



N° d'ordre : 15 / 2014

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mr: Faouzi LAACHARI

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Production, Purification, Caractérisation et Prédiction de la Structure des Lipases Microbiennes Thermostables

(Trichosporon coremiiforme, Aspergillus flavus et Bacillus pumilus)

2014

Thèse présentée et soutenue le 26 Avril devant le jury composé de

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Abdellatif HAGGOUD	PES	Faculté des Sciences et Techniques Fès	Président
Abdellatif El Meziane	PES	Faculté des Sciences et Techniques-Guéliz, Marrakech	Rapporteur
Jamal IBIJBIJEN	PES	Faculté des Sciences Meknès	Rapporteur
Mohamed HASSOUNI	PES	Faculté Sciences Dhar El Mahraz	Rapporteur
Abdellatif BARAKAT	PES	Faculté des Sciences, Marrakech	Examineur
Abdellatif BOUKIR	PES	Faculté des Sciences et technique, Fès	Examineur
Saad Ibsouda KORAICHI	PES	Faculté des Sciences et Techniques Fès	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil
Etablissement

: Laboratoire de Biotechnologie Microbienne
: Faculté des Sciences et technique de Fès

Laboratoire d'accueil
Etablissement

: Laboratoire de Biochimie et de Génie Enzymatique des Lipases
: Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax-Tunisie





Résumé de la thèse

L'intérêt des lipases microbiennes pour des applications biotechnologiques a pris un essor fulgurant ces dernières années. Par conséquent, l'industrie nécessite de nouvelles enzymes qui répondent aux critères d'utilisation, notamment au niveau de la thermostabilité.

Dans le but de contribuer à l'isolement des lipases thermostables, un screening de souches microbiennes provenant de sources variées a été réalisé. Les trois souches sélectionnées pour leur potentiel de production de lipases ont été identifiées par des techniques moléculaires comme étant *Trichosporon coremiiforme*, *Aspergillus flavus* et *Bacillus pumilus*. Les résultats de dosage ont révélé que les trois souches produisent des lipases thermostables et non inductibles en présentant une activité lipasique très élevée (plus de 16 U/mL). La mise au point du protocole classique de dosage de l'activité lipasique nous a permis d'améliorer le rendement de celui-ci et les résultats obtenus ont été par la suite confirmés en utilisant l'IRTf et la RMN. Ceci nous a également permis de dévoiler la régiosélectivité de la lipase de *Bacillus pumilus*.

Les trois enzymes isolées ont été purifiées et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes, nous ont permis de révéler une masse moléculaire de 65 KDa, 55 KDa et 27 KDa respectivement pour les lipases de *T. coremiiforme*, *A. flavus* et *B. pumilus*. Celles-ci ont présenté respectivement une activité spécifique finale de 1800 U/mg, 4300 U/mg et 2100 U/mg sur une émulsion d'huile d'olive comme substrat. La caractérisation biochimique des trois enzymes a montré leur résistance à des conditions extrêmes de pH et de température. Elles maintiennent 100% de leur activité après incubation pendant 30 min à 70°C. En outre, 60% de cette activité a été conservée à 100°C pendant 5 min dans le cas *B. pumilus*. Ces enzymes restent stables dans un intervalle de pH variant de 4 à 12 dans le cas de *T. coremiiforme*, *A. flavus* et de 3 à 7 dans le cas de *B. pumilus*. Les trois lipases ont gardé leur stabilité même en présence de concentrations élevées en détergeant (NaDC). Les sels de calcium ont montré à leur tour une action stimulante de l'activité lipasique d'*A. flavus* et *B. pumilus*. Les trois lipases ont présenté le phénomène d'activation interfaciale.

Le séquençage de la partie N-terminale de deux lipases a été réalisé et l'alignement des séquences obtenus a révélé 100% homologie avec les lipases d'*A. oryzae* RIB40 et *A. flavus* NRRL3357 dans le cas d'*A. flavus* et de 100% avec les lipases de *B. subtilis* dans le cas de *B. pumilus*. Une modélisation moléculaire des structures 3-D des deux lipases a été également effectuée et les résultats nous ont permis de montrer que ces deux lipases tolèrent l'accumulation des acides gras à longues chaînes à l'interface lipide/eau. Ces résultats attestent que ces nouvelles lipases présentent des propriétés biochimiques attrayantes pour diverses applications industrielles.

Mots clés : lipase microbienne, thermostabilité, purification des protéines, séquençage, modélisation moléculaire.

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i> -----	00
<i>Résumé</i> -----	00
<i>Liste des abréviations</i> -----	00
<i>Liste des tableaux</i> -----	00
<i>Liste des Figures</i> -----	00

