



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah  
Faculté des Sciences et Techniques  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



---

Année Universitaire : 2014-2015

**Master Sciences et Techniques : Biotechnologie Microbienne**  
**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Sous le thème

---

*Isolement des microorganismes  
producteurs de lipases à intérêt  
biotechnologique*

---

**Présenté par :**

Mlle. BOUKAA Meryem

**Encadré par :**

-Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI

**Co-encadrant :**

- Mr. Faouzi LAACHARI

**Soutenu le :** 27 juin 2015

**devant le jury composé de :**

-Pr. Saad IBNSOUDA

-Pr. Omar EL FARRICHA

-Pr. Soumya ELABED

-Pr. Mohammed Ali TAHRI JOUTI

---

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES**

☒ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☒ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14

## Résumé

Les lipases sont des enzymes largement répandues dans la nature et font partie de la famille des hydrolases qui interviennent dans l'hydrolyse des lipides. Vu la polyvalence de ces enzymes, les lipases ont attiré l'attention des chercheurs scientifiques grâce à leur large spectre d'application dans l'industrie alimentaire, la production des détergents, les produits pharmaceutiques, cuir, textile, cosmétique, et l'industrie du papier.

Dans le but de contribuer à l'isolement des microorganismes producteurs de lipases, un screening de souches microbiennes provenant d'un bain de dégraissage au sein des tanneries de l'ancienne médina de Fès a été réalisé. Les deux souches sélectionnées pour leur potentiel de production de lipases ont été identifiées par les techniques de biologie moléculaire et biochimique comme étant *Proteus vulgaris*. Les résultats du dosage ont révélé que les deux souches produisent des lipases inductibles en présentant une activité lipasique (de 5 et 7 U / mL). En outre, la production de lipases se trouve être associée à la croissance bactérienne et sa sécrétion débute lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle.

La caractérisation biochimique de deux enzymes a montré des résultats qui nous ont permis de révéler des optima d'activité des deux lipases à une température de 50 °C et à pH 8 dans le cas de *Proteus vulgaris* et à pH 7 dans le cas de la souche C<sub>2</sub>. En plus, il s'est montré que celles-ci restent stables à un intervalle de pH variant de 5 à 8 dans le cas de *Proteus vulgaris* respectivement et de 5 à 7 dans le cas de la souche C<sub>2</sub>. Les ions de Zn<sup>2+</sup> présentent un effet stimulant pour les lipases en augmentant significativement l'activité lipasique, bien que l'activité lipasique de la souche *Proteus vulgaris* passe de 3 à 8 U/ml avec une concentration de 4 mM et de 5 à 8U/ml avec une concentration de 10 mM pour la souche C<sub>2</sub>. Ainsi que la présence des ions MgSO<sub>4</sub> et FeSO<sub>4</sub> à une concentration de 10 mM donne un maximum d'activité avec une valeur de 8 U/ml dans le cas de la souche C<sub>1</sub>. et la présence des ions CaCl<sub>2</sub> donne un maximum d'activité 3 U/ml en présence d'une concentration de 4mM dans le cas de la souche C<sub>1</sub> et une concentration de 2mM dans le cas de la souche C<sub>2</sub>.

## Remerciements

*Avant tout, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir aidé à porter ce travail à son terme.*

*Ce travail de recherche a été réalisé au « Laboratoire Biotechnologie Microbienne » au sein de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès (FSTF), je voudrais remercier mon Professeur **S.IBNSOUDA** pour l'accueil qu'il m'a accordé dans son laboratoire, pour l'aide, la collaboration, les précieux conseils et la compréhension qu'il a montrés à mon égard, ainsi que pour toutes les informations utiles qu'il n'a cessées de nous fournir pendant toute la période consacrée à la réalisation de ce modeste travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **F.LAACHARI**, Docteur pour l'aide, la compréhension, ses conseils, pour m'avoir encouragé et son aide si précieuse.*

*Je remercie également Madame **S.ELABED** professeur au CURI, Monsieur **O.EL FARRICHA** et Monsieur **M.A.TAHRI JOUTI**, professeurs à la FSTF, d'avoir accepté d'être membres du jury de ce mémoire.*

*Un grand merci à Mr **H.BARKAI**, Mlle **A .MISBAH** et aux thésards et les étudiants en Master, plus particulièrement ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail, pour leur sympathie. Je leur souhaite une bonne continuation.*

*Finalement, j'espère que ce modeste travail soit à la hauteur*

# *Dédicaces*

## ***A mes chers parents***

*Rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et bien être, afin que je puisse poursuivre mes études et réaliser mes objectifs. Mon plus vif espoir est de vous voir à mes côtés le plus long possible. Je vous dois tout, veuillez trouver dans ce modeste travail, le témoignage de mes profonds sentiments.*

## ***A tous les membres de ma famille :***

*Je vous exprime à travers ce modeste travail mes sentiments d'amour et d'affection.*

## ***A nos enseignants :***

*Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde reconnaissance et ma grande estime.*

**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1** : Lipases commercialement disponibles, et leurs applications industrielles-----18

**Tableau 2**: Constituants du mélange utilisé pour l'amplification des bactéries ----- 22

**Tableau 3** : Programme de la PCR utilisé ----- 23

**Tableau 4** : Réactifs utilisés dans la réaction de séquençage ----- 24

**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Structure d'un triglycéride-----	4
<b>Figure2</b> : transport des lipides par les lipoprotéines -----	5
<b>Figure 3</b> : Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride ---	8
<b>Figure 4</b> : Schéma du repliement / -----	11
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester-----	12
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique du mécanisme d'activation interfacial de lipases	13
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique du mécanisme catalytique des lipases-----	13
<b>Figure 8</b> : Technique de dilution en série -----	19
<b>Figure 9</b> : Visualisation sous UV de la fluorescence émise par les différents isolats en présence de la rhodamine -----	28
<b>Figure 10</b> : Profil de migration électrophorétique du produit d'amplification des séquences d'ADN16S -----	29
<b>Figure 11</b> : gamme d'étalonnage de l'acide oléique-----	30
<b>Figure 12</b> : Cinétique de production de lipases et de croissance de la souche C1 -----	30
<b>Figure 13</b> : Cinétique de production de lipases et de croissance de la souche C2 -----	31
<b>Figure 14</b> : Effet des ions métalliques sur l'activité lipasique -----	33
<b>Figure 15</b> : Effet de la température sur l'activité lipasique -----	33
<b>Figure 16</b> : Effet du pH sur l'activité lipasique -----	35
<b>Figure 17</b> : Effet de la température et du pH sur la stabilité des lipases-----	36

**LISTE DES ABREVIATIONS**

- ARNr 16s : ARN ribosomal 16s
- BET : Bromure d'éthidium
- CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium
- DO : densité optique
- EDS : Eau Distillée Stérile
- FeSO<sub>4</sub> : Sulfate de fer
- HCl : chlorure d'hydrogène ou acide chlorhydrique
- MgSO<sub>4</sub> : Sulfate de magnésium
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- TE : Tampon d'extraction
- UV : Ultra violet
- ZnSO<sub>4</sub> : Sulfate de zinc
- CURI : Centre Universitaire de Recherche et d'Interface

# SOMMAIRE

Liste des tableaux-----	I
Listes des figures -----	II
Liste des abréviations -----	III
Introduction -----	1

## Revue Bibliographique

### *Chapitre 1 : Dégradation des lipides*

<b>I. Digestion des lipides et mobilisation des lipides de réserve -----</b>	<b>3</b>
1. Définition des lipides -----	3
2. Digestion des lipides alimentaires -----	4
3. Mobilisation des triglycérides de réserve -----	6
<b>II. <math>\beta</math>-oxydation des acides gras -----</b>	<b>6</b>
1. Introduction -----	6
2. Hydrolyse des triglycérides -----	7

### *Chapitre 2 : les lipases*

1. Définition -----	8
2. Origine des lipases -----	8
3. Séquence, structure et mécanisme réactionnel -----	10
3.1. / hydrolases -----	10
3.2 .Mécanisme enzymatique d'hydrolyse -----	10
4. Propriétés physico-chimiques des lipases -----	13
5. Applications industrielles -----	14
5.1. Hydrolases -----	14
5.2. Synthèse organique -----	15

## Matériel et méthodes

<b>I. Isolement et caractérisation des isolats -----</b>	<b>18</b>
1. Origine des souches -----	18
2. Composition chimique des milieux de culture -----	18
3. Isolement des microorganismes -----	18
4. Mise en évidence de l'activité lipase -----	19

---

<b>II. Identification des isolats</b> .....	19
1. Identification classique .....	19
a. Coloration de Gram .....	19
b. Galerie Api 20E .....	20
2. Identification moléculaire des isolats .....	20
a. Extraction de l'ADN .....	20
b. Amplification de l'ADN .....	21
c. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	22
d. Séquençage .....	22
<b>III. Caractérisation biochimique des lipases</b> .....	24
1. Méthode de suivie de la production des lipases .....	24
2. Méthode de suivie de la croissance bactérienne .....	24
3. Effet de l'huile d'olive sur la production des lipases .....	24
4. Effet des ions métalliques sur l'activité lipasique .....	25
5. Effet de la température et pH sur l'activité des lipases .....	25
6. Effet de la température et du pH sur la stabilité des lipases .....	26
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>I. Isolement et caractérisation des isolats</b> .....	27
1. Isolement des microorganismes .....	27
2. Mise en évidence de l'activité lipase .....	27
<b>II. Identification des souches sélectionnées</b> .....	27
<b>III. Caractéristiques biochimiques des lipases</b> .....	29
1. Dosage de l'activité lipasique en unité enzymatique et la détermination de la courbe de croissance des deux isolats sélectionnés .....	30
2. Effet de l'huile sur la production des lipases .....	31
3. Effet des ions métalliques sur l'activité lipasique .....	32
4. Effet de la température et du pH sur l'activité des lipases .....	33
5. Effet de la température et du pH sur la stabilité des lipases .....	35
Conclusion .....	36
Références bibliographiques .....	37

# *INTRODUCTION*

L'ensemble de la population consomme des biens et services qui sont issus de la biotechnologie. Qu'il s'agit d'un aliment d'un médicament d'un détergent ou d'une crème hydratante. Une ou plusieurs des étapes de production de ces produits a vraisemblablement nécessité l'action d'enzymes microbiennes. Parmi ces enzymes potentiellement intéressants on trouve les lipases, spécifiquement ceux d'origine microbienne. En effet, les lipases sont largement produites par les micro-organismes, et spécifiquement par les levures, les champignons et les bactéries. Ces dernières ont été particulièrement étudiées d'une part en raison de leurs utilisations dans les différents domaines, alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et d'autre part en raison de la simplicité de leurs procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale (Fickers et al., 2005). De plus les lipases d'origine microbienne présentent une grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques.

Les lipases appelés aussi Les triacylglycérol acyl-hydrolases, forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides à longues chaînes d'acides gras en glycérol et en acides gras correspondant. La réaction d'hydrolyse se déroule à l'interface eau-substrat (Hernández et al., 2009).

En effet, Les lipases, sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides en acide gras et en glycérol. Chez de nombreux êtres vivants, cette réaction est capitale de par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme des graisses et des lipides. De plus, certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques. En milieu solvant, elles peuvent catalyser bon nombre de réactions allant de l'estérification à l'acidolyse ou l'alcoololyse tout en présentant une certaine énantio- régio- et chimio-sélectivité (Gupta, 2004).

L'industrie nécessite de nouvelles enzymes qui répondent aux critères d'utilisation, notamment au niveau de la thermostabilité, la capacité à catalyser des réactions en conditions alcalines, ou encore en présence de quantités élevées de solvants.

Le présent travail a pour objectif de chercher des lipases microbiennes à intérêt agroalimentaire. Pour cette fin nous nous sommes intéressés à l'isolement des souches possédant une activité lipasique. Ensuite nous avons visé l'identification moléculaire des souches isolées. En suite, nous avons étudié les caractéristiques biochimiques des lipases produites par les deux souches sélectionnées.

