 39).

**Ogino *et al.*, (2000)** montre qu'il n'y a pas une corrélation significative entre la stabilité de la lipase en présence du solvant organique et son performance se diffère d'une lipase à un autre.

**Chartain *et al.*, (1993)** est observé que la lipase extracellulaire du *P. fluorescens* est fortement inhibé par  $ZnSO_4$  (94% d'inhibition) mais stimulé avec l'addition du  $CaCl_2$ , ce qui est accordé avec notre résultats. L'activité de certaines enzymes n'est pas affecté par  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$  (**Mase *et al.*, 1995**).

La lipase est inhibé par le SDS, un surfactant anionique, tandis que les surfactants cationiques comme le Tween20 et Tween 80 enrichis sensiblement l'activité enzymatique (**Simon *et al.*, 1998**)

# CONCLUSION GENERALE

Les extrêmophiles sont des microorganismes largement utilisées dans de nombreux domaines tels que l'agriculture, l'industrie, la pétrochimie et la bioremédiation des sols.

Les microorganismes thermophiles se développent d'une manière optimale à des températures supérieures à 50°C et ont trouvés de nombreuses applications en raison de la particularité de leurs propriétés.

L'isolement et caractérisation des bactéries productrices de la lipase constitue l'objectif de ce travail.

Différents prélèvements ont été effectués à partir de 6 sources thermales terrestres de hammam Debagh de Hammam Bouhanifia de hammam Bouhdjar et de la station d'hydrocarbures, de Hammam Rabi, de hammam Righa.

Le criblage primaire des souches productrices de lipase sur un milieu minimal à base de l'huile d'olive et de tween 80a permis l'isolement 59 souches bactériennes aérobies thermophiles, isolées à partir d'échantillons d'eau et de sédiments récupérés.

Les souches pures sélectionnées productrices de lipase ont été soumises à une caractérisation de type phénétique, identifiées à l'aide de l'utilisation du logiciel bacterial identification program.

Les températures mesurées des échantillons prélevés à partir des points d'émergence des eaux chaudes de différentes sources thermales varient entre 50-96°C avec des valeurs de pH légèrement neutres. Les analyses microbiologiques ont montré que majorité des souches isolées se présentent sous forme de bâtonnets ou filaments à Gram positif, avec des réactions de cytochrome oxydase et une catalase positives et partagent quelques caractères communs tels que leur croissance à des températures comprises entre 55-65°C, et en absence de NaCl avec un pH optimum de 7.

Le criblage secondaire a permis la sélection de 5 souches productrices de lipase. L'utilisation des galeries API (20E, 20NE) et l'interprétation probalistique des résultats obtenus a montré l'identification des souches sélectionnées comme étant : GH5 : *Geobacillus*, S5 : *Bacillus subtilis*, HB5 : *Pseudomonas fluorescens*, WO4 : *Bacillus licheniformis*, HR2 : *Bacillus cereus*.



Différents paramètres impliqués dans la production de lipase et la biomasse tels que la température, la source de carbone et d'azote, la durée d'incubation, la concentration de l'inoculum, la valeur de pH ont été optimisés.

Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation des souches sélectionnés (WO4, GH5, HB5, HR2, S5) sur milieu de culture minimal, incubées à une température de 50°C pendant un temps d'incubation 72 heures a donné une production maximale (35000, 33000, 29000, 26000, 24000  $\mu\text{mol/ml/min}$ ).

La purification enzymatique de souches sélectionnées productrices de la lipase a été effectuée en étapes successives : Dans un premier temps, les protéines sont fractionnées par précipitation au sulfate d'ammonium, ensuite dialysées dans une solution tampon de phosphate de potassium pendant une heure. Dans un second temps, la fraction protéique active est ensuite soumise à une purification partielle sur chromatographie d'échange d'anion (DEAE de cellulose).

L'activité enzymatique des lipases produites chez les cinq souches sélectionnées est maximale à des valeurs de pH comprise entre 7-10 et une température de 50-70°C.

La purification de la lipase produite chez les souches (S5, HR2, HB5, GH5, WO4) par précipitation au sulfate d'ammonium (40% et 60%) et la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, a donné les rendements respectifs (19,4, 19,38, 18,1, 17,4, 19,4 %). L'activité enzymatique de la lipase se manifeste stable à des valeurs de pH comprise entre 5-10 et à des températures situées entre 60-90°C pendant un intervalle de temps d'une heure.

Par ailleurs, L'activité enzymatique de la lipase est fortement stimulée en présence des ions de  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$  à une concentration de 1mM. Cependant, la présence de certains métaux tels que le  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  et  $\text{Mn}^{+2}$  à une concentration de 1mM a manifesté un effet d'inhibition.

Cette contribution à l'étude du potentiel biotechnologique des bactéries thermophiles peut être complétée d'abord par une identification polyphasique plus poussée des souches isolées, sélectionnées productrices de la lipase par combinaison de l'approche phénotypique avec la chimiotaxonomie et moléculaire. L'identification et le clonage de leurs gènes, permettront le développement et la production d'enzymes recombinées à grande échelle.

La purification de la lipase par l'utilisation des colonnes selon les différents principes de la chromatographie consiste en une étape indispensable pour la cristallisation de la lipase afin de déterminer le site catalytique.

# BIBLIOGRAPHIE

- (1). **ADIGUZEL A., OZKAN H., BARIS O., INAN K., GULLUCE M., SAHIN F. (2009).** Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J. of Microbiol. Meth.*, 79:321-328.
- (2). **Akram Kashmiri, Ahmad Adnan and Beenech Wassem. (2006).** African journal of biotechnologie, production, purification and partial characterisation of lipase, 878.
- (3). **Albers S., Vossenbergh J., Driessen A. and Konings W. (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*, p. 285-294.
- (4). **Alloue W.A.M. (2008).** Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat. Faculté universitaire des sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. Pp 165.
- (5). **Amend J.P., Rogers K.L., Shock E.L., Gurrieri S. and Inguaggiato S. (2003).** Energetics of chemolithoautotrophy in the hydrothermal system of Vulcano Island, southern Italy. *Geobiology*, p. 37-58.
- (6). **ANTRANIKIAN G. (2008).** Industrial relevance of thermophiles and their enzymes in: *Thermophiles, biology and technology at high temperatures*. Ed. Robb F., Antranikian G., Grogan D., Driessen A. 8:114-147. CRC Press, New York.
- (7). **ANTRANIKIAN G., VORGIAS G.C., BERTOLDO C. (2005).** Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 96: 219-262.
- (8). **Arpigny J.L. et Jaeger K.E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 343 Pt 1: 177-83.
- (9). **Au-Young J. ET Fielding C.J. (1992).** Synthesis and secretion of wild-type and mutant human plasma cholesteryl ester transfer protein in baculovirus-transfected insect cells: the carboxyl-terminal region is required for both lipoprotein binding and catalysis of transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9): 4094-8.
- (10). **Babu I. S. & Rao H. (2007).** Optimisation of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Research journal of microbiology*. 1: 88-93.
- (11). **BAHRI F., SAIBI H., CHERCHALI M.H. (2010).** Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arab. J. Geosci.*, 1-13.