INTRODUCTION -----	01
---------------------------	-----------

BIBLIOGRAPHIE

1. Lipases : généralité -----	04
2. Origines des lipases -----	04
2.1. Lipases des mammifères (lipases gastrique, pancréatique)-----	04
2.2. Lipases végétales-----	09
2.3. Lipases microbiennes-----	10
2.4. Les réactions catalysées par les lipases-----	13
3. Spécificité des lipases -----	14
4. Aspects structuraux des lipases -----	15
4.1. Repliement α/β -----	16
4.2. Triade catalytique-----	17
4.3. Volet amphiphile-----	18
4.4. Mécanisme d'action des lipases-----	19
5. Phénomène d'activation interfaciale -----	20
6. Modèle cinétique interfaciale -----	23
7. Facteurs influençant la production de lipase -----	24
7.1. Effet du pH et de la température-----	25
7.2. Effet du solvant organique-----	25
7.3. Effet d'ions du métal-----	26
7.4. Les sels biliaires-----	26
7.4.1. Propriétés générales des molécules amphiphiles-----	27
7.4.2. Les sels biliaires : origine, structure et propriétés physico-chimiques-----	28
7.4.3. Influence des sels biliaires sur l'activité enzymatique des lipases-----	28
8. applications des lipases -----	31
8.1. Réaction d'hydrolyse-----	31
8.1.1. Industrie agro-alimentaire-----	31
8.1.2. Industrie des détergents-----	33
8.1.3. Industrie du papier-----	34
8.1.4. Industrie laitière-----	34
8.1.5. La production des monoglycérides-----	34
8.1.6. Résolution de racémiques-----	35
8.2. Réaction de synthèse-----	36
8.2.1. Oléochimie-----	36
8.2.2. Industrie Médicinale et cosmétique-----	37
8.2.4. Synthèse organique-----	37
8.2.5. Synthèse d'arômes-----	38

8.2.5. Synthèse d'émulsifiants	40
8.2.6. Synthèse de biocarburants	42
8.2.7. Synthèse des polymères biologiques	43

MATERIEL ET METHODES

I. Caractérisation des sites d'étude	46
1. Sites d'étude et prélèvement des échantillons	46
1.1. Choix des sites	46
1.2. Prélèvement des échantillons	46
II. Isolement et caractérisation des isolats	47
1. Milieux de cultures	47
1.1. Milieu d'isolement	47
1.2. Milieu de mise en évidence de l'activité lipasique	47
2. Isolement et purification des isolats	48
3. Caractérisation des isolats : mise en évidence de l'activité lipasique	48
III. Identification des isolats producteurs de la lipase	49
1. Caractérisation morphologique et macroscopiques	49
2. Identification moléculaire	49
2.1. Extraction de l'ADN génomique	49
2.2. Amplification de l'ADNr 5.8S par PCR	50
2.3. Séquençage et analyse bioinformatique des séquences	52
IV. Etude de la production des lipases	53
1. Dosage de l'activité lipasique	54
1.1. Dosage par la méthode pH-Stat	54
1.2. Dosage par la méthode spectrophotométrique classique	55
1.3. Mise au point de la méthode spectrophotométrique classique de dosage	55
2. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	55
3. Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	56
V. Purification et caractérisation biochimique des lipases isolées	56
1. Purification des lipases isolées	56
2. Détermination de la concentration en protéines	58
3. Analyse des protéines par électrophorèse	58
4. Caractérisation biochimique des lipases isolées	60
4.1. Etude de l'activité lipasique	60
4.1.1. Effet du pH	60
4.1.2. Effet de la température	60
4.1.3. Effet du calcium	60
4.1.4. Effet des détergents	61
4.1.5. Effet des acides gras libres	61
4.2. Etude de la stabilité des lipases isolées	61
4.2.1. Effet du pH	61
4.2.2. Effet de la température	61
4.3. Etude du phénomène d'activation interfaciale	61
VI. Etude structurale et modélisation des lipases purifiées	62
1. Séquençage de la partie N-terminale des lipases purifiées	62
2. Alignement des séquences : utilisation du programme BLASTP/NPSA	62

3. Modélisation des lipases purifiées -----	63
3.1. Recherche de motif -----	63
3.2. Modélisation par homologie -----	64
3.3. Minimisation de l'énergie -----	64
3.4. Evaluation du modèle -----	64
3.5. Calcul de la surface -----	64

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Isolement, caractérisation et identification des souches productrice de lipase -----	67
1. Sélection des isolats producteurs de lipase -----	67
2. Identification moléculaire des isolats sélectionnés -----	68
II. Etude de la production des lipases sur milieu liquide -----	69
1. Etude de l'activité lipolytique dosée par la Technique du pH-Stat -----	69
2. Etude de l'activité lipolytique des souches isolées en présence du substrat -----	71
3. Etude de l'activité lipolytique dosée par le protocole classique et modifié -----	73
4. Validation du nouveau protocole de dosage de l'activité lipase -----	74
4.1. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (IRTF) -----	74
4.2. Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) -----	78
III. Purification et caractérisation biochimique des lipases isolées -----	85
1. Purification des lipases isolées -----	85
2. Caractérisation biochimique des lipases isolées -----	88
2.1. Effet du pH et de la température sur l'activité lipasique -----	88
2.2. Effet du pH et de la température sur la stabilité des lipases -----	90
2.3. Effet de la température (100 °C) sur la stabilité de la lipase de <i>B. pumilus</i> -----	92
2.4. Effet du calcium sur l'activité lipasique -----	93
2.5. Effet des détergents sur l'activité lipasique -----	94
2.6. Effet des acides gras libres sur la réaction catalytique -----	96
2.7. Phénomène d'activation interfaciale -----	97
VI. Etude structurale et modélisation des lipases purifiées (<i>A. flavus</i> et <i>B. pumilus</i>) -----	99
1. Séquençage de la partie N-Terminale -----	99
2. Analyse bioinformatique de la séquence N-Terminale par le programme BLASTP -----	101
3. Analyse bioinformatique de la séquence N-Terminale par le programme NPSA -----	102
4. Construction du modèle de la lipase d' <i>A. flavus</i> et <i>B. pumilus</i> -----	105
Conclusion générale et perspectives -----	110
Références bibliographiques -----	115