

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologies



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité Sciences Alimentaires

Par

NEHAL FATMA

Thème :

Caractérisation de lipases isolées à partir
de souches microbiennes locales.

Soutenue le 26/01/2017, devant le jury composé de :

SBAIHIA Mohammed	MCA	U. Chlef	Président
DILMI BOURAS Abdelkader	Professeur	U. Chlef	Rapporteur
BOUDEROUA Kadour	Professeur	U. Mostaganem	Examineur
CHERIGUENNE Abderahim	Professeur	U. Mostaganem	Examineur
SETTI Benali	MCA	U. Chlef	Examineur

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Hassiba Benbouali de Chlef
Faculté des Sciences de la Nature et de
la Vie



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة حسيبة بن بوعلي بالشلف
كلية علوم الطبيعة و الحياة

THESE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

EN SCIENCES

Présentée par: **Nehal Fatima**



Caractérisation de lipases isolées à partir

de souches microbiennes locales

Devant le jury :

Président : **SBAIHIA** Mohammed

Directeur de thèse : **DILMI BOURAS** Abdelkader

Co-directeur de thèse : **YOUSSEF-TALLEL** Gargouri

Examineur : **BOUDEROUA** Kadour

Examineur : **CHERIGUENNE** Abderahim

Examineur : **SETTI** Benali

Maitre de conférences A UHB Chleff.

Professeur UHB Chleff.

Professeur ENIS -Tunisie.

Professeur Université de Mostaganem.

Professeur Université de Mostaganem.

Maitre de conférences A UHB Chleff.

Année universitaire : 2016-2017



Dédicace

Je dédie ce travail :

A

*La mémoire de mon père
Que son âme repose en paix*

A

*Ma mère, Qui m'a toujours comblé d'amour et d'affection.
Son dévouement et ses sacrifices resteront pour moi un exemple
de patience et de compréhension*

A

*Mon mari qui m'a permis d'atteindre mon objectif par son soutien
moral et matériel et par l'amour et la confiance qu'il m'a toujours
donnés,*

Que Dieu le préserve bonne santé et longue vie.

A

*Ma sœur fettouma, pour son soutien moral et son affection
Mes enfants Hadil, Nabila et Abderrahmane*

A

Mes frères et sœurs

*A tous ceux qui me sont chers
Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon éternelle reconnaissance
et qu'ils reçoivent L'expression de ma profonde affection*

Fatima

*« Dans les sciences, le chemin est plus important que le
but »*

Erwin Charagff

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie et de Génie Enzymatique des Lipases de l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (LBGEL – ENIS, Tunisie).

Je tiens d'abord à remercier vivement Monsieur le Professeur Youssef Talél GARGOURI, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire. Je le remercie pour les conseils judicieux qu'il m'a prodigués et pour ses qualités humaines. Je tiens à lui exprimer mon profond respect. La formation que j'ai eu dans son laboratoire m'a permis d'améliorer mes connaissances et mes méthodes de travail. Je le remercie vivement pour tous les moyens qu'il a su mettre à ma disposition pour assurer de bonnes conditions de travail dans une excellente ambiance. Je voudrais remercier Professeur Youssef Talél GARGOURI, pour m'avoir donné tant de son temps pour corriger ma thèse, mon article et pour discuter sur les moindres détails de mes expériences. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier Monsieur Dilmi Bouras Abdelkader, Professeur à l'université Hassiba Ben Bouali, Chlef. A travers ce travail je lui exprime mon respect pour ses qualités humaines qui ont largement contribué au bon déroulement de mon travail de thèse. A travers ce travail je lui exprime mon plus grand respect et ma plus profonde gratitude pour sa confiance, sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils fort judicieux. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame Raida Jallouli Docteur à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax pour avoir encadré ce travail de recherche et pour le soutien constant qu'elle a bien voulu m'accorder tout au long de ce

travail. Je la remercie pour sa façon de me mettre en confiance pendant les moments difficiles, pour le suivi et l'encadrement scientifique de ce travail. Pour ses remarques constructives et pour les qualités pédagogiques dont elle a fait preuve.

*Mes remerciements s'adressent également à monsieur **Sbaihia Mohammed**, Maitre de conférence au Département de Biologie - Université Hassiba Ben Bouali de Chleff, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce travail. Je le remercie également pour son soutien moral et ses conseils scientifiques forts intéressants, qu'il trouve ici ma sincère reconnaissance.*

*Je tiens à remercier aussi Monsieur **Setti Benali**, Maitre de conférences au Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologies- Université Hassiba Ben Bouali de Chleff, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de le juger.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également à monsieur **CHERIGUENE Abderrahim**, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mostaganem, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également à monsieur **BOUDEROUA Kaddour** Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mostaganem, d'avoir donné du temps pour évaluer ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également au docteur **Nabil Smichi** pour ses conseils précieux et ses remarques constructives, pour l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail ainsi que pour les conseils précieux qu'il m'a prodigués. Sa*

bonne humeur et son dynamisme m'ont encouragée durant les moments difficiles. Qu'il trouve ici l'assurance de ma reconnaissance et de mon respect.

*J'adresse toute ma reconnaissance au Docteur **Ahmed Fendri**, maître-assistant à la Faculté des Sciences de Sfax, Je le remercie pour son aide très précieuse, pour ses conseils scientifiques ainsi que pour sa gentillesse. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande gratitude.*

*Tous mes remerciements aux Professeurs : **Nabil Miled**, Professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax et **Adel SAYARI**, Professeur à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, et aux Docteurs **Ahmed ALOULO**, et **Zied Zarai** et **Yassine BenAli**, Maître de conférences à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax pour les discussions scientifiques.*

*J'exprime ma profonde et sincère amitié aux membres du LBGEL qui m'ont accueilli comme une seconde famille, pour les discussions scientifiques que nous avons eues, pour leurs encouragements, leurs appuis et leurs gentillesse qui ont beaucoup facilité le déroulement de mes recherches. Je leurs souhaite plein de succès dans leurs projets. Je remercie spécialement **Hanan Louati**, **Madiha Benali**, **Najeh Krayem**, **Nadia Kharrat**, **Nadia Charmiti**, **Sawsan BEN AYED**, **Amal**, **Imen AISSA**, **Mohamed SELAMI**, **Fatma Aloui**, **Neila ACHOURI**, **Jannet KAMMOUN** et **Hamida JDIR**, Je garderai toujours un excellent souvenir des moments qu'on a passé ensemble.*

Je ne peux pas clore mes remerciements sans rendre un hommage à tous les enseignants de l'université Hassiba Ben bouali qui ont contribué à ma formation pédagogique tout au long de mon cursus universitaire ainsi qu'à tous le personnel du Département de Biologie.

FATIMA

SOMMAIRE

Dédicaces

Remerciements

Liste des figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

Introduction

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES LIPIDES	04
1. Définition	04
2. Classification et structure	04
2.1 Lipides non polaires	04
2.2 Lipides polaires	04
3. Auto-organisation des lipides en phase aqueuse	06
3.1 Couches monomoléculaires	06
3.2 Emulsions	07
3.3 Liposomes	07
3.4 Micelles	08
3.5 Cristaux liquides	09
II. LES LIPASES	09
1. Définition	09
2. Propriétés cinétiques	11
2.1 Modèle cinétique interfaciale	11
2.2 Le volet amphiphile et l'activation interfaciale	12
3. Propriétés structurales des lipases	14
3.1 Un repliement α/β	14
3.2 Une triade catalytique	15
4. Mécanisme d'action catalytique	15
5. Comportement des lipases aux interfaces : Technique des films monomoléculaires	18
6. Spécificité des lipases	19
6.1 La regiosélectivité	19
6.2 La stéréosélectivité	19
6.3 L'énantiosélectivité	20
6.4 La typosélectivité	20
7. Origines et classification des lipases	20
7.1 Les lipases microbiennes	20

7.2 Les lipases fongiques	21
7.3 Les lipases bactériennes	22
8. Staphylocoques	25
8.1 Morphologie et caractères cultureux	25
8.2 Caractéristiques de Staphylococcus aureus	26
8.3 Les lipases de Staphylocoques	27
8.4 Caractérisation biochimique des lipases de Staphylocoques	27
8.5 Caractérisation moléculaire de lipases de Staphylocoques	29
8.6 Transformation de la pro-forme	31
8.7 Rôle du pro-peptide	32
9. Applications biotechnologiques des lipases	33
9.1 Incorporation des lipases aux détergents	33
9.2 Les lipases dans l'industrie alimentaire	34
9.3 Hydrolyse des huiles	35
9.4 Synthèse d'esters	36

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL	39
1. Matériel biologique	39
2. Milieux de culture	39
3. Réactifs	39
4. Tampons et solutions	40
5. Enzymes et vecteur	40
6. Supports chromatographiques	41
7. Appareillage	41
II. METHODES	42

PARTIE I: SELECTION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES LIPOLYTIQUES

1. Isolement et collection des échantillons	42
2. Sélection de souches lipolytiques	42
3. Repiquage et revivification des souches	42
4. Identification biochimique des souches	43
5. Identification moléculaire des souches	43
5.1 Extraction de l'ADN génomique	43
5.2 Amplification de l'ADN	45
5.3 Purification de l'ADN	46
5.4 Séquençage de l'ADN et alignement de séquences	47

PARTIE II: PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA LIPASE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	47
1.Préculture	47
2. Culture	47
3. Dosage de l'activité lipasique	48
3.1 pH-Stat	48
3.2 Barosta t	49
3.2.1 Mesure de la pression superficielle de la SAL	51
3.2.2 Mesure de la pression critique de la SAL	51
4. Purification de la lipase	51
4.1 Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium	51
4.2 Chromatographie de filtration S200	52
4.3 Chromatographie échangeuse de cations	53
4.4 Chromatographie de filtration G75	53
5. Détermination de la masse moléculaire de la lipase purifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE)	54
6. Détermination de la concentration en protéines	54
7. Détermination de l'extrémité NH ₂ -terminale	54
PARTIE III:CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA LIPASE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	57
1. Technique de pH-Stat	57
1.1 Effet du pH sur l'activité lipasique	57
1.2 Effet de la température sur l'activité lipasique	57
1.3 Effet du calcium sur l'activité lipasique	57
1.4 Effet des composés amphipatiques sur l'activité lipasique	57
1.5 Stabilité de la lipase en fonction du pH	57
1.6 Stabilité de la lipase en fonction de la température	57
PARTIE V:CLONAGE DU GENE CODANT LA FORME MATURE DE LA SAL	58
1. Amplification du gène qui code pour la SAL	58
2. Clonage du gène qui code pour la SAL mature	58
2.1 Ligation du plasmide et de l'insert	58
2.2 Transformation d'E-coli	58
2.2.1 Préparation des cellules d'E-coli chimiocompétentes	58
2.2.2 Transformation des cellules compétentes d'E-coli	59
2.2.3 Extraction et purification de l'ADN plasmidique	59
2.2.4 Séquençage des produits amplifiés	59
2.2.5 Analyse bioinformatique des séquences	60

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

I.	ISOLEMENT ET SELECTION DES SOUCHES LIPOLYTIQUES	62
1.	Sélection des espèces lipolytiques	62
2.	Identification biochimique de la souche	62
3.	Identification moléculaire de la souche	63
II.	PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA LIPASE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	64
1.	Production de la lipase de <i>Staphylococcus aureus</i>	64
2.	Purification de la lipase de <i>Staphylococcus aureus</i>	65
III.	CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA LIPASE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	68
1.	Phénomène d'activation interfaciale	68
2.	Spécificité de substrat de la SAL	69
3.	Effet du calcium sur l'activité de la SAL	70
4.	Effet des sels biliaires sur l'activité de la SAL	72
5.	Effet du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de la SAL	73
6.	Cinétiques d'hydrolyse des différents triglycérides par la SAL	74
7.	Propriétés interfaciales de la SAL sur des films monomoléculaires	75
7.1	Cinétiques d'hydrolyse des différents isomères de dicaprine	76
7.2	Mesure de la pression critique de la SAL sur des films monomoléculaires de	78
7.3	phosphatidylcholine du jaune d'œuf (Egg-PC).	
V.	Clonage du gène de la lipase mature de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
	Conclusion & perspectives	
	Références bibliographiques	

Liste des abréviations

AG	: Acide gras
AS	: Activité spécifique
BSA	: Bovine Sérum Albumine
DG	: Diglycéride
DiC₁₀	: Dicaprine
diC₁₂-PC	: 1,2-dilaurylphosphatidyl choline
diC₁₂-PE	: 1,2-dilaurylphosphatidyl éthanolamine
diC₁₂-PS	: 1,2-dilaurylphosphatidyl sérine
diC₁₂-PG	: 1,2-dilaurylphosphatidyl glycérol
EDTA	: Acide E thylène Diamine tétraacétique
Egg-PC	: Phosphatidylcholine de jaune d'œuf
FFA	: Free fatty acids (acides gras libres)
FSL	: Lipase de <i>Fusarium solani</i>
H.O	: Huile d'olive
HPL	: Lipase pancréatique humaine
K_m	: Constante de dissociation
MM	: Masse moléculaire
MG	: Monoglycéride
NaDC	: Acide deoxycholique de sodium
NaTDC	: Acide taurodeoxycholique de sodium
Pb	: Paire de base
PC	: Phosphatidylcholine
PCR	: Polymerase Chain Reaction
ROL	: Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
SAL	: Lipase de <i>Staphylococcus aureus</i>
SEL	: Lipase de <i>Staphylococcus epidermidis</i>
SHL	: Lipase de <i>Staphylococcus hyicus</i>
SSL	: Lipase de <i>Staphylococcus simulans</i>
SXL	: Lipase de <i>Staphylococcus xylosus</i>
S.I	: Indice de stéréosélectivité
Sn	: Nombre stéréospécifique
SWL	: Lipase de <i>Staphylococcus warneri</i>
TC₃	: Triacétine
TC₄	: Tributyrine
TC₈	: Trioctnoine

TG	: Triglycéride
TLL	: Lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i>
U	: Unité enzymatique
V.I	: Index de Vicinité
wtSAL3	: Lipase de <i>Staphylococcus aureus</i> sauvage
wtSSL	: Lipase de <i>Staphylococcus simulans</i> sauvage
wtSXL	: lipase de <i>Staphylococcus xylosus</i> sauvage
π_c	: Pression critique

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du comportement des lipides en présence d'eau et à l'interface air/eau (Small, 1968).

Figure 2: Organisation des lipides en films monomoléculaires à l'interface air-eau.

Figure 3: Représentation schématique d'une émulsion, d'un liposome unilamellaires de petite taille et d'une micelle (Linthorst *et al.*, 1977 ; Dennis, 1983).

Figure 4: Hydrolyse des liaisons esters des triacylglycérols par les lipases. Identification des liaisons esters hydrolysables par une lipase (Verger, 1997).

Figure 5 : Modèle cinétique interfaciale (Verger et de Haas, 1973).

Figure 6 : Cinétique d'hydrolyse de la triacétine par la lipase pancréatique de porc et par l'estérase du foie de cheval (Sarda et Desnuelle, 1958).

Figure 7 : Représentation de la structure secondaire du repliement α/β des hydrolases (Bornscheuer, 2002a).

Figure 8 : Schématisation de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique d'après Beer *et al.*, (1996).

Figure 9: La structure pré-pro de la lipase de *Staphylococcus hyicus*.

Figure 10 : Carte de restriction du vecteur pGEMT-Easy.

Figure 11 : Représentation schématique condensée de la technique de pH-Stat.

Figure 12 : Dégradation chimique d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines.

Figure 13 : Représentation schématique d'une cuve d'ordre zéro, utilisée pour la mesure de l'activité lipase sur des films monomoléculaires en utilisant la méthode de Wilhelmy (1863).

Figure 14: Screening de l'activité lipasique sur LB solide en présence 1‰ de rhodamine et 1% d'huile d'olive (pH 7, 37°C).

Figure 15: Aspect microscopique après coloration de Gram et macroscopique de *Staphylococcus aureus*.

Figure 16: Amplification de l'ARN 16S de la souche S4 par les amorces universelles.

Figure 17: Suivi de la croissance et de la production lipasique de *Staphylococcus aureus* à 200 rpm et à 37°C. La croissance est estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

Figure 18: Profil d'éluion de la lipase de *Staphylococcus aureus* déposée sur : (a) une colonne de filtration Séphacryl S200 suivi d'une colonne échangeuse de cations (b). Les fractions actives sont déposées sur une colonne de filtration G75 (c).

Figure 19: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% dans les conditions dénaturantes.

Figure 20 : Taux d'hydrolyse de TC₃ par la SAL en fonction de différentes concentration en substrat.

Figure 21: Dosage de l'activité lipasique de la SAL sur différents substrats à 40°C et à pH8. TC4 : Tributyrine, TC8 : Trioctanoineet sur huile d'olive.

Figure 22: Effet du CaCl₂ sur l'activité de la SAL.

Figure 23 : Effet de NaDC sur l'activité de la SAL.

Figure 24 : Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la SAL. L'activité lipasique est mesurée à pH 8 à différentes température sur émulsion d'huile d'olive comme substrat en présence de 1mM CaCl₂ et 2 mM NaDC.

Figure 25: Cinétiques d'hydrolyse d'une émulsion d'huile d'olive (HO), de tributyrine (TC4) et de Trioctanoine (TC8) par la SAL.

Figure 26 : Variation de la pression de surface de la lipase de *Staphylococcus aureus* (SAL) sur trois isomères de dicaprine.

Figure 27: (A) Indice de regiosélectivité (VI) calculé à partir des activités spécifiques de la SAL à 20 et 30 mN/m. (B) L'indice de stéréosélectivité calculé à 20 et 30 mN/m.

Figure 29: Mesure de la pression critique de la SAL sur des films monomoléculaires de PC de jaune d'œuf (Egg-PC).

Figure 30 : Résultat d'amplification du gène codant la SAL.

Figure 31 : Alignement de séquence protéique de la SAL avec la SAL3.

Liste des tableaux

Tableau 1: Exemples de lipases de champignons disponibles sur le marché (Bornscheuer et Kazlauskas, 1999; Schmid et Verger, 1998)

Tableau 2: Caractéristiques biochimiques de quelques lipases bactériennes

Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques de quelques lipases de Staphylocoques.

Tableau 4 : Pourcentage d'identité et pourcentage d'homologie de certaines lipases matures de Staphylocoques.

Tableau 5 : Applications industrielles des enzymes lipolytiques (Jaeger et Eggert, 2002 ; Hasan *et al.*, 2006).

Tableau 6: Caractères biochimiques d'identification de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 7: Tableau de purification de la lipase de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 8 : Séquences NH₂ terminales des différentes lipases des différentes espèces de Staphylocoques.

RESUMÉ

Les lipides constituent une grande partie de la biomasse de la terre et les enzymes lipolytiques jouent un rôle important dans la transformation de ces composés insolubles dans l'eau. Les lipases microbiennes ne sont pas comparables aux lipases d'origine végétale et animale en termes d'activité, rendement, facilité de purification, modifications moléculaires et stabilité. L'environnement où ces micro-organismes sont isolés confère certaines caractéristiques à ces enzymes. *Staphylococcus aureus* isolée à partir d'un biotope algérien sécrète dans le milieu de culture une lipase non-induite. La Lipase de *S. aureus* nommée (SAL) a été purifiée à homogénéité. La SAL pure est une protéine monomérique possédant une masse moléculaire apparente d'environ 43 kDa. Le séquençage de 20 résidus d'acides amines de l'extrémité NH₂-terminale a révélé un degré d'homologie élevé comparée aux autres lipases de Staphylocoques. La SAL présente des activités spécifiques d'environ 1600 U/mg ou de 555 U/mg en utilisant la tributyrine et l'émulsion d'huile d'olive comme substrats, respectivement. Contrairement à d'autres lipases Staphylococciques précédemment caractérisées, la SAL est stable à une gamme de pH de 6 à 9 après 1h d'incubation et maintient 50% de son activité après 10 minutes d'incubation à 50°C. L'enzyme purifiée a été également caractérisée en utilisant la technique de couche monomoléculaire. L'activité de lipase peut être mesurée seulement quand la pression de surface atteint 15 mN/m. Les résultats obtenus montrent que la SAL hydrolyse préférentiellement les diacylglycérols à groupements esters adjacents à hautes pressions et les diacylglycérols à groupements esters distals à faible pression et une préférence pour la position sn-3 du 2,3-sn-dicaprine. Le pouvoir de pénétration (π_c) de la SAL mesuré sur film monomoléculaire d'Egg-PC est de 33mN/m. La séquence NH₂-terminale de la SAL présente une forte homologie avec une lipase de la même souche nommée SAL 3. Une délétion de 3 résidus (LKA) du côté NH₂-terminale est observée dans la séquence de la SAL avec substitution de la glycine 208 et l'isoleucine 226 par une arginine et une leucine respectivement.

Mots clés: Lipases de *Staphylococcus aureus*, pH-stat, Baro-stat, Régiosélectivité, stéréosélectivité.

المخلص

تشكل الدهون جزء كبير من الكتلة الحية الموجودة على الأرض وتلعب الانزيمات الدهنية دورا هاما في تحويل هذه المركبات غير قابلة للانحلال في الماء.

ان الانزيمات ذات أصل ميكروبي ليست مماثلة لتلك التي هي من أصل نباتي أو حيواني من حيث النشاط والأداء سهولة التنقية والتغيرات الجزئية والاستقرار.