- (12). **Baker-Austin C. and Dopson M., (2007).**Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. Trends in Microbiology, p. 165-171.
- (13). **Balakrishnan P., Thamarachelvan R., Ereelot N., Dhannya G., Chidambaram K . (2011).** Production of lipase enzyme from *Lactobacillus spp* and its application in the degradation of meat. World applied sciences journal 12(10): 1798-1802.
- (14). **Bashir, N.B., Phythian, S.J., Reason, A.J. and Rioberts, S.M., (1995).** Enzymatic esterification and de-esterification of carbohydrates: synthesis of a naturally occurring rhamnopyranoside of p-hydroxybenzaldehyde and a systematic investigation of lipasecatalysed acylation of selected arylpyranosides. J Chem Soc Perkin Trans, vol.1, p. 2203-2222.
- (15). **Benerjee, M., Sengputa, I., and Majudar, S.k. (1958).** Lipase production by *Hansuenula anomala*. var. Schnegii, J. Food Sci.Technol., 22:137-139.++
- (16). **BERTOLDO C., ANTRANIKIAN G. (2001).** Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. Methods., Enzymol., 330:269-289.
- (17). **Bornsheur U. T., Bessler C., Srinivas R. & Krishna S. H. (2002).** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in biotechnology. 20: 433-437.
- (18). **BOUANANE-DARENFED A., FARDEAU M.L., GREGOIRE P., JOSEPH M.,**
- (19). **KEBBOUCHE-GANA S., BENAYAD T., HACENE H., CAYOL J.L., OLLIVIER B. (2011).** *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. a new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. Curr. Microbiol., 62:826-832.
- (20). **Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Hugel-Jensen B., Patkar S.A. et Thim L. (1991).** A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351(6326): 491-4.
- (21). **BRAGGER J.M., DANIEL R.M., COOLBEAR T., MORGAN H.W. (1989).**Very stable enzymes from extremely thermophilic archae bacteria and eubacteria. Appl. Microbiol. And Biotech., 31:556-561.
- (22). **Brock T. D., (1965).** The road to Yellowstone-and Beyond. Annual Review of Microbiology, p. 1-28.
- (23). **BURGESS S.A., LINDSAY D., STEVE H. FLINT S.H. (2010).** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. Intern. J. of Food Microbiol., 144:215-225.

- (24). **CAMACHO. R M , MATEOS. J C , REYNOSO. O G , PRADO. L A , CODOVA . J, (2009).** Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* , 36(7) ,901,909 .
- (25). **Castro-choa L.D., Rodrigez-Gomez C., Valerio-Alfaro. & Ros R. O. (2005).** Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans CCR11*. *Enzyme and microbial technology.* 37:648-654.
- (26). **Chahinian H. & Sarda L. (2009).** Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein. Pept. Lett.* 16: 1149-1161.
- (27). **Costas M., Dieve F. J. & Longo M. A. (2004).** Lipolytic activity in submerged cultures of *Issantchankia orientalis*. *Process biochemistry.* 39: 2109-2114.
- (28). **Cygler M., Schrag J.D., Sussman J.L., Harel M., Silman I., Gentry M.K. et Doctor B.P. (1993).** Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science*, 2(3): 366-82.
- (29). **Demirjian, D. C., F. Moris-Varas et C. . Cassidy. (2001).** Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical biology.* Vol. 5, no. 2, p. 144-151.
- (30). **DEMIRJIAN D.C., SHAH P.C., MORIS-VARAS F. (1999).** Screening for novel enzymes. *Topics Curr. Chem.*, 200:1-29.
- (31). **Dennis, E.A. (1973).** Kinetic dependence of phospholipase A<sub>2</sub> activity on the detergent Triton X-100. *J Lipid Res*, 14,152-159.
- (32). **Derewenda U., Brzozowski A.M., Lawson D.M. et Derewenda Z.S. (1992a).** Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*, 31(5): 1532-41.
- (33). **DINSDALE A.E., HALKET G., COOREVITS A., Van LANDSCHOOT A., BUSSE H.J., De VOS P., LOGAN N.A. (2011).** Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus*. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 61, 1802–1810.
- (34). **Drouault S., Corthier G., Ehrlich S.D. & Renault P. (2000).** Expression of the *Staphylococcus hyicus* Lipase in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology.* 66: 588 598.
- (35). **DUCKWORTH A.W., GRANT W.D., JONES B.E., VAN STEENBERGEN R. (1996).** Phylogenetic diversity of soda Lake Alkaliphiles. *F.E.M.S Microbiol. Ecol.*, 19:181-191.