## **Chapitre1: Dégradation des lipides**

### **I. Digestion des lipides et mobilisation des lipides de réserve**

#### **1. Définition des lipides**

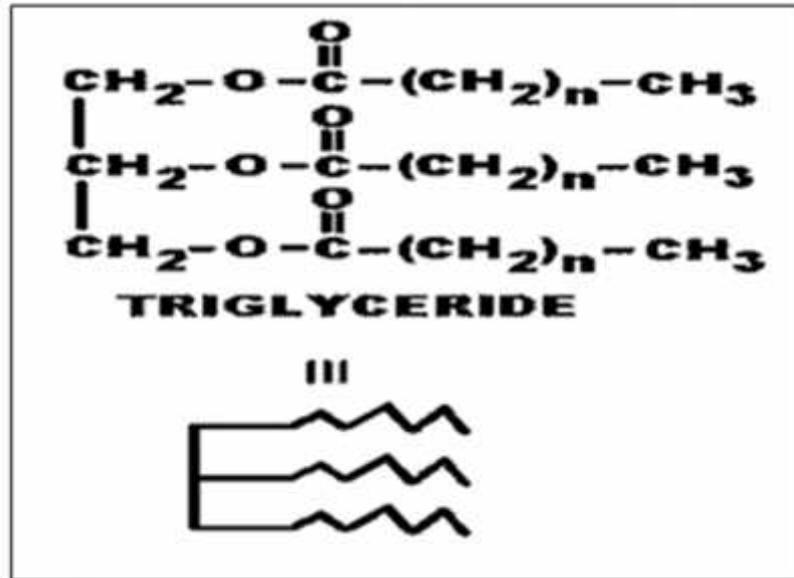
Les lipides sont des produits naturels largement répandus dans le règne animal, végétal et microbien. Ils forment une famille hétérogène du point de vue de la structure ou de groupements fonctionnels mais possèdent des propriétés communes concernant leur densité (inférieure à celle de l'eau) et leur solubilité. Ils sont tous insolubles dans les solvants polaires (comme l'eau) mais très solubles dans les solvants non polaires ou faiblement polaire (comme l'éther, le chloroforme, l'acétone).

Les lipides développeront une large gamme de propriétés fonctionnelles : réserve énergétique, transport de molécules liposolubles (vitamines, colorants), molécules structurales (élaboration des membranes cellulaires), régulateurs métaboliques (hormones stéroïdes), émulsifiants, texture.

Les lipides englobent les triglycérides (graisses et huiles), les phospholipides et les stéroïdes. Les acides gras qui les composent peuvent être classés comme acides gras saturés (sans liaisons doubles) ou acides gras insaturés (avec une plusieurs liaisons doubles).

#### **Les triglycérides (Figure1)**

Les triglycérides sont formés d'un glycérol lié à 3 acides gras. Les triglycérides sont des esters d'acides gras et du glycérol. Ils constituent la part importante des huiles végétales et animales. Ils constituent une réserve énergétique très importante pour plusieurs organismes vivants.



**Figure 1** : Structure d'un triglycéride

## 2. Digestion des lipides alimentaires

Les principaux lipides de l'alimentation humaine ou animale sont constitués essentiellement de triacylglycérols (triglycérides), de phospholipides et de stérols.

La digestion de ces lipides est sous la dépendance des enzymes pancréatiques et des sels biliaires.

### 2.1 Les enzymes

Les enzymes qui hydrolysent les lipides sont les lipases et les phospholipases. Leur activité se déroule dans l'intestin grêle.

L'action complète du triglycéride lipase (pancréatique) conduit à la libération de 2 acides gras et du 2-monoacylglycérol. Seuls les esters des fonctions alcool primaire du triglycéride sont hydrolysés.

Les phospholipases qui hydrolysent les phospholipides sont au nombre de 4 : A1, A2, C et D.

Les phospholipases A1 et A2 (B) libèrent respectivement les acides gras qui estérifient les fonctions alcool primaire et secondaire du glycérol. Les composés privés de ces acides gras sont appelés des lysophospholipides. La phospholipase C hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le groupement phosphate. Enfin la phospholipase D libère l'alcool qui spécifie le phospholipide.

Ces enzymes hydrolytiques agissent uniquement à l'interface eau-lipide. Elles se fixent à la surface des grosses gouttelettes de graisses. Les premiers produits de l'action des lipases et phospholipases, acides gras et lysophospholipides, servent de puissants détergents qui

accélèrent le processus en réduisant les graisses en fines gouttelettes. L'action des sels biliaires complète la mise en émulsion et la formation de micelles des triglycérides.

## 2.2 Absorption

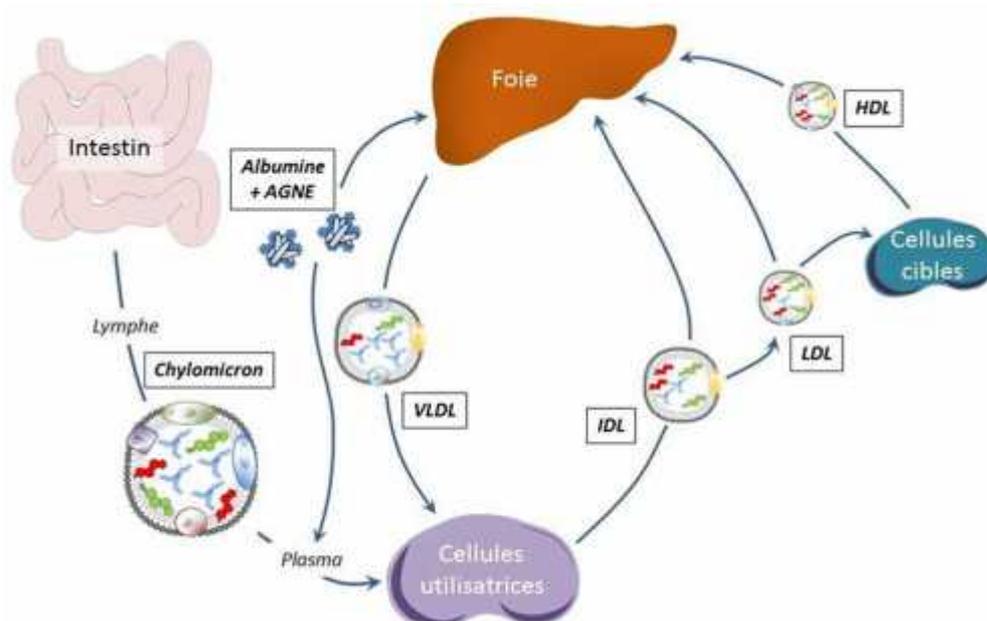
Les micelles mixtes contiennent, après l'action complète des lipases, des acides gras et des 2-mono-acylglycérols. Elles sont absorbées par les entérocytes (cellules absorbantes de l'intestin grêle). Une fois entrés dans l'entérocyte, les acides gras sont pris en charge par un transporteur spécifique qui les achemine dans le réticulum endoplasmique lisse. Ils sont rejoints par les 2 monoacylglycérols qui ont la capacité de traverser par diffusion passive.

Les acides gras et les 2-mono-acylglycérols sont recombinaés en triacylglycérols par les enzymes du réticulum endoplasmique (Hernell et al., 1990).

## 2.3 Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des formes de transport des graisses hydrophobes dans le plasma sanguin. De structure globulaire, elles sont constituées d'un cœur hydrophobe de triglycérides, entouré de protéines, d'esters de cholestérol et de phospholipides. Les lipoprotéines majeures sont :

- ✓ Les chylomicrons synthétisés dans les entérocytes (intestin) : forme de transport des triglycérides alimentaires vers les tissus utilisateurs et le tissu adipeux.
- ✓ Les VLDL (very low density lipoproteins) synthétisées dans le foie.
- ✓ Les LDL (low density lipoproteins).
- ✓ Les HDL (high density lipoproteins) synthétisés dans le sang.



**Figure2** : Destinées des lipoprotéines dans le sang

C'est sous la forme de triglycérides que les lipides sont transportés vers les tissus adipeux et sous la même forme qu'ils sont acheminés vers les tissus utilisateurs. Au niveau des capillaires, les chylomicrons et les VLDL s'attachent progressivement aux parois où une lipoprotéine lipase les débarrasse de leur triglycéride en les hydrolysant en acides gras et en 2-monoacylglycérol. Le reste protéique du chylomicron retourne dans le flux sanguin et est retiré par le foie. Les acides gras et le monoglycéride pénètrent dans les cellules adjacentes : musculaires ou adipeuses, par diffusion grâce au gradient entre les deux compartiments. Ces composés sont utilisés directement dans la -oxydation ou sont retransformés en triglycérides pour être stockés. Les VLDL sont transformés en LDL dans les tissus. Ces derniers sont abondants dans la circulation. Ils constituent une source de cholestérol exogène aux tissus. Au cours de leur déplacement dans le flux sanguin ils se fixent sur des récepteurs spécifiques localisés dans des certains sites de la membrane plasmique, appelés " vésicules recouvertes ". Lorsque la quantité de récepteurs-ligands est suffisante, la vésicule s'invagine et se ferme sur elle-même donnant un réceptosome inclus dans le cytoplasme. Ces réceptosomes sont dirigés, à travers des tubulures, vers des lysosomes avec lesquels ils fusionnent. Les enzymes du lysosome libèrent les acides gras, le cholestérol et les récepteurs protéiques qui sont hydrolysés en acides aminés. Le cholestérol est incorporé dans le réticulum endoplasmique.

Les HDL circulent sans discontinuer et contiennent une enzyme (la phosphatidylcholine: cholestérol acyltransférase) qui estérifie le cholestérol libre. Ils sont prélevés par les hépatocytes et se retrouvent dans les sels biliaires (Bruss, 2008).

### **3. Mobilisation des triglycérides de réserve**

Les triglycérides de réserve constituent une source d'énergie utilisable par toutes les cellules. Ils sont mobilisés en l'absence du glucose. La diète prolongée, les exercices physiques et le stress favorisent leur mobilisation. Ils sont hydrolysés par un triglycéride lipase sensible aux hormones (adrénaline, glucagon, noradrénaline, corticostéroïdes, hormones hypophysaires, etc.). Leur hydrolyse dans les adipocytes fournit des acides gras et des 2-monoacylglycérol. Ce dernier est hydrolysé dans les cellules par une lipase intracellulaire non sensible aux hormones.

## **II. -oxydation des acides gras**

### **1. Introduction**

Les acides gras et les glucides jouent un rôle très important comme substances énergétiques aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Les cellules peuvent en accumuler de très grandes quantités sous forme de triglycérides.

Chez les vertébrés les lipides fournissent environ 40% de l'énergie lorsqu'ils sont soumis à un régime normal. Chez les animaux au jeûne ou en hibernation et les oiseaux migrateurs, ils constituent la seule source d'énergie. Les triglycérides représentent des formes de mise en réserve de l'énergie hautement concentrée. Ceci est lié au fait qu'ils sont mis en réserve pratiquement sous forme anhydre alors que les glucides et les protéines sont liés à l'eau. Ces lipides sont essentiellement stockés dans le cytoplasme des cellules adipeuses qui sont spécialisées dans leur synthèse. Ils sont véhiculés par le sang vers les sites d'utilisation.

La séquence de réactions dans laquelle ils sont impliqués débute par une hydrolyse enzymatique par les lipases, puis par une dégradation préparatoire appelée  $\beta$ -oxydation, avec transformation des acides gras en acétyl-CoA qui alimente ensuite le cycle tricarboxylique. Pour être oxydés les acides gras à longue chaîne (nombre de carbones supérieur à 10) doivent d'abord être activés. Dans la mitochondrie l'acyle est transféré sur le coenzyme A dans l'espace intermembranaire, puis transporté dans la matrice par la navette acylcarnitine à travers la membrane mitochondriale interne. Les acides gras à courte chaîne peuvent être transportés directement dans la matrice mitochondriale pour y être activés (Bruss, 2008).

La -oxydation consiste en l'élimination séquentielle d'unité à 2 carbones de la chaîne acylée. Elle est cytosolique chez les procaryotes et mitochondriale chez les eucaryotes.

### **2. Hydrolyse des triglycérides**

L'utilisation des triglycérides comme source d'énergie débute par une hydrolyse par les lipases qui libèrent le glycérol et les acides gras. Elle se fait en deux étapes :

La première activité hydrolytique, catalysée par le triglycéride lipase, libère un 2-monoacylglycérol et 2 acides gras. Elle est régulée par des hormones comme l'adrénaline, la noradrénaline, le glucagon et l'hormone corticotrope. On obtient :



- La deuxième activité lipase, intracellulaire et indépendante des hormones, libère le dernier acide gras et le glycérol.