تمنح البيئة التي يتم من خلالها عزل الكائنات الدقيقة بعض الخصائص الى هذه الانزيمات.

تفرز المكورات العنقودية الذهبية التي تم عزلها من بيئة حيوية جزئية في وسط مغذي انزيم الليباز غير محرض.

تمت تنقيته حتى التجانس. SAL يسمى انزيم الليباز الذي تفرزه المكورات العنقودية الذهبية

كيلو دالتون. 43 هو بروتين احادي وزنه الجزيئي حوالي SAL

. درجة تماثل كبيرة مقارنة بانزيم الليباز الذي تفرزه مكورات عنقودية اخرى NH_2 حمض اميني ذو نهاية 20 كشف ترتيب بقايا

باستعمال تريبتيرين و مستحلب زيت الزيتون 555 U/mg او 1600 U/mg على خصائص معينة حوالي SAL يحتوي انزيم بمثابة ركيزة على التوالي.

الى 6 مستقر في درجة حموضة من SAL على عكس انزيمات ليبازية اخرى تفرزها المكورات العنقودية مميزة سابقا، يكون

° مئوية الانزيم المنقى 50 % من وظيفته بعد عشر دقائق من الحضان في درجة حرارة 50 بعد ساعة من الحضان و يحقق 9

15mN/m. يمكن ان يكون قياس نشاط الانزيم فقط عند ضغط سطحي يصل الى يتم تميزه باستعمال

تقنية احادي الطبقة .

مجموعة الاستر المتجاورة ذات ضغط عالي و diacylglycérol يفضل تحليل SAL اظهرت النتائج المحصل عليها ان

مجموعة الاستر متباعدة ذات ضغط منخفض مع انحياز او sn-3 ل 2,3-sn-dicaprine
تفضيل الموقع Diacylglycérol

. 13 mN /m و هي Egg-PC Filmmonomoléculaire بتقنية SAL تقاس مقدار النفاذية π لانزيم

SAL3 تجانس كبير مع انزيم ليباز اخر ينتمي الى نفس السلالة يسمى SAL الطرفية لانزيم NH2 يظهر تسلسل

بالارجنين 226 و ايزولوسين 208 مع استبدال غليسين SAL الطرفية في سلسلة NH2 بجانب LKA بقايا 3 تمت ملاحظة حذف

واللوسين على التوالي.

الكلمات المفتاحية:

ليباز المكورات العنقودية الذهبية ، pH-stat ، Baro-stat ، انتقائية موضعية ، Stéréosélectivité

ABSTRACT

Lipids constitute a large part of the earth's biomass, and lipolytic enzymes play an important role in the turnover of these water insoluble compounds. microbial lipases are not comparable with plant and animal ones in terms of activity, yield, ease of purification, molecular modifications, and continuous production independent of season and stability. The environment where microorganisms are isolated occasionally confers some characteristics to these enzymes. A *Staphylococcus aureus* strain isolated from an Algerian biotope secretes a non-induced lipase in the culture medium. The *S. aureus* lipase (SAL) was purified to homogeneity. Pure SAL is a monomeric protein (43 kDa). The 20 N-terminal amino acid residues showed a high degree of homology with other staphylococcal lipase sequences. SAL presents specific activities of about 1600 U/mg or 555 U/mg using tributyrin and olive oil emulsion as substrates, respectively. In contrast to other staphylococcal lipases previously characterized, SAL was stable at a pH range from 6 to 9 after 1 h incubation and retained 50% of its activity after 10 min incubation at 50°C. The purified enzyme was also characterized using monolayer technique. Lipase activity can be measured only when the surface pressure exceeds 15 mN/m. SAL showed, a preference for the distal ester groups of the diglyceride isomers at low surface pressure, for the adjacent ester groups at high surface pressure and a preference for the *sn*-3 position of the 2,3-*sn*-enantiomer of dicaprin. The critical surface pressure (π_c) measured with monomolecular films of egg-PC was estimated to 33 mN/m. Cloned and sequenced gene part encoding the mature lipase shows, in comparison with *Staphylococcus aureus* lipase 3 (SAL3), a deletion of three residues (LKA) at the N-terminal extremity and a substitution a glycine 208 and isoleucine 226 with an arginine and leucine, respectively.

Keywords: *Staphylococcus aureus* lipase, pH-stat, Baro-stat, regioselectivity, stereoselectivity

Introduction

Introduction

Les lipases appartiennent à la famille des enzymes lipolytiques qui catalysent l'hydrolyse d'un grand nombre d'esters d'acides gras plus particulièrement les triacylglycérols. Les lipases sont parfaitement solubles dans l'eau agissant sur des substrats insolubles. Cette biocatalyse hétérogène suppose un phénomène en deux étapes : adsorption de l'enzyme à la surface insoluble, suivie de la catalyse proprement dite (Verger *et al.*, 1973).

Les lipases forment une classe hétérogène de par leurs origines, qu'elles soient animale, végétale ou microbienne. Elles sont produites sous forme de protéines extracellulaires (Alloue *et al.*, 2008). Les lipases pancréatiques de mammifères sont les enzymes lipolytiques les mieux étudiées. Cependant, les potentialités que présentent les lipases de microorganismes (production, purification à grande échelle...) ont focalisé l'intérêt vers ces enzymes. Les lipases microbiennes ont l'avantage d'être disponibles en grande quantité et à faible coût, d'être sélectives vis à vis de leurs substrats et de ne pas nécessiter de cofacteurs. L'utilisation de ces enzymes dans les applications industrielles est devenue de plus en plus importante grâce à une meilleure connaissance de leurs propriétés intrinsèques mais aussi au développement des techniques de purification, de mutagenèse dirigée et à l'utilisation de nouveaux systèmes d'expression.

La polyvalence réactionnelle des lipases et la diversité de leurs propriétés catalytiques leur confèrent une place de choix pour des applications industrielles potentielles, telles que la confection de produits alimentaires, de détergents, de produits pharmaceutiques et cosmétiques. L'utilisation des lipases dans ces nombreux secteurs nécessite une formulation préalable (Alloue *et al.*, 2008).

Habituellement, les enzymes ne sont pas stables dans les solvants organiques et elles tendent à se dénaturer et perdre leurs activités. Mais les lipases restent stables et actives dans les solvants organiques sans stabilisateur. Les substrats de la lipase sont souvent insolubles ou partiellement solubles dans l'eau et ainsi l'utilisation des solvants organiques ou des solutions organique – aqueuses est en faveur de quelques réactions en raison de sa capacité de catalyser ces solvants. Beaucoup de nouvelles applications

biotechnologiques des lipases ont été identifiées. Une des applications est la synthèse des médicaments et des intermédiaires chirals (Singh et Benarjee, 2005).

Dans le présent travail, notre démarche scientifique vise les objectifs suivants :

- L'isolement et l'identification d'espèces lipolytiques à partir de biotope algérien.
- L'optimisation par la suite des conditions de culture dans le but d'atteindre un maximum de production de l'activité lipasique.
- La purification à homogénéité de la lipase.
- Enfin, la caractérisation biochimique et moléculaire de cette lipase

Etude
Bibliographique

I. Les lipides

1. Définition

Les lipides (du Grec Lipos, graisses) constituent une classe de molécules biologiques organiques solubles dans les solvants organiques et qui se distinguent des autres composants de la matière vivante par leur insolubilité dans l'eau. Les lipides forment un groupe de composés ayant des structures chimiques très hétérogènes qui ont été réunis sur le seul critère de solubilité dans les solvants organiques (éther, acétone, chloroforme, benzène, etc....) (Gurr *et al.*, 1971). On inclut dans les lipides : les graisses, les huiles, les cires et certaines substances qui leur sont apparentées (stérois, stéroïdes, terpènes, etc.). Parce qu'ils ne sont pas chargés électriquement, les glycérides (acylglycérols) ainsi que le cholestérol et ses esters sont appelés lipides neutres. Chez les êtres vivants, les lipides assurent quatre fonctions principales:

- ✓ Les glycérides et les cires constituent des réserves énergétiques
- ✓ Les phospholipides constituent les éléments structuraux universels des biomembranes
- ✓ Certains lipides agissent comme les seconds messagers intra et inter cellulaires tels que les facteurs d'activation des plaquettes (PAF), les hormones etc....
- ✓ Certains lipides sont doués d'une activité biologique essentielle comme certaines vitamines liposolubles (A, D, E, K).

2. Classification et structure

Small. (1968), a classé les lipides en deux grands groupes:

2.1. Lipides non polaires : Cette classe de lipide est totalement insoluble dans l'eau et ne forme pas de couches monomoléculaires. On trouve dans cette catégorie les hydrocarbures ramifiés ou insaturés ainsi que les composés terpéniques (comme le carotène, le limonène, le géraniol ou encore le squalène) (Figure1).

2.2. Lipides polaires: Les lipides de ce groupe s'étalent partiellement à la surface de l'eau en formant des films monomoléculaires stables. Small. (1968), a subdivisé ce groupe en trois classes :

2.2.1 Classe I: Cette classe comprend des lipides ne présentant pas le phénomène de gonflement. Ils forment des films monomoléculaires stables à l'interface eau/air (TAG, DAG, phytols, rétinols, vitamines A, K et E, les cires et les stérois).

2.2.2 Classe II : Cette classe comprend des molécules amphiphiles insolubles dans l'eau et qui s'étalent également à la surface de l'eau pour former des couches monomoléculaires stables (exemples : phospholipides, monoacylglycérols et acides gras). Ces lipides s'hydratent et gonflent pour former des phases lyotropes (cristallines liquides) bien définies. Ils peuvent donner naissance par exemple à des vésicules appelées liposomes. Il s'agit de bicouches lipidiques closes, sphériques et concentriques, séparées les unes des autres par des couches d'eau. Ces vésicules sont visibles au microscope électronique (Bangham et Horne, 1964).

2.2.3 Classe III : Cette classe comprend des lipides polaires solubles dans l'eau et qui forment des couches monomoléculaires instables à l'interface air-eau en équilibre avec des molécules à l'état de solution monomérique dans la phase aqueuse. Lorsque la concentration en lipides polaires de classe III excède la concentration micellaire critique (CMC), ces lipides s'organisent de manière à minimiser le contact entre leurs parties apolaires et le milieu aqueux : ils forment alors des micelles. On trouve dans cette catégorie les détergents cationiques, anioniques, non ioniques ainsi que les lysophospholipides, acides gras ionisés et les sels biliaires.

Récemment, une nouvelle classification des lipides basée, non plus sur leurs propriétés, mais sur leur natures chimiques a été proposée par Fahy *et al.*, (2005). Cette classification consiste à subdiviser les lipides en 8 classes : acides gras (FA), lipides glycéridiques (GL), phospholipides glycéridiques (GP), sphingolipides (SP), lipides stéroïdique (ST), lipides prenoliques (PR), saccharolipides (SL) et les polyketides (PK). Cette classification a pour but de faciliter la communication entre les scientifiques. Tous les lipides et leurs métabolites sont disponibles sur une banque de données (<http://www.lipidmaps.org>). Un vocabulaire universel est utilisé pour nommer les lipides disponibles dans cette base de données (Fahy *et al.*, 2005).

Une autre classification des lipides basée sur trois classes principales (lipides simples, lipides complexes et protéolipides) a été proposée. Des documents additionnels sur cette classification peuvent être trouvés dans la banque de données CYBERLIPID (<http://www.cyberlipid.org>).



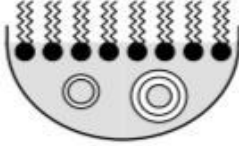
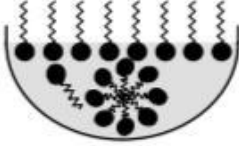
Lipides non polaires	Totalement insolubles dans l'eau Ne forment pas de films monomoléculaires  Hydrocarbures paraffiniques et aromatiques, carotène, cholestane, etc...		
	Classe I	Classe II	Classe III
Lipides polaires	Forment des films monomoléculaires stables: <ul style="list-style-type: none"> • Triglycérides • Diglycérides • Cholestérol Ne présentent pas le phénomène de gonflement 	Forment des films monomoléculaires stables: <ul style="list-style-type: none"> • Phospholipides • Monoglycérides • Acides gras ionisés Présentent le phénomène de gonflement 	Forment des films monomoléculaires instables: <ul style="list-style-type: none"> • Sels biliaires • Lysophospholipides Présent sous forme de micelles et de monomères 

Figure 1 : Représentation schématique du comportement des lipides en présence d'eau et à l'interface air/eau (Small, 1968).

3. Auto-organisation des lipides en phase aqueuse

3.1. Couches monomoléculaires

Si l'on dépose à l'interface air-eau un lipide polaire, dissous dans un solvant organique volatil, il se forme après évaporation du solvant, une monocouche de lipides. Les parties hydrophobes sont orientées du côté air et les parties hydrophiles du côté eau (Figure 2).

Durant la compression isotherme d'un tel film, différentes phases lipidiques peuvent être observées. On distingue ainsi les films gazeux, liquides expansés et les films solides. La pression de surface à partir de laquelle le lipide ne peut plus être comprimé est appelée pression d'affaissement ou « pression de collapse ». Au-delà de cette pression, le film n'est plus monomoléculaire et les molécules peuvent se chevaucher puisque la surface est saturée.

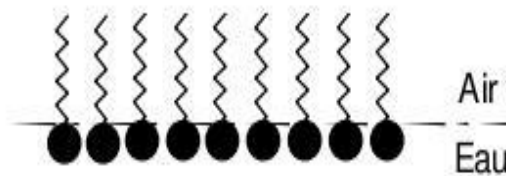


Figure 2: Organisation des lipides en films monomoléculaires à l'interface air-eau.

3.2. Emulsions

L'émulsification en milieu aqueux d'un lipide de la classe I (triacylglycérols, diacylglycérols et le cholestérol) est un processus physico-chimique qui provoque une augmentation considérable de la surface de contact lipide-eau (Figure 3A). Ainsi, la surface d'une goutte d'huile initiale de 1cm de diamètre est augmentée d'un facteur 10^4 au cours de l'émulsification en particules de 1 μm de diamètre. Les émulsions de TG purs dans l'eau ne sont en général pas stables et une coalescence est rapidement observée si une agitation mécanique n'est pas maintenue. Divers émulsifiants (la gomme arabique) peuvent être utilisés pour stabiliser les émulsions. *In vivo*, les émulsions de TG sont stabilisées principalement par la présence de phospholipides et de protéines amphiphiles alimentaires (Linthorst *et al.*, 1977).

3.3. Liposomes

Les lipides de classe II (phospholipides, sphingolipides, monoacylglycérols et acides gras ionisés) présentent en phase aqueuse un phénomène de gonflement. Ils forment des structures en bicouches lipidiques closes, sphériques et concentriques, séparées les unes des autres par des couches d'eau. Ces structures sont appelées liposomes ou vésicules et sont très bien visualisées en microscopie électronique (Bangham et Home, 1964). Les différentes formes de liposomes sont les suivantes (Dennis, 1983) :

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

Liposomes unilamellaires de grande taille (LUV pour Large Unilamellar Vesicles) : ce sont des liposomes (macrovésicules) de diamètre variant de 200 nm à 1000 nm. Les LUV sont préparés à partir d'une fine couche de phospholipides qui est lentement hydratée par une solution aqueuse dépourvue d'électrolytes.

Liposomes unilamellaires de petite taille (SUV pour Small Unilamellar Vesicles) : ce sont des bicouches continues (ou microvésicules) de phospholipides d'environ 25 nm de diamètre. Les SUV s'obtiennent par exemple par un traitement aux ultra-sons des MLV (Figure 3B).

3.4. Micelles

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

Lorsque les lipides polaires sont mis en suspension, en présence d'une faible quantité d'eau et d'un excès de solvant organique, il se forme des micelles inverses : les parties hydrophobes sont orientées en direction du solvant organique et les parties polaires vers la phase aqueuse, piégeant ainsi dans le cœur de la micelle un microenvironnement aqueux. Les micelles sont en équilibre dynamique, c'est-à-dire qu'il existe des échanges rapides des molécules amphiphiles d'une micelle à l'autre ainsi qu'avec les monomères présents dans le solvant organique environnant (Figure 3C).

Quant aux sels biliaires, ils peuvent former des micelles mixtes avec certains lipides polaires, comme les phospholipides et les produits d'hydrolyse des TAG. *In vitro*, on peut former des micelles mixtes en ajoutant aux phospholipides des détergents tels que le Triton X-100 (Dennis, 1973) ou les sels biliaires (Nieuwenhuisen *et al.*, 1974).

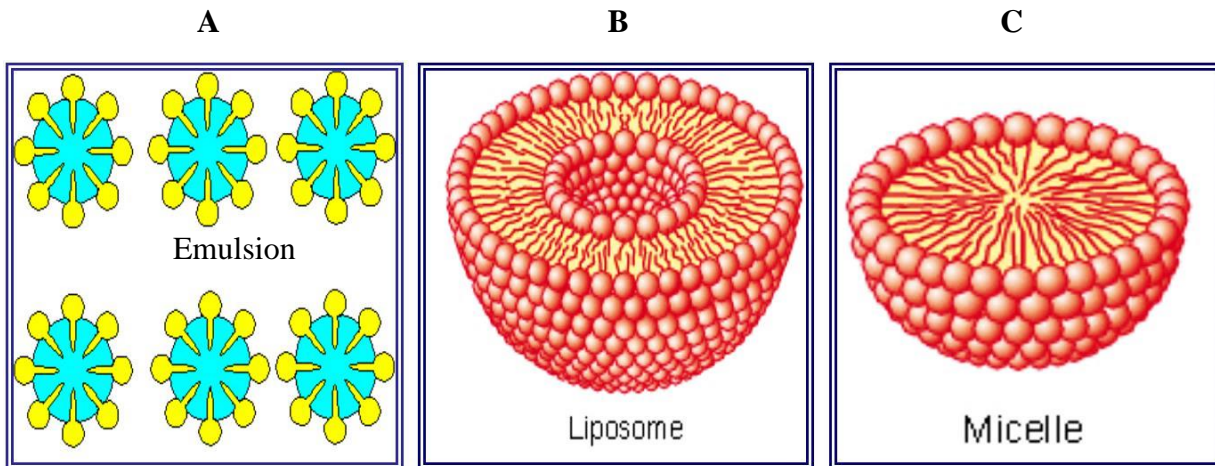


Figure 3: Représentation schématique d'une émulsion (A), d'un liposome unilamellaires de petite taille (Small Unilamellar Vesicles : SUV) (B) et d'une micelle (C). Pour la clarté de la figure, l'échelle de taille n'est pas respectée (Linthorst *et al.*, 1977 ; Dennis, 1983).

3.5 Cristaux liquides

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

II. Les lipases

1. Définition

Les lipases, ou triacylglycérols hydrolases (EC 3.1.1.3), font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques (Verger, 1984). Elles hydrolysent les fonctions esters des triacylglycérols (TG) à chaînes longues hydrocarbonés et insolubles dans l'eau pour libérer des acides gras. La figure 4 montre les trois liaisons esters carboxyliques des TG potentiellement hydrolysables par les lipases.

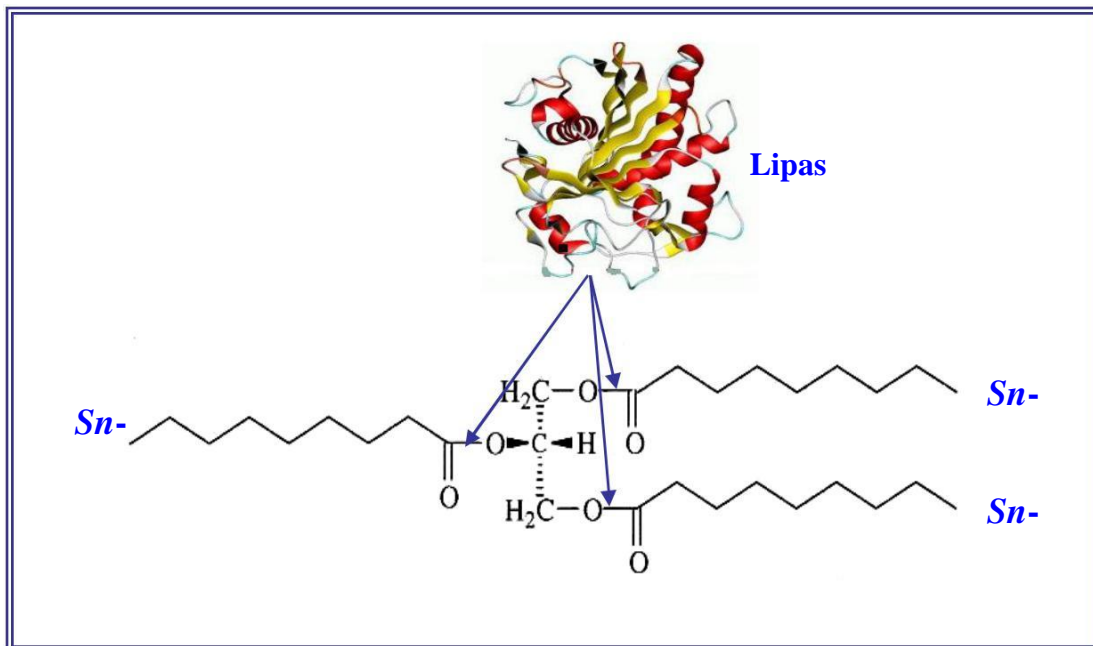


Figure 4: Hydrolyse des liaisons esters des triacylglycérols par les lipases. Identification des liaisons esters hydrolysables par une lipase (Verger, 1997).