- (36). **EGOROVA K., ANTRANIKIAN G. (2005)**. Industrial relevance of thermophilic  
(37). Archaea.Curr. Opin. Microbiol., 8: 649–55.
- (38). **Einarson, H., B. G. Snygg et C. Eriksson. (1983)**. Inhibition of bacterial growth by  
Maillard reaction products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 31, no.  
5, p. 1043-1047.
- (39). **Essamri M, Valerie D, Louis C. (1998)**. Optimization of lipase production by  
*Rhizopus oryzae*. and study on the stability of lipase activity in organic solvents. J  
Biotechnol; 60:97–103.
- (40). **Falk, M. P. F., Sander, E. A. and Deckwer, W-D. (1991)**. Studies on the production  
of lipase from recombinant *Staphylococcus carnosus*. Appl. Microbiol. Biotechnol.,  
vol. 35, p. 10-13
- (41). **FERRERA I., REYSENBACH A.L. (2007)**. Thermophiles in: encyclopedia of life  
sciences. John Wiley & Sons; P:1-9.
- (42). **Fischer M. (2004)**. Die Lipase Engineering Database systematische analyse  
familienspezifischer eigenschaften und der sequenz-struktur-funktionsbeziehung von  
 $\alpha/\beta$ -hydrolasen. Thèse de doctorat. *Institut für Technische Biochemie der Universität  
Stuttgart*. 176.
- (43). **Fickers P., Destain J. & Thonart P. (2008)**. Les lipases sont des hydrolases  
atypiques : Principales caractéristiques et application. Biotechnol. Agron. Soc.  
Environ. 12: 119-130.
- (44). **Fischer M. et Pleiss J. (2003)**. The Lipase Engineering Database: a navigation and  
analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research*, 31(1): 319-21.
- (45). **FRAZIER W.C. (1926)**. A method for the detection of changes in gelatin due to  
bacteria. J. Infect. Dis. 39:302-309.
- (46). **Fujita, Y., Awaji, H., Shimoto, H. and Shayrou, M., (1992)**. Lipase-catalyzed ester  
hydrolysis in dealing with pitch troubles in papermaking. PCT Int Appl, p. 11.
- (47). **Gallagher, S., & Wiley, E. (2008)**. Current Protocols Essential Laboratory  
Techniques. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- (48). **Gareeb A.P. and Setati M.E., (2009)**. Assessment of alkaliphilic *haloarchaeal*  
diversity in Suapan evaporator ponds in Botswana. African Journal of Biotechnology;  
vol. 8, p. 259-267.
- (49). **Garde V. L. (2000)**. Enzymes en agro-alimentaire. Lavoisier Tec. Doc.

- (50). **Gargouri M., Akacha N.B., Kotti F. & Ben Rajeb I. (2008).** Voie de la lipoxygénase valorisation d huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12:185-202.
- (51). **Gargouri Y., Julien R., Pieroni G., Verger R. & Sarda L. (1986).** Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal of lipid research.* 25: 1214-1221.
- (52). **Ghanem, A. and Aboul-Enein, H.Y., (2005).** Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, vol. 17, p. 1-15.
- (53). **Ghori M. I., Iqbal M. J., Hameed, A. (2011).** *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 22-29 ISSN 1517-8382.
- (54). **GODFREY T. (1996).** Textiles. In: Godfrey E, West S (eds) *Industrial enzymology*, 2nd edn. Macmillan Press, London, P:361-371.
- (55). **Gilham D. & Lehner R. (2005).** Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods.* 36: 139-147.
- (56). **GORDONE E., HAYNESW C., PANG C.H.N. (1973).** The Genus *Bacillus* (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC: United States Department of Agriculture.++
- (57). **GREGOIRE P., FARDEAU ML., GUASCO S., BOUANANE A., MICHOTÉY V., BONIN P., DUBOURG K., CAMBAR J., OLLIVIER B. (2009).** Les microorganismes de l'extrême. *Press. Therm. Climat.*,146:49-61.
- (58). **Grochulski P., Li Y., Schrag J.D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B. et Cygler M. (1993).** Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17): 12843-7.
- (59). **Guiraud J.P., (1998).** Techniques d'analyses microbiologiques : Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, France.
- (60). **Gurr,M.I. and James , A .T. (1971).** Lipid biochemistry: an introduction. (eds)*Chapman ET Hall, London.*
- (61). **Haider M.A. & Pakshirajan K., (2007).** Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by soil microorganism using statistically designed experiments. Copyright Humana press Inc. *Applied biochemistry and biotechnology.* Vol. 141, p. 377-390.
- (62). **HARLEY J.P., PRESCOTT L.M. (2002).** *Laboratory Exercises in Microbiology*, 5th Ed., 449P.

- (63). **Handelslam, T. and Shomam, Y. (1994).** Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus sp.* J. Gen. Appl. Microbiol., vol. 40, p. 435-443.
- (64). **Hasan F., Shah A.A. et Hameed A. (2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-51.
- (65). **Horikoshi K., (1999).** Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ; vol. 63, p. 735-750.
- (66). **Horikoshi K., (2006).** Alkaliphiles: Genetic Properties and Applications of Enzymes. Springer, Berlin, Germany.
- (67). **HORVATH I.T., HORVATH I. (2002).** Encyclopedia of catalysis, John Wiley & Sons Ed. 4772 P .
- (68). **Ileperuma N.R., Marshall S.D., Squire C.J., Baker H.M., Oakeshott J.G., Russell R.J., Plummer K.M., Newcomb R.D. et Baker E.N. (2007).** High-resolution crystal structure of plant carboxylesterase AeCXE1, from *Actinidia eriantha*, and its complex with a high-affinity inhibitor paraoxon. *Biochemistry*, 46(7): 1851-9.
- (69). **Ito T., Kikuta H., Nagamori E., Honda H., Ogino H., Ichikawa H. & Kobagachi T. (2001).** Lipase production in two step fed batch culture of organic solvent tolerant *Pseudomonas aerogenosa* LST-03. *Journal of bioscience and bioengineering*. 91:245-250.
- (70). **Jaeger K. E. & Eggert T. (2002).**Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 13:390-397.
- (71). **Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M. V & Misset O. (1994).**Bacterial lipases. *FEMS Microbiology reviews*. 15:29-63.
- (72). **Jahir Alam Khan<sup>1</sup> and Ruchika Priya. (2011).** A study on partial purification and characterization of extracellular amylases from *Bacillus subtilis*. *Pelagia Research Library*. 2 (3): 509 519.
- (73). **Janda K. (2005).** The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. *International Bio deterioration & Biodegradation*. 55:149 152.
- (74). **JOFFIN J.N., LEYRAL G. (2006).** Microbiologie technique, tome 1 : dictionnaire des techniques 4 ème édition. 361P.
- (75). **Kanwar S.S., Gupta M., Kauchaland R.K., Chimni S.S.(2006).**Properties of hydrogel entrapped lipase of thermophilic *Pseudomonas aeruginosa* *BTS-2*. *Indian journal of biotechnology*, 5, 292-297.