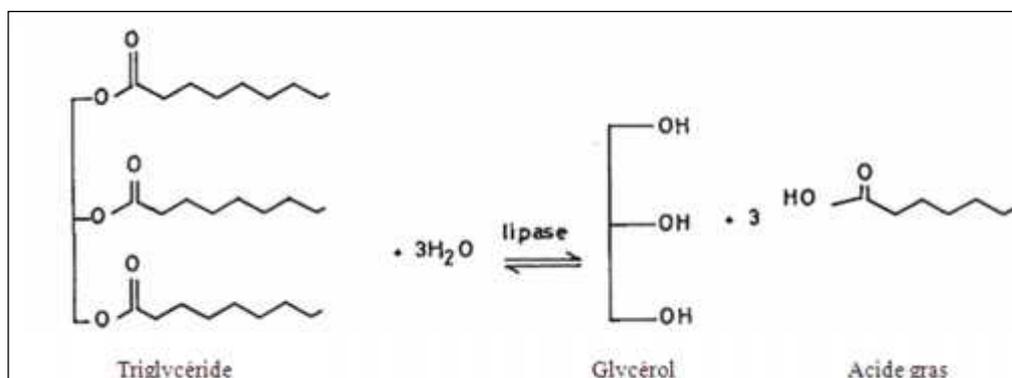


## Chapitre2 : Les lipases

### 1. Définition

Encore appelées les triacylglycérol acylhydrolases ou lipases, ce sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. Elles font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques. Elles sont largement présentes chez les plantes et chez les animaux ainsi que chez les microorganismes. Elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol (Reis et al., 2009).

L'hydrolyse des liaisons esters formées par des acides gras et du glycérol est catalysée par les lipases, à l'interface eau - lipide. Elles sont également capables de catalyser la réaction réversible de synthèse et échangeuse de groupes d'esters et résolution de mélange racémique en alcools et acides optiquement actives, dans le milieu eau /solvant organique immiscible (**Figure 2**). Des lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques.



**Figure 3 :** Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse des triglycérides

## 2. Origine des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires.

### Lipases végétales

On les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (*oil bodies*). Sous l'action de lipase ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante (Fickers et al., 2008).

### Lipases de mammifères

Pour les mammifères la lipase est une source énergétique essentielle et avantageuse de par leur faible densité. Chez l'homme, aussi chez d'autres vertébrés, les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. Ces enzymes peuvent être classées en trois groupes.

Groupe 1 : les lipases associées à la digestion (les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique)

Groupe 2 : lipases présentes dans (le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux)

Groupe 3 : lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel.

En effet, les lipases jouent un rôle important dans la digestion chez le nouveau-né dont l'alimentation est riche en lipides (Fickers et al., 2008).

### Lipases microbiennes

Le volume des ventes mondiales estimées pour les enzymes industrielles s'accroît au cours de ces dernières années, 75 % de ces enzymes sont des hydrolases, ainsi que 90 % d'entre eux sont produites à partir des micro-organismes par fermentation. Suivant les protéases et les carbohydrases, lipases sont considérées comme le troisième plus grand groupe basé sur le volume total des ventes (Jaeger et al., 1997).

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram<sup>+</sup> telles que celles de genres *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries Gram<sup>-</sup> telles que *Pseudomonas*. Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum*

ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces* (Fickers et al., 2008).

En effet, les lipases microbiennes ont des avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples par rapport aux lipases d'origine animal et d'autre part, d'avoir 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 abouti à de nombreux produits commerciaux (Jaeger et Eggert, 2002).

### 3. Séquence, structure et mécanisme réactionnel

C'est au début des années 1980 que les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées au point de vue biochimique (Sexena R et al., 2003). Les lipases sont des enzymes très variables de par leurs origines et leurs spécificités de substrats. Les plus petites ont des masses moléculaires de 20-25 KD a tandis que les plus grosses ont des masses moléculaires de 60-65 KD. Les premières structures cristallographiques publiées ont été celles de lipases du champignon filamenteux *Rhizomucor miehei* et de lipase pancréatique humaine.

#### 3.1 / hydrolases

Le repliement / est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases mais également l'acétylcholine estérase, la carboxypeptidase, la diènelactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase. Ces enzymes ont tous en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins connectés par 6 hélices formant un repliement dit / (Dijkstra et al., 1992). Autour de ce domaine central, viennent se greffer diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme ainsi que de sa spécificité de substrat. 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 Ser-Asp/Glu-His. De plus, la sérine catalytique est généralement incluse dans le pentapeptide Gly-X1-Ser-X2-Gly où X1 et X2 représentent un acide aminé variable. Ce pentapeptide 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 5e brin et immédiatement suivi d'une hélice (Figure 3).

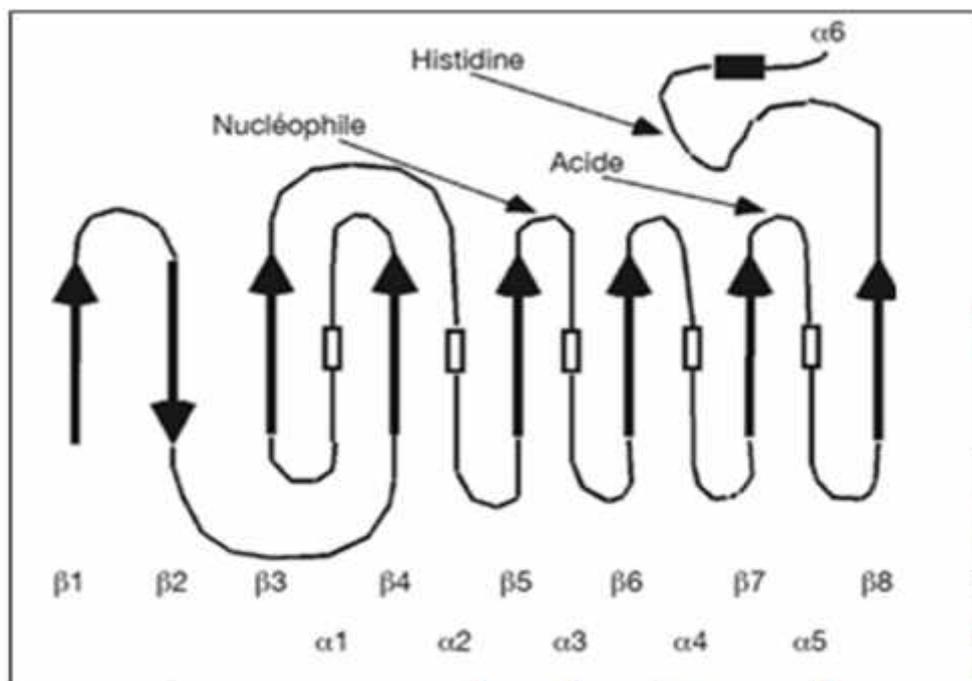
L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxy-terminale du dernier brin du feuillet constituant le repliement / tandis que l'acide carboxylique est généralement

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 (Dodson et al., 1992 ; Canaan et al., 1999).

### 3.2 Mécanisme enzymatique d'hydrolyse

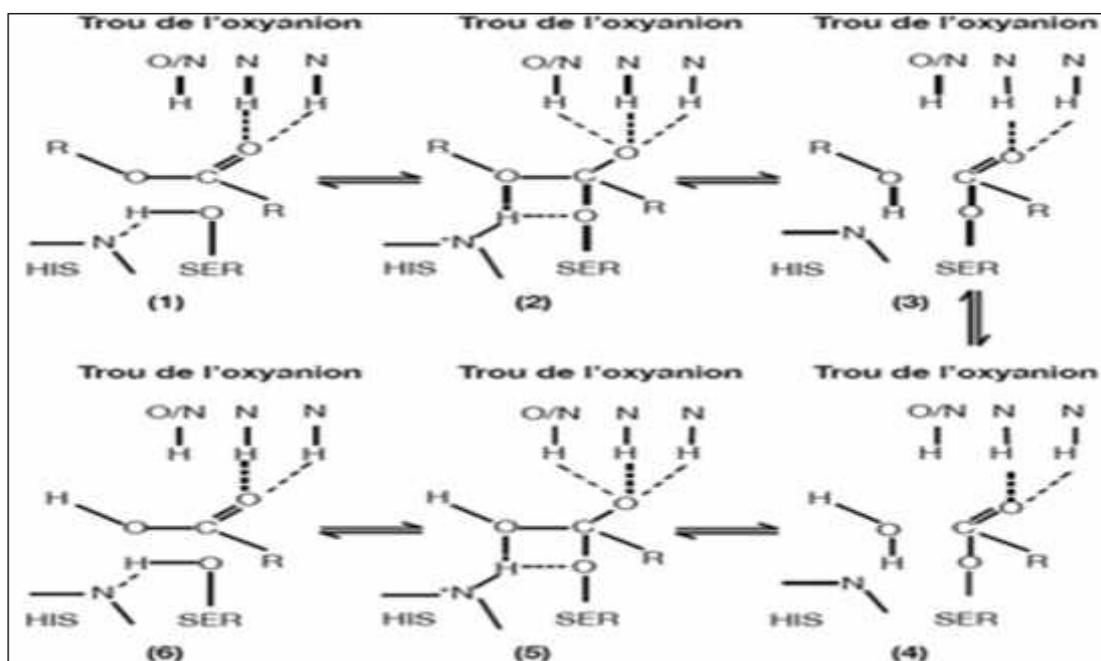
Le mécanisme enzymatique des lipases montre quelques similitudes avec celui des protéases à sérine active. Contrairement aux autres hydrolases, le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice amphiphile d'une quinzaine d'acides aminés qui agit comme un volet (lid) (Dijkstra et al., 1992 ; Davranov et al., 1997) (Figure 3). Lorsque cette hélice recouvre le site actif, l'enzyme est dans sa forme fermée ou inactive. Dans cette conformation, la face hydrophobe de cette hélice amphiphile est en interaction avec des résidus hydrophobes entourant le site actif tandis que sa face hydrophile interagit avec des molécules d'eau. Le substrat ne peut donc pas être en interaction avec la triade catalytique.

Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme et suite au mécanisme d'activation interfaciale, il y a un déplacement de l'hélice constituant le volet. La face hydrophobe de l'hélice orientée auparavant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau / corps gras. Le site actif de l'enzyme est dès lors accessible au substrat.



**Figure 4** : Schéma du repliement / . Les flèches représentent les feuillets et les rectangles les hélices . le rectangle noir représentent le volet amphiphile

L'hydrolyse d'un ester carboxylique par la triade catalytique peut se décomposer en six grandes étapes (Figure 4). Tout d'abord, le carbone de la fonction carboxylique du substrat subit une attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine dont le caractère nucléophile est augmenté par le résidu histidine suite à la formation d'une liaison hydrogène. L'anneau imidazole de l'histidine devient alors protoné et chargé positivement. Cette charge positive est stabilisée par une charge d'un résidu acide (Asp ou Glu) (1). Il en résulte la formation d'un premier intermédiaire tétraédrique, stabilisé par deux liaisons hydrogènes avec des résidus du trou de l'oxyanion (2). Par la suite, il y a libération d'une molécule d'alcool, formation de l'acyl-enzyme (3) et attaque nucléophile de l'acyl-enzyme par une molécule d'eau (4). Cette seconde attaque nucléophile aboutit à la formation d'un second intermédiaire tétraédrique, stabilisé par le trou de l'oxyanion (5). Finalement, il y a libération de l'acide gras et retour de l'enzyme dans sa conformation initiale (6) (Jaeger et Reetz, 1998 ; Fickers et al., 2008).

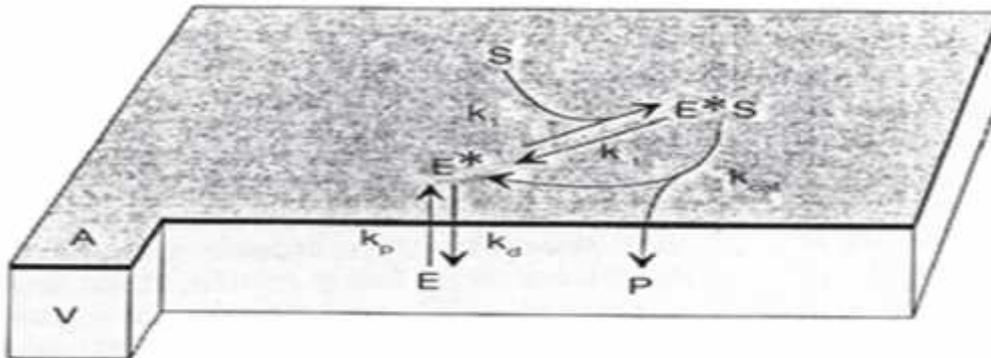


**Figure 5 :** Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester

### 3.3 Cinétique d'hydrolyse

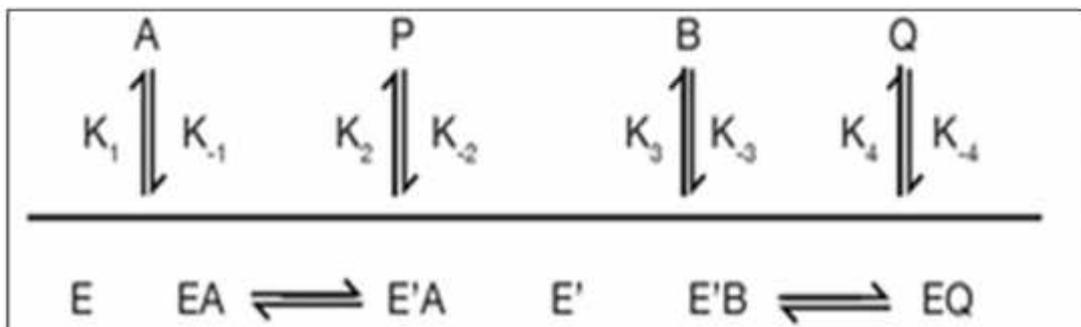
Il été déjà mentionné que les lipases agissent sur des composés insolubles en phase aqueuse et que la réaction se déroulait à l'interface eau / corps gras. De ces propriétés atypiques résulte une cinétique d'hydrolyse particulière. La première étape consiste en

l'adsorption de l'enzyme à l'interface eau / huile. La réaction se déroulant dans un système biphasique, la vitesse d'hydrolyse dépend non seulement de la quantité de substrat présent dans le milieu mais également de l'aire interfaciale. Cette adsorption provoquant l'activation de l'enzyme par déplacement de l'hélice amphiphile recouvrant son site actif. La seconde consiste en la formation d'un complexe enzyme / substrat qui, après hydrolyse, conduit aux produits de la réaction (**Figure5**) (Verger , 1985 ; Reis et al., 2009).