Les lipases ont des origines variées : on les trouve dans le monde animal (organes digestifs, tissus adipeux, système vasculaire, lymphatique et lysosomes) aussi bien que dans le monde végétal (graines oléagineuses) ou encore microbien (bactéries et champignons) (Carrière *et al.*, 1993, Dominguez de Maria *et al.*, 2005).

Les lipases ont été mises en évidence, dès 1901, chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens* (maintenant dénommées respectivement *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*) (Eijkmann *et al.*, 1901). Cependant, ce n'est qu'à partir de la fin des années 1950 que l'étude des lipases a réellement pris son essor, notamment avec les travaux de l'équipe de Pierres Desnuelle à Marseille sur la lipase pancréatique de porc. Cet enzyme a servi de modèle pour la définition des lipases car elle fut la première disponible en quantité importante. Le fait qu'elle montrait une activité particulièrement élevée sur les triglycérides (huile d'olive, beurre,...) a conduit au choix du terme de triacylglycérol hydrolase (EC.3.1.1.3) comme dénomination officielle des lipases (Commission internationale des enzymes : « International Union of Biochemistry », IUB. (*Enzyme Nomenclature*, Academic Press, New York, 1979). La masse

moléculaire (MM) des différentes lipases varie de 20 kDa (lipase de *Streptococcus fecalis*) à 120 kDa (lipase de *Chromobacterium viscosum*) (Sugiugara *et al.*, 1974b).

2. Propriétés cinétiques

2.1 Modèle cinétique interfaciale

Le modèle de Michaelis-Menten a été conçu pour l'enzymologie en milieu homogène. C'est à dire lorsque la réaction enzymatique se déroule dans une phase unique dans laquelle l'enzyme et le substrat sont solubles. Pour l'étude des enzymes lipolytiques qui agissent à l'interface lipide/eau (enzymologie en milieu hétérogène), ce modèle ne peut pas être appliqué car on passe d'un système tridimensionnel ou volumique, à un système bidimensionnel ou surfacique. Pour rendre compte des propriétés particulières des lipases, Verger et de Haas ont proposé un modèle cinétique interfaciale (Figure 5) (Verger et Haas, 1973).

La réaction enzymatique peut être décomposée en deux étapes élémentaires :

- Une première étape d'adsorption de l'enzyme (E) à l'interface (E^*). Cette réaction partielle est régie par deux constantes de vitesse k_p et k_d représentant respectivement l'adsorption de l'enzyme à l'interface et sa désorption.
- Une deuxième étape catalytique proprement dite. Elle résulte de la formation d'un complexe enzyme-substrat (E^*S), ayant la dimension d'une concentration surfacique (mole.cm^{-2}). Cette étape catalytique est alors analogue à une pseudo-réaction de Michaelis et Menten se déroulant à l'interface et non en solution. Les formes enzymatiques présentes à l'interface sont notées avec un astérisque (E^*) afin de les différencier des formes enzymatiques solubles dans la phase aqueuse (E).

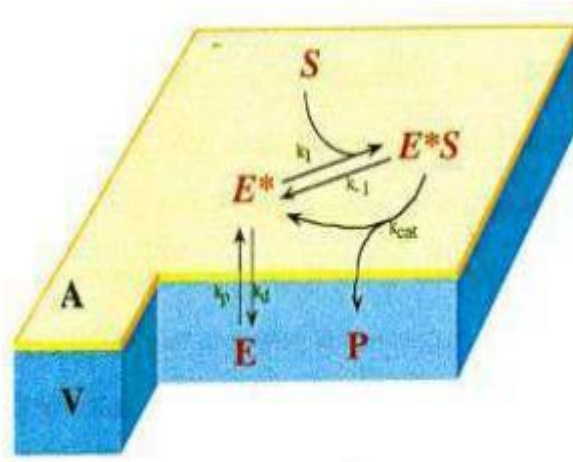


Figure 5 : Modèle cinétique interfaciale (Verger et de Haas, 1973). A : air, V : volume, P : Produit, S : Substrat.

2.2 Le volet amphiphile et l'activation interfaciale

Les lipases sont une famille particulière d'estérases active sur les triacylglycérols insolubles et possédant la propriété d'activation interfaciale (Sarda et Desnuelles, 1958). En solution moléculaire vraie, c'est-à-dire en dessous de la concentration micellaire critique du substrat (CMC), les vitesses d'hydrolyse sont faibles. Par contre au dessus de cette concentration critique, les molécules de substrat prennent la forme de micelles, d'une émulsion ou d'un film monomoléculaire aboutissant à la formation d'une interface lipide/eau. La formation de cette interface a pour conséquence une augmentation brutale de la vitesse de lipolyse (Sarda et Desnuelles, 1958 ; Verger *et al.*, 1973). C'est ce qu'on appelle le phénomène d'activation interfaciale. Cette propriété cinétique a longtemps servi de critère pour discriminer les lipases des estérases (figure 6).

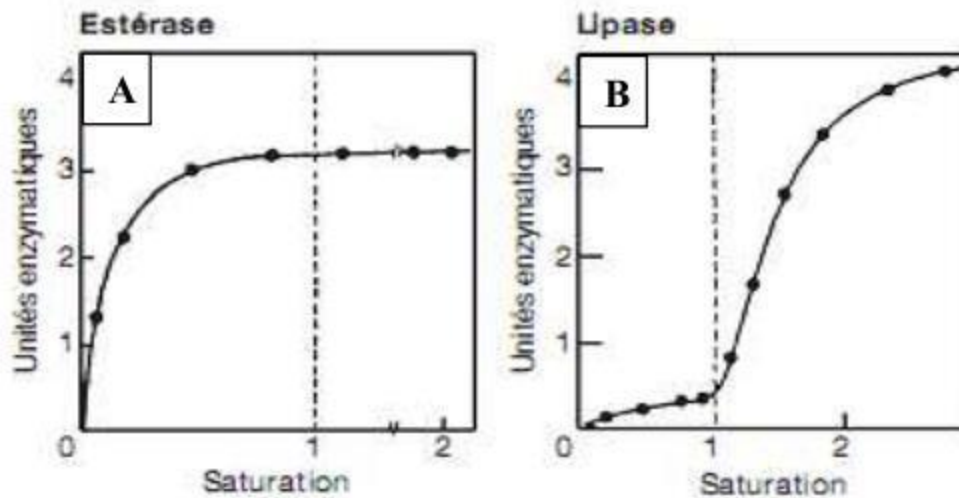


Figure 6 : Cinétique d'hydrolyse de la triacétine par la lipase pancréatique de porc et par l'estérase du foie de cheval (Sarda et Desnuelle, 1958). La ligne en pointillés désigne la limite de séparation entre la forme monomérique et la forme agrégée de la triacétine. La concentration de substrat est exprimée en multiples de saturation.

Pour expliquer le phénomène d'activation interfaciale de la lipase pancréatique de porc, l'hypothèse d'une modification conformationnelle de l'enzyme au cours de sa fixation à l'interface a été proposée par Desnuelle *et al.*, (1960). Ce n'est qu'en 1990, grâce à la résolution des structures tridimensionnelles de la lipase pancréatique humaine (HPL) (Winkler *et al.*, 1990) et la lipase fongique de *Rhizomucor miehei* que cette hypothèse a été confirmée au niveau structural (Brady *et al.*, 1990).

En effet, les premières structures tridimensionnelles des lipases (Brady *et al.*, 1990 ; Winkler *et al.*, 1990) ont permis de supposer que le phénomène d'activation interfaciale pourrait être dû à la présence d'une boucle peptidique amphiphile appelée volet, recouvrant le site actif de l'enzyme en solution. Lors de l'interaction avec une interface lipide/eau, ce volet subirait un réarrangement conformationnel, découvrant ainsi le site actif (Derwenda *et al.*, 1992 ; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Lorsque l'enzyme est au contact d'une interface eau/lipides, ce volet s'écarterait permettant la fixation du substrat et son hydrolyse (Brzozowski *et al.*, 1991; Brzozowski *et al.*, 2000). En absence d'interface, une très faible activité est observée. On suppose que le volet cacherait alors le site actif. Le mouvement du volet est mis en évidence par la cristallisation des lipases en présence d'un inhibiteur qui

mime les substrats à l'intérieur du site actif et le mouvement du volet qui couvre le site actif est clairement déterminé (Brzozowsk *et al.*, 1991 ; Derewenda *et al.*, 1992).

Cependant, ce phénomène n'est pas présent chez toutes les lipases. Les cas les plus représentatifs sont ceux de *Pseudomonas glumae* (Deveer, 1992 ; Noble *et al.*, 1993), de *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger *et al.*, 1993 ; Jaeger *et al.*, 1994) qui possèdent pourtant un volet amphiphile recouvrant le site actif. Il a été montré aussi qu'il existe des lipases qui possèdent un volet hydrophobe recouvrant le site actif comme la lipase de *Candida antarctica A* (Uppenberg *et al.*, 1994) mais ne présentent pas le phénomène d'activation interfaciale. De même, la cutinase de *Fusarium solani pisi*, sans "lid", ne possède pas le phénomène d'activation interfaciale. D'autres lipases, comme celle de *Staphylococcus hyicus*, présentent le phénomène d'activation interfaciale avec certains substrats seulement (Van Oort *et al.*, 1989). Donc le critère d'activation interfaciale n'est pas toujours relié à la présence du volet. Selon Ferrato *et al.* (1997), c'est plutôt la capacité d'hydrolyser les TG à chaînes longues qui est le critère expérimental le plus fiable pour identifier une lipase.

3. Propriétés structurales des lipases

C'est au début des années 1980 que les premières lipases et estérases ont été purifiées, caractérisées et cristallisées. A ce jour, plusieurs centaines de séquences sont répertoriées dans les bases de données.

Les lipases sont des enzymes très variables par leurs origines et leurs spécificités de substrat (Cygler *et Schrag*, 1999). Les premières structures cristallographiques résolues ont été celle de la lipase du champignon filamenteux *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) et celle de la lipase pancréatique humaine (Winkler *et al.*, 1990). Depuis, un grand nombre de structure tridimensionnelle de différentes lipases d'origine variée a été résolu.

3.1 Un repliement α/β

Le repliement α/β est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases. Ces enzymes ont en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins β connectés par 6 hélices α (Ollis *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 domaine catalytique de la HPL (résidus 1-336) possède une structure du type α/β hydrolase comprenant 11 brins β et 7 hélices α .

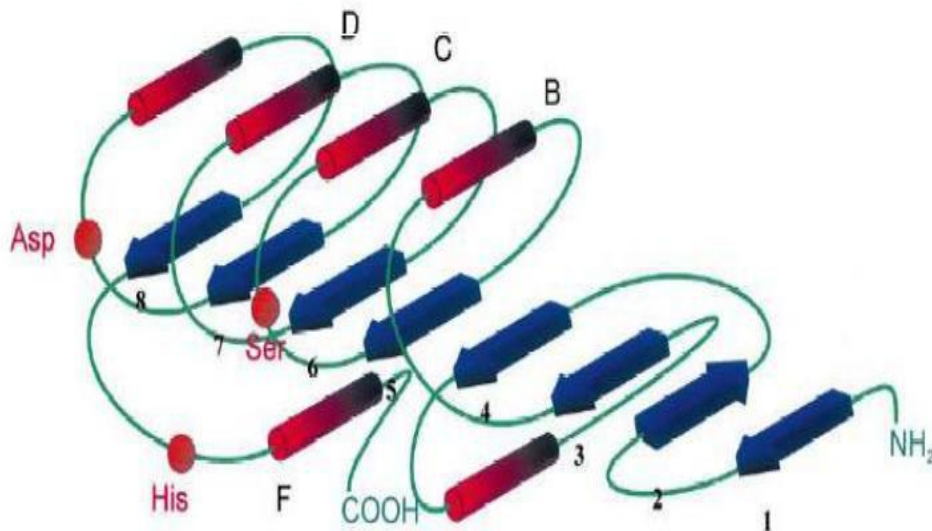


Figure 7 : Représentation de la structure secondaire du repliement α/β des hydrolases (Bornscheuer, 2002a). Les brins (1 à 8) sont représentés par des flèches bleues et les hélices (A à F) par des cylindres rouges. Le positionnement relatif des acides aminés de la triade catalytique est indiqué par des points rouges.

3.2. Une triade catalytique

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

4. Mécanisme d'action catalytique

Le mécanisme d'action des lipases a été exploité à partir de celui proposé dans le cas de la chymotrypsine (Blow *et al.*, 1969). Ce mécanisme réactionnel met en jeu les étapes d'acylation et de déacylation de l'enzyme. L'acylation provient de l'attaque nucléophile d'une des fonctions ester carboxyliques du substrat par la sérine de la triade catalytique (Figure 8). Le groupement hydroxyle de la sérine activé par le réseau de relais de charge Ser-His-Asp, attaque le carbone de la fonction ester carboxylique du substrat pour former un premier

intermédiaire tétraédrique. Des liaisons hydrogènes entre l'oxygène chargé négativement (oxyanion) de l'intermédiaire tétraédrique et des groupes N-H peptidiques stabilisent la charge négative de l'oxyanion. Au cours de cette catalyse acido-basique, la liaison ester carboxylique est rompue et le groupement alcool partant (le diacylglycérol lorsque le substrat est un triacylglycérol) emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine. La chaîne acyle de la liaison ester du substrat reste liée de façon covalente à l'enzyme sous forme d'un intermédiaire acyl-enzyme. La désacylation provient de l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur cet intermédiaire acyl-enzyme pour donner un deuxième intermédiaire tétraédrique. Ce dernier se dissocie en libérant un acide carboxylique (acide gras) et en restituant la lipase dans son état initial. Dans les deux étapes d'acylation et de déacylation, le trou de l'oxyanion est nécessaire à la stabilisation des intermédiaires réactionnels.

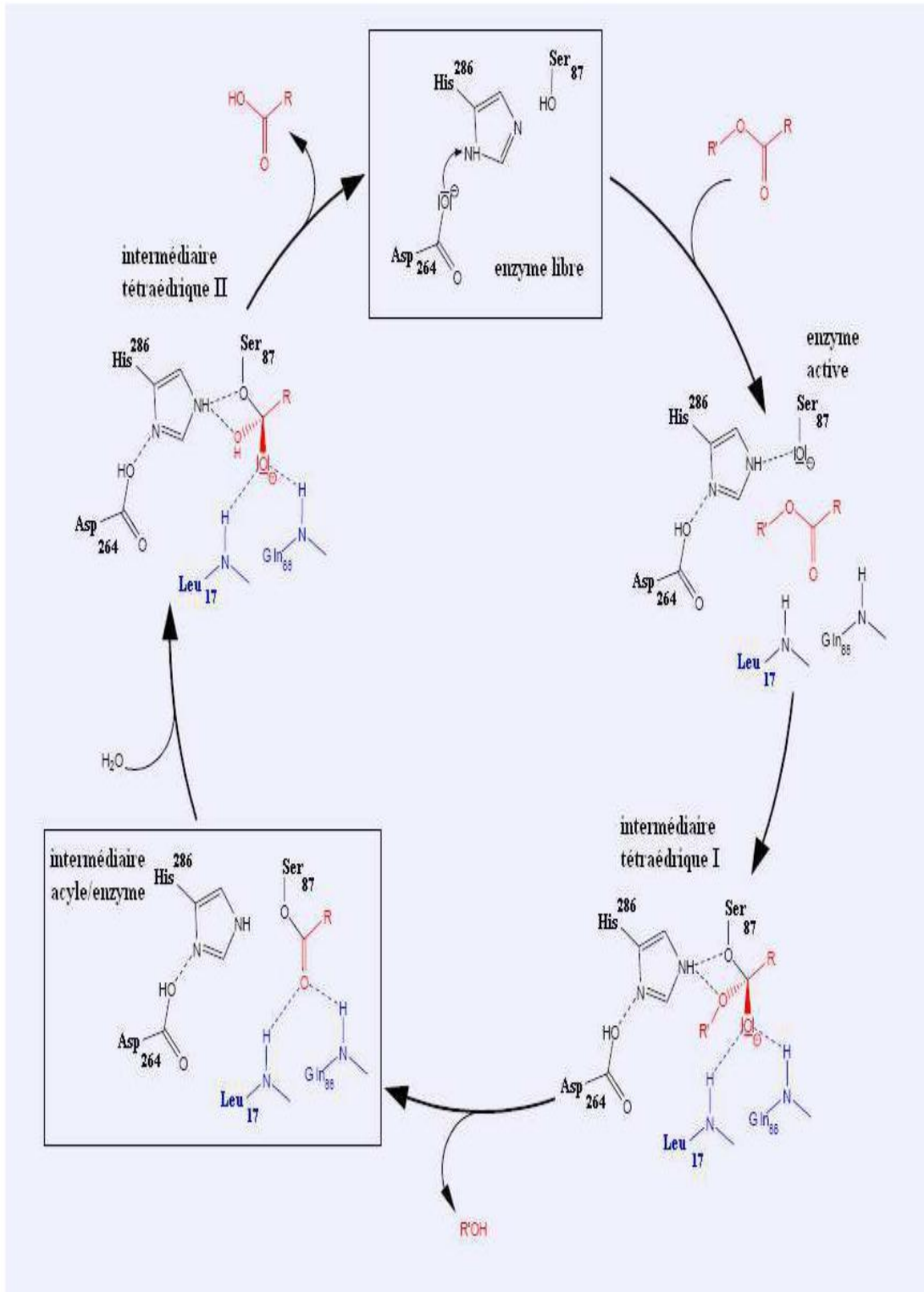


Figure 8: Schématisation de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique d'après Beer *et al.*, (1996).

5. Comportement des lipases aux interfaces : Technique des films monomoléculaires

Le dépliement et la dénaturation des protéines présentes aux interfaces lipide/eau sont des phénomènes très connus dans la chimie des surfaces (James et Augenstein, 1966; McLaren et Packer, 1970). Aux pressions de surface faibles, c'est-à-dire à des hautes tensions interfaciales, les enzymes subissent une dénaturation interfaciale irréversible (Gargouri *et al.*, 1995). Cette dénaturation peut être évitée en augmentant la pression de surface par l'ajout de composés amphiphiles. La technique des films monomoléculaire a été développée pour étudier les interactions lipides/protéines à l'interface ainsi que le comportement des enzymes lipolytiques à l'interface et en fonction de la pression de surface (Verger et de Hass, 1973, 1976; Gargouri *et al.*, 1985, 1989b; Piéroni *et al.*, 1990; Ransac *et al.*, 1991).

Cette technique a permis de déterminer la régiosélectivité, la typosélectivité et l'énantiosélectivité des lipases de mammifères et de microorganismes. En effet, Rogalska *et al.*, (1995) ont étudié la stéréo et la régiosélectivité de lipases d'origine animale et microbienne en utilisant des isomères de dicaprine optiquement purs étalés en films monomoléculaires à l'interface air/eau. Les lipases testées sur le 1,2-, le 2,3- et le 1,3-*sn*-dicaprine ont montré une variation de leur stéréosélectivité en fonction de la pression de surface. Cette différenciation est plus prononcée à haute pression de surface. En effet, les changements de conformation de la lipase sont les résultats des interactions de l'enzyme avec les lipides qui peuvent affecter la spécificité des enzymes. Douchet *et al.* (2003) ont classé les lipases en deux groupes : le premier groupe comprend les lipases capables d'hydrolyser la position *sn*-2 des triacylglycérols alors que le deuxième groupe regroupe les lipases incapables d'hydrolyser cette position.

La technique des films monomoléculaires a permis aussi d'étudier les interactions qui peuvent intervenir entre le complexe lipide/protéine à l'interface. En effet, Point *et al.* (2012) ont étudié l'effet inhibiteur d'un composé néosynthétisé sur des lipases pancréatiques. Les résultats obtenus montrent que ce composé inhibe ces lipases de manière similaire à l'orlistat, un médicament anti-obésité. De même, Bénarouche *et al.*, ont caractérisé l'inhibition réversible de la lipase gastrique par l'orlistat (Bénarouche *et al.*, 2014). Cette technique a été utilisée pour déterminer l'effet de l'expression hétérologue sur les propriétés interfaciales des lipases de Staphylocoques (Sayari *et al.*, 2007 ; Horchani *et al.*, 2010; Bou Ali *et al.*, 2014).

6. Spécificité des lipases

Une classification des lipases peut être faite selon leurs spécificités (Jensen *et al.*, 1983; Jensen *et al.*, 1990). Dans de nombreuses applications industrielles, ce critère est important. Les lipases présentent différentes sélectivités par rapport à leurs substrats :

6.1. La régiosélectivité

La régiosélectivité est une spécificité de position. Les lipases ont la capacité d'hydrolyser préférentiellement des acides gras en position 1, 2 ou 3 (*sn1*, *sn2*, *sn3* spécifique respectivement) (Rogalska *et al.*, 1993). Par contre, d'autres lipases hydrolysent indifféremment toutes les liaisons ester au sein de la molécule de TG, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. En effet, la cristallisation de la lipase de *Burkholderia cepacia* révèle la présence de 4 poches ou cavités, l'une étant celle du trou oxyanion, les trois autres accueillant les chaînes carbonées des acides gras en position *sn1*, *sn2* et *sn3* tandis que celles de *Pseudomonas fragi* et de *P. geniculata* sont spécifiques des positions *sn1* et *sn2*. Les lipases de *P. glumae* et *P. fluorescens* semblent quant à elles être spécifiques de la position *sn2* (Jeager *et al.*, 1994).