- (76). **Kazlauskas, R.J. and Weber, H.K., (1998).** Improving hydrolases for organic synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, vol. 2, p. 121-126.
- (77). **KECHA M., BENALLAOUA S., TOUZEL J.P. (2007).** Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles*; 11:65-73.
- (78). **Kim, K. W., et S. B. Lee. (2003).** Inhibitory effect of Maillard reaction products on growth of the aerobic marine hyperthermophilic archaeon *Aerodyrum pernix*. *Applied and Environmental microbiology*. Vol. 69, no. 7, p. 4325-4328.
- (79). **Ko W. H., wang I. T. & Ann P. J., (2005).** A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil biology & biochemistry*. Vol. 37, p. 597-599.
- (80). **Kojima Y, Yokoe M, Mase T. (1994).** Purification and characterization of alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens*.
- (81). **Kordel, M., Hoffman, B., Schomburg, D. ET Schmid, R. (1991).** Extracellular lipase of pseudomonas sp strains ATCC2808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction. *Bacteriol*, 173, 15, 4836-4841.
- (82). **Kouker G. & Jaeger K. E. (1987).** Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental Microbiology*. 53: 211-213.
- (83). **Kraut J. (1977).** Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 331-58.
- (84). **Kristjansson J.K. and Hreggvidsson G.O., (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; vol. 11, p. 17-25.
- (85). **KRULWICH T.A., GUFFANATI A.A. (1989).** Alkaliphilic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 43:435-463.
- (86). **Lakchmi B.S., Kanguane P., Abraham B. & Pennathur G. (1999).** Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031) .*Applied microbiology*. 29: 66-70.
- (87). **Lambit, K., Binod Kumar, G., Pranab, G (2002).** Production of a pseudomonas lipase in n alkaline substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, 84, 3,207-211.
- (88). **Largea K. P., Mirjalili N., Osbornea M., Peacocka L. M., Zormpaidis V., Walsha M., Cavanagha M.E., Leadlayb P. F. & Isona A. P. (1999)** Lipase activity in *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 569 575.

- (89). **LARSEN, H. (1986)**. Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspective, *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, 39: 3-7.
- (90). **Lawrence R.C., Fryer T. F. & Reiter B. (1967)**. The Production and Characterization of Lipases from a *Micrococcus* and a *Pseudomonad*. *J. gen. Microbial.* 48: 401-418.
- (91). **Lee, D., Y. Kim, B. Kim, H. choi, D. kim, M. T. Suhaton et Y. Pyun. (1999)**. Isolation and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology letters*. Vol. 179, no. 2, p. 393-400.
- (92). **Leyral G. & Joffine J. N., (1998)**. *Microbiologie technique* 2 ème édition.
- (93). **LEWINSON O., PADAN E., BIBI E. (2004)**. Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *P.N.A.S*; 101 (39): 14073-14078.
- (94). **Lichtenberg, D., Robson, R.j .and Dennis, EA. (1983)**. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim biophys. Acta*, 737, 285-304.
- (95). **Litthauer, D., Ginster, A., Van eder Skein, E. (2002)**. *Pseudomonas luteola* Lipase: a new member of the 320 residue Pseudomonas lipase family. *J, enzyme and microbial Technology*. 30, 2, 209-211.
- (96). **LOGAN N.A., BERGE O., BISHOP A.H., BUSSE H.J., De VOS P., FRITZE D., HEYNDRICKX M., KAAMPFER P., SALKINOJA-SALONEN M.S., SELDIN L., RABINOVITCH L., VENTOSA A. (2009)**. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:2114-2121.
- (97). **LOGAN N.A., ALLAN R.N. (2008)**. Aerobic, endospore-forming bacteria from Antarctic geothermal soils in microbiology of extreme soils. *Soil Biology*; 13: 155-173.
- (98). **LOGAN N.A., HALKET G. (2011)**. Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria *in* Endospore-forming Soil Bacteria, *Soil Biology*; 27: 1-29.
- (99). **Longhi S. et Cambillau C. (1999)**. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441(2-3): 185-96.++
- (100). **LOO. J L, LAI. O M, LONG. K, GHAZALI. H M, (2006)**. Identification and characterization of A locally Isolated lipolytic Microfungus *Geotrichum candidum*. *Malaysian. J Microbiology*. 2 (1), 22, 29.

- (101). **Loperena L., Ferrari M.D., Diaz A. L., Inglod G., Pérez L. V., Carvalho F., Travers D., Menes R.J. & Lareo C. (2008)**. Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. *Bio resource technology*. pp 5.
- (102). Lotti M., Tramontano A., Longhi S., Fusetti F., Brocca S., Pizzi E. et Alberghina L. (2002). Variability within the *Candida rugosa* lipases family. *Protein Engineering*, 7(4): 531-5.
- (103). **Lund E. and John W., (2007)**. Characteristics, development and utilization of geothermal resources. *Q. Bull*; vol. 28, p. 1-9.
- (104). **Madigan M.T. and Martino J.M., (2006)**. Brock Biology of Microorganisms, 11<sup>th</sup> ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA.
- (105). **Mancheno J.M., Pernas M.A., Martinez M.J., Ochoa B., Rua M.L. et Hermoso J.A. (2003)**. Structural Insights into the Lipase/esterase Behavior in the *Candida rugosa* Lipases Family: Crystal Structure of the Lipase 2 Isoenzyme at 1.97 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 332(5): 1059-69.
- (106). **Machy, P. and Leserman, L.(1987)**. Composition , propriétés et préparation des liposomes .les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie. *INSERM, 1-25*
- (107). **Mannesse M.L., Cox R.C., Koops B.C., Verheij H.M., de Haas G.H., Egmond M.R., van der Hijden H.T. et de Vlieg J. (1995)**. Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. *Biochemistry*, 34(19): 6400-7.
- (108). **Marchant, R., I. M. Banat, T. J. Rahman et M. Berzano., (2002a)**. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental Microbiology*. Vol. 4, no. 10, p. 595-602.
- (109). **Marchant, R., I. M. Banat, T. J. Rahman et M. Berzano., (2002b)**. What are high-temperature bacteria doing in cold environment. *Trends in Microbiology*. Vol. 10, no. 3, p. 120-121.
- (110). Martinez C., Nicolas A., van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Cudrey C., Verger R. et Cambillau C. (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry*, 33(1): 83-9.
- (111). Martins R.F., Davids W., Al-Sond W.A., Levander F., Radström P. and Hatti Kaul R., (2001). Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. *Extremophiles*; vol. 5, p. 135-144.