**Figure 6:** Représentation schématique du mécanisme d'activation interfacial de lipases

Le mécanisme décrivant le mieux les cinétiques des réactions catalysées par les lipases est un mécanisme de type Ping-Pong Bi-Bi (Jaeger et al., 1994 ; Reis et al., 2009). Dans ce mécanisme, il y a dans un premier temps fixation du substrat A sur l'enzyme pour former le complexe EA avec libération du premier produit. Le second substrat nucléophile B se fixe sur le complexe acyl-enzyme E' pour aboutir au complexe E'B. Ce dernier subit un réarrangement pour libérer le second produit Q et l'enzyme E régénéré (Figure 6).



**Figure 7 :** Représentation schématique du mécanisme catalytique des lipases

#### **4. Propriétés physico-chimiques des lipases**

Les lipases bactériennes ont en général un pH optimum neutre ou légèrement alcalin (8-8,5) (Sharma et al., 2001) tandis que les lipases d'origine fongique ont un pH optimum neutre ou légèrement acide. Cependant, il existe des lipases conservant une bonne activité à des pH plus extrêmes.

D'autre part, certaines lipases sont stables et actives dans une large gamme de valeurs de pH. La lipase de *Pseudomonas cepacia* conserve 100 % de son activité après incubation durant 24 h à 30 °C pour une gamme de pH variant de 3 à 11 (Jaeger et al. 1994).

La température optimale des lipases est souvent comprise entre 30 et 40 °C. En général, les lipases d'origine végétale ou animale sont peu thermostables contrairement aux lipases microbiennes.

#### **5. Applications industrielles**

Les lipases microbiennes sont souvent perçues comme une des plus importantes et des plus intéressantes classes d'enzymes pour le monde industriel. Cet intérêt provient principalement du fait d'une part, que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypiques et que d'autre part, les technologies à mettre en œuvre pour les produire sont relativement simples. La plupart des lipases microbiennes sont stables dans de nombreux solvants organiques et ne requièrent pas de cofacteur pour être actives. On peut les utiliser en tant qu'hydrolase ou comme catalyseur en synthèse organique. Elles présentent une large gamme de spécificité de substrat et une grande énantiosélectivité. Leurs domaines d'applications sont donc très vastes et variés.

##### **5.1 Hydrolases**

Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie, dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Ils sont également utilisés en industrie des détergents, en tannerie, et en bioremédiation.

###### **➤ 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. 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). 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'interestérification 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).

#### ➤ **Détergents**

L'addition des lipases hydrolytiques aux détergents, constitue le domaine commercial le plus important. Ces détergents sont utilisés principalement dans le ménage et la lessive industrielle et dans le lave-vaisselle. Le pouvoir nettoyant des détergents semble atteint son sommet, tous les détergents contiennent des ingrédients similaires et sont fondés sur les mêmes mécanismes de détergence. Pour améliorer la détergence, ils ajoutent aux détergents soient en poudre ou ceux utilisés dans le lave vaisselle des enzymes tels que la protéase, amylase, cellulase et la lipase.

Les enzymes peuvent réduire la charge environnementale des détergents, car elles économisent l'énergie en permettant un lavage à des températures de plus en plus faible. Et permettent en plus de réduire les produits chimiques en résidus non nocifs, qui ont un impact non négatif sur le processus de traitements des eaux usées, et sur la vie aquatique. D'autres enzymes sont actuellement utilisés dans les produits de nettoyage domestiques. Un grand nombre de recherche est actuellement en cours dans le développement des lipases qui sont actives contre les graisses en conditions alcalins ( Jaeger et Reetz ,1998 ; Fickers et al., 2008).

#### ➤ **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 (Jaeger et al., 1994).

#### ➤ **Bioremédiation**

Les lipases sont également utilisées en environnement et en bioremédiation. Les effluents des industries agro-alimentaires sont souvent riches en lipides et en graisses, ce qui peut

entraîner le colmatage des canalisations. 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 (Hasan et al., 2006).

## 5.2 Synthèse organique

Les lipases sont des catalyseurs très largement utilisés en synthèse organique, principalement en raison de leur stabilité et de leur activité en milieu solvant. De plus, elles présentent une grande chimiosélectivité, régiosélectivité et stéréosélectivité. Dans ce domaine, la plupart des lipases utilisées sont d'origine microbienne.

### ➤ Industrie cosmétique

Dans l'industrie des cosmétiques et de la parfumerie, les lipases sont utilisées dans la synthèse d'arômes soit par réactions de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7-octadien-1-ol qui présente 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'arômes. 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 (Jaeger et Eggert, 2002).

Les esters d'acides gras et de sucres sont des substances amphiphiles pouvant être utilisées comme surfactant non-ionique. Ils présentent les avantages d'être biodégradables, peu toxiques et non allergènes. Leur synthèse par voie enzymatique est une alternative pour la production de molécules intervenant dans la formulation de produits agro-alimentaires, cosmétiques ou détergents. Ducret et collaborateurs ont ainsi mis en évidence les propriétés tensio-actives d'ester de sorbitol et de glucose synthétisés en présence de la lipase de *C. antarctica* à partir des sucres correspondants, d'acides laurique, caprylique et oléique. D'autre part, Blecker ainsi que Moreau ont étudié la synthèse et les propriétés tensioactives d'esters d'acide gras de longueur de chaînes différentes (Hasan et al., 2006).

### ➤ Industrie pharmaceutique

Les lipases sont largement mises en œuvre dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse de médicaments ou dans la préparation d'intermédiaire homochiral optiquement actif. C'est le cas de la nikkomycin-B, des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, de certains agents anti tumoraux, 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 (R). L'utilisation de la lipase de *Candida cylindracea* permet, par une réaction de

transestérification en milieu iso-octane, de résoudre le mélange racémique et d'enrichir le milieu réactionnel en isomère (S) (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-phénylglycidic ester acide qui est une clé intermédiaire dans la synthèse d'hydrochloride du diltiazem, un vasodilatateur coronaire largement utilisé, a été emportée avec *S. marcescens* (Hasan et al., 2006).

Tableau 1: lipases commercialement disponibles, et leurs applications industrielles (Gupta, 2004)

Commercial lipase	Source	Supplier	Application	References
Lumafast	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Genencor International, USA	Detergent	Jaeger et al. 1994; Jaeger and Reetz 1998
Lipomax	<i>P. alcaligenes</i>	Gist-Brocades, The Netherlands; Genencor International, USA	Detergent	Jaeger et al. 1994; Jaeger and Reetz 1998
n.s.	<i>P. glaucae</i>	Unilever, The Netherlands	Detergent	Jaeger et al. 1994
n.s.	<i>Bacillus pumilus</i>	Solvay, Belgium	Detergent	Jaeger et al. 1994
Chiro CLEC-PC, Chirazyme L-1	<i>P. cepacia</i>	Altus Biologics, Mannheim	Organic synthesis	Jaeger and Reetz 1998
Amano P, P-30, PS, LPL-80, LPL-200S	<i>P. cepacia</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Organic synthesis	Jaeger and Reetz 1998
Lipase AH	<i>P. cepacia</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Organic synthesis	Jaeger and Reetz 1998
Lipase AK, YS	<i>P. fluorescens</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Organic synthesis	Jaeger and Reetz 1998
Lipase 56P	<i>P. fluorescens</i>	Biocatalysts, UK	Biotransformations, chemicals	Godfrey and West 1996
Lipase K-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano Pharmaceuticals, Japan	Organic synthesis	Jaeger and Reetz 1998
<i>Chromobacterium viscosum</i> lipase	<i>C. viscosum</i>	Asahi Chemical Biocatalysts	Organic synthesis	Godfrey and West 1996
Lipase 50P	<i>C. viscosum</i>	Biocatalysts, UK	Biotransformations, chemicals	Godfrey and West 1996
Lipase QL	<i>Alcaligenes</i> sp.	Meito San-kyo Co., Japan	Organic synthesis	Jaeger and Reetz 1998
Lipoprotein lipase	<i>Alcaligenes</i> sp.	Meito San-kyo Co., Japan	Research	Godfrey and West 1996
Lipase PL, QL-QLL, PLC/PLG, QLC/QLG	<i>Alcaligenes</i> sp.	Meito San-kyo Co., Japan	Technical grade	Godfrey and West 1996
Alkaline lipase	<i>Achromobacter</i> sp.	Meito San-kyo Co., Japan	Research	Godfrey and West 1996
Lipase AL, ALC/ALG	<i>Achromobacter</i> sp.	Meito San-kyo Co., Japan	Technical grade	Godfrey and West 1996
Combizyme 23P (proteinase/lipase mix)	n.s.	Biocatalysts, UK	Waste treatment	Godfrey and West 1996
Combizyme 61P (proteinase/lipase mix)	n.s.	Biocatalysts, UK	Waste treatment	Godfrey and West 1996
Combizyme 209P (amylase/lipase/proteinase mix)	n.s.	Biocatalysts, UK	Waste treatment, grease disposal	Godfrey and West 1996
Greasesx (lipase)	n.s.	Novo Nordisk	Leather	Godfrey and West 1996

Dans le cadre de préparation de notre projet fin d'étude (Biotechnologie Microbienne) et sur une période de quatre mois (février-mai /2015), ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la FST de Fès.

## I. Isolement et caractérisation des isolats

### 1. Origine des souches

Un échantillon a été prélevé au niveau d'un bain de dégraissage au sein des tanneries de l'ancienne médina de Fès, dans un flacon en verre stérile.

### 2. Composition chimique des milieux de culture

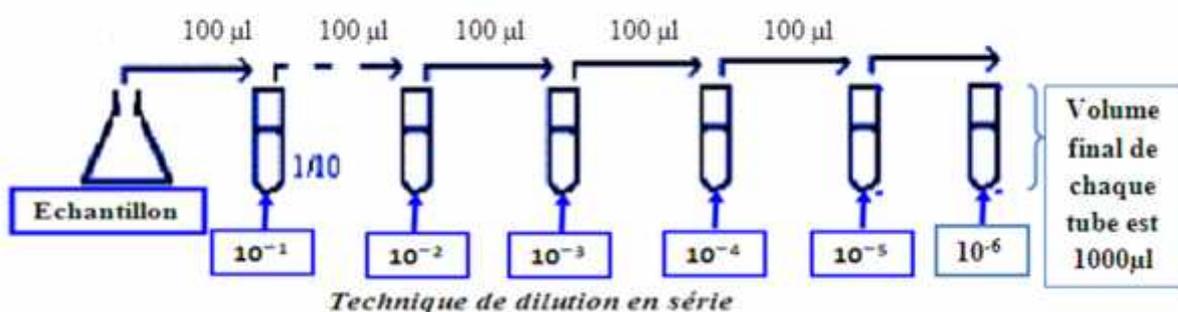
Les milieux choisis sont le milieu YPG spécifique à la croissance des levures et le milieu LB spécifique à la croissance des bactéries.

La composition de ces milieux, pour 1000ml est la suivante :

- Milieu LB : Peptone, 20g NaCl ,20g Extrait de levure ,10g Agar, 20g.
- Milieu YPG : Peptone, 20g Glucose, 20gExtrait de levure, 10g Agar ,20g.