6.2. La stéréosélectivité

C'est la discrimination entre les positions *sn-1* et *sn-3* des triacylglycérols. L'étude de la stéréosélectivité de 25 lipases d'origines animale et microbienne a permis d'établir une classification de ces enzymes totalement indépendante de leurs origines biologiques (Rogalska *et al.*, 1995). La plupart des lipases testées manifestent une préférence pour la position *sn-1* à l'exception des lipases gastriques qui préfère la position *sn-3*.

Pleiss *et al.*, (2000) ont mis en évidence l'importance de l'histidine catalytique et de la position *sn 2* du triglycéride dans la stéréosélectivité des lipases. Ils ont aussi mis en évidence un motif structural appelé « fossé histidine » formé par l'histidine catalytique et un autre acide aminé. Ainsi, la stéréosélectivité pourra être affectée soit par la rigidité du substituant *sn 2* soit par la forme du fossé histidine. La forme du site actif et notamment le positionnement de certaines boucles aura aussi un rôle dans la stéréopréférence.

6.3. L'énantiosélectivité

Les lipases sont utilisées dans de nombreuses applications pour réaliser la résolution de mélanges racémiques. L'énantiosélectivité est la capacité d'une lipase à discriminer entre deux énantiomères d'un mélange racémique (1,2- contre 2,3-*sn*-diacylglycerol). De nombreux exemples de l'aptitude des lipases à distinguer les énantiomères de diverses molécules organiques chirales ont été décrits dans la synthèse d'esters à propriétés aromatiques (Lutz *et al.*, 1992). L'énantiosélectivité peut être mesurée par le ratio énantiomérique E qui représente le rapport des vitesses initiales de conversions des deux énantiomères.

6.4. La typosélectivité

La typosélectivité est la préférence à un type d'acide gras donné. Les lipases peuvent reconnaître différemment les acides gras selon leur degré d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée. La lipase de *G. candidum* est ainsi spécifique des acides cis 9 insaturés, et ceci quelque soit leur position sur le glycérol (Grochulski *et al.*, 1993).

7. Origines et classification 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 micro-organismes, très souvent sous forme de protéines extracellulaires.

7.1. Les lipases microbiennes

Les lipases de mammifères ont été parmi les premiers enzymes étudiées et caractérisées (Sarda et Densuelle, 1958 ; Verger, 1984). Cependant, les lipases microbiennes sont souvent perçues comme une importante et intéressante classe d'enzyme pour le monde industriel. Cet intérêt provient principalement du fait qu'elles sont stables dans les solvants organiques, ne nécessitent pas de cofacteur, possèdent une large gamme de spécificités de substrats, peuvent être utilisées en tant qu'hydrolases ou comme catalyseurs en synthèse organique et montrent une grande sélectivité dans les réactions mises en œuvre. Ces caractéristiques permettent d'utiliser les lipases dans plusieurs applications biotechnologiques et d'obtenir une variété de molécules à haute valeur ajoutée.

7.1.1. Les lipases fongiques

Les lipases fongiques ont l'avantage d'être disponibles en grande quantité, à faible coût et de ne pas nécessiter la présence de cofacteur pour leur activité. De plus, la majorité des lipases secrétées par les champignons sont libérées sous formes solubles dans le milieu de culture. Ces lipases sont facilement séparables du mycélium par simple filtration ou centrifugation (Sallah *et al.*, 1993). Ainsi, l'utilisation de ces enzymes pour la production de nouvelles molécules est une stratégie prometteuse dans divers secteurs industriels.

Le tableau 1 présente quelques espèces fongiques qui produisent des lipases extracellulaires utilisées dans diverses applications industrielles.

Tableau 1:Exemples de lipases de champignons disponibles sur le marché (Schmid et Verger, 1998 ; Bornscheuer et Kazlauskas, 1999).

Origine	Autres noms	Applications
<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>	Synthèse organique
<i>Candida antarctica a</i>	-	
<i>Candida antarctica b</i>	-	Synthèse organique
<i>Canadia lipolytica</i>	-	
<i>Geotricum candidum</i>		Oléochimie
<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Détergents
<i>Rhizomucor michei</i>	<i>Mucor michei</i>	Transésthérification
<i>Rhizomucor javanicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	-	Fromagerie
<i>Aspergillus orizae</i>	-	
<i>Penicillium camambertii</i>	-	Monoglycérides
<i>Penicillium roquefortii</i>	-	Oléochimie
<i>Rizopus orizae</i>	<i>R.javanicus R. delemar R. niveus</i>	

7.1.2. Les lipases bactériennes

Comme les lipases de champignons, les lipases bactériennes ont l'avantage d'être disponibles en grande quantité et à faible coût, d'être sélectives vis-à-vis de leurs substrats et de ne pas nécessiter de cofacteurs. En effet, de nombreuses lipases bactériennes ont été purifiées et caractérisées (Leli *et al.*, 2005 ; Sekhon *et al.*, 2005 ; Zaliha *et al.*, 2005 ; Kanwar *et al.*, 2006).

Le tableau 2 représente certaines lipases bactériennes isolées, purifiées et caractérisées.

Souches	MM (kDa)	pH optimum	Température optimale (°C)	Stabilité en fonction du pH	Activité spécifique (U/mg)	Autres caractéristiques	Références
<i>Chromobacterium viscosum</i> Lipase A	120	7	60	4 - 9 (37 °C, 20 min)	135,8	- Se présente sous forme de deux sous-unités de masses moléculaires 80 et 50 kDa.	Sugiugara & Isobe., 1974a.
Lipase B	24	6,5	65	4 - 11	5780	- un seul monomère.	Sugiugara & Isobe., 1974b.
<i>Burkholderia cepacia</i>	34	9	65	5-10	4910	-Alcaline et thermostable	Ishimoto <i>et al.</i> , 2001.
<i>Bacillus stearothermophilis</i> MC7	62.5	7.5-9	75-80	7-11	12	-thermostable	Kambourova <i>et al.</i> , 2003.
<i>Bacillus megaterium</i> AKG1	35	7	55	6,5-8	414	-thermostable	Sekhon <i>et al.</i> , 2005.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	8	60	7-9	84	-Thermostable	Singh & Banerjee, 2005
<i>Pseudomonas sp strain</i> S5	60	9,0	45	6-9	1240	-Alcaline	Rahman <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus coagulans</i> MTCC-6375	103	8,5	45	-	1,98	- Temps de ½ vie est de 20 min à 55°C.	Kanwar <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus thermoleovorans</i> CCR11	11	10	60	-	-	- Activée par le Ca ²⁺ et le triton et inhibée par Al ³⁺ et Mn ²⁺ .	Leli <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	60	8	40	6-8,5	-	- Stable dans les solvants organiques - Préférence pour les TG à chaîne longues	Ruchi <i>et al.</i> , 2008

Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques de quelques lipases bactériennes

➤ *Les lipases bactériennes comme facteur de virulence*

Le but principal de l'étude des propriétés des lipases bactériennes était pour des finalités biotechnologiques. Cependant, il est évident que les lipases extracellulaires jouent aussi un rôle durant les infections microbiennes. Parmi ces microorganismes certaines sont pathogènes et sont de ce fait associées à plusieurs types de maladies surtout pour des individus ayant une faible défense immunitaire. *Propionibacterium acnes* est impliquée dans la pathologie de l'acné vulgaris, maladie de la peau qui affecte la plupart des individus durant la puberté. *Propionibacterium acnes* vit au niveau de la peau et se multiplie à l'intérieur des follicules du système pileux. La principale source d'alimentation de cette bactérie est le sébum qui est une sécrétion de la glande sébacée, composée essentiellement de lipides. La lipase de *Propionibacterium acnes* a été purifiée et caractérisée. Elle hydrolyse une partie de triacylglycérols du sébum produisant ainsi des acides gras libres qui prédisposent le porteur humain de l'acné (Ingham *et al.*, 1981). La lipase de cette bactérie est considérée comme un facteur de colonisation. En effet, la présence d'acides gras libres augmente l'adhérence cellulaire dans les follicules du système pileux favorisant de ce fait la colonisation de ce germe (Gribbon *et al.*, 1993).

De plus, il a été montré que certaines lipases bactériennes provoquent plusieurs types d'infections telles que les inflammations superficielles et profondes, l'endocardite, la méningite, les infections enroulées et le sepsis. Les lipases sont aussi impliquées dans les toxoinfections alimentaires et elles sont associées au syndrome du choc toxique (Christensson *et al.*, 1985 ; Novick, 1993).

Parmi les souches les plus dangereuses, productrices de lipases, on peut citer l'exemple de *P. aeruginosa*. Cette bactérie provoque plusieurs types de maladies infectieuses chez les patients atteints de cancer ou de mucoviscidose. L'infection des poumons par cette bactérie est la principale cause de mort (Döring, 1993). Le sérum isolé de patients souffrant de mucoviscidose et qui sont infectés par *P. aeruginosa*, présente un taux élevé d'anticorps anti-lipase (Jaeger *et al.*, 1992b). Les études *in vitro*, faites sur les réponses immunitaires à médiation cellulaire, montrent que la lipase sécrétée par *Pseudomonas aeruginosa* inhibe la chemotaxie des monocytes (Jaeger *et al.*, 1991). En outre, la lipase libère l'acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque (12-HETE) à partir des plaquettes impliquées dans les phénomènes inflammatoires. Cependant, l'action combinée de la lipase avec la phospholipase C amplifie la libération du 12-HETE (König *et al.*, 1994), ce qui suggère une

synergie d'action des deux enzymes lipolytiques synthétisés par *P.aeruginosa*.

L'action de lipases comme étant un facteur de virulence doit être étudiée en combinaison avec d'autres enzymes extracellulaires, particulièrement les phospholipases, décrites comme des enzymes provoquant la dégradation des membranes. Les dégâts membranaires sont fréquemment observés chez les patients infectés par des bactéries productrices de lipases et de phospholipases (Titball, 1993).

8. Les staphylocoques

8.1. Morphologie et caractères cultureux

Les staphylocoques sont des cocci de 0,1 à 1 µm de diamètre. Ils se présentent isolés, en diplocoques, ou en amas rappelant la caractéristique d'une grappe de raisin. Ce sont des germes à Gram-positif. Sauf dans des cas rares, ils sont dépourvus de capsules ; ils ne forment pas de spores. Ils se développent facilement, en aérobie ou en anaérobie, sur la plupart des milieux usuels. Des milieux sélectifs, hypersalés ou contenant du tellurite de potassium, facilitent leur isolement à partir des prélèvements plurimicrobiens.

Les Staphylocoques ont été répartis en 32 espèces et 4 sous-espèces qui ont été individualisées grâce à l'analyse du génome (hybridation ADN-ADN, analyse du profil de migration électrophorétique des fragments de restriction de l'ADN chromosomique portant les gènes qui codent pour l'ARN ribosomique), des constituants de la paroi (acide téichoïque, peptidoglycane, protéine A), des caractères métaboliques (acidification des sucres, production d'enzymes et de protéines diverses) et à la résistance à certains antibiotiques (novobiocine)

Certaines de ces espèces sont rencontrées chez l'homme et l'animal (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. schleiferi*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*) ; d'autres espèces sont rencontrées plus particulièrement chez l'homme (*S. epidemidis*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*) ou chez l'animal (*S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. coprae*, *S. gallinarum*, *S. arlettae*, *S. chromogenes*, *S. delphini*, *S. equorum*, *S. kloosii*, *S. muscae*, *S. piscifermentans*, *S. vitulus*).

Les espèces incluant des souches productrices de coagulase libre, dont l'espèce *S. aureus*, sont plus pathogènes que celles qui n'en produisent pas. Les staphylocoques à coagulase-négative, dont l'espèce *S. epidermidis*, constituent la majeure partie de la microflore normale de l'homme, et pour cette raison elles ont été généralement considérées comme saprophytes ou organismes non ou peu virulents (Kloos *et al.*, 1991). Cependant, ces derniers sont des pathogènes opportunistes qui provoquent des infections sur des corps étrangers. En effet, il a été montré que *S. epidermidis* constitue une cause importante d'infection chez des patients qui ont des cathéters ou des prothèses cardiaques (Huebner et Goldmann, 1999). La raison importante de ce risque d'infection est la capacité de ces espèces de former un biofilm sur la surface solide. Le facteur principal responsable de colonisation de biomatériaux semble être la sécrétion de polysaccharides de surface. Deux types de polysaccharides, relativement proches, sont produits par les souches isolées d'infections de cathéter. Le PS/A (polysaccharide/adhésine) et d'autre part le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) (Mckenney *et al.*, 2000). Les deux polysaccharides sont constitués de longues chaînes de beta-1,6-glucosamines, mais ont des propriétés biophysiques différentes. Le PS/A est impliqué dans l'adhérence aux biomatériaux tels que le polyéthylène. Le PIA est impliqué dans la cohésion des bactéries entre elles. La synthèse des deux polysaccharides semble être sous le contrôle d'un locus commun nommé « ica »(intercellular adhesin) qui, quand il est muté, provoque la perte de la capacité de formation d'un biofilm (Ziehbuhr *et al.*, 1997).

Ensemble, le PS/A, le PIA et d'autres éléments de la surface bactérienne (acides téchoïques) contribuent à la formation du biofilm. Après l'adhérence, les colonies de *S. epidermidis* se multiplient dans une sorte de gangue de polysaccharides, le biofilm, qui assure à la fois leur résistance au détachement mécanique, à la phagocytose et à l'effet bactéricide des antibiotiques. Les interactions entre les polysaccharides de surface et les biomatériaux sont non spécifiques et ne nécessitent pas la présence de protéines de l'hôte.

8.2. Caractéristiques de *S. aureus*

S. aureus, appelé couramment staphylocoque doré en raison de la couleur jaune des colonies qui apparaissent sur gélose, est une bactérie sphérique à Gram positif, anaérobie facultative, immobile et forme des amas réguliers à la manière de grappes de raisin.

S. aureus présente le potentiel de pathogénicité le plus important pour l'homme et c'est la seule qui produit une coagulase, exoenzyme capable de coaguler le plasma sanguin, ce qui constitue un moyen d'identification rapide et facile. Le réservoir naturel de *S. aureus* est

l'homme et l'animal à sang chaud. Son site de colonisation préférentiel chez les humains se situe au niveau des fosses nasales et de la gorge. Ainsi environ 20% de la population adulte héberge cette bactérie de façon permanente, et 30% de façon intermittente, généralement de manière asymptomatique (Wertheim *et al.*, 2005). A partir des sites de portage, *S. aureus* peut coloniser les territoires cutanés, en particulier les zones humides (aisselles, périnée). De plus, ces bactéries particulièrement résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement.

Son caractère remarquablement flexible lui permet en effet de survivre ou de se développer dans de nombreuses autres niches (surface inanimée, denrées alimentaires...) ce qui facilite sa dissémination. Du fait de ses bonnes capacités d'adaptation et de nombreux facteurs de virulence qu'elle produit, *S. aureus* pose de graves problèmes de santé, sanitaires et économique.

8.3. Les lipases de staphylocoques

L'activité lipolytique produite par *S.aureus* a été décrite depuis 1901. Eijkman (1901) a montré que la lipase de *S. aureus* est responsable de la libération d'acide gras, surtout l'acide octadécanoïque, dans le plasma sanguin. Dans les années 80, plusieurs lipases de staphylocoques ont été purifiées et caractérisées (Brune et Götz, 1992). L'activité de ces enzymes est fortement dépendante des ions Ca^{2+} , les agents chélateurs telles que l'EDTA et l'EGTA agissent comme de puissants inhibiteurs. De nouvelles lipases sont récemment étudiées telles que la lipase de *Staphylococcus simulans* (SSL) (Sayari *et al.*, 2001), la lipase de *Staphylococcus xylosus* (SXL1) (Mosbah *et al.*, 2005) et la lipase de *Staphylococcus aureus* (SAL3) (Horchani *et al.*, 2001b) qui présentent des caractéristiques différentes des lipases de staphylocoques connues.

8.4. Caractérisation biochimique des lipases de staphylocoques

Ces dernières décennies, plusieurs lipases de staphylocoques ont été clonées, séquencées, purifiées et caractérisées. Malgré la grande homologie de séquences entre les différentes lipases de staphylocoques, ces enzymes présentent des différences significatives au niveau des caractéristiques biochimiques et catalytiques à savoir la spécificité de substrat, le pH optimum et l'activation interfaciale. Le tableau 3 résume les principales caractéristiques de quelques lipases de staphylocoques :

Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques de quelques lipases de staphylocoques

Souches	Calcium	Temp optimale °C	pH optimum	Activité spécifique sur TC ₄ (U/mg)	Substrats	Activation inter-faciale	Références
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 850 (SAL1)	Dépendante	37	6	636	- Spécifique de l'hydrolyse des TG à chaînes courtes. - Incapable de dégrader les phospholipides.	-Pas de phénomène d'activation interfaciale	- Muraoka <i>et al.</i> , 1982 - Simon <i>et al.</i> , 1998 - Sayari <i>et al.</i> , 2001a
<i>Staphylococcus hyicus</i> DSM20459 (SHyL)	Dépendante	37	8,5	-	- Ne présente pas de spécificité vis-à-vis de la longueur de chaînes d'acyles des TG. - Le TC ₈ est le meilleur substrat. - Dégrade les phospholipides.	-Présence de Phénomène d'activation interfaciale	- Van Oort <i>et al.</i> , 1989 - Rosenstein and Götz, 2000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A (SEL3)	Dépendante	37	6	-	- Spécifique de l'hydrolyse des TG à chaînes courtes. - Incapable de dégrader les phospholipides.	-	- Simon <i>et al.</i> , 1998 - Rosenstein and Götz, 2000
<i>Staphylococcus warneri</i> 863 (SWL)	Dépendante	25	9	1860	- Spécifique de l'hydrolyse des TG à chaînes courtes	-	- Talon <i>et al.</i> , 1995
<i>Staphylococcus simulans</i> (SSL)	Indépendante	37	8,5	1000	- Ne présente pas de spécificité vis-à-vis de la longueur de chaînes d'acyles des TG. - Incapable de dégrader les phospholipides.	Pas de phénomène d'activation interfaciale	- Sayari <i>et al.</i> , 2001
<i>Staphylococcus xylosus</i> (SXL)	Indépendante	45	8,2	1900	- Ne présente pas de spécificité vis-à-vis de la longueur de chaînes d'acyles des TG. -Ne dégrade pas les phospholipides	Pas de phénomène d'activation interfaciale	- Mosbah <i>et al.</i> , 2005

8. 5. Caractérisation moléculaire de lipases de *Staphylocoques*

En 1985, la séquence nucléotidique et la séquence primaire de la protéine de la SHL ont été déterminées. Le clonage et le séquençage du gène qui code pour la SHL montre qu'il s'agit d'une protéine de masse moléculaire de 71 kDa, comprenant une chaîne polypeptidique de 641 acides aminés (Figure 9) (Gotz *et al.*, 1985). Cependant, dans le milieu de culture de la souche de *Staphylococcus hyicus*, on ne révèle que la présence d'une lipase de masse moléculaire 46 kDa. La SHL est alors organisée sous forme d'une pré-pro-lipase composée d'un peptide signal de 38 acides aminés, un pro-peptide de 207 résidus et une lipase mature de 369 résidus (Gotz *et al.*, 1985) (Figure 9).

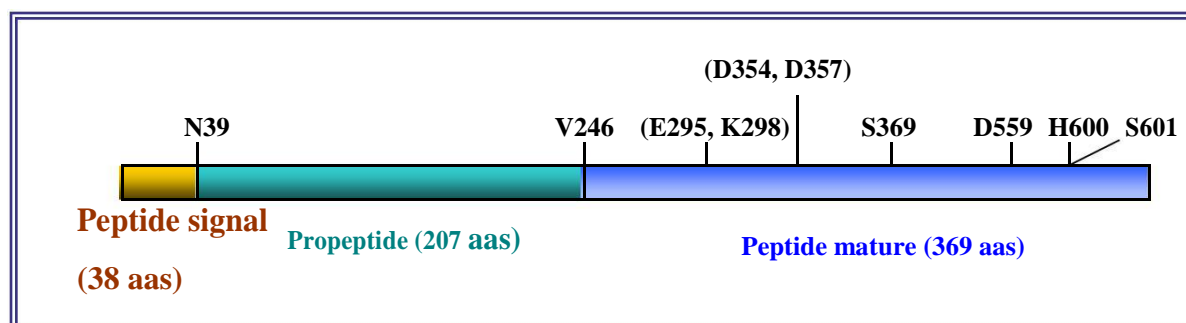


Figure 9:La structure pré-pro de la lipase de *Staphylococcus hyicus* (Gotz *et al.*, 1985).

Les premiers acides aminés du pro peptide et du peptide mature sont indiqués. Les résidus : **S369, D559, H600** forment la triade catalytique. Les acides aminés responsables de la fixation des ions Ca^{2+} sont **D354, D357**

Le clonage et l'expression du gène qui code pour la SHL dans *Staphylococcus carnosus* TM300, donne une protéine de 86 kDa. La comparaison des séquences N-terminales des formes 86 kDa et 46 kDa avec la séquence de la SHL montre que ces deux formes dérivent du même précurseur. Contrairement à la forme 46 kDa, sécrétée par *Staphylococcus hyicus*, dont la séquence commence par Val 246, la séquence de la forme 86 kDa, sécrétée par *Staphylococcus carnosus*, commence par Asn39. Ce résidu est situé directement après le site de clivage du peptide signal (Ala36-Glu37-Ala38) par la signalase peptidase I (Wenzig *et al.*, 1990). La SHL est donc sécrétée dans le milieu de culture sous forme d'une pro lipase qui se transforme en forme mature sous l'action d'une protéase neutre extracellulaire produite par *Staphylococcus hyicus* (Ayora et Gotz, 1994a ; Ayora *et al.*, 1994b). Cette protéolyse ne s'effectue pas dans le cas de la lipase hétérologue produite par *Staphylococcus carnosus*.

Cette souche est dépourvue de l'activité protéolytique extracellulaire responsable du clivage qui donne la forme mature.

L'alignement de séquence des lipases de staphylocoques montre une conservation remarquable au niveau du peptide signal avec un motif contenant des résidus conservés (Ser, Ile, Arg et Lys) appelé: SIRK-motif (Nikoleit *et al.*, 1995 ; Gotz *et al.*, 1998). La conservation de ce motif au niveau du peptide signal des lipases de staphylocoques, reflète probablement, une fonction biologique au niveau du processus de sécrétion.

Les proséquences ne présentent pas de grandes similarités au niveau des séquences mais elles sont distinguées par leur caractère fortement hydrophile (Gotz *et al.*, 1985 ; Farrell *et al.*, 1993; Nikoleit *et al.*, 1995). Les lipases matures de staphylocoques présentent une forte identité de séquences variant de 50 à 81 % (Tableau 4).

Tableau 4 : Pourcentage d'identité et pourcentage de similarité (en bleu) de certaines lipases matures de staphylocoques.

	<i>SAL2</i>	<i>SEL2</i>	<i>SEL3</i>	<i>SHaL</i>	<i>SHL</i>	<i>SWL</i>
<i>SAL1</i>	55 (68)	51 (67)	81 (88)	53 (67)	53 (66)	66 (78)
<i>SAL2</i>		58 (74)	54 (67)	66 (79)	51 (64)	53 (68)
<i>SEL2</i>			53 (71)	70 (83)	50 (67)	50 (67)
<i>SEL3</i>				54 (69)	56 (70)	66 (79)
<i>SHaL</i>					51 (67)	54 (66)
<i>SHL</i>						50 (64)

Les résidus Ser, Asp et His, présumés intervenir dans l'étape de catalyse, sont conservés au niveau de toutes les séquences de lipases de staphylocoques connues. De plus, une séquence consensus appelée boucle P (P-loop), -[AG]-x4-G-K-[ST], est présente dans toutes les lipases de staphylocoques à l'exception de la SEL2 et SHL. Ce motif est nécessaire

pour toutes les protéines ATP- ou GTP dépendantes (ATP- ou GTP-binding proteins) (Saraste *et al.*, 1990). L'incubation de la SAL1, en présence de 2 mM ATP ou GTP, entraîne une inactivation significative de l'enzyme. Ces études préliminaires montrent que l'ATP ou le GTP est un moyen de protection de la souche contre les effets néfastes de la lipase pleinement active à l'intérieur de la cellule (Nikoleit *et al.*, 1995).

8.6. Transformation de la pro-forme

Wenzig *et al.* (1990) ont montré que la forme 86 kDa purifiée à partir de *Staphylococcus carnosus* pourrait se transformer à la forme mature lorsqu'elle est incubée avec le surnageant de culture de *Staphylococcus hyicus*. Ces auteurs ont conclu que le processus de maturation de la SHL se fait avec une protéase extracellulaire. Ces auteurs ont détecté plusieurs intermédiaires de dégradation (72, 55 et 46 kDa) lors de la transformation de la pro lipase à la lipase mature. La pro-forme (86 kDa) ainsi que tous les produits intermédiaires possèdent une certaine activité lipasique (Wenzig *et al.*, 1990). A la fin de la phase stationnaire de la croissance, des formes ayant des masses moléculaires inférieures à 46 kDa sans activité lipasique, ont été détectées ce qui montre qu'une dégradation au delà de Val246 affecte les fonctions catalytiques de la SHL mature. La pro-SHL et les formes intermédiaires 72 et 55 kDa sont prédominantes au début de la phase de croissance, tandis que la forme mature (46 kDa) devient majoritaire au niveau de la phase stationnaire de la croissance. Ce qui montre que cette transformation se fait en cascade en commençant à partir de l'extrémité N-terminale de la pro-SHL.

Deux protéases, ShpI et ShpII, ont été identifiées au niveau du surnageant de *Staphylococcus hyicus*. La ShpII est impliquée dans le processus de transformation de la pro-SHL (Ayora et Gotz, 1994a ; Ayora *et al.*, 1994b). La ShpII est une métallo protéase neutre, de masse moléculaire 34 kDa et un optimum d'activité à pH 7,4 et à 55°C. Son site de coupure, au niveau de la pro-SHL, se situe entre Thr245-Val246. Cette protéase est fortement inhibée en présence d'agents chélateurs tels que l'EDTA ou l'EGTA. En effet le passage, *in vivo*, de la forme pro lipase à la forme mature est inhibé en présence de 300 µM EDTA (Ayora *et al.*, 1994b). Ce processus de maturation semble être universel pour toutes les souches de staphylocoques étudiées. Les lipases détectées au niveau des milieux de cultures de plusieurs souches de staphylocoques possèdent des masses moléculaires entre 40 et 48 kDa (Rollof *et al.*, 1992 ; Farrel *et al.*, 1993 ; Nikoleit *et al.*, 1995 ; Talon *et al.*, 1995 ; Oh *et al.*, 1999).

8.7. Rôle du pro-peptide

En se basant sur la comparaison de séquences, les différentes lipases de staphylocoques sont traduites sous forme de pré-pro-lipases. Malgré que le rôle du peptide signal au niveau de la sécrétion soit évident, celui du pro-peptide n'est pas encore bien défini. Parmi les hypothèses proposées, le pro-peptide aurait une fonction de masquer l'activité enzymatique jusqu'à ce que le processus de sécrétion soit achevé et ceci dans le but de protéger la cellule productrice contre les effets néfastes de l'activité lipasique. Cependant, la pro-SHL, comme la SHL mature, est active et peut être synthétisée à l'intérieur de la cellule sans entraver les fonctions vitales de la souche productrice.

Gotz *et al.*, (1998) ont suggéré que ce pro-peptide agit comme une chaperonne intramoléculaire qui facilite la translocation de la lipase native. Cette hypothèse a été décrite dans le cas du pro-peptide de la subtilisine E de *Bacillus subtilis* qui pourrait être impliqué dans la sécrétion, probablement comme une chaperonne intramoléculaire (Hu *et al.*, 1994). Pour mieux comprendre le rôle du pro-peptide de la SHL, différentes constructions génétiques ont été réalisées (Liebl et Gotz, 1986). Le gène qui code pour la β -lactamase de *E.coli*, dépourvu de sa séquence signale, a été fusionné en aval de différentes parties du gène qui code pour le pro-peptide de la SHL. L'expression de ces protéines hybrides a été effectuée dans *S.carnosus*. La quantité de β -lactamase sécrétée par les différents clones de *S. carnosus* a été mesurée. Seules les protéines ayant fixées au minimum 160 acides aminés de la pré-pro-séquences ont été sécrétés dans le milieu de culture. Toutes les protéines hybrides ayant une portion fusionnée plus faible, restent fixées à la structure membranaire et présentent une tendance élevée aux dégradations protéolytiques. Ces résultats sont en faveur d'un double rôle pour le pro-peptide : participation dans la translocation de la protéine et dans la stabilisation de la protéine contre les dégradations protéolytiques (Liebl et Götz, 1986). De plus, ces 160 acides aminés de la portion pré-pro de la SHL ont été utilisés pour faciliter la sécrétion de plusieurs protéines hétérologues produites par *Staphylococcus carnosus* telles que la pro-insuline et l'antigène de la malaria (Knorr, 1992 ; Samuelson *et al.*, 1995).

Dans le but de déterminer la localisation de ces deux fonctions dans la pro-séquence, plusieurs gènes codant pour la SHL et présentant différentes délétions au niveau de la séquence du pro-peptide, ont été construits et produites dans *S. carnosus*. Ces études ont montré que le pro-peptide de la SHL pourrait avoir deux domaines fonctionnels dont chacun est situé dans une moitié de la proséquence. La région N-terminale semble être importante pour l'activité lipasique et la partie C-terminale pour la translocation et la stabilité de la protéine (Demleitner et Götz, 1994)

9. Applications biotechnologiques des lipases

Au-delà de leurs fonctions biologiques, dans le métabolisme lipidique, les lipases ont de nombreuses applications dans les domaines médicaux et thérapeutiques ainsi que dans la technologie alimentaire et la chimie des corps gras. Ces enzymes peuvent intervenir dans une partie ou dans la totalité des étapes d'un procédé de transformation. Leur utilisation présente plusieurs avantages tels que la spécificité pour les substrats, l'absence de formation de produits secondaires et des conditions réactionnelles douces. Pour chaque application, la sélection d'une lipase est basée sur les caractéristiques incluant le substrat, la spécificité positionnelle ainsi que la stabilité vis-à-vis du pH et de la température.

9.1. Incorporation des lipases aux détergents

La plus grande révolution dans l'application des lipases est arrivée en 1988, quand la firme Novo Nordisk a introduit dans le marché la première lipase commerciale, Lipolase, exprimée dans *Aspergillus oryzae*, mais produite naturellement par le champignon thermophile *T. lanuginosa*. En 1995, deux autres lipases ont fait leur apparition: Lumafast, produite par *Pseudomonas mendocina* et Lipomax, provenant de *Pseudomonas alcaligenes*, toutes les deux ont été commercialisées par Genecor International (Okkels *et al.*, 1996).

L'intérêt de l'utilisation des lipases a été favorisé par deux événements fondamentaux: la baisse du taux de phosphate dans les détergents, pour lutter contre la pollution de l'environnement, et la tendance, ces dernières années, à laver à basse température par souci d'économie d'énergie. L'industrie de détergents domestiques représente actuellement le marché le plus large des lipases car l'ajout de ces enzymes aux détergents accroît leur efficacité (Fuji *et al.*, 1986). A cause de problèmes dérivant de la compatibilité avec les

surfactants, aussi présents dans les détergents, une recherche étendue a été exigée pour améliorer la stabilité et l'activité des lipases dans les conditions alcalines (Jaeger *et al.*, 1994). Les lipases utilisées dans les détergents doivent posséder un large spectre de substrats (être peu sélectives) et être capables de tolérer les conditions de lavage telles que des valeurs de pH entre 10 et 11, ainsi qu'une température oscillant entre 30°C et 60°C. Ces enzymes doivent également résister aux effets dénaturants et/ ou inhibiteurs des composés chimiques (détergents) constituant les lessives, et à la dégradation protéolytique par les protéases contenues dans la formulation de celles-ci (Jaeger et Reetz, 1998 ; Sharma *et al.* 2001).

9.2. Les lipases dans l'industrie alimentaire

Plusieurs lipases présentent une spécificité (sn-1,3), et peuvent être utilisées pour faire l'interestérisation régiosélective des positions 1 et 3 d'un triglycéride naturel. La position, la longueur de chaîne et le degré d'insaturation influencent non seulement les propriétés physico-chimiques des triglycérides mais aussi la valeur nutritionnelle et sensorielle.

Le point de fusion d'une huile peut être modulé par hydrogénation catalytique des doubles liaisons des acides gras insaturés. Ceci est mis en œuvre à grande échelle dans la préparation de margarines à partir des huiles de plantes. Une alternative à la réalisation de ces procédés réside dans l'interestérisation d'un mélange adéquat de triglycérides à l'aide des lipases *sn-1,3* spécifiques (Holemans *et al.*, 1987; Moore 1987).

Le beurre de cacao, qui a un point de fusion de 34°C, est largement utilisé pour la production du chocolat. Les triglycérides prédominants dans le beurre de cacao sont le glycérol contenant l'acide oléique en position *sn-2*, et les acides stéarique et palmitiques en position *sn-1* et *sn-3* (SOS et SOP). Des équivalents du beurre de cacao peuvent être préparés soit chimiquement ou à l'aide de lipases par transestérisation de l'huile de palme riche en POP ou de l'huile de tournesol riche en OOO) avec la triestiarine (SSS) ou l'acide stéarique, pour donner le triglycéride (SOS) désiré.

Une autre application des lipases dans l'industrie alimentaire est la préparation des triglycérides facilement assimilables. En effet, l'absorption de triglycérides par l'intestin dépend fortement de leur structure. Les triglycérides contenant l'acide palmitique en position *sn-2* comme le lait humain sont facilement assimilables. «Unichema» commercialise le

Betapol (OPO), un additif diététique pour les enfants prématurés, préparé par la transestérification de tripalmitin avec l'acide oléique à l'aide de la lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei*. La lipase pancréatique humaine hydrolyse préférentiellement les chaînes moyennes, donc des triglycérides du type MLM avec des acides gras à longue chaîne (L) dans la position *sn-2*, et des acides gras moyens (M) dans les positions *sn-1* et *sn-3* qui sont facilement hydrolysés et absorbés. Les triglycérides du type MLM contenant des acides gras essentiels, tels que l'acide eicosapentaénoïque ou docosahexaénoïque, ont montré des effets bénéfiques contre les inflammations et les maladies cardio-vasculaires. Ces triglycérides sont préparés par voie enzymatique préférentiellement par des lipases *sn-1,3* spécifiques, car la voie chimique d'interestérification des triglycérides hautement insaturés (huile de poisson) entraînent des réactions secondaires comme l'oxydation et l'isomérisation *cis-trans* ou la migration de la double liaison (Haraldsson *et al.*, 1993 ; Akoh, 1995).

9. 3. Hydrolyse des huiles

Les procédés chimiques classiques présentent l'inconvénient d'être lourds et engendrant des réactions secondaires. Ces problèmes peuvent être surmontés en utilisant l'hydrolyse enzymatique. De même, le coût du procédé enzymatique est nettement baissé grâce à l'immobilisation, la réutilisation des lipases et les réacteurs d'hydrolyse en continue (Yang et Rhee, 1992; Kuncová *et al.*, 1994).

Les monoacylglycérols, obtenus par hydrolyse des triacylglycérols, sont des agents émulsifiants utilisés comme additifs alimentaires et dans la préparation des produits cosmétiques et des médicaments (Bornscheuer, 1995 ; Jaeger et Eggert 2002). En panification, ils renforcent la pâte et augmentent le volume du pain. En cosmétologie, les monoacylglycérols présentent des caractéristiques moins agressives que les autres agents tensioactifs. Dans le domaine pharmaceutique, ils sont utilisés comme agent d'enrobage de certains médicaments. En 2003, Sun et ses collaborateurs ont montré l'effet antibactérien des monoacylglycérols contre *Helicobacter pylori*. Ils ont proposé que les monoacylglycérols puissent former des micelles avec les cellules bactériennes ce qui leur permet de pénétrer dans les membranes et par la suite d'altérer leur perméabilité.

9.4. Synthèse d'esters

Les esters peuvent être obtenus par estérification enzymatique d'un alcool ou d'un glucide avec un acide gras. Ces esters sont utilisés dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Gubicza *et al.*, 2000; Hari *et al.*, 2001). L'utilisation de lipases pour produire des esters entre, de plus en plus, en compétition avec les méthodes chimiques classiques. Les esters produits par voie enzymatique sont considérés, de point de vue législatif, comme «naturels» et répondent de ce fait aux exigences du consommateur (Fayolle *et al.*, 1991).

Gillies *et al.*, (1987) ont synthétisé le butyrate d'éthyle, un constituant des arômes naturels de fruits, avec un rendement de 86% en utilisant la lipase de *Candida cylindracea* adsorbée sur gel de silice. D'autres chercheurs ont synthétisé des esters d'alcool terpénique (citronellol, géraniol et phytol) en utilisant la lipase de *Pseudomonas* stabilisé au polyéthylène glycol (PEG) dans le benzène avec des rendements compris entre 50 et 95% (Claon et Akoh, 1993; Shieh *et al.*, 1996). Le tableau ci-dessous présente les domaines d'application potentiels des lipases.

Tableau 5 : Applications industrielles des enzymes lipolytiques d'après Jaeger et Eggert, 2002 ; Hasan *et al.*, 2006.

Domaine industriel	Réaction	Exemples de produit ou d'application
Nettoyage, Détergents	Hydrolyse des graisses	Lessives, détachants
Industrie du papier	Hydrolyse	Dissolution enzymatique des pitchs, blanchiment écologique de la pâte à papier
Textile	Hydrolyse	Blanchiment des tissus de typejean, modification des fibressynthétiques (polyester)
Cosmétique	Synthèse, transestérification	Soins cutanés, crèmes amaigrissantes, parfums
Oléochimie (huiles et graisses)	Transestérification, hydrolyse	Synthèse des esters, hydrolysedes graisses et de la lécithine
Chimie fine	Synthèse énantiosélective	Synthèse de substances organiques
Dégradation des hydrocarbures, Traitement des déchets	Hydrolyse	Nettoyage des eaux contaminées
Production de biodiesel	Transestérification	Esters de méthyle
Tannage	Hydrolyse	Préparation des peaux, élimination des poils et de la graisse
Alimentation	Estérification	Synthèse de lipides structurés de meilleure qualité nutritionnelle, synthèse d'esters aromatiques
Applications médicales	Transestérification, hydrolyse	Lipides spécifiques, aides digestives, action bactéricide, diagnostic

Matériel

&

Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Matériel

1. Matériel biologique

- Une collection de souche obtenue de différents biotopes algériens a fait l'objet d'un criblage dans le but de chercher une activité lipolytique éventuelle. La souche isolée à partir d'un sol gras et présentant l'activité la plus importante a été retenue. Son identification moléculaire est réalisée au sein du Laboratoire de Biochimie et de Génie Enzymatique de Lipases (LBGEL), Sfax, Tunisie.
- La souche XL1 blue d'*E. coli* : Cette souche d'*E. coli* possède un gène conférant une résistance à l'ampicilline ainsi qu'une mutation *lacIq* ZDM15 fournissant une possibilité d' α -complémentation, permettant ainsi la sélection des clones par criblage blanc/bleu, sur milieu contenant de l'TPTG et du X-Gal.

2. Milieux de culture

- Gélose Lauria-Bertani (LB)
- Bouillon A de préculture pour Staphylocoque
- Bouillon B de production de lipase de Staphylocoque

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 20 min. Les bactéries sont cultivées sur boîte de Petri ou en milieu liquide à 37 °C.

2. Réactifs :

Le deoxycholate de sodium (NaDC), le persulfate d'ammonium, le N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED), l'hydroxyméthyl aminométhane (Tris-HCl), l'éthylène diamine tétra acide acétique (EDTA), l'extrait de levure, l'agar-agar, le β -mercaptoéthanol (β ME) et la sérum albumine bovine (BSA) ($\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 6,7$) sont de Sigma Chemical Company (St. Louis, USA); La tributyrine (TC₄) (pureté 99 %), la Trioctanoïne (TC₈), la tripiopionine (TC₃), la benzamidine est de Fluka (Bucks, Suisse); le phosphatidylcholine du jaune d'oeuf (PC), la Rhodamine ainsi que les isomères de Dicaprine (1,2DiC10, 1,3DiC10, 2,3DiC10) sont de Sigma. l'éthanol (pureté 99,5 %) est de Codex Panreac (Barcelone, Espagne). La peptone de caséine est

de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le sodium dodécyl sulfate (SDS), l'acrylamide et le bisacrylamide sont de Bio-Rad (Paris, France). L'huile d'olive et la gomme arabique (Tunisie). Marqueur de poids moléculaire pour les protéines est de Sigma: 116-96-66-45-35-18,8-14,4 (en kDa), Le marqueur de taille d'ADN utilisé est 1kb ladder® d'Invitrogen Corporation.

3. Tampons et solutions

- TAE (10x) : 0,4 M Tris-HCl : 10mM EDTA-Na₂ pH 8,0
- Tampon de dépôt (6x) pour électrophorèse sur gel d'agarose : 0,25% bleu de bromophénol ; 40% Saccharose.
- TE (1x) : 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA
- Tampon A de purification : 20 mM acétate de sodium pH 6, 20 mM NaCl, 2 mM benzamidine.
- Le bromure d'éthidium (solution mère) : 10 mg/ml. La concentration finale dans le gel d'agarose est de 1 µg/ ml.

5. Enzymes et vecteur

- Les endonucléases de restriction sont fournies par Amersham, ou Invitrogen et sont utilisées selon les instructions du fournisseur.
- Kit d'extraction d'ADN plasmidique : QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ;
- Kit de purification de l'ADN : QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen)
- Les amorces universelles NW9 et NW 17.
- Les amorces SALFw et SAL Rv sont de Bio Basic (Canada)
- Le lysozyme, protéinase K, la ligase et la Taq polymérase sont de Promega.
- Vecteur de clonage pGEMT : Ce vecteur (3015pb) est utilisé pour le clonage de l'ADN de la lipase de *S. aureus*. Il porte le gène de résistance à l'ampicilline comme marqueur de sélection (Figure 10).

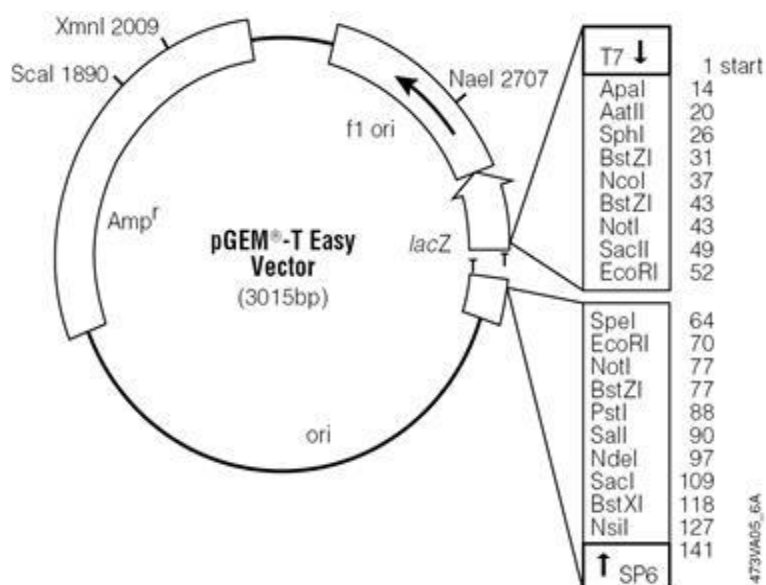


Figure 10: Carte de restriction du vecteur pGEMT-Easy. La taille du vecteur est de 3015 pb.

6. Supports chromatographiques

Le séphacryl S-200, G75 et la Mono-S sépharose sont de Pharmacia Chemicals (Uppsala, Suède). Les gels sont utilisés selon les instructions du fournisseur.

7. Appareillage

pH-Stat, Metrohm (Suisse); Barostat KSV-2000 (KSV-Helsinki) ; spectrophotomètre à longueur d'ondes variables, Cecil CE 1020 (Royaume Unis); Appareil d'électrophorèse, Biorad (France); Collecteur de fraction et pompe péristaltique, Pharmacia LKB (Suède); La centrifugeuse J21B est de Beckman (Etats-Unis) ; Le shaker (Certomat) est de B. Braun Biotech (Allemagne). L'appareil de PCR est d'Applied biosystems (Singapour).

II. Méthodes

Partie I : Sélection et identification des souches lipolytiques

1. Isolement et collection des échantillons

Un ensemble de souches (50) est isolé à partir de différents biotopes au niveau de la Wilaya de Chlef à savoir, le lait de vache cru, le Smen fabriqué traditionnellement, Berouil, Saumures d'olives fermentés et sol gras. Un criblage sélectif est réalisé sur gélose Chapman et Gélose au cétrimide additionnée de Tween 80 (1%) afin de sélectionner les espèces potentiellement lipolytiques. Treize (13) espèces retenues sont conservées à 4 °C sur bouillon glycérolé.

2. Sélection de souches lipolytiques

Dans le but de chercher des souches produisant des lipases, les 13 souches retenues sont passées au crible. L'activité lipasique est testée sur milieu LB en présence de 1% d'huile d'olive et 1% de Rhodamine B (Kouker *et al.*, 1987). Après une incubation à 37°C pendant une nuit, les souches (10) présentant un halo fluorescent sous UV ont été retenues. Parmi elles, une seule souche continue à produire une activité lipasique en présence de 4 mM de sels biliaires (NaDC) après incubation à 37°C une nuit. Cette souche a été sélectionnée pour la suite de ce travail et cultivée sur différents milieux de culture afin d'optimiser les conditions de culture pour une meilleure production de lipase.

3. Repiquage et revivification des souches

Les souches conservées sont réactivées par étalement de 100 µl de culture sur gélose LB et incubées à 37 °C pendant une nuit. La purification des souches se fait par prélèvement au cure dent d'une colonie et ensemencement par stries sur gélose LB. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant une nuit. Des examens microscopiques (examen à l'état frais et coloration de Gram) permettent de confirmer l'état de pureté et d'initier l'identification biochimique des souches retenues.

4. Identification biochimique des souches

L'identification des souches à potentiel lipolytique est réalisée à l'aide de la galerie API Staph. Ce test est accompagné par des examens microscopiques (Examen à l'état frais, Coloration de Gram).

5. Identification moléculaire des souches

Cette étude a porté sur l'homologie de la séquence rRNA 16S suivie du séquençage des bases azotées de cette séquence. L'ARN 16S a été choisi comme marqueur phylogénétique en constituant une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier les bactéries entre elles.

5.1. Extraction de l'ADN génomique

Le protocole d'extraction d'ADN génomique est basé sur le principe de la lyse alcaline. Après extraction, l'ADN est resuspendu dans 30 µl de TE et conservé à -20°C.

L'ADN génomique est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (w/v). Le protocole d'extraction d'ADN est le suivant :

1. Transférer 1 ml d'une préculture d'une nuit à 37°C dans un tube eppendorf
2. Centrifuger 1 min à 13000 rpm
3. Eliminer le surnageant
4. Resuspendre le culot dans 500 µl d'une solution TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8)
5. Ajouter 20 µl lysozyme (50 mg / ml) et incuber 30min à 37 °C
6. Ajouter 60 µl d'EDTA (0,5M pH 8)
7. Ajouter 10 µl Protéinase K (20mg/ ml) et incuber 1 h à 37°C
8. Ajouter 100 µl SDS 10% et incuber 10 min à 50°C
9. Ajouter 350 µl d'acétate de potassium 3M pH 5,2
10. Mélanger délicatement par inversion du tube en incuber 10 min dans la glace
11. Centrifuger 10 min à 10000rpm
12. Transférer le surnagent dans un tube eppendorf neuf
13. Ajouter 1 volume d'isopropanol
14. Mélanger par inversion (jusqu'à apparition de l'ADN sous forme de filament) et laisser précipiter pendant 10 min à - 20 °C
15. Centrifuger 1min à 10000 rpm

16. Eliminer le surnageant
17. Ajouter 200 µl d'éthanol 70% pour laver l'ADN, sans aucune agitation
18. Centrifuger 10 min à 10000 rpm
19. Eliminer le surnageant
20. Sécher le culot en inversant le tube sur un papier filtre pendant 10 min
21. Dissoudre le culot dans 20 µl TE.

➤ **Quantification de l'ADN**

L'analyse de l'absorption en UV des nucléotides procure une estimation simple de la concentration des acides nucléiques dans un échantillon. En effet, les bases puriques et pyrimidiques présentent dans les acides nucléiques montrent un maximum d'absorption autour de 260 nm, si l'échantillon d'ADN est pur (sans aucune contamination significative par les protéines et les solvants). Le rapport Absorbance 260/ Absorbance 280 doit donc être déterminé pour évaluer la pureté de l'échantillon. L'absorbance des échantillons d'ADN extrait dilué au 1/10^{ème} (dans de l'eau extra pure ou dans un tampon TE : 10 mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH8), est alors déterminée à 260 et 280 nm, par un spectromètre UV-Visible. Le zéro de l'appareil est obtenu avec de l'eau extra pure ou du tampon TE.

➤ **Détermination de la pureté d'ADN :**

Le rapport Absorbance 260/ Absorbance 280 doit être compris entre : 1,7 et 1,9. Si ce rapport est inférieur à 1,7 cela signifie que notre ADN est contaminé par de l'ARN ou du phénol, par contre s'il est supérieur à 1,9 cela suppose qu'il est contaminé par des protéines, et qu'il faudra le purifier avant de poursuivre les tests.

➤ **Concentration d'ADN :**

Celle-ci est déterminée par la formule suivante :

[ADN]= Absorbance 260 x facteur de dilution x 50 µg OÙ une unité d'absorbance correspond à 50µg/µl d'ADN (Hoisington *et al.*, 1994).

5.2. Amplification de l'ADN

La technique d'amplification par PCR consiste à effectuer de multiple cycle de réplication de l'ADN en utilisant comme amorce des oligonucléotides de synthèse qui s'hybrident avec des séquences complémentaires bordant la séquence à amplifier. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de la matrice, une étape d'hybridation des oligonucléotides à la matrice et une étape de polymérisation. Les essais d'amplification ont été réalisés avec un thermocycleur programmable, avec les amorces universelles.

Amorces	Séquence
NW9	5'- GCTAACTAACGTGCCAGCAG-3'
NW17	5'-TAAGGGCCATGAGGATTTGAC-3'

Ces amorces permettent d'amplifier une région interne au niveau de 16S rDNA. Approximativement 60 ng (3 μ l) d'ADN génomique est utilisée comme matrice.

Solutions	Volumes des solutions (μ l)
H ₂ O	26,75
Tampon Tris-HCl (1x)	10
MgCl ₂ (25mM)	6
dNTPs (10mM)	2
Amorce 1 (20 μ M)	1
Amorce 2 (20 μ M)	1
Taq polymerase	0.25
ADN	3

La réaction PCR a été effectuée selon le programme suivant :

Une dénaturation initiale 94°C pendant 5 min suivit par 30 cycles de : 94 °C pendant 1 min, 59 °C pendant 1 min et 72 °C pendant 2 min. A la fin de ces cycles, une élongation finale de 72°C pendant 10 min a été effectuée.

5.3. Purification de l'ADN

L'ADN a été purifié à partir du gel en utilisant un kit d'extraction d'ADN à partir de gels électrophorétique (Promega Gel extraction). Le protocole de purification est le suivant:

1. Couper avec une lame la bande contenant l'ADN
2. Peser cette portion de gel et la mettre dans un eppendorf stérile
3. Pour 10 mg de gel on ajoute 10 µl de la solution de fixation à la membrane
4. Incuber à 50°C en agitant à chaque fois le tube doucement jusqu' à dissolution de l'agarose
5. Transférer le mélange sur une minicolonne placée dans un tube collecteur de 2 ml (fourni) et centrifuger 1min à 13000 rpm, jeter l'effluent
6. Replacer la colonne sur le même tube collecteur et ajouter 700 µl d'une solution de lavage et centrifuger 1min à 13000 rpm
7. Jeter l'effluent et ajouter 500 µl de la même solution de lavage et centrifuger 5 min à 13000 rpm
8. Jeter l'effluent et centrifuger 1min à 13000 rpm afin de sécher la colonne
9. Jeter l'effluent et le tube collecteur
10. Transférer la colonne sur un tube eppendorf autoclavé et éluer l'ADN en déposant 25 µl de H₂O autoclavée
11. Incuber 2 min à température ambiante
12. Centrifuger 2 min à 13000 rpm
13. Passer à l'électrophorèse pour vérifier l'état de pureté de l'ADN

5.4. Séquençage de l'ADN et alignement de séquences

Les séquences nucléotidiques sont déterminées par la société Genome-Express (Grenoble, France). La réaction de séquençage a été effectuée par la méthode de « dideoxynucléotide chain termination » en utilisant la thermoséquenase «Amarsham Pharmacia Biotech » selon la technique enzymatique décrite par Sanger (1977). Les produits de séquençage ont été analysés avec un séquenceur d'ADN automatique ABI PRISM3100/3100-Avant Genetic Analyser (France).

La recherche des similitudes entre séquences dans les banques de données a été réalisée par le biais d'un BLAST (Basic local Alignment Search Tool).

Partie II : Production et purification de la lipase de *Staphylococcus aureus*

1. Préculture

Une préculture de 100 ml est réalisée dans des erlenmeyers de 500 ml. La préculture est incubée une nuit à 37 °C et à 220 rpm. Le milieu liquide A de préculture est composé de (5g/l peptone pepsique de viande, 2g/l extrait de levure et 1 g/l extrait de viande, 5g /l NaCl ; pH 7).

2. Culture

Plusieurs milieux de culture ont été testés, seul le milieu B, pour lequel nous avons obtenu le maximum d'activité lipasique, a été retenu. La composition du milieu de culture B est la suivante : 17g/l caséine peptone, 3g/l tryptone, 2,5g/l glucose, 5g/l NaCl, 2,5g/l phosphate bipotassique, pH 7).

La culture est inoculée à partir de la préculture en partant d'une densité optique (DO) de 0,6 à 600 nm. La culture est effectuée dans des erlenmeyers de 1 litre sous agitation pendant 24h à 200 rpm et à 37°C.

Un suivi de la sécrétion lipasique et la croissance bactérienne en fonction du temps est réalisé.

3. Dosage de l'activité lipasique

A. pH-Stat

Plusieurs techniques sont développées pour mesurer une activité lipasique (Beisson *et al.*, 2000). La technique adoptée dans ce manuscrit est celle du pH-Stat ; Il s'agit d'une méthode potentiométrique qui permet de mesurer les activités lipasiques à pH constant en utilisant des substrats émulsifiés. Cette technique permet de titrer automatiquement et en continu les acides gras libérés, lors de l'hydrolyse d'une émulsion de triacylglycérols par une lipase. Les acides gras sont titrés par addition de la soude 0,1 N dans le milieu réactionnel maintenu à pH constant (Figure 11). Le pH de consigne choisi correspond au pH optimum d'activité de l'enzyme étudié dans les conditions de dosage (Gargouri *et al.*, 1986). La quantité d'acide gras libérée, en fonction du temps, correspond à l'activité enzymatique exprimée en unité lipase internationale. Une unité lipase correspond à la libération d'une μ mole d'acide gras par min. L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions optimales de dosage pH 8 et à 40°C.

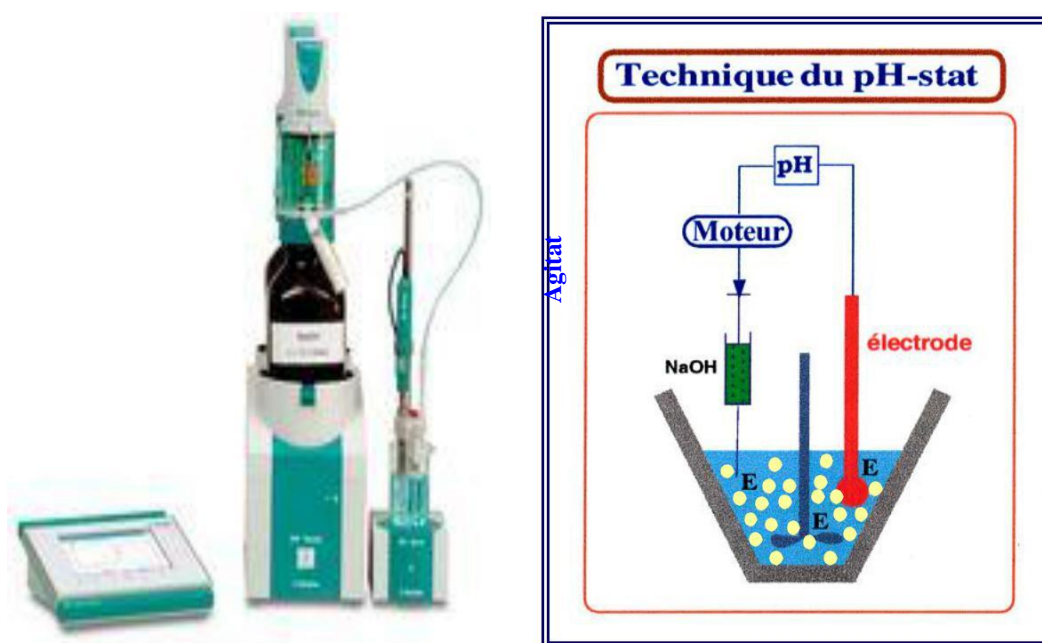


Figure 11: Représentation schématique condensée de la technique de pH-stat. E : enzyme en solution.

Le substrat utilisé est une émulsion d'huile d'olive à 10 % (10 ml d'huile d'olive dans 90 ml de gomme arabique à 10 % (100 g gomme arabique dans un litre d'eau cuite puis filtré par une gaz médicale)) (Rathelot *et al.*, 1975). Dans ce cas, le milieu de dosage contient 10 ml d'émulsion dans 20 ml eau distillée, 1 mM CaCl₂, 2 mM NaDC.

Dans le cas où la tributyrine (TC₄), la trioctanoïne (TC₈) qui sont utilisés comme substrat, le milieu de dosage contient 250 µl de substrat dans 30 ml de tampon Tris-HCl 2,5 mM, pH 8 en présence de 1 mM CaCl₂ et 4 mM NaDC (Gargouri *et al.*, 1992).

La tripropionine, partiellement soluble dans l'eau (CMC = 12 mM), a été utilisée pour l'étude de l'activation interfaciale de la lipase étudiée selon le protocole décrit par Ferrat *et al.*, (1997). La libération de l'acide propionique est suivie à pH 7 et à 37 °C.

Pour le dosage de l'activité phospholipasique, le substrat utilisé est le phosphatidylcholine (PC) ou le jaune d'œuf. Le milieu de dosage contient 15 ml émulsion jaune d'œuf dans 15 ml d'eau distillée (1 jaune d'œuf dispersé dans 90 ml d'eau distillée) en présence de 2 mM NaDC et 1 mM CaCl₂ à pH 8 et à 37°C (Six et Dennis, 2000).

B. Barostat

La technique du pH-stat, qui représente une méthode simple et rapide pour doser des activités lipasiques, ne permet pas de contrôler les paramètres physicochimiques de l'interface telle que la pression de surface et d'expliquer le comportement des lipases aux interfaces. La qualité de l'interface est mieux évaluée à l'aide des films monomoléculaires qui permet aussi d'étudier les interactions lipide/protéine et d'apprécier certaines paramètres telles que la pression de surface et la pression critique.

La technique des films monomoléculaires permet de mesurer des cinétiques d'hydrolyse à une tension interfaciale constante (Verger et De Hass, 1973, 1976; Gargouri *et al.*, 1985, 1989b; Piéroni *et al.*, 1990; Ransac *et al.*, 1991).

Cette technique utilise une cuve en Téflon d'ordre zéro formée de deux compartiment : un compartiment réactionnel et un compartiment réservoir. La cuve est remplie d'une solution de tampon réactionnel. Une plaque mince de platine, plongée à la surface de la phase aqueuse

est fixée à une électromicrobalance permettant de mesurer la pression de surface (π) (Figure 13). Au cours d'une cinétique, un film monomoléculaire de lipides est étalé à la surface de la phase aqueuse. La surface occupée par le film lipidique peut être limitée et réglée avec une barrière en téflon mobile qui en se déplaçant sur le compartiment réservoir permet de maintenir la pression superficielle constante et d'amener par la suite des molécules du substrat à hydrolyser à la surface du compartiment réactionnel. Lorsqu'une lipase est injectée dans le compartiment réactionnel au-dessous du film lipidique, la pression de surface diminue, en raison de la solubilisation des produits d'hydrolyse et la barrière se déplace de maintenir la pression de surface constante.

Avec cette technique, il est possible de mesurer et de contrôler certains paramètres importants telles que la pression interfaciale (l'énergie libre interfaciale), la densité superficielle et les interactions lipides/Protéines.

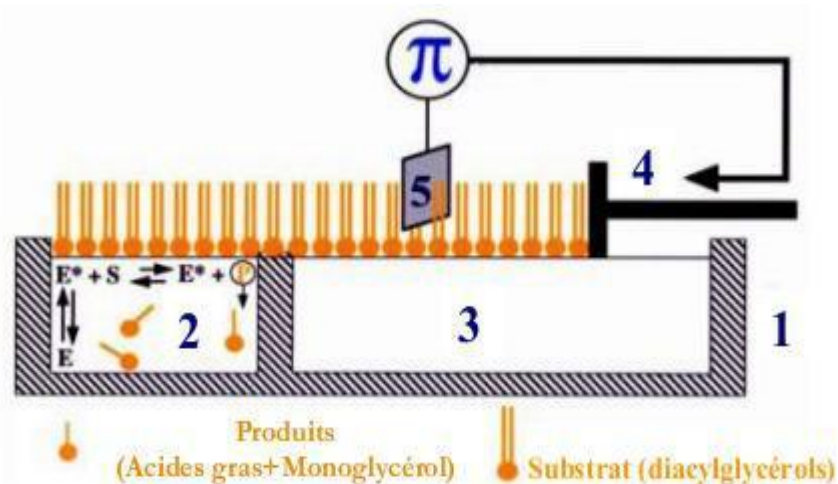


Figure 12 : Représentation schématique d'une cuve d'ordre zéro, utilisée pour la mesure de l'activité lipase sur des films monomoléculaires en utilisant la méthode de Wilhelmy (1863). 1: Cuve en téflon, 2: Compartiment réactionnel, 3: Compartiment réservoir, 4: Barrière mobile, 5: Lame en platine, E: Enzyme en phase aqueuse, E*: Enzyme adsorbé à l'interface lipide /eau.

1. Mesure de la pression superficielle de la SAL

Afin de mesurer la pression superficielle de la SAL, trois isomères de Dicaprine (DiC10) ont été utilisés : 1,2 DiC10, 2,3 DiC10 et 1,3 DiC10 (Sigma). Lors d'une cinétique, les deux compartiments, réservoir et réactionnel, sont remplis avec le tampon de dosage: 10 mM Tris, pH 8, 100 mM NaCl, 21 mM CaCl₂ et 1mM EDTA. Le lipide, solubilisé dans le chloroforme à une concentration de 1mg/mL, est étalé à la surface du compartiment réservoir jusqu'à ce que la pression désirée soit atteinte. Cette pression de surface est mesurée à l'aide d'une lame en platine et sa stabilité est vérifiée pendant quelques minutes. L'enzyme est injectée par la suite sous le film lipidique dans le compartiment réactionnel et tout changement de pression de surface est récompensé par le déplacement de la barrière en téflon.

2. Mesure de la pression critique de la SAL

La pression critique présente un paramètre déterminant pour l'évaluation du pouvoir de pénétration des lipases dans un film lipidique (un film de phosphatidylcholine DiC12PC). La variation de la pression de surface ($\Delta\pi$), suite à la pénétration de la SAL, est déterminée à différentes valeurs de pression initiale (π_i). La pression critique de la SAL est calculée par une extrapolation linéaire à zéro de la courbe expérimentale : variation de la pression de surface en fonction de la pression initiale : $(\Delta\pi)=f(\pi_i)$.

4. Purification de la lipase

1 L du milieu de culture est centrifugé à 8500 rpm pendant 15 min. Le surnageant renfermant l'activité enzymatique est récupéré. Le protocole expérimental de purification de la lipase comporte les étapes suivantes :

Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Cette précipitation est un procédé basé sur la différence de solubilité des protéines (Osterland et Janson, 1997). L'effet des sels sur la solubilité des protéines dépend de la force ionique de la solution. A faible force ionique, les sels ont un effet solubilisant tandis qu'à force ionique élevée, au contraire, ils provoquent l'insolubilisation des protéines (relargage). Cette propriété fait intervenir le caractère plus ou moins hydrophobe des protéines. La modification de la couche d'hydratation, par addition de sels, entraînera l'exclusion des molécules d'eau et permettra la formation de précipité.

On peut donc, en choisissant le degré de saturation en sels, favoriser la précipitation d'une ou d'un ensemble de protéines (Voir tableau en annexe démontrant les quantités de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C).

Le surnageant de culture ainsi obtenue (1L), subit une précipitation sous agitation à 4°C pendant 1h au sulfate d'ammonium à 65% de saturation. Après centrifugation (9500 rpm, 30 min, 4°C), le culot obtenu est repris dans un minimum de tampon A puis centrifugé (13000 rpm, 5 min, 4°C). Le surnageant récupéré est traité thermiquement à 50 °C pendant 3 min puis centrifugé de nouveau à 13000 rpm pendant 5 min. Ensuite, on passe à la purification sur colonnes.

a. Chromatographie de filtration S200

Le principe de cette technique est la séparation des protéines selon leur taille en utilisant un tamis moléculaire. Les molécules vont se répartir, par diffusion entre deux phases aqueuses, intérieure et extérieure aux grains du gel. Plus les molécules sont grosses, plus elles pénètrent dans la phase intérieure, plus vite elles filtrent à travers la colonne. Au cours de l'élution, la phase mobile liquide va entraîner en premier lieu les molécules exclues, les molécules de taille inférieure nécessiteront un volume d'éluant d'autant plus grand que leur taille est petite. Ce type de chromatographie permet donc :

- L'élimination des sels d'une solution protéique
- Le fractionnement des protéines en fonction de leur poids moléculaire
- La détermination du poids moléculaire d'une protéine en comparant son volume d'élution à celui de protéines de référence

L'échantillon est déposé sur une colonne de séphacryl S200 (2.5 x 150 cm) préalablement équilibrée dans le tampon A. L'élution des protéines est faite avec le même tampon, à un débit de 30 ml/h. L'élution des protéines est suivie par la lecture de la DO à 280 nm et par la mesure de l'activité lipasique. Cette étape est résumée ci-dessous :

1. Déposer avec le maximum de soins la fraction. Généralement le volume du dépôt doit représenter environ 1à5% du volume total du gel

2. Laisser couler la solution protéique jusqu'à ce qu'elle effleure la surface du gel. Eliminer par lavage avec un petit volume d'éluant les traces d'échantillons restant sur la paroi de la colonne
3. Le réservoir du tampon A est ensuite connecté à la colonne. Ajuster la hauteur du réservoir de manière à obtenir un débit d'environ 0,5 /ml /min
4. Collecter les fractions de 5 ml à l'aide d'un collecteur de fractions
5. Lire les DO des différentes fractions à 280 nm
6. Réaliser les dosages de l'activité lipasiques sur les fractions collectées.

b. Chromatographie échangeuse de cations

Une résine portant des groupements négatifs est dite "échangeuse de cations" parce que ce sont des cations ou les groupements basiques d'une protéine qui interagissent avec elle.

L'éluion des protéines d'une telle résine se fait par l'augmentation progressive de la force ionique du tampon d'éluion, ou en changeant le pH de telle façon que la protéine soit moins chargée. Un gradient salin permet de séparer les protéines selon leur degré de charge positive ou négative à un certain pH.

Les fractions actives issues de la colonne S₂₀₀ sont collectées puis déposées sur S-Sépharose (2 x 30 cm) équilibrée dans le même tampon A. Les protéines fixées sont éluées avec un gradient linéaire de 200 mM à 600 mM de NaCl dans le tampon A. Des fractions de 4 ml sont collectées à un débit de 45 ml/h.

c. Chromatographie de filtration G75

Les fractions contenant l'activité sont collectées et concentrées jusqu'à un volume final de 1ml et déposées sur une colonne de filtration G75 préalablement équilibrée avec le même tampon. Des fractions de 2 ml sont collectées à un débit de 8 ml/h.

C. Détermination de la masse moléculaire de la lipase purifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE)

L'analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes a été réalisée selon la méthode de Laemmli, (1970) décrite pour séparer les protéines en fonction de leurs poids moléculaire.

Les protéines sont dénaturées par du sodium dodecyl sulfate (SDS), molécule très fortement chargée négativement. Les diverses fractions obtenues ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les gels sont colorés au bleu de coomassie pour révéler les bandes protéiques.

D. Détermination de la concentration en protéines

Le dosage de protéines par la méthode de Bradford (1976) utilise le réactif éponyme, dont le constituant principal est le bleu de Coomassie. Sous sa forme cationique libre, ce réactif absorbe la lumière à une longueur d'onde de 465 nm. Lorsqu'il est mis en contact avec une solution protéique à doser, il se lie aux protéines présentes et aux groupements aromatiques ce qui a pour effet de déplacer sa principale raie d'absorption à 595 nm (forme anionique).

L'absorbance du rayonnement visible à 595 nm est mesurée par un spectrophotomètre, et permet de doser indirectement la teneur en protéine de la solution à l'aide d'une courbe d'étalonnage en BSA utilisée comme standard (coefficient d'extinction molaire $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ est de 6,7) (Sigma Chemical Company, USA).

E. Détermination de l'extrémité NH₂-terminale

Dans le but de séquencer l'extrémité N-terminale de l'enzyme purifiée, on utilise une membrane PVDF. Après électrophorèse de l'enzyme dans les conditions dénaturantes, la bande correspondant à la protéine objet de l'étude est coupée, lyophilisée ensuite mise au shaker pendant 24h au contact de 200 µl de tampon de transfert (150 mM Tris-HCl pH 8, 0, 3% SDS). On ajoute par la suite une membrane PVDF lavée au méthanol 10% et on l'incube au shaker pendant 24H.

La séquence N-terminale de la protéine purifiée est déterminée par la méthode d'Edman automatisée des protéines sur un séquenceur Applied Biosystem 492 cLC (Hunkapiller et Hood, 1978; Hewick *et al.*, 1981). Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir: le couplage, le clivage et la conversion.

Ces analyses ont été réalisées à la plateforme protéomique de l'IMM, CNRS Marseille. La dégradation d'Edman permet de libérer de façon séquentielle, à partir de l'extrémité N terminale, les acides aminés d'un peptide ou d'une protéine en utilisant l'isothiocyanate de phényl (IPTC) comme réactif. A pH alcalin, l'amine primaire N- terminal de la protéine réagit avec l'IPTC pour former un complexe phénylthiocyanaldantoine (PTHAA), tout en laissant le reste de la chaîne polypeptidique intact. La chaîne résiduelle, avec un nouvel acide aminé N-terminal, peut être alors soumise à un nouveau cycle de dégradation permettant de libérer et d'identifier l'acide aminé suivant, et ainsi de suite. A chaque cycle, les dérivés PTH-AA libérés sont séparés par chromatographie HPLC (modèle 120 A, Applied biosystem) sur une colonne C18 (Séphéri_5 PTH, 5M) de type phase inverse (22x0, 21cm) et détectés à 269 nm (Figure12).

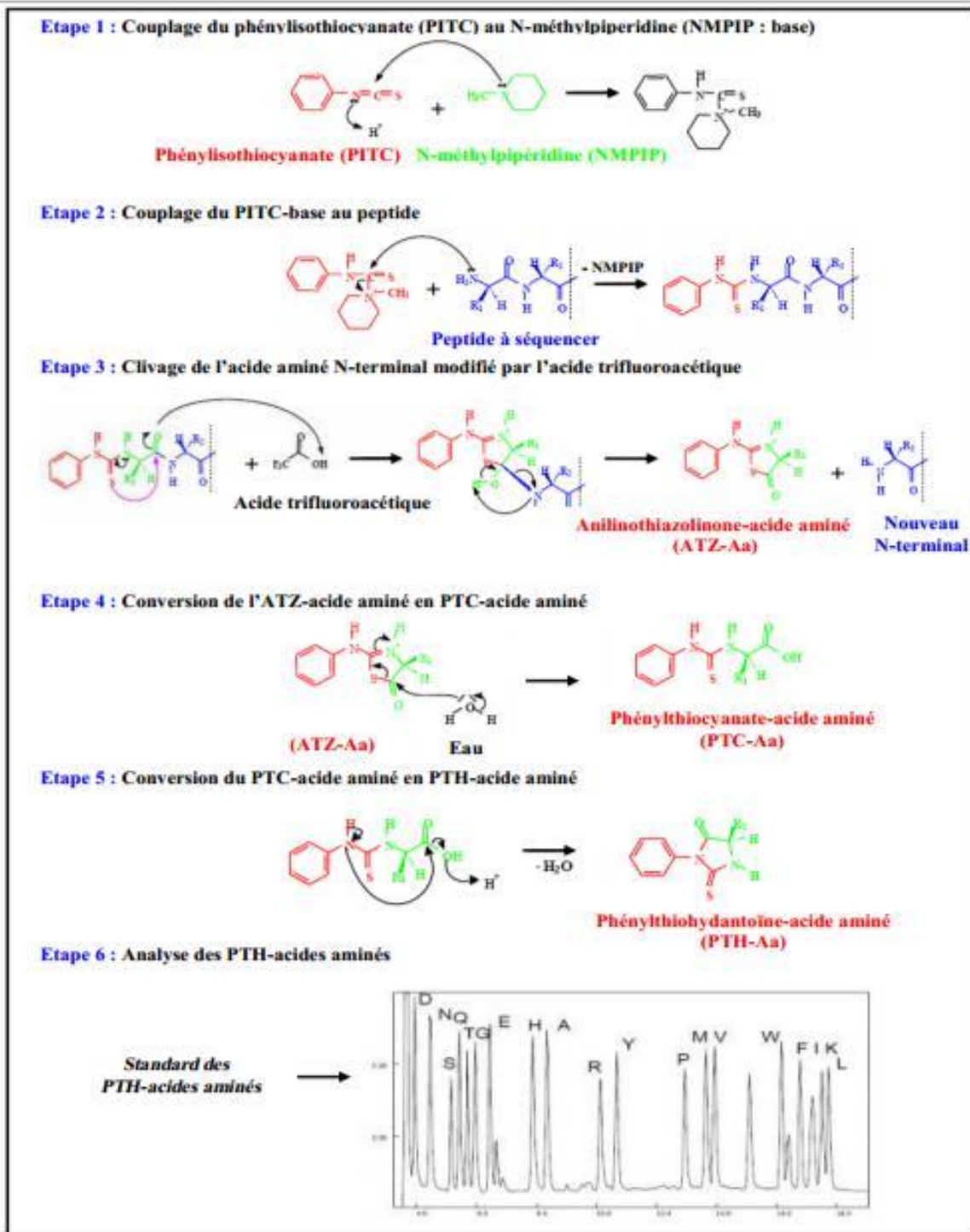


Figure 13 : Dégradation chimique d'Edman automatisée sur un microséquenceur de protéines (Edman *et al.*, 1950).

Partie III : Caractérisation biochimique de la lipase de *Staphylococcus aureus*

1. Technique de pH-Stat

1.1. Effet du pH sur l'activité lipasique

L'activité lipasique est mesurée à 37°C et à différents pH en utilisant l'émulsion d'huile d'olive comme substrat en présence de 2 mM NaDC et 1mM CaCl₂.

1.2. Effet de la température sur l'activité lipasique :

L'effet de la température sur l'activité lipasique a été étudiée en mesurant l'activité à différentes températures (37, 40, 42, 45 et 50°C) en utilisant l'huile d'olive comme substrat à pH 8 et en présence de 2mM NaDC et 1 mM CaCl₂.

1.3 Effet du calcium sur l'activité lipasique :

L'activité lipasique est mesurée en utilisant une émulsion d'huile d'olive comme substrat en présence de concentrations croissantes de calcium dans les conditions optimales de pH et de température. En absence de calcium, l'activité lipasique est mesurée en présence de 10 mM EDTA.

1.4 Effet des composés amphipatiques sur l'activité lipasique :

L'effet de détergents naturels NaDC sur l'activité lipasique a été réalisé en utilisant l'huile d'olive comme substrat. Le test est effectué dans les conditions optimales de dosage.

1.5. Stabilité de la lipase en fonction du pH

L'enzyme est incubé à des pH variant de 3 à 12 en utilisant différents tampons: glycine-HCl 50 mM (pH 3-4); acétate de sodium 50 mM (pH 5-6); phosphate 50 mM (pH 7); Tris-HCl 50 mM (pH 8-9), borate 50 mM (pH 10-12). Après 1 h d'incubation à 4°C, l'échantillon est centrifugé pendant 2 min à 13 000 rpm et l'activité résiduelle est mesurée dans le surnageant dans les conditions optimales en utilisant l'huile d'olive comme substrat.

1.6. Stabilité de la lipase en fonction de la température

La stabilité de la lipase en fonction de la température a été étudiée en incubant l'enzyme à différentes températures (25, 37, 40, 47 et 50°C) pendant 10 min. Après centrifugation à

13000 rpm pendant 2 min, l'activité résiduelle est mesurée dans le surnageant dans les conditions optimales en utilisant l'émulsion d'huile d'olive comme substrat.

Partie V : Clonage du gène codant la forme mature de la SAL

1. Amplification du gène qui code pour la SAL

Le gène codant pour la lipase de *S. aureus* a été amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides suivants (Genom express, Grenoble, France):

SAL Fw : 5'- AATCAAGTACAACCACTTAAC -3'

SAL Rv : 5'- TTAAGTTGCTTTCAATTGTGT-3'

Ces oligonucléotides ont été déduits, respectivement, à partir de l'extrémité N-terminale de la lipase purifiée et la partie C-terminale de la lipase de *S. aureus* (SAL3) (Horchani *et al.*, 2009).

Le volume réactionnel de 50 µL comporte 5µL du tampon réactionnel (10X), l'ADN, de 0,1µM à 1µM des deux amorces, 0,2 mM dNTP, et 1,25U de la Go Taq DNA Polymérase (Promega). L'ADN codant pour l'enzyme étudiée a été amplifié en utilisant un thermocycleur (Techne® TC-312, LabSource). Le programme de la PCR consiste en une première étape de dénaturation pendant 3min à 95°C suivie par 35 cycles de polymérisation : dénaturation (1min à 95°C), hybridation (1min à 49°C) et élongation (1,30 min à 72°C). L'élongation finale est effectuée pendant 5 min à 72°C. Le produit de la PCR a été purifié avec le kit Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega).

2. Clonage du gène qui code pour la SAL mature

2.1. Ligation du plasmide et de l'insert

La ligation de l'insert avec le vecteur de clonage (pGEM-T) est réalisée avec la T4 ADN ligase (Promega). Le rapport molaire utilisé entre le plasmide et l'insert est de 1/3. La réaction est effectuée dans un volume final de 10 µl.

2.2. Transformation d'*E-coli*

2.2.1 Préparation des cellules d'*E-coli* chimiocompétentes

Une préculture de 3 ml de milieu LB inoculé par la souche *E.coli* appropriée est placée sous agitation (220 rpm) à 37 °C pendant une nuit. Cette préculture sert pour ensemercer une

culture de 50 mL de milieu LB à 37°C sous agitation jusqu'à la phase exponentielle de croissance ($DO_{600\text{ nm}} = 0.4$ à 0.6). Ensuite, les cellules ont été collectées par centrifugation à 6500 rpm pendant 15 min à 4°C, et mises en suspension dans 10 mL de 0,1M $CaCl_2$ à froid. Après 45 min d'incubation dans la glace, les cellules récoltées, après centrifugation, sont resuspendues de novo dans 500 μ l de $CaCl_2$ à froid (0,1M). Les cellules compétentes ont été maintenues pendant 2h dans la glace avant leur utilisation.

2.2.2. Transformation des cellules compétentes d'*E-coli*

La transformation des cellules chimiocompétentes est faite par choc thermique. Les bactéries sont mélangées avec 6 μ l d'ADN plasmidique puis incubées pendant 45 min dans la glace suivie d'une incubation à 42 °C pendant 90 secondes puis les tubes sont transférés immédiatement dans la glace et incubés pendant 3 min dans la glace. Du milieu liquide LB, stérile, est ajouté aux cellules puis celles-ci sont incubées pendant 1h à 37 °C. 100 μ L des cellules transformées est ensuite étalée sur milieu LB solide contenant 50 μ g / ml d'ampicilline en présence d'IPTG et X-gal.

2.2.3. Extraction et purification de l'ADN plasmidique

La purification d'ADN plasmidique est réalisée avec le Kit Midiprep System (Promega). Ce kit utilise la méthode de la lyse alcaline des cellules, initialement proposée par Birnboim et Doly (1979) et reprise par Sambrook et *al.*, (1989). Après extraction, la solution contenant l'ADN plasmidique est transférée dans une colonne à filtre de silice.

L'ADN retenu est lavé puis élué, soit avec de l'eau, soit avec un tampon approprié. L'ADN plasmidique purifié est dosé par spectrophotométrie d'adsorption à 260 nm. Sa concentration est calculée par la formule suivante : $C(\text{g/ml}) = A_{260} \times 50$.

La qualité du plasmide extrait est estimée par une électrophorèse sur gel d'agarose (1%). L'insertion du gène cible dans le vecteur de clonage est vérifié par une digestion avec *EcoRI*.

2.2.4. Séquençage des produits amplifiés

Le séquençage a été effectué sur les plasmides recombinants en utilisant comme amorces celles du promoteur T7 (sens) et de terminateur Sp6 (antisens) (Promega). Ces séquences étant présentes dans le vecteur de clonage utilisé.

2.2.5. Analyse bioinformatique des séquences

La recherche de similitudes entre séquences dans les banques de données a été réalisée par le biais d'un BLAST (Basic Local alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990).

Résultats

&

Discussion

I. Isolement et sélection des souches lipolytiques

1. Sélection des espèces lipolytiques

Dans le but d'isoler une souche lipolytique, un ensemble de souches collectées à partir de différents biotopes algériens (Smen fabriqué traditionnellement, Berouil, Saumures d'olives, sol grasseux, etc.) sont passées au crible. Le criblage est réalisé sur gélose LB en présence de 1% d'huile d'olive et 1‰ Rhodamine selon la technique décrite par Kouker et Jeager (1987). Dans ce test, les colonies qui produisent une activité lipase entraînent la formation d'un halo fluorescent de couleur orange qui peut être visualisé sous lumière UV. Jeager *et al*, ont postulé que la fluorescence était plutôt due à la formation d'un complexe Rhodamine B- acide gras libre, provenant d'huile d'olive hydrolysé (Jeager *et al*, 1994). Après incubation à 37 °C pendant 24 h, dix souches qui présentent un halo fluorescent sous UV sont retenues. Parmi elles, une souche nommée (S4) a été retenue pour sa tolérance aux détergents naturels (4 mM NaDC).

La figure 14 présente le résultat du criblage des espèces lipolytiques.

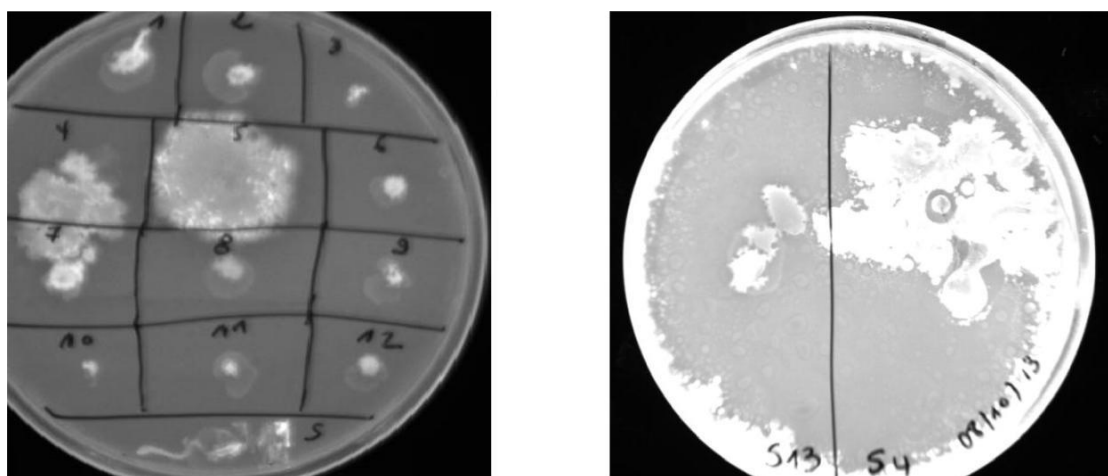


Figure 14: Screening de l'activité lipasique sur LB solide en présence 1‰ de Rhodamine et 1% d'huile d'olive (pH 7, 37°C).

2. Identification biochimique de la souche

L'identification biochimique de la souche sélectionnée révèle que la bactérie est une cocci, Gram+, catalase (+) et coagulase (+) (Figure 15). Les résultats obtenus à partir de la galerie API STAPH, montrent qu'il s'agit de *Staphylococcus aureus* (Tableau 6).

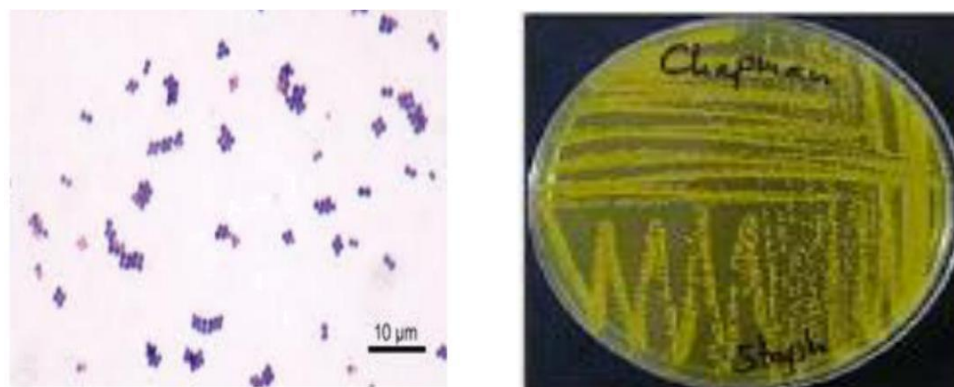


Figure 15: Aspect microscopique (a) après coloration de Gram et macroscopique (b) de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 6: Caractères biochimiques d'identification de *Staphylococcus aureus*.

UR E	AD H	ODC	VP	ONPG	NIT	GLU	TRE	MAN	XYL	SAC	GLY	MNE	LA C	RAF
+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

I. Identification moléculaire de la souche

Le gène codant pour l'ARN 16 S de la souche retenue a été amplifié avec les amorces universelles FW17 et RW9. Une bande de taille attendue (750 pb) est obtenue (Figure 16). Le séquençage du gène amplifié montre qu'il s'agit de *S. aureus*.

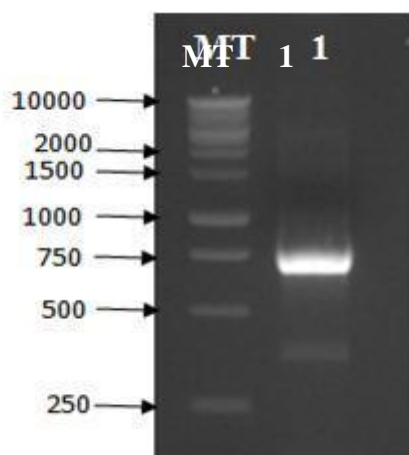


Figure 16: Amplification de l'ARN 16S de la souche S4 par les amorces universelles. MT :Marqueur de taille, 1 : produit PCR.

II. Production et purification de la lipase de *Staphylococcus aureus*

1. Production de la lipase de *S. aureus*

Les conditions de la culture assurant une meilleure production d'activité lipolytique par la souche sélectionnée, *S. aureus*, ont été optimisées. Le maximum d'activité lipasique est obtenu avec une inoculation de 3.10^8 UFC/ml pendant 24h à 37°C et à 200 rpm. La sécrétion de la lipase n'est induite ni par les triacylglycérols (tributyryne ou huile d'olive) ni par les esters (tween 20, tween 80). Le suivi de la sécrétion lipasique et la croissance bactérienne en fonction du temps montre que la lipase est sécrétée dès le début de la phase de croissance et atteint son maximum d'activité (20 U/ml) après 24 h de culture (Figure 17). Des niveaux de production comparables ont été obtenus avec *S. simulans* et *S. xylosus* (Sayari *et al.*, 2001b ; Mosbah *et al.*, 2005).

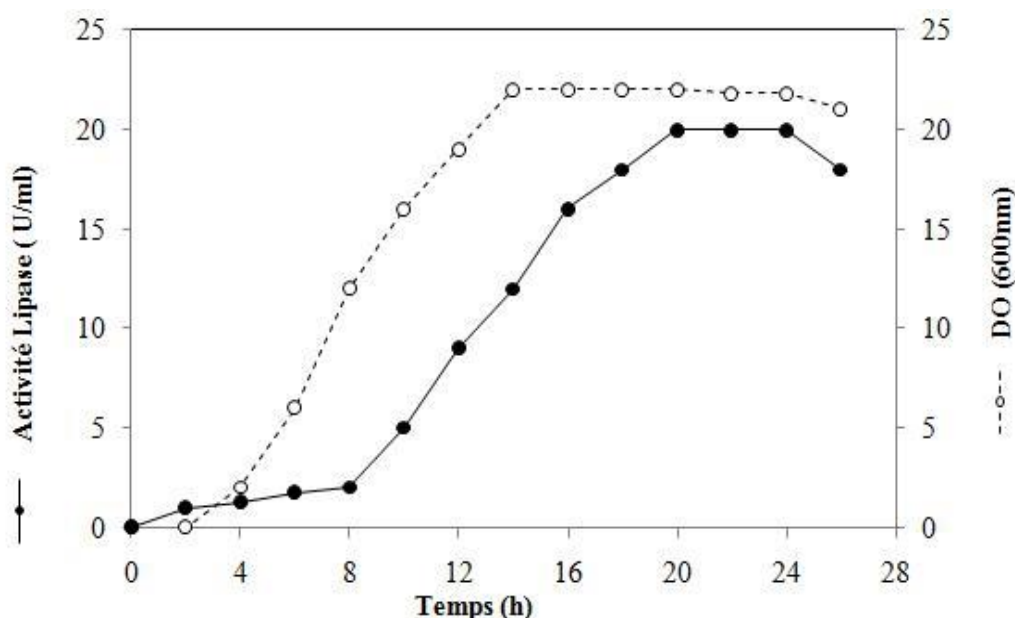


Figure 17: Suivi de la croissance (○) et de la production lipasique (●) de *Staphylococcus aureus* à 200 rpm et à 37°C. La croissance est estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

La synthèse et la sécrétion des lipases par des bactéries est influencée par une série de facteurs environnementaux comme des ions, des sources de carbone, ou la présence des polysaccharides non métabolisables.

Les Lipases bactériennes sont influencées par des facteurs alimentaires et physico-chimiques ; comme la température, pH, l'azote et les sources de carbone, présence des lipides, sels inorganiques, conditions émouvants, concentration en oxygène dissout (Rosenau et Jaeger, 2000).

Le facteur principal pour l'expression de l'enzyme de lipase est la source de carbone. Les lipases généralement produites en présence de la source de lipide telle que le pétrole, les triacylglycérols, les acides gras, d'esters hydrolysables, l'addition de tweens et de glycérols à la source de carbone, le type de source d'azote influence également la production des lipases. Généralement, la source organique d'azote est préférée par la bactérie, telles que peptone et l'extrait de levure (Gupta et *al.*, 2004).

Le pH initial du milieu de croissance est important pour la production de lipase. La plupart des bactéries préfèrent un pH autour de 7.0 pour une meilleure croissance et production de lipase. La température optimale pour la production de lipase coïncide avec la température de croissance du micro-organisme. On a signalé que des lipases sont produites dans des températures allant de 20 à 45°C (Jaeger et *al.*, 1999). Les périodes d'incubation changent de peu d'heures en beaucoup de jours jusqu'à ce que la production maximale de lipase à partir des bactéries soit enregistrée.

2. Purification de la lipase de *Staphylococcus aureus*

Des méthodes de purification doivent être appliquées afin de comprendre les fonctions enzymatiques, les relations entre l'environnement et les structures à trois dimensions (Reis et *al.*, 2008).

La lipase de *S. aureus* a été purifiée à homogénéité à partir du milieu de culture. Le protocole expérimental de purification a été optimisé et comprend 4 étapes : une précipitation par le sulfate d'ammonium à 65% de saturation, suivie d'un traitement thermique à 50°C pendant 10 min. après centrifugation le surnageant est déposé sur une colonne de filtration séphacryl S-200. Les fractions actives sont collectées et déposées sur une chromatographie échangeuse de cation mono S-sépharose. L'enzyme retenu est élué avec un gradient linéaire de NaCl allant de 200 mM à 600 mM puis déposées sur une deuxième filtration sépharose G-75 (Figure 18).

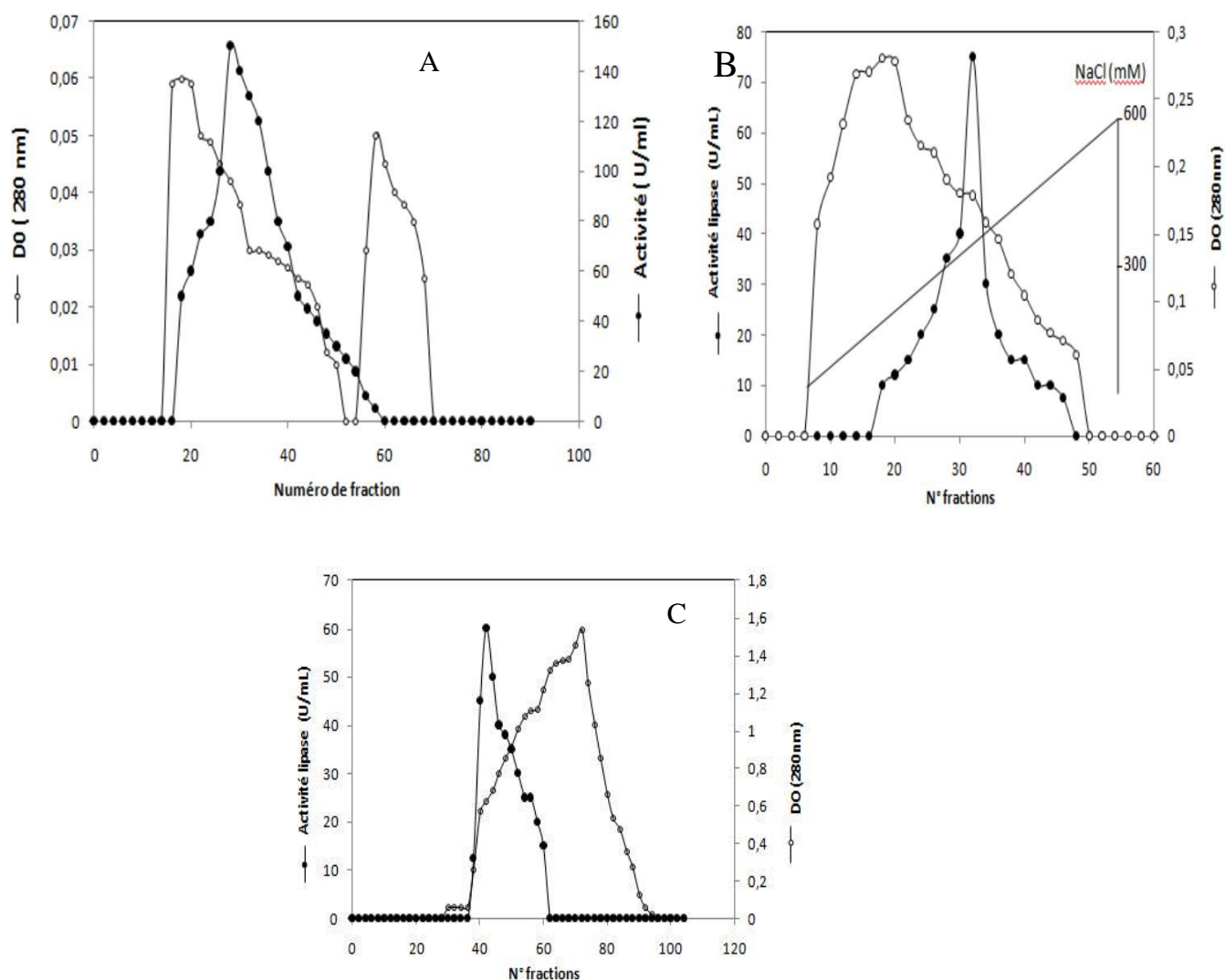


Figure 18: Profil d'éluion de la lipase de *Staphylococcus aureus* déposée sur : (A) une colonne de filtration Séphacryl S200 suivi d'une colonne échangeuse de cations (B), Les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de 200 mM à 600 mM de NaCl dans le tampon A. Les fractions actives sont déposées sur une colonne de filtration G75 (C), équilibrées dans le même tampon A.

L'analyse des fractions actives, éluées de la deuxième filtration, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes, montre que la SAL présente une seule bande de masse moléculaire apparente égale à 45 kDa (Figure 19).

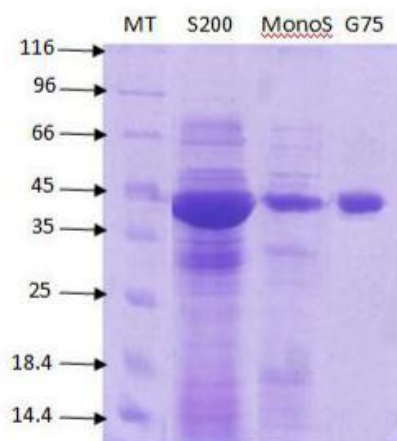


Figure 19:Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% dans les conditions dénaturantes. L'échantillon (20µg) est précipité par deux volumes d'acétone, le culot est ensuite repris dans 20µl d'eau distillé. Piste 1: Marqueur de taille, Piste 2: Sortie S200, Piste 3 : Sortie Mono-S et enfin Piste 4: Sortie G75.

L'enzyme est purifiée avec un rendement de 32% avec une activité spécifique de 555 U/mg sur une émulsion d'huile d'olive. Le tableau suivant résume les étapes de purification de la lipase de *S.aureus* qu'on a nommé « SAL ».

Tableau 7: Tableau de purification de la lipase de *Staphylococcus aureus* « SAL »

Étapes de purification	Activité totale (UT)	Quantité de protéines (mg)	Activité Spécifiques (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Surnagent	13000	380	34,2	100	1
Précipitation sulfate d'ammonium	12000	93.9	127,8	92	3,7
Traitement thermique	10800	38	283	83	8,2
S200	9000	19	466,7	69	13,6
Mono-S	6000	12	500	46	14,6
G75	4200	7.5	555,5	32	16,2

Le séquençage NH₂ terminal de la lipase purifiée nommée SAL permet l'identification de 20 acides aminés (N-Q-V-Q-P-L-N-K-Y-P-V-V-F-V-H-G-F-L-G-L). Par comparaison avec la lipase de *Staphylococcus simulans* (SSL)(Sayari *et al.*, 2001b) et la lipase de *Staphylococcus xylosus* (SXL) (Mosbah *et al.*, 2005) , on remarque la délétion d'un résidu alanine (A) à l'extrémité N-terminale. Par contre, on remarque la délétion de trois résidus du coté N-

terminal (LKA) par rapport à la séquence de la lipase de *Staphylococcus aureus* 3 (SAL3) (Horchani *et al.*, 2008) et à celle de la lipase de *Staphylococcus aureus* SAL NCTC8530 (Simons *et al.*, 1998). Cette différence pourrait être expliquée par les différentes étapes de protéolyse survenues lors du processus de maturation de la lipase des *Staphylocoques* après leurs sécrétions dans le milieu de culture.

Tableau 8 : Séquences NH₂-terminales de différentes lipases des différentes espèces de *Staphylocoques*.

Présent travail	N-Q-V-Q-P-L-N-K-Y-P-V-V-F-V-H-G-F-L-G-L
SSL (Sayari <i>et al.</i>, 2001b)	ANQVQPLNKYPVVFVHGFLGLVG
SXL (Mosbah <i>et al.</i>, 2005)	ANQVQPLNKYPVVFVHGFLGLVG
SAL3 (Horchani <i>et al.</i>, 2008)	LKANQVQPLNKY

II. Caractérisation biochimique de la lipase de *S.aureus*

Malgré la grande homologie de séquences entre les différentes lipases de *Staphylocoques*, ces enzymes présentent des différences significatives au niveau des caractéristiques biochimiques et catalytiques à savoir la spécificité de substrat, le pH optimum d'activité et l'activation interfaciale.

1. Phénomène d'activation interfaciale

La triopionine (TC₃) est considérée comme étant le meilleur système, parmi les triacylglycérols à chaînes courtes, qui permet de mettre en évidence le phénomène d'activation interfaciale (Ferrato *et al.*, 1997). Pour cela, nous avons mesuré l'activité de la SAL en fonction de concentrations croissantes de TC₃ émulsifiée dans la gomme arabique à 0,33%. Les résultats obtenus montrent que la SAL est pleinement active même à des concentrations de TC₃ inférieures à la limite de solubilité de ce substrat. Ce comportement est celui d'un enzyme qui ne présente pas le phénomène d'activation interfaciale (cinétique de type Michaelis-Menten) (Figure 20).

L'activation interfaciale ne peut pas être le critère unique et nécessaire pour distinguer les lipases des estérases (Ferrato *et al.*, 1997). En effet, les lipases sont définies comme étant une famille d'enzymes capables d'hydrolyser des triacylglycérols à chaînes longues indépendamment de la présence ou de l'absence du phénomène d'activation interfaciale.

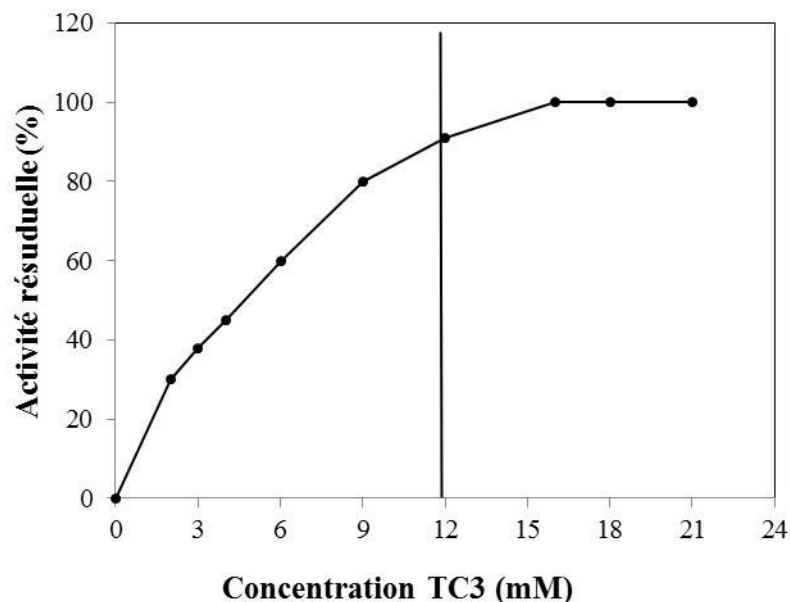


Figure 20 : Taux d'hydrolyse de TC3 par la SAL en fonction de différentes concentration en substrat. La libération de l'acide propionique est mesurée à pH 7 et à 37°C sur pH-Stat. La CMC de TC3 (12 mM) est indiquée en pointillé.

2. Spécificité de substrat de la SAL

Différents triacylglycérols à différentes longueurs de chaînes ont été testés pour déterminer l'activité spécifique de la SAL. Les résultats obtenus montrent que cette lipase est plus active sur les triglycérides à chaînes courtes (TC4) que sur ceux à chaînes moyennes (TC8) et longues (Huiles d'olive). Ce comportement est similaire à celui de la lipase de *Staphylococcus aureus* 3 (SAL3) (Horchani *et al.*, 2008). En effet, une activité spécifique de 1600 U/mg et de 555 U/mg a été mesurée en utilisant la tributyrine et l'huile d'olive comme substrats, respectivement, en présence de 1mM CaCl₂ et 4 mM NaDC pour la tributyrine et en présence de 1mM CaCl₂ et 2 mM NaDC pour l'émulsion d'huile d'olive.

En comparant les activités spécifiques de différentes lipases de *staphylocoques*, mesurées sur la tributyrine, on remarque que la SAL est plus active que la SEL3 (lipase 3 de *S. epidermidis*), la SAL1 (lipase 1 de *S. aureus*), la SSL (lipase de *S. simulans*) qui présentent

des activités spécifiques de 121; 110 et de 1000 U/mg, respectivement (Simons *et al.* 1998 et Sayari *et al.*, 2001b). La capacité de la SAL d'hydrolyser les triglycérides à chaînes longues (huile d'olive) permet de définir cette enzyme comme étant une vraie lipase.

Contrairement à la SHyL (Nikoleit *et al.*, 1995) et comme toutes les lipases de *Staphylocoques* déjà décrites (Rosenstein *et al.*, 2000, Sayari *et al.*, 2001b, Mosbah *et al.*, 2005), la SAL ne présente pas d'activité phospholipasique testée sur le phosphatidylcholine (PC) ou sur la lécithine de jaune d'œuf (Egg-PC) comme substrat.