- (112). **Mathis B. J., Marchll C. W., Milliken C. E., Makkar R. S., Creager S.E., May H. D. (2008).** Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78:(1):147-155.
- (113). **MESBAH N.M., WIEGEL J. (2008).** Life at extreme limits. The anaerobic halophilicalkali thermophiles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125:44-57.
- (114). **McMullan, G., J. M. Christie, T. J. Rahman, I. M. Banat, N. G. Ternan et R. Marchant. (2004).** Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochemical society transactions*. Vol. 32, Pt 2, P. 214-217.
- (115). **MINANA-GALBIS D., PINZO D.L., LORE J.G., MANRESA A., OLIART-ROS R.M. (2010).** Reclassification of *Geobacillus pallidus* as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 60:1600-1604.++
- (116). **Moraleda-Munoz A. & Shimkets L. J. (2007).** Lipolytic Enzymes in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology*. 183: 3072 3080.
- (117). **Morozkina E.V., Slutskaya E.S., Fedorova T.V., Tugay T.I., Golubeva L.I. and Koroleva O.V., (2010).** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*; vol.46, p. 1-14.
- (118). **Mosbah H., Sayari A., Majdoub H., Dhouib H. & Gargouri Y.(2005).** Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochemical & biophysica. Acta*. 1723: 282-291.
- (119). **Najjar A. (2010).** Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d huile d olive. Thèse. Microbiologie et Biotechnologies.
- (120). **Nardini M. et Dijkstra B.W. (1999).** □/B Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 732-737.
- (121). **NAZINA T.N., TOUROVA T.P., POLTARAUS A.B., NOVIKOVA E.V., GRIGORYAN A.A., IVANOVA A.E., LYSENKO A.M., PETRUNYAKA V.V., OSIPOV G.A., BELYAEV S.S., IVANOV M.V. (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int., J., Syst., Evol., Microbiol.*, 51:433-446.

- (122). **Neerupma N., Rajvinder S., Jagdeep K. (2006).** Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458.
- (123). **Nerhaya H.Z., Sinan E.S. (2012).** Production, purification and characterization of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *All nahrain university journal*, 15, (1), 94-102.
- (124). **NIEHAUS F., BERTOLDO C., KAHLER M., ANTRANIKIAN G. (1999).** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 711-729.
- (125). Ollis D., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B.W., Frolow F., Franken S., Harel M., Remington S., Silman L., Shrag J., Sussman J., Verschueren K. et Goldman A. (1992). The  $\alpha/\alpha$  hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5: 197-211.
- (126). **Pabai F. (1997).** Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for interesterification of better fat. Department of food science & agricultural chemistry. McGill University, Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179.
- (127). **Park, C. B., S. B. Lee et D. D. Ryu. (2001).** L- pyroglutamate spontaneously formed from L- glutamate inhibits growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Applied and Environmental microbiology*. Vol. 67, no. 8, p. 3650-3654.
- (128). **Patrick Forterre., 2007.** *Microbes de l'enfer*, Éd. Belin, Pour la science.
- (129). **Petersen M. & Daniel R. (2006).** Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphom*. *World journal of microbiology & Biotechnology*. 22: 431-435.
- (130). **Pencreac'h G. & Baratti J.C. (1997).** Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 47: 630-635.
- (131). **Pedersen K., Nilsson E., Arlinger J., Hallbeck L. and O'Neill A., (2004).** Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. *Extremophiles* ; vol. 8, p. 151-164.
- (132). Pimentel, M. C., Krieger, N., Coelho, L, C., Fontana, J. O., Melo, E. H., Ledingham, W. M. and Lima Filho, J. L. (1994). Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Oct., 49 (1): 59-74.
- (133). PINZÓN-MARTÍNEZ D.L, RODRÍGUEZ-GÓMEZ C., MIÑANA-GALBIS D.,
- (134). CARRILLO-CHÁVEZ J.A., VALERIO-ALFARO G., OLIART-ROS R. (2010).

- (135). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environ. Techn.*, 31(8-9) 957-966.
- (137). **PIKUTA E., LYSENKO A., CHUVILSKAYA N., MENDROCK U., HIPPE H., SUZINA N., NIKITIN D., OSIPOV G., LAURINAVICHIOUS K. (2000).** *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 50, 2109-2117.
- (138). **PRIEST G.F., FERGUS G., GOODFELLOW M., TODD C. (1988).** A Numerical Classification of the genus *Bacillus*. *J. of general microbiol.*, 134:1847-1882.
- (139). **Prita, S Borkar., Ragini, G Bodade., Srinivasa, R Rao., Khobragade, C N (2009)** Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain- *Pseudomonas aeruginosa SRT9*. *Brazilian J. Microbiology* 40: (2), 358-366.
- (140). **Reis P., Holmberg K., Miller R., Leser M. E., Raab T. & Watzke H.J. (2008).** Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. *C. R. Chimie.* 1-8.
- (141). **Rohwerder T. and Sand W., (2007).** Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences*; vol. 7, p. 301-309.
- (142). **Sarkar. S., Sreekanth, B., Kant, S., Banerjee. R. and Bhattacharyya, B. C., (1998).** Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Engineering*, vol. 19, p.29-32.
- (143). **Satyanarayana T., Raghukumar C. and Shivaji S., (2005).** Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*; vol. 89, p. 78-90.
- (144). **Shabtai, Y, and Daya- Mishne, N. (1992).** Production, purification and properties of lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water- restricted environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, Jan. 58(1): 174-180.
- (145). **Shah N. P. (2007).** functional cultures and Health benefits. *International dairy journal* 17 :1262-1277.
- (146). **Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. C. (2001).** Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances.* 19: 627-662.
- (147). **Shelley, A.W., H.C. Deeth, and I.C. MacRae.1987.** Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *J. Microbiol. Methods* 6:123-137.

- (148). Schmidt B. M., Baumann M., Henke E., Konarzycka-Bessler M. & Bornscheuer U. T. (2004). Directed evolution of Lipases and Esterases. *Methods in enzymology*. 388: 199-207.
- (149). **Schrag J.D., Li Y.G., Wu S. et Cygler M. (1991)**. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351(6329): 761-4.
- (150). **Sentaniello E., Ciuffreda P., Casati S. & El-Sayed H. (2006)**. Design of new chromogenic substrates for the spectrophotometric assay of lipolytic activity of lipases. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* .40: 76-80.
- (151). **Selva Mohan, T., Palavesam, A. and Immanuel, G. (2008)**. Isolation and characterization of lipase producing *Bacillus* strain from oil mills waste. *AFR. Journal biotechnologie.*, vol.7, p. 2728-2735.
- (152). Sidhu P., Scharma R., Soni S.K. & Gupta J. K. 1998. Production of extra cellular alkaline lipase.
- (153). **SIGURGISLADOTTIR S., KONRAOSDOTTIR M., JONSSON A., KRISTJANSSON J.K., MATTHIASSON E. (1993)**. Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. Volume 15, Number 4, 361-366.
- (154). **Singh A. K. & Mukhopadhyay M. (2012)**. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166: 486-520.
- (155). **Singh L., Ram M.S., Agarwal M. K. & Alam S. I. (2000)**. Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains and their evaluation for biodegradation of night soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16: 625-630.
- (156). **Sommer P., Bormann C. & Gutz F. (1997)**. Genetic and biochemical characterization of a new extra cellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied and environmental microbiology*. 63: 3553-3560.
- (157). **Song, Q. X., Lin, J. P., Rong, Y. P. and Wei, D. Z. (2001)**. Studies on lipase production from *Candida Rugosa*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.*, Jan; 17(1):101-104.
- (158). **Small, D.M. 1968**. A classification of bacterial lipids based upon their interaction in aqueous systems. *J Amer Oil Chemists Soc*, 45,108-119.
- (159). **Snellman E. A., Colwell R.R. (2004)**. *Acinetobacter* lipases: Molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J. Ind. Microbial. biotechnol.* 31: 391-400.
- (160). **Stern A.M., Ordal Z. J. & Halvorson H. O. (1953)**. Utilization of fatty acids by and lipolytic activities *Mucor mucido*. 24 -27.

- (161). **STERNER R., LIEBL W. (2001).** Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 36: 39-106.
- (162). **STETTER K.O. (1996).** Hyperthermophilic prokaryotes. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, 18:149- 158.
- (163). **Sugihara A., Tani T. & Tominaga Y., (1991).** Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* *J. Biochem.* Vol. 109, p. 211 216.
- (164). **Surucu, G. (1999).** Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes. *Water Science and Technology.* Vol. 40, no. 1, p. 53-60.
- (165). **Svendsen A. (2000).** Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543(2): 223-38.
- (166). **THOLEY A., HEINZLE E. (2002).** Methods for Biocatalyst Screening. *Adv. in Biochem.Engin/Biotechn.*, 74:1-19.
- (167). **Thomson,C.A., P.J. Delaquis, and G. Mazza.1999.** **Detection** and Measurement of Microbial Lipase Activity: A Review.*Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39(2): 165-187.
- (168). **TINDALL B. J., SIKORSKI J., SMIBERT R.M. KRIEG, N. R. (2007).** Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: *Methods for General and Molecular Microbiology*; P: 330-393.
- (169). **TINDALL B.J., ROSSELLO-MORA R., BUSSE H.J., LUDWIG, W., KAMPFER P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60:249-266.
- (170). **Ulrih N.P., Gmajner D. and Raspor P., (2009).** Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic *archaea*. *Applied Microbiology and Biotechnology* ; vol. 84, p. 249-260.
- (171). **Uppenberg J., Patkar S., Bergfors T. et Jones T.A. (1994b).** Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Biology*, 235(2): 790-2.
- (172). **Van Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K.E. et Dijkstra B.W. (2001).** The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 309(1): 215-26.
- (173). **Vargas V.A., Delgado O. D., Hatti Kaul R. & Mattiasson B., (2004).** Lipases producing microorganisms from Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters.* Vol. 26, p. 81-86.



- (174). **Verger R. (1985)**. Les enzymes lipolytiques. In Mouranche A. & Costes C. Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d'intérêt industriel. Paris, Edition : Gauthier Villars. 313-329.
- (175). **Vieille , C., et G. J. Zeikus., (2001)**. Hyperthermophilic enzyme : source, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 65, no. 1, p. 1-43.
- (176). **VOLKL P., HUBER R., DROBNER E., RACHEL R., BURGGRAF S., TRINCONE A., STETTER KO. (1993)**. *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. Appl. and Environ. Microbiol., 59:2918-2926.
- (177). **WAGNER I.D., WIEGEL J. (2008)**. Diversity of thermophilic anaerobes. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1125:1-43.
- (178). **Wainwright M., (2003)**. A microbiologist looks at panspermia. Astrophysics and Space Science ; vol. 285, p. 563-570.
- (179). **Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY. (1995)**. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). J Ferment Bioeng; 79:433-8.
- (180). **WEIGEL J. (1986)**. Methods for isolation and study of thermophiles. In: Brock (ed),
- (181). Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology; P: 17-37.
- (182). **WIEGEL J. (1990)**. Temperature spans for growth: a hypothesis and discussion. F.E.M.S. Microbiol. Rev., 75:155-170.
- (183). **Wisdomkofi Amoa- Awua, Nora NarkiTerlabie, Esther Sakyi-Dawson.** Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. International journal of microbiology 2006.106 343-347.
- (184). **Winkler F. K., Darcy A. & Hunziker W. (1990)**. Structure of human pancreatic lipase. Nature. 343: 771-774.
- (185). **Woese,C., et al. ,(1990)**. Towards a natural system of organisms ,proposai for domains *archaeobacteria* ,and *eucarya* .proceeding of the national academy of USA, vol. 97, p. 4576-4579

# WEBOGRAPHIE

(186). <http://www.lipidmaps.org>

(187). <http://www.cyberlipid.org>

# ANNAXES

## *Annexe A*

### ❖ **Gélose nutritive :**

**Composition** par litre :

- Extrait de viande 1g
- Extrait de levure 2g
- Peptone 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Agar 15g
- pH = 7,4

### ❖ **Milieu VF (Viande-Foie)**

**Composition** par litre:

- Base viande foie 30,0g
- Glucose 2,0g
- Agar 6,0g
- pH = 7,0

### ❖ **Bouillon Cœur-cerveille (*Brain Heart Infusion Broth = BHIB*)**

**Composition** par litre

- Cerveille de veau, Infusion à partir de 200 g.....7.7g
- Coeur de boeuf, Infusion à partir de 250 g.....9.8g
- Protéose Peptone.....10.0g
- Dextrose..... 2.0g
- Chlorure de sodium..... 5.0g
- Phosphate Di-sodique..... 2.5g
- pH 7.4 ± 0.2 à 37°C

❖ **Milieu de culture minimal pour l'activité lipolytique :**

- $K_2HPO_4$ .....0, 8g/l
- $KH_2PO_4$ .....6g/l
- $(NH_4)_2SO_4$ .....1g/l
- $MgSO_4, 7H_2O$ .....0, 2g/l
- $CaCl_2$ .....0,05g/l
- NaCL.....3g/l
- $FeSO_4$ .....0, 001g/l
- Emulsion de l'huile d'olive.....1%
- pH : 7

**Préparation de l'émulsion de l'huile d'olive à 1% :**

- 1ml de l'huile d'olive dans 9 ml de la gomme arabique à 1%, agitation pendant 2 minutes.

❖ **Le milieu minimal optimal pour la souche GH5**

- $K_2HPO_4$ .....0, 8g/l
- $KH_2PO_4$ ..... 6g/l
- Extrait de malt.....1g/l
- $MgSO_4, 7H_2O$ .....0, 2g/l
- $CaCl_2$ .....0,05g/l
- NaCL.....3g/l
- $FeSO_4$ .....0,001g/l
- Emulsion de l'huile d'argan.....1%
- pH : 10

❖ **Le milieu minimal optimal pour la souche WO4**

- $K_2HPO_4$ .....0, 8g/l
- $KH_2PO_4$ .....6g/l
- Extrait de viande.....1g/l
- $MgSO_4, 7H_2O$ .....0, 2g/l
- $CaCl_2$ .....0,05g/l

- NaCL.....3g/l
- FeSO<sub>4</sub>.....0,001g/l
- Emulsion de l'huile d'olive.....1%
- pH : 10

❖ **Le milieu minimal optimal pour la souche HR2**

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0, 8g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....6g/l
- Extrait de malt.....1g/l
- MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0, 2g/l
- CaCL<sub>2</sub>.....0,05g/l
- NaCL.....3g/l
- FeSO<sub>4</sub>.....0,001g/l
- Emulsion de l'huile d'olive.....1%
- pH : 8

❖ **Le milieu minimal optimal pour la souche S5**

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0, 8g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....6g/l
- Peptone.....1g/l
- MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0, 2g/l
- CaCL<sub>2</sub>.....0,05g/l
- NaCL.....3g/l
- FeSO<sub>4</sub>.....0, 001g/l
- Emulsion de l'huile de sésame.....1%
- pH : 10

❖ **Le milieu minimal optimal pour la souche HB5**

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0, 8g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....6g/l
- peptone.....1g/l
- MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0, 2g/l
- CaCL<sub>2</sub>.....0,05g/l

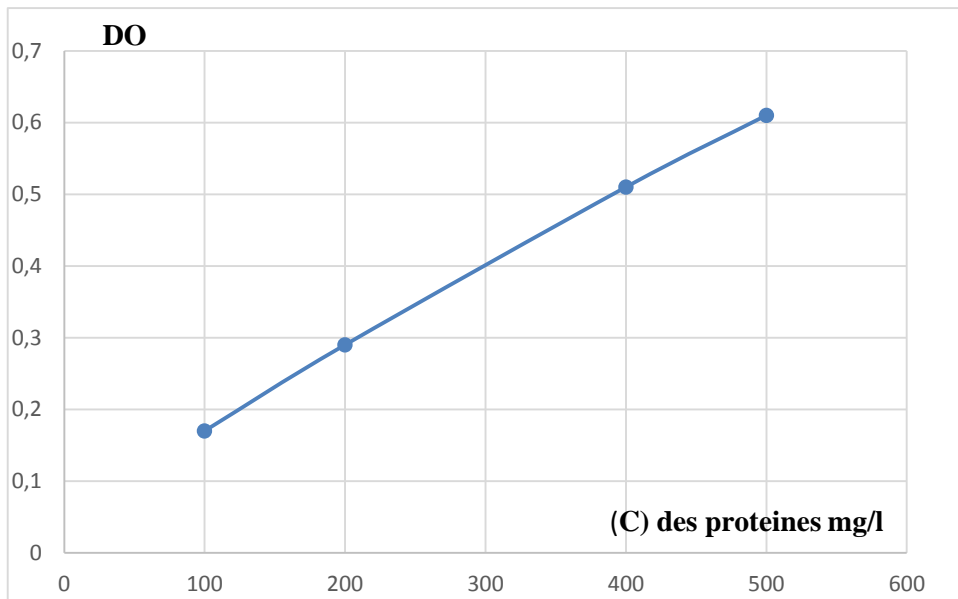
- NaCL.....3g/l
- FeSO<sub>4</sub>.....0,001g/l
- Emulsion de l'huile d'olive.....1%
- pH : 8

**La courbe d'étalonnage de la solution protéique (BSA).**

|  |      |      |      |      |
|--|------|------|------|------|
| <b>C<sub>BSA</sub> (mg/l)</b>                | 100  | 200  | 400  | 500  |
| <b>Densité optique (DO<sub>495 nm</sub>)</b> | 0,17 | 0,29 | 0,51 | 0,61 |

la droite de la corrélation obtenue est présenté par l'équation suivante :

$$Y = 0,0011.X + 0,065. R = 0,9992$$



# *Annexe B*

## **Présentation des galeries API 20 E (d'après la documentation BioMérieux).**

### **1. Principe**

La galerie API 20 E, commercialisée par la société « bioMérieux,» est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé.

La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sontensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H<sub>2</sub>S), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides" : glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA).

La galerie permet également la recherche du nitrate réductase qui se fait dans le microtube "GLU".

### **2. Technique**

- Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée.
- Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium".

- ☑ A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.
- ☑ Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.
- ☑ Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H2S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.
- ☑ Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR,RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.
- ☑ Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

### 3. Lecture et interprétation :

#### ✓ Lecture de la galerie :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- **Test TDA** : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
- **Test IND** : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
- **Test VP** : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **négative**.

#### ✓ Interprétation :

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.



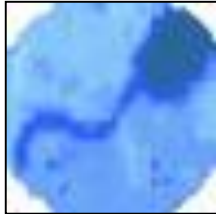
✓ **Détermination du profil numérique :**

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

**TABLEAU DE LECTURE**

| <i>Tests</i> | <i>Composants actifs</i>           | <i>Qte</i> | <i>Réactions</i>   | <i>Résultats</i>         |                           |
|--------------|------------------------------------|------------|--|--------------------------|---------------------------|
|              |                                    |            |  | NEGATIF                  | POSITIF                   |
| ONPG         | 2-nitrophényl-βD galactopyranoside | 0,223      | β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βDGalactopyranosidase | Incolore                 | jaune                     |
| <u>ADH</u>   | L-arginine                         | 1,9        | Arginine DiHydrolase                                     | Jaune                    | rouge                     |
| <u>LDC</u>   | L-lysine                           | 1,9        | Lysine DéCarboxylase                                     | Jaune                    | rouge - orangé            |
| <u>ODC</u>   | L-ornithine                        | 1,9        | Ornithine DéCarboxylase                                  | Jaune                    | rouge - orangé            |
| <u>CIT</u>   | trisodium citrate                  | 0,756      | Utilisation du CITrate                                   | vert pâle - jaune        | bleu-vert - bleu          |
| <u>H2S</u>   | sodium thiosulfate                 | 0,075      | Production d'H2S   | incolore - grisâtre      | dépôt noir - fin liseré   |
| URE          | Urée                               | 0,76       | UREase   | Jaune                    | rouge - orangé            |
| TDA          | L-tryptophane                      | 0,38       | Tryptophane DésAminase                                   | TDA-immédiat             |                           |
|              |                                    |            |  | Jaune                    | marron-rougeâtre          |
| IND          | L-tryptophane                      | 0,19       | production d'INDole /                                    | JAMES-immédiat           |                           |
|              |                                    |            |  | Incolore-vert pâle-jaune | rose                      |
| <u>VP</u>    | sodium pyruvate                    | 1,9        | production d'acétoïne                                    | VP 1 + VP 2 / 10 min     |                           |
|              |                                    |            |  | incolore - rose pâle     | rose - rouge              |
| <u>GEL</u>   | Gélatine                           | 0,6        | Gélatinase   | non diffusion            | diffusion du pigment noir |
| GLU          | D-glucose                          | 1,9        | fermentation - oxydation                                 | bleu - bleu-vert         | jaune - jaune gris        |
| MAN          | D-mannitol                         | 1,9        | (GLUcose   | bleu - bleu-vert         | Jaune                     |
| INO          | Inositol                           | 1,9        | fermentation - oxydation (MANnitol)                      | bleu - bleu-vert         | Jaune                     |
| SOR          | D-sorbitol                         | 1,9        | fermentation - oxydation (INOsitol)                      | bleu - bleu-vert         | Jaune                     |
| RHA          | L-rhamnose                         | 1,9        | fermentation - oxydation (SORbitol)                      | bleu - bleu-vert         | jaune                     |
| SAC          | D-saccharose                       | 1,9        | fermentation - oxydation (RHAmmose)                      | bleu - bleu-vert         | jaune                     |
| MEL          | D-melibiose                        | 1,9        | fermentation - oxydation (SACcharose)                    | bleu - bleu-vert         | jaune                     |
| SAC          | D-saccharose                       | 1,9        | fermentation - oxydation (MELibiose)                     | bleu - bleu-vert         | jaune                     |
| MEL          | D-melibiose /                      | 1,9        | fermentation - oxydation (SACcharose)                    | bleu - bleu-vert         | jaune                     |
| AMY          | Amygdaline /                       | 0,57       | fermentation - oxydation (MELibiose)                     | bleu - bleu-vert         | jaune                     |

## *Annexe C*



### **Probabilistic Identification of Bacteria for Windows**

- **Désignation du logiciel :** Probabilistic Identification of Bacteria for Windows
- **Abréviation :** PIBWin
- **La version :** 0.2
- **Référence:** Bryant TN. PIBWin - software for probabilistic identification. Journal of Applied Microbiololgy. 2004;97(6):1326-7.
- **Le programme a trois fonctions principales:**
  - ✓ L'identification des isolats inconnus
  - ✓ la sélection des tests supplémentaires pour distinguer les souches dont l'identification n'est pas atteinte
  - ✓ le stockage et la récupération des résultats

Le programme est conçu pour utiliser des matrices d'identification probabilistes qui ont soit publiés dans la littérature ou créés par l'utilisateur. Les matrices qui sont fournis avec PIBWin ont été prises à partir de la littérature. Ces matrices ont été publiées eux et les utilisateurs doivent se référer à ces publications pour plus de détails sur les méthodes utilisées lors de tests sur les isolats.

# RESUME

La demande en thermo-enzymes pour des applications biotechnologiques est de forte croissance. Les lipases sont, parmi les enzymes thermophiles, les plus recherchées dans divers secteurs industriels. Les objectifs de ce travail étaient l'isolement et l'identification des souches thermophiles productrices de la lipase à partir des sources thermales de différentes wilayas d'Algérie, L'optimisation des conditions impliquées dans la production de la lipase par ces souches, leur purification et l'étude des propriétés catalytique de la lipase sont mise en évidence.

Le criblage primaire des souches productrices de la lipase sur milieu minimal contenant une concentration de 1% de l'huile d'olive et de tween 80 comme seul source de carbone a permis l'isolement de 59 souches bactériennes thermophiles aérobies.

Le criblage secondaire a permis la sélection de 5 souches productrices de la lipase très performantes.

L'utilisation des galeries API (20E, 20NE) et l'interprétation probalistique des résultats obtenus a permis l'identification des souches sélectionnées comme étant : GH5 : *Geobacillus*, S5 : *Bacillus subtilis*, HB5 : *Pseudomonas fluorescens*, WO4 : *Bacillus licheniformis*, HR2 : *Bacillus cereus*.

Différents paramètres impliqués dans la production de lipase et la biomasse tels que la température, la source de carbone et d'azote, la durée d'incubation, la concentration de l'inoculum, la valeur de pH ont été optimisés. Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation des souches sélectionnés (WO4, GH5, HB5, HR2, S5) sur milieu de culture minimal, incubées à une température de 50°C pendant un temps d'incubation 72 heures a donné une production maximale (35000, 33000, 2 9000, 26000, 24000 $\mu$ mol/ml/min).

La purification partielle de la lipase chez les souches sélectionnées productrices a été effectuée en étapes successives : Dans un premier temps, les protéines sont fractionnées par précipitation au sulfate d'ammonium, ensuite dialysées dans une solution tampon de phosphate de potassium pendant une heure. Dans un second temps, la fraction protéique active est ensuite soumise à une purification partielle sur chromatographie d'échange d'anion (DEAE de cellulose).

L'activité enzymatique des lipases produites chez les cinq souches sélectionnées est maximale à des valeurs de pH comprise entre 7-10 et une température de 50-70°C.

La purification de la lipase produite chez les souches (S5, HR2, HB5, GH5, WO4) par précipitation au sulfate d'ammonium (40% et 60%) et la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, a donné les rendements respectifs (19,4, 19,38, 18,1, 17,4, 19,4 %). L'activité enzymatique de la lipase se manifeste stable à des valeurs de pH comprise entre 5-10 et à des températures situées entre 60-90°C pendant un intervalle de temps d'une heure.

Par ailleurs, L'activité enzymatique de la lipase est fortement stimulée en présence des ions de  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$  à une concentration de 1mM. Cependant, la présence de certains métaux tels que le  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  et  $\text{Mn}^{+2}$  à une concentration de 1mM a manifesté un effet d'inhibition.

**Mots clés:** lipase, criblage, thermophiles, optimisation, caractérisation, stabilité, cinétique de croissance