### 3. Isolement des microorganismes

Dans un premier temps nous avons réalisé un préenrichissement : 2 ml de l'échantillon sont mis en suspension dans 50 ml du milieu LB. La culture est incubée à 37 °C pendant 24h. Ensuite une série de dilution a été réalisée jusqu'à  $10^{-6}$



**Figure 8 :** Technique de dilution en série

Un aliquote de 100 µl de chaque dilution est étalé sur une boîte de pétrie contenant les milieux LB et YPG gélosés. Les boîtesensemencés ont été incubées à 37°C dans le cas des bactéries et à 30°C dans le cas des levures pendant 24h. Après incubation, les colonies ont été repiquées sur d'autres boîtes contenant les milieux déjà cités.

#### 4. Mise en évidence de l'activité lipase

La mise en évidence de l'activité lipasique chez les différents isolats a été réalisée sur les milieux gélosés précédemment cités à base d'huile d'olive et de Rhodamine B, (1 % d'huile d'olive et 1 % de Rhodamine B).

Nous avons sélectionné 15 isolats à partir des milieux LB et YPG. Ensuite ces isolats ont été testés pour la production d'enzymes lipolytiques. Les boîtes de pétries contenant les milieux gélosés à base d'huile d'olive et de Rhodamine ont été ensemencés par les différents isolats. Les colonies donnant lieu à une coloration rose sous UV autour d'eux étaient considérées comme des productrices de lipases.

## II. Identification des isolats

### 1. Identification classique

#### a. Coloration de Gram

La coloration de Gram constitue la première étape d'identification bactérienne. Elle doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mis au point le protocole en 1884. Elle permet de différencier les micro-organismes selon la structure de leur paroi.

Le test de coloration de Gram est réalisé selon le protocole suivant :

- effectuer un frottis à partir des boîtes de pétri contenant les cultures bactériennes.
- le fixer à la chaleur.
- recouvrir de Cristal violet (colorant) pendant 1 minute, puis rincer à l'eau.
- recouvrir de lugol (mordant) pendant 1 minute, puis rincer à l'eau.
- décolorer à l'aide de l'alcool pendant 20 secondes puis rincer à l'eau.
- contre-colorer à la Fuchsine pendant 1 minute, puis rincer à l'eau.

Après séchage à l'air, les bactéries sont observées au microscope optique à l'aide d'un objectif à immersion. Une coloration rose indique que les bactéries sont Gram négatives, et une coloration violette qu'elles sont Gram positives.

#### b. Galerie Api 20E

À l'issue d'un examen microscopique (gram, et morphologie), les souches bactériennes (gram-) ayant révélé une activité lipolytiques ont été soigneusement purifiées par repiquages successifs sur gélose LB pour une éventuelle identification biochimique des espèces purifiées. Celle-ci a été menée à l'aide de galerie biochimique : Api 20E

Api 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés.

## **Principe**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

### **2. Identification moléculaire des isolats**

Les premiers efforts d'identification bactérienne, nés des expériences de Louis Pasteur en 1870, se sont fondés sur les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les méthodes traditionnelles d'identification bactérienne par la détermination de quelques caractéristiques phénotypiques et l'appréciation de quelques propriétés physiologiques ont montré leurs limites. Le gène qui code pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) a été choisi comme marqueur phylogénétique du fait de son universalité liée à son rôle clé dans la traduction de l'ARNm en protéines, de sa structure mosaïque incluant des régions conservées, variables et hypervariables, et de son abondance dans les cellules (Woese et al., 1987).

#### **a. Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN a été réalisée en soumettant les bactéries isolées à un choc thermique ce qui permet à la fois de :

- ✓ Lysér les cellules bactériennes.
- ✓ Extraire les acides nucléiques (ADN, ARN).
- ✓ Éliminer les autres constituants cellulaires par centrifugation.

## **Protocole**

A l'aide d'une anse stérile, une colonie bien isolée de chaque souche est prélevée puis mise dans un tube d'ependorff qui contient 50 µl d'EDS, ensuite les échantillons subissent les deux étapes suivantes :

- Congélation à -20 °C pendant 25 min.
- Décongélation à 90 °C pendant 5 min.

Ces deux dernières étapes sont répétées deux fois afin d'obtenir un bon rendement d'extraction. Après le choc thermique, les échantillons sont centrifugés à 7000 rpm pendant 10 min.

### b. Amplification de l'ADN

La PCR (Polymerase Chain Reaction) fut inventée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une replication in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). Pour amplifier l'ADN extrait à partir des bactéries isolées, 2 µl du surnageant sont mélangés avec le milieu réactionnel du PCR qui contient les éléments indiqués dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Les constituants du mélange utilisé pour l'amplification des bactéries

Constituants	Concentrations	Volumes (µL)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	6.6
<b>Tampon TAQ</b>	10 X	4
<b>dNTP</b>	10 mM	2
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1.2
<b>Fd1</b>	10 mM	2
<b>RS16</b>	10 mM	2
<b>TAQ enzyme</b>	5 Unité/µL	0.4
<b>ADN</b>	-	2

Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN sont les Fd1 et la RS16 qui sont des amorces universelles et dont les séquences sont les suivantes :

fD1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3')

Rs16 (5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3')

Enfin le mélange est mis dans la thermocycleur selon le programme indiqué dans le tableau3.

**Tableau 3 :** Programme de la PCR utilisé

Phase		Bactéries	
		Température	Durée
Dénaturation initiale		94°C	5 min
35 cycles	Dénaturation	94°C	30 s
	Hybridation	55°C	45 s
	Elongation	72°C	1 min 30
Elongation finale		72°C	5 min

### c. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'efficacité de la PCR est testée par électrophorèse sur gel d'agarose. C'est une technique utilisée pour séparer les macromolécules biologiques (par exemple l'ADN) en fonction de leur taille et de leur charge électrique.

L'agarose est utilisé à une concentration de 1 % (masse/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement l'ADN ou l'ARN.

Les étapes de la préparation du gel sont les suivantes :

0.5g d'agarose dans 50 ml de tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) (1 X) (Tampon de migration).

- Chauffage jusqu'à ébullition.
- Refroidissement de 45 – 50 °C.
- L'ajout de 2 µl de bromure d'éthidium (BET).
- Mélanger et couler dans une cuvette.

Après la fin de l'amplification, 2 µl du produit de PCR sont mélangés avec une solution de charge qui contient les éléments suivants :

- Le bleu de bromophénol : Il est utilisé comme marqueur coloré afin de vérifier le bon déroulement d'une électrophorèse en gel d'agarose.
- glycérol : Il est utilisé comme alourdisseur pour entraîner l'ADN au fond des puits.

Le mélange est mis dans les puits du gel, et la migration est lancée dans la cuve électrophorétique qui contient le TAE à 35 V.

### d. Séquençage des ADN amplifiés

Afin d'avoir un ADN amplifié bien pure, deux procédés de purification sont utilisés :

### Première purification

Elle se fait grâce au Kit ExoSAP-IT qui se base sur un traitement enzymatique destiné à éliminer les amorces et les dNTP qui peuvent fausser le séquençage de l'ADN bactérien qui reste intact. Ce kit contient deux enzymes ( Exonucléase I + phosphatase alcaline de crevette) qui sont activées par incubation avec l'ADN amplifié a 37 °C pendant 15 min, puis désactivées a 80 °C pendant 15 min.

### Réaction de séquençage

Les deux premières publications rapportent un séquençage datant de 1973. Il s'agissait du séquençage de l'opérateur Lac et de l'ARNm de celui-ci. Ainsi, le premier séquençage de l'ARNr 16S bactérien date de 1994. Le séquençage automatique est une adaptation de la technique de Fred Sanger où les 4 didésoxynucléotides sont marqués spécifiquement par un fluorophore (méthode dite des dyes Terminator). Lors de la migration électrophorétique, les fragments d'ADN possédant en leur extrémité une molécule fluorescente sont détectés par un système optique (une caméra CCD) et le signal est traité informatiquement pour construire un électrophérogramme. Ces fichiers ou «Sample Files » sont interprétables par le logiciel « Sequencing Analysis v1.3 ».

Après avoir préparé le mélange, le séquençage de l'ADN bactérien est lancé selon le programme suivant :

- ✓ Dénaturation initiale : 96 °C pendant 1 min
- ✓ 25 cycles :
  - Denaturation : 96 °C pendant 10s
  - Hybridation : 50 °C pendant 5s
  - Elongation : 60 °C pendant 4 min
- ✓ Elongation finale : 72 °C pendant 7 min

**Tableau 4** : Réactifs utilisés dans la réaction de séquençage

Réactifs	Volumes (µl)
<b>Produit PCR purifié</b>	10
<b>FD1 (10µM) ou RS16 (10µM)</b>	0,3
<b>Kit de séquençage BigDye</b>	2
<b>H2O ultrapure</b>	7,7
<b>Volume final</b>	20

Après avoir préparé le mélange, le séquençage de l'ADN bactérien est lancé selon le programme suivant :

- ✓ Dénaturation initiale : 96°C pendant 1 min
- ✓ 25 cycles :
  - Denaturation : 96°C pendant 10s
  - Hybridation : 50°C pendant 5s
  - Elongation : 60°C pendant 4 min
- ✓ Elongation finale : 72°C pendant 7 min

### **Deuxième purification**

Elle se fait en utilisant le kit de purification BigDye X Terminator. 45 µl de la solution SAM et 10 µl de la solution BigDye X Terminator sont ajoutés au 10 µl de chaque échantillon, ensuite, ils sont mélangés sous l'agitation pendant 30 min. Le mélange est centrifugé pendant 2 min à 1000 rpm, et 10 µl du surnageant est récupéré puis mis dans la plaque de séquenceur.

## **III. Caractéristiques biochimiques des lipases**

### **1. Méthode du suivi de la production des lipases**

Dans un premier temps une culture bactérienne a été inoculée dans 50 ml du milieu LB et contenu dans des erlenmeyers de 250 ml. Puis ils ont été incubés à 37°C sous agitation.

Les acides gras libérés ont été déterminés par spectrophotométrie selon Kwon et Rhee (1986) en utilisant l'huile d'olive comme substrat. Un mélange a été préparé contenant 2,5 ml d'huile d'olive ; 2,5 ml du tampon phosphate pH 7,0 ; 20 µl de CaCl<sub>2</sub> (10 mM) et 1 ml (le du surnageant). Le mélange a été par la suite incubé sous agitation (200 rpm) pendant 5 min à 60 °C. Après incubation la réaction a été stoppée en ajoutant 1 ml de HCl (6 M). Le mélange a été par la suite incubé sous agitation pendant 5 min puis additionné 5 ml du chloroforme. Le mélange a été transféré dans un tube à essai et bien agité. La couche supérieure contenant les acides gras libre a été récupérée pour la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 715 nm, et la courbe d'étalonnage a été tracée à l'aide de l'acide oléique. La mesure de la DO (densité optique) a été suivie toutes les 6 heures pendant une période de 72 heures. Une unité (U internationale) d'activité est définie comme 1 µmole d'acide gras libéré par minute par ml à 60 °C Kwon et Rhee (1986).

## **2. Méthode du suivi de la croissance bactérienne**

L'étude de la croissance des souches bactériennes isolées a été réalisée dans le but de quantifier la production de lipases en fonction des différentes phases de croissance. La courbe de croissance a été déterminée en mesurant la DO des cellules à une longueur d'onde de 600 nm en fonction du temps.

La mesure de la DO a été suivie toutes les 6 heures pendant une période de 72 heures.

## **3. Effet de l'huile d'olive sur la production des lipases**

Pour la production de lipases, le choix d'un milieu de fermentation approprié est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. Les bactéries isolées ont ainsi été cultivées dans un milieu minéral.

- Le milieu de production est composé de :50 ml milieu LB ; 0,15 g de glucose ; 0,05 g d'extrait de viande et 1 ml d'huile d'olive.
- L'effet de l'huile sur la production des lipase a été déterminé en incubant la suspension bactérienne en présence d'huile d'olive 1% sous agitation à 37 °C pendant 48 heures, la mesure de l'activité a été assurée par la méthode de Kwon & Rhee (1986) .

## **4. Effet des ions métalliques sur l'activité lipasique**

Des différentes concentrations de (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>) ont été préparées allant de 2 à 10mM, leurs effets sur l'activité lipase a été étudié en incubant la suspension bactérienne à 37 °C pendant 48h sous agitation .Ensuite la mesure de l'activité est réalisée selon la méthode de Kwon et Rhee (1986) à une température de 60 °C.

## **5. Effet de la température et du pH sur l'activité des lipases**

L'effet de la température et du pH sur la activité lipasique a été déterminé par la méthode spectrophotométrique (Kwont et Rhee ,1986), après une incubation de la suspension bactérienne pendant 48 heures, sous agitation et à 37 °C.

- L'effet de la température (de 30 à 90 °C) sur l'activité lipase est déterminé après incubation de l'enzyme et de son substrat (huile d'olive) pendant 5min, en présence de 10mM de ZnSO<sub>4</sub> comme catalyseur.
- L'effet du pH sur l'activité est déterminée à des valeurs de pH variées allant de 5 à 10 en présence de 10 mM ZnSO<sub>4</sub> et à une température de 50 °C.

## **6. Effet de la température et du pH sur la stabilité des lipases**

La stabilité des lipases en fonction de la température a été mesurée en incubant le surnageant à différentes températures variantes de 30 à 90 °C pendant 1 heure. Ensuite la mesure de l'activité est réalisée selon la méthode de Kwon et Rhee (1986) à une température de 50 °C.

L'effet du pH sur l'activité est déterminé à des valeurs de pH variées allant de 3 à 10, en utilisant différents tampons à des concentrations de 50mM, et à une température de 50 °C.

Tampon acétate de sodium (pH 5), tampon acétate de sodium (pH 6), tampon phosphate (pH 7), tampon tris HCl (pH 8), tampon tris HCl (pH9), tampon glycine NaOH (pH 10).

## I. Isolement et caractérisation des isolats

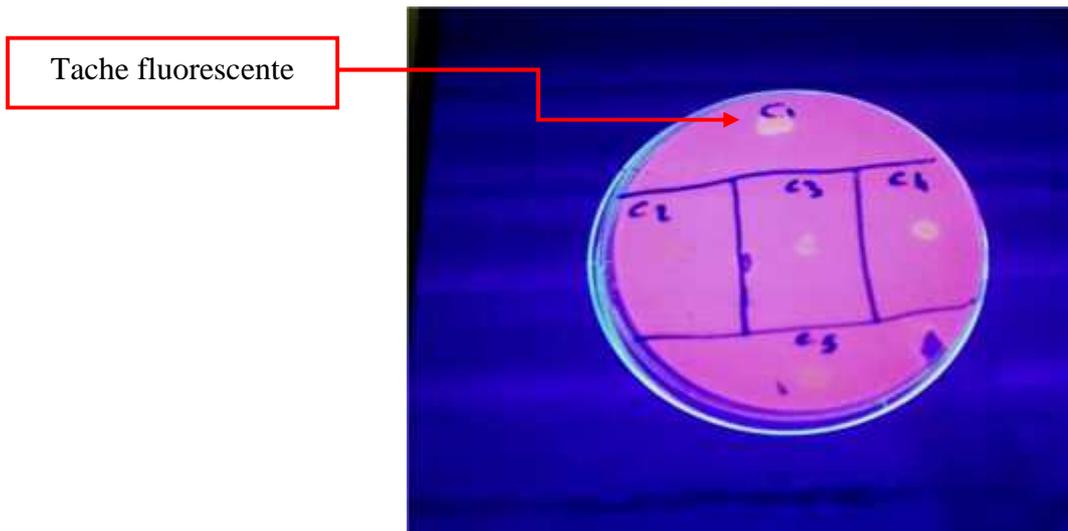
### 1. Isolement des microorganismes

Après 24 h d'incubation, 15 isolats microbiennes ont été isolés et dont 13 bactéries et 2 champignons. Les critères morphologiques des colonies sont différents.

### 2. Mise en évidence de l'activité lipase

Les différents isolats obtenus ont été testés pour la production de l'enzyme lipase par la Rhodamine B. Dix isolat ont présenté une fluorescence sur le milieu de révélation dont deux nommées C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> ont été sélectionné pour la suite du travail.

La figure (8) montre la fluorescence émise par les différentes souches en présence de la Rhodamine B visualisée sous la plaque UV, ce qui explique l'hydrolyse enzymatique des lipides.



**Figure 9:** Visualisation sous UV de la fluorescence émise par les différents isolats en présence de la rhodamine

## II. Identification des souches sélectionnées

### 1. Identification classique

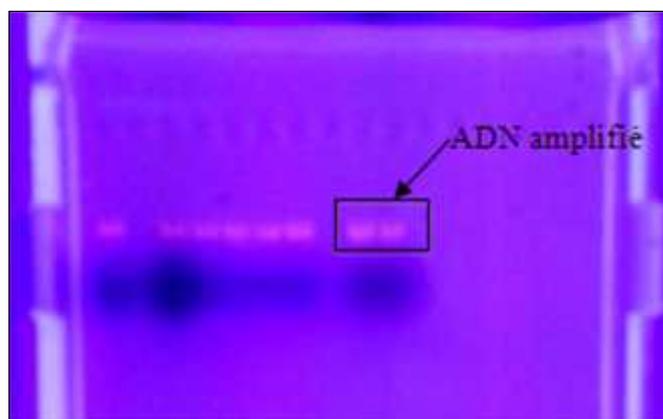
Les résultats de l'identification classique des deux isolats C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> montrent qu'ils s'agissent d'un bacille gram négatif. L'identification des isolats à l'aide de la Galerie Api 20 E se fait à partir du profil numérique. Ces résultats nous permettent de suspecter que:

Taxon(C1)	probabilité
<i>Proteus vulgaris</i> group	1.0000

Taxon(C2)	probabilité
<i>Brukholderia cepacia</i>	0.3673
<i>Aeromonas hydrophila gr.1</i>	0.3612
<i>Aeromonas hydrophila gr.2</i>	0.2268
<i>vibrio fluvialis</i>	0.0230
<i>serratia rubidaea</i>	0.0211

## 2. Identification moléculaire

Le résultat de l'amplification de l'ADN a été visualisé sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose 1% est montré dans la (Figure9).



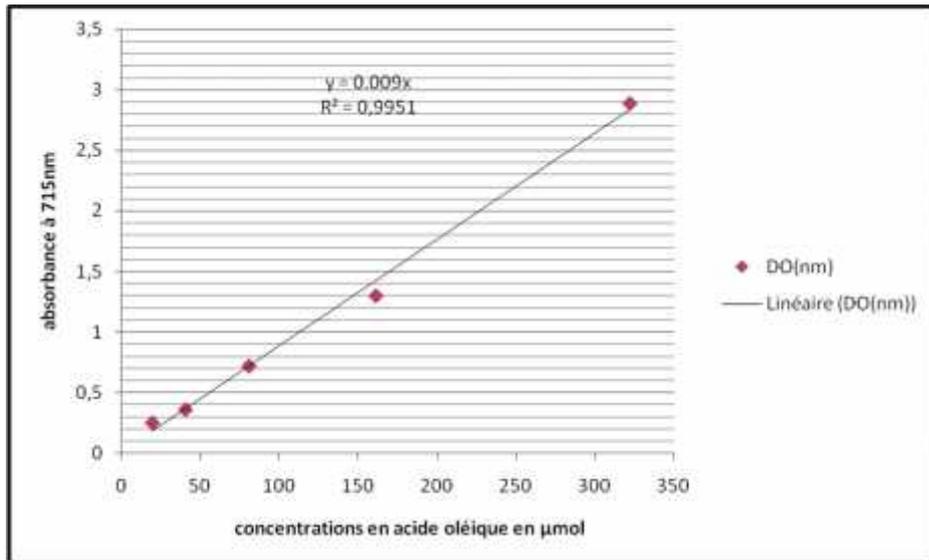
**Figure 10:** Profil de migration électrophorétique du produit d'amplification des séquences d'ADN 16S

D'après la figure (9) les deux bandes sélectionnées correspondent à l'ADN des deux isolats (C1 et C2) qui ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces (FD1 et RS16) après leur extraction par choc thermique à partir des isolats bactériens.

## III. Caractéristiques biochimiques des lipases

L'acide oléique représente l'acide gras dominant (70%) des triglycérides qui entre dans la composition de l'huile d'olive. La courbe d'étalonnage a été tracée à l'aide de l'acide oléique pour une mesure de l'absorbance de l'acide oléique à 715 nm comme acide gras libre qui dérive de l'activité lipolytique de l'huile d'olive et par conséquent, les valeurs d'activité enzymatiques exprimée en U/ml grâce à la relation :

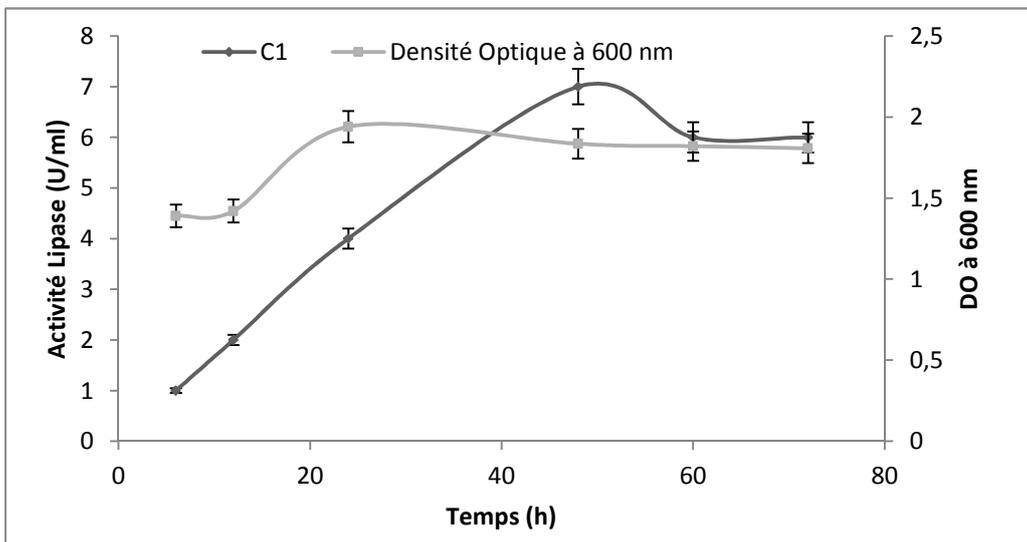
Une unité (U internationale) d'activité est définie comme 1µmole d'acide gras libéré par minute par ml



**Figure11** : Gamme d'étalonnage de l'acide oléique

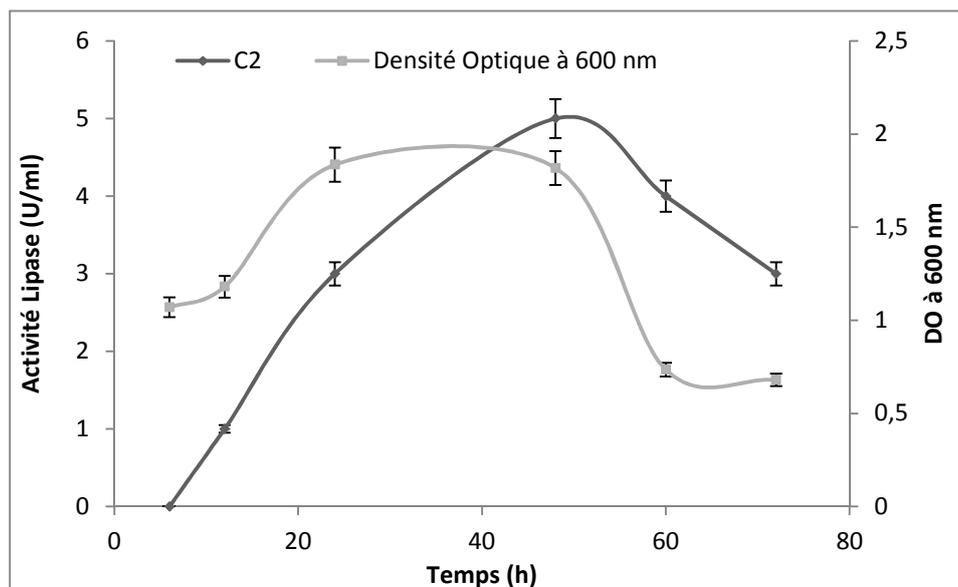
### 1. Cinétique de production des lipases et détermination de la courbe de croissance des deux isolats sélectionnés

D'après la figure (10), nous remarquons que l'activité lipasique augmente progressivement de 1U/ml au bout de 6h à 4U/ml au bout de 24h, pour atteindre un maximum de 7 U/ml après 48h d'incubation, ensuite on remarque une chute de l'activité à une valeur de 6 U/ml.



**Figure12:** Cinétique de production des lipases et de croissance de la souche C1

En outre la figure (11) montre que l'activité lipasique augmente progressivement de 0U/ml au bout de 6h à 3U/ml au bout de 24h, pour atteindre un maximum de 5 U/ml après 48h d'incubation, après on remarque une chute de l'activité à une valeur de 3 U/ml.



**Figure13:** Cinétique de production des lipases et de croissance de la souche C2

Une hypothèse peut être proposée pour expliquer ces différentes valeurs d'activités en fonction du temps. Nous supposons que l'activité des lipases varie en fonction des phases de croissance de la souche productrice. Pour répondre à cette hypothèse, une courbe de croissance de la bactérie est déterminée grâce à la mesure de la DO à 600 nm en fonction du temps.

D'après les résultats obtenus nous remarquons que, au cours de la phase exponentielle allant de 6 h à 24 h, l'activité lipase augmente progressivement en parallèle avec la biomasse et atteint son maximum d'activité à la fin de la phase stationnaire.

On peut dire que la production des enzymes (lipases) qui sont des métabolites secondaires se fait progressivement au cours de la croissance mais n'atteint son maximum qu'à la phase stationnaire de la croissance bactérienne.

En contradiction avec nos résultats, la production maximale de lipase de *Bacillus pumilus* a été obtenue après 48 h d'incubation. Cette production atteint son maximum (15 U/ml) au début de la phase de croissance. La production de la lipase de *Bacillus pumilus* n'a pas été induite par la présence d'huile d'olive ou des esters (Tween-20) (Laachari et al., 2015).

## 2. Effet de l'huile d'olive sur la production des lipases

L'effet de l'huile d'olive sur l'activité a été évalué, en incubant 1 % d'huile d'olive avec la culture à 37 °C sous agitation.

L'activité atteint une valeur de 5 U/ml au bout de 24 h dans le cas de la souche C<sub>1</sub>, à la différence de celle en absence de l'huile d'olive qui atteint 4 U/ml au bout de 24 h. D'autre part, dans le cas de la souche C<sub>2</sub> l'activité atteint la même valeur de 3 U/ml au bout de 24 h en présence et en absence d'huile d'olive. Il semble également que l'utilisation d'huile d'olive comme source de carbone à une concentration 1 % n'induit pas l'activité lipolytique et évidemment la production des lipases. Ainsi, l'activité lipasique exprimée de manière constitutive dans le cas des deux souches

### 3. Effet des ions métalliques sur l'activité lipasique

Les ions métalliques et les sels jouent un rôle important dans l'activité catalytique des enzymes. Ces ions sont liés à des sites de liaison spécifiques à la surface des molécules et ils ont un rôle structurel (Mendes et al., 2012).

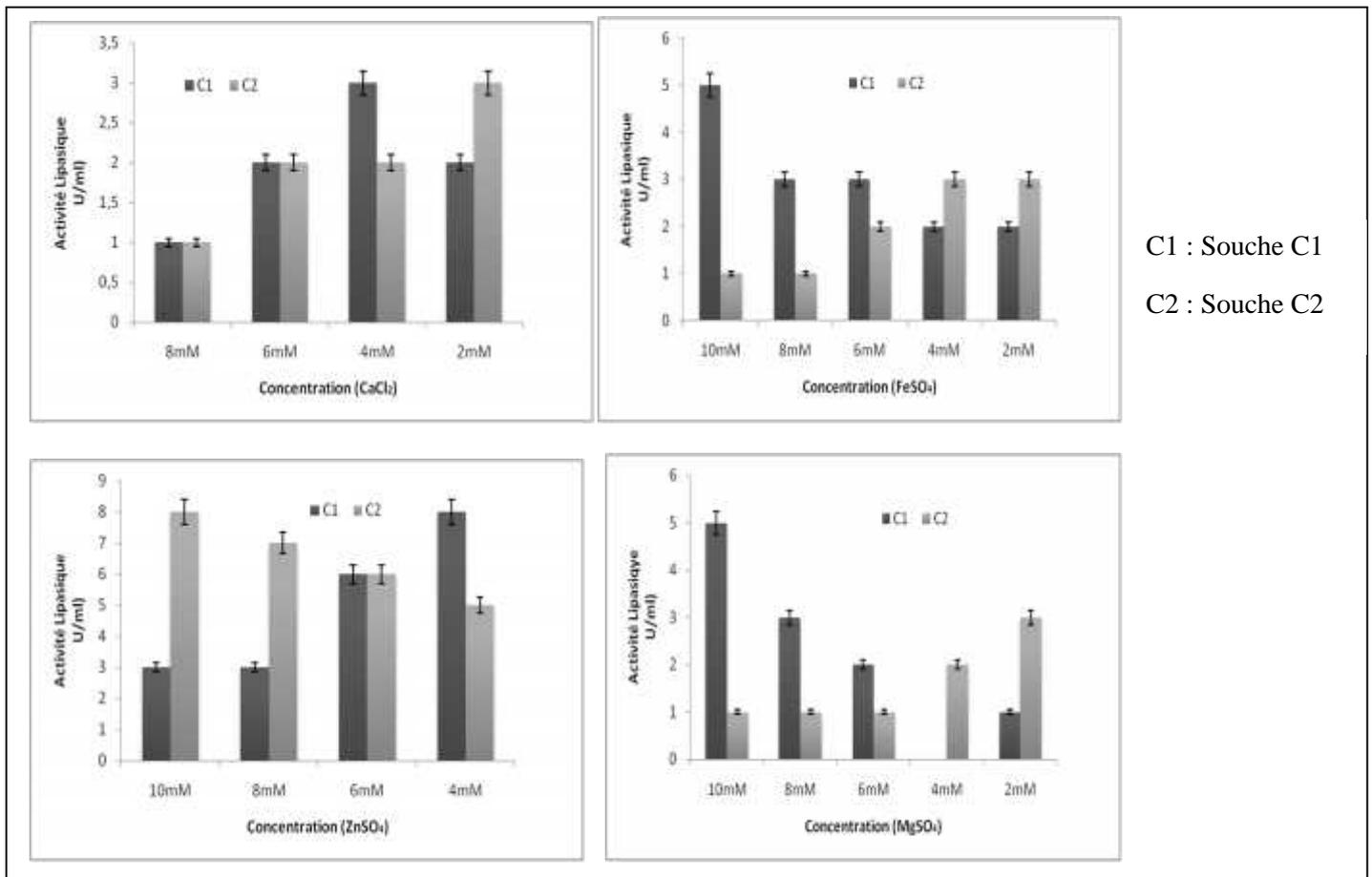
Les cofacteurs ne sont généralement pas nécessaires pour l'activité de la lipase, mais les cations divalents tels que le calcium stimulent souvent l'activité enzymatique. Ceci est dû à la formation des sels de calcium d'acides gras à longue chaîne (Gupta, 2004).

Des différentes concentrations de (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> et FeSO<sub>4</sub>) ont été utilisées pour déterminer l'activité lipase (figure 12).

D'après les résultats présentés dans la figure (12), nous remarquons que les ions (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> et FeSO<sub>4</sub>) présentent un effet stimulant en augmentant significativement l'activité lipasique des deux souches. Dans le cas de la souche C<sub>1</sub> (*proteus vulgaris*) l'activité lipasique atteint son maximum (8 U/ml) en présence de 4 mM de ZnSO<sub>4</sub> et l'activité lipasique de la souche C<sub>2</sub> atteint son maximum (8 U/ml) en présence de 10 mM ZnSO<sub>4</sub>. D'autre part la présence des ions MgSO<sub>4</sub> et FeSO<sub>4</sub> à une concentration de 10 mM donne un maximum d'activité avec une valeur de 8 U/ml dans le cas de la souche C<sub>1</sub> et la présence des ions CaCl<sub>2</sub> donne un maximum d'activité 3 U/ml en présence d'une concentration de 4mM dans le cas de la souche C<sub>1</sub> et une concentration de 2mM dans le cas de la souche C<sub>2</sub>.

Cependant, des recherches montrent que la stimulation des lipases par le Calcium a été rapportée dans le cas de *B.subtilis* 168, *B. thermoleovorans* ID-1, *P. aeruginosa* EF2 et *S. aureus* 226. Au contraire, la lipase de *P. aeruginosa* 10145 est inhibée par la présence du Calcium.

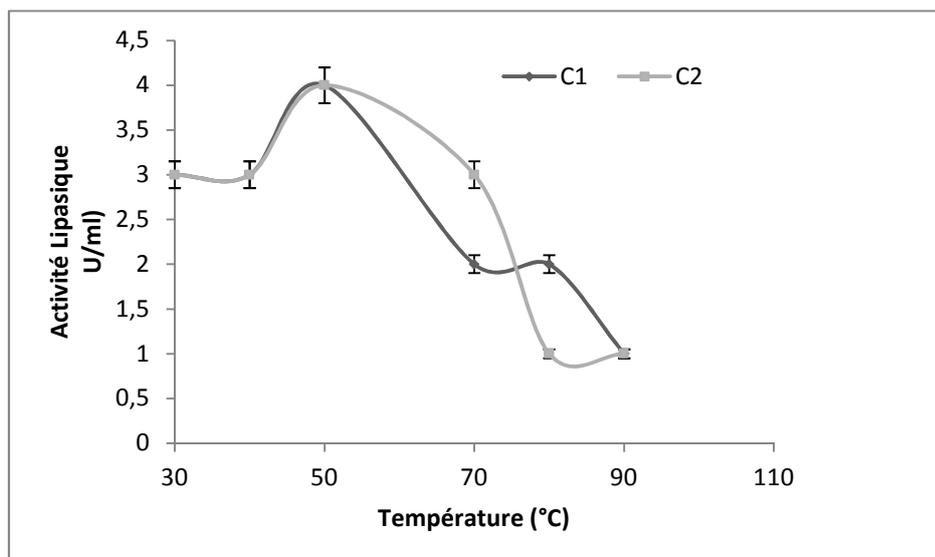
En outre, l'activité lipase est généralement inhibée par les métaux lourds comme le  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Sn}^{2+}$  et légèrement inhibés par  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Alors que, la lipase issue de *A. calcoaceticus* LP009 a été stimulée par la présence de  $\text{Fe}^{3+}$  (Gupta, 2004).



**Figure 14:** Effet des différentes concentrations des ions métalliques sur l'activité lipasique (n=3)

#### 4. Effet de la température et du pH sur l'activité des lipases

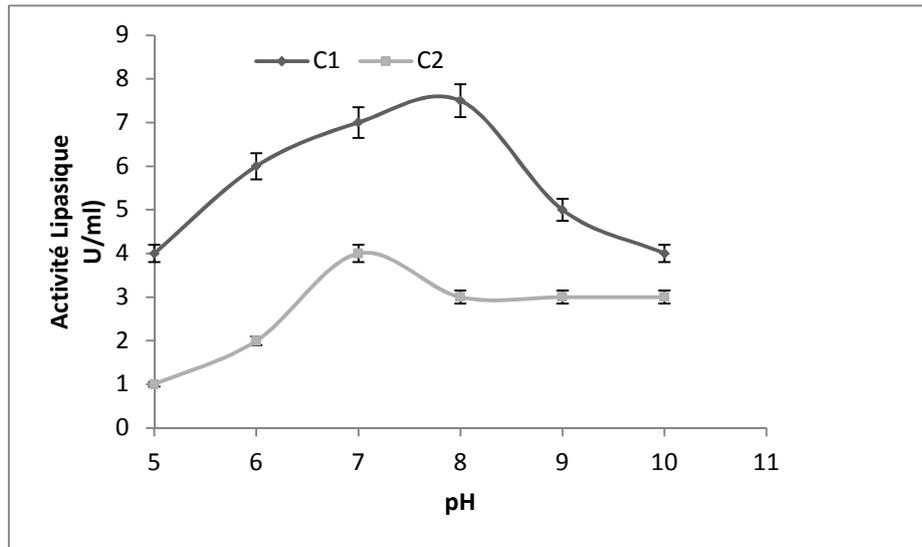
L'activité enzymatique a été déterminée à des températures variées allant de 30 à 90 °C, après incubation de l'enzyme et de son substrat pendant 5min en présence du tampon phosphate (pH = 7) et 10 mM de  $\text{ZnSO}_4$  comme catalyseur.



**Figure15 :** Effet de la température sur l'activité lipase

L'effet des différentes températures sur l'activité lipasique est montré dans la figure (13), la température correspond à l'activité maximale est 50 °C. Alors que l'activité est minimale à des températures 40 °C. L'enzyme commence à perdre son activité après 60 °C. Des résultats similaires ont été obtenus par Kim et al., (1996) qui ont montré que l'activité lipasique de la souche *Proteus vulgaris* a été maximale près de 60 °C.

L'effet des différentes valeurs du pH sur l'activité lipase à une température constante de 50 °C est montré dans la figure 14. Les profils du pH montrent que les lipases ont été actives sur une large gamme de pH allant de 5 à 10.



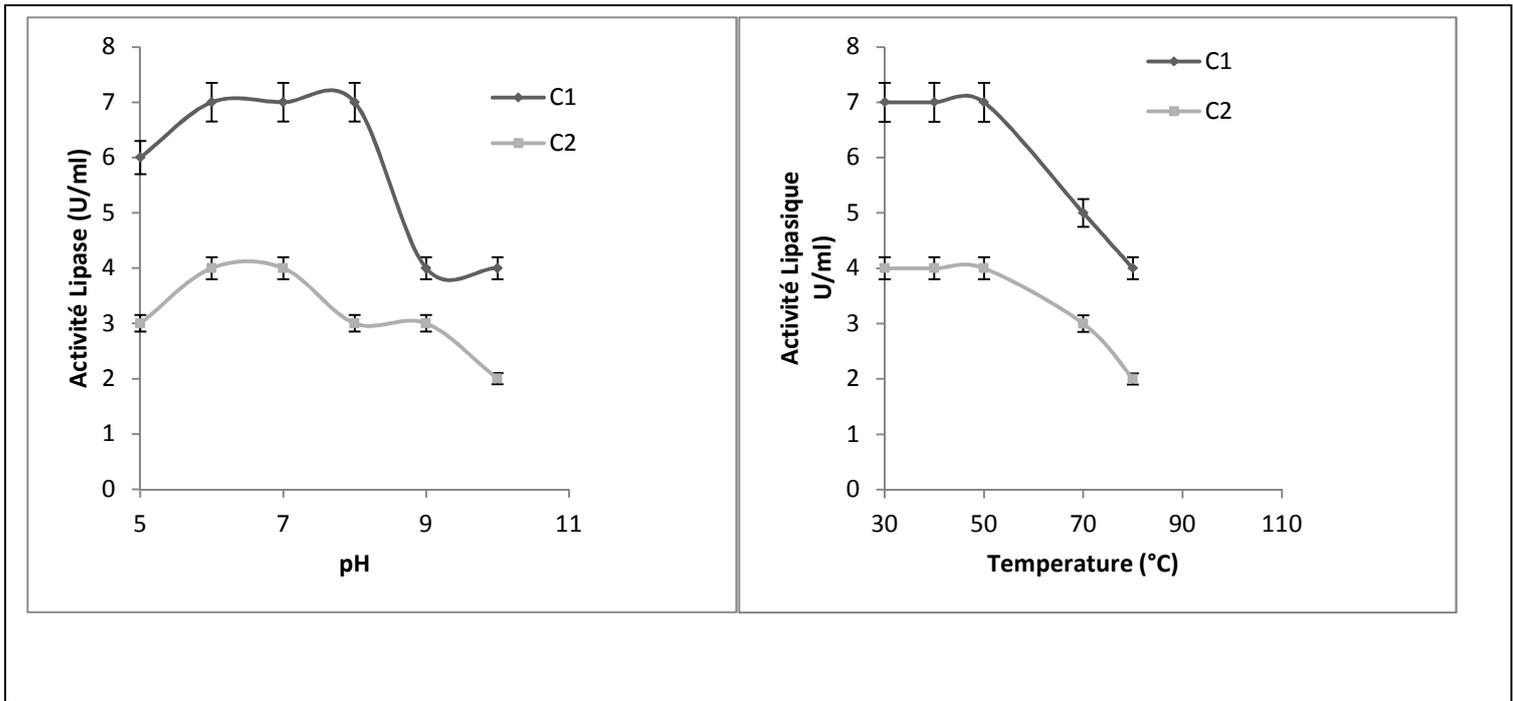
**Figure 16 :** Effet du pH sur l'activité lipase

L'activité lipasique de la souche  $C_1$  atteint son maximum à pH 7. Alors que celle de la souche  $C_2$  atteint son maximum à pH 8. Alors que (Kim et al., 1996) ont montré que l'enzyme a une activité maximale à pH 10.

### 5. Effet de la température et du pH sur la stabilité des lipases

L'effet de la température a été mesuré en incubant le surnageant pendant une heure à différentes températures. Les résultats obtenus dans la figure (15) ont montrés que les lipases étaient stables à des températures variant entre 30 et 50 °C pendant 1 heure. Cependant, une heure d'incubation à 60-80 °C diminue l'activité des lipases des deux souches  $C_1$  et  $C_2$ .

L'effet du pH a été déterminé après une heure d'incubation à différentes valeurs de pH allant de 5 à 10 à 50 °C. L'activité lipasique des deux souches étudiées était stable à un pH 6-8 dans le cas de la souche  $C_1$ . La souche  $C_2$  présente une activité lipasique stable à un pH 6-7.



**Figure 17 :** Effet de la température et du pH sur la stabilité des lipases

En comparaison avec d'autres études (Laachari et al., 2015), qui ont montré que la lipase de *Bacillus pumilus* a été stable à un pH de 5 et 8 à la différence de tous les lipases de *Bacillus*, cette enzyme conserve environ 100% de son activité après 30 minutes d'incubation à 70 °C. D'autre part l'étude de la stabilité du pH, de la lipase produite par *Aspergillus flavus*, montre que la protéine est stable dans la zone de pH 5 à 12 après 24 heures d'incubation.

La thermostabilité d'*Aspergillus flavus* a également été déterminée après incubation de l'enzyme pure à différentes températures. L'enzyme a présenté une stabilité maximale à 70°C (Laachari et al., 2015).

## Conclusion

Les lipases restent parmi les plus importants biocatalyseurs à effectuer des réactions dans les milieux aqueuses et non aqueux. Cela est principalement dû à leur capacité à utiliser un large éventail de substrats, une grande stabilité à des températures élevées, au pH et aux solvants organiques.

Notre travail a été réalisé dans le but d'identifier des microorganismes producteurs des lipases. L'isolement réalisé à partir d'un bain de dégraissage au sein des tanneries a permis de sélectionner 15 isolats microbiens toutes aptes à dégrader l'huile d'olive comme substrat lipidique dans le milieu réactionnel.

L'identification biochimique par galeri ApI 20 E, nous a permis d'identifier une souche productrice de lipases comme étant *Proteus vulgaris*.

En outre, les résultats montrent que la production de lipases se trouve être associée à la croissance bactérienne, La caractérisation biochimique des deux enzymes produits par nos souches (C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>) a montré des résultats qui nous ont permis de révéler des optima d'activité des deux lipases à une température de 50 °C et à pH neutre et que celles-ci restent stables à un intervalle de pH variant de 5 à 8.

Par ailleurs, les ions métalliques testés ont stimulé l'activité des lipases sélectionnées, sachant que l'activité lipasique est maximale en présence des ions Zn<sup>2+</sup>.

### Perspectives

Les résultats sont intéressants dans le mesure où ils sont nous permettront de :

- Optimiser les conditions de la mesure de l'activité lipase de ces microorganismes
- Choisir les conditions optimums pour la purification de ces enzymes
- Optimiser la production des lipases par l'étude des facteurs inductibles

## Références bibliographiques

**Bruss, M. L.** (2008). Lipids and Ketones. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 81–115. Cnaan S, Roussel A, Verger R et Cambillau C, (1999). Gastric lipase: crystal structure and activity . *Biochim. Biophys. Acta*, 1441, 197-204.

**Davranov K.** and **Khalameiser V. B.** (1997). Current state of the study of microbial lipases. *Chemistry of natural compounds*. 33: 113-126.

**Dijkstra B,** Frolow F, Franken S. M., Harel M, Remington S. J , Silman I, Verschueren K. H. G. (1992). The / hydrolase fold.

**Dodson G,** Lawson D, and Winkler F. (1992) . Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss.* 93, 95-105.

**Fickers P,** Destain J, and Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 12(2), 119–130.

**Fickers P,** Fudalej F, Nicaud J.-M , Destain J and Thonart P. (2005). Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 115(4), 379–386.

**Gupta, M. R.** (2004). Bacterial lipases : an overview of production , purification and biochemical properties, 763–781.

**Hasan F,** Ali Shah A and Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235 251.

**Hernández B,** Córdova J , Bárzana E , and Favela E. (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3-4), 136–142

**Hernell O,** J. E. Staggars and M. C. Carey (1990). Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry* 29(8): 2041-56.

**Jaeger K. E ,** Schneidinger B , Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra B. W, Reetz M. T. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 3(1-4), 3–12.

**Jaeger K,** and Eggert T. (2002). Lipases for biotechnology . *Current Opinion in Biotechnology*, 13:390–397.

**Jaeger K. E.** and Reetz M. T. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends biotechnol.* 16: 396-403.

**Jaeger K. E.** , Ransac S, Dijkstra B. W , Colson C , Heuvel M. V & Misset O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology reviews.* 15:29-63.

**Kim H. K.** , Lee J. K and Oh, T. K. (1996). Characterization of an alkaline lipase from *Proteus vulgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. *FEMS Microbiology Letters*, 135(1), 117–121.

**Kwon, D.Y** and Rhee, J.S. (1986). A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. *J Am Oil Chem Soc* 63:89-92.

**Laachari F,** El Bergadi F, and Ibsouda S. K. (2015). Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Aspergillus Flavus* *International Journal of Research*, 2(2), 342–352.

**Laachari F,** El Bergadi F. E. B., Sayari A , Elabed S , Iraqui M , Harchali H and Ibsouda S. K. (2015). Biochemical characterization of a new thermostable lipase from *Bacillus pumilus* strain.

**Mendes A. A.** , Oliveira ,P. C and Castro H. F. De. (2012). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. “*Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic,*” 78, 119–134.

**Reis P,** Holmberg K., Watzke H, Leser M. E., rt Miller R. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148(C), 237–250.

**Sharma R,** Chisti Y. et Banerjee U. C. (2001). Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances.* 19: 627-662.

**Sexena R. K,** Sheoran A, Giri B, Davidson W. S. (2003). Purification Strategy for microbial lipases. *Journal of microbiological methods.* 52: 1-18.

**Vergier R.** (1985). Les enzymes lipolytiques. In Mouranche A. et Costes C. *Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d intérêt industriel.* Paris, Edition: Gauthier Villars. 313-329.



*Matériel & Méthodes*



*Résultats & Discussion*

*REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE*



## Résumé

Les lipases sont des enzymes largement répandues dans la nature et font partie de la famille des hydrolases qui interviennent dans l'hydrolyse des lipides. Vu la polyvalence de ces enzymes, les lipases ont attiré l'attention des chercheurs scientifiques grâce à leur large spectre d'application dans l'industrie alimentaire, la production des détergents, les produits pharmaceutiques, cuir, textile, cosmétique, et l'industrie du papier.

Dans le but de contribuer à l'isolement des microorganismes producteurs de lipases, un screening de souches microbiennes provenant d'un bain de dégraissage au sein des tanneries de l'ancienne médina de Fès a été réalisé. Les deux souches sélectionnées pour leur potentiel de production de lipases ont été identifiées par les techniques de biologie moléculaire et biochimique comme étant *Proteus vulgaris*. Les résultats du dosage ont révélé que les deux souches produisent des lipases inductibles en présentant une activité lipasique (de 5 et 7 U / mL). En outre, la production de lipases se trouve être associée à la croissance bactérienne et sa sécrétion débute lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle.

La caractérisation biochimique de deux enzymes a montré des résultats qui nous ont permis de révéler des optima d'activité des deux lipases à une température de 50 °C et à pH 8 dans le cas de *Proteus vulgaris* et à pH 7 dans le cas de la souche C<sub>2</sub>. En plus, il s'est montré que celles-ci restent stables à un intervalle de pH variant de 5 à 8 dans le cas de *Proteus vulgaris* respectivement et de 5 à 7 dans le cas de la souche C<sub>2</sub>. Les ions de Zn<sup>2+</sup> présentent un effet stimulant pour les lipases en augmentant significativement l'activité lipasique, bien que l'activité lipasique de la souche *Proteus vulgaris* passe de 3 à 8 U/ml avec une concentration de 4 mM et de 5 à 8U/ml avec une concentration de 10 mM pour la souche C<sub>2</sub>. Ainsi que la présence des ions MgSO<sub>4</sub> et FeSO<sub>4</sub> à une concentration de 10 mM donne un maximum d'activité avec une valeur de 8 U/ml dans le cas de la souche C<sub>1</sub>. et la présence des ions CaCl<sub>2</sub> donne un maximum d'activité 3 U/ml en présence d'une concentration de 4mM dans le cas de la souche C<sub>1</sub> et une concentration de 2mM dans le cas de la souche C<sub>2</sub>.

**Mots clés :** Lipase microbienne, *Proteus vulgaris*, PCR, Thermostable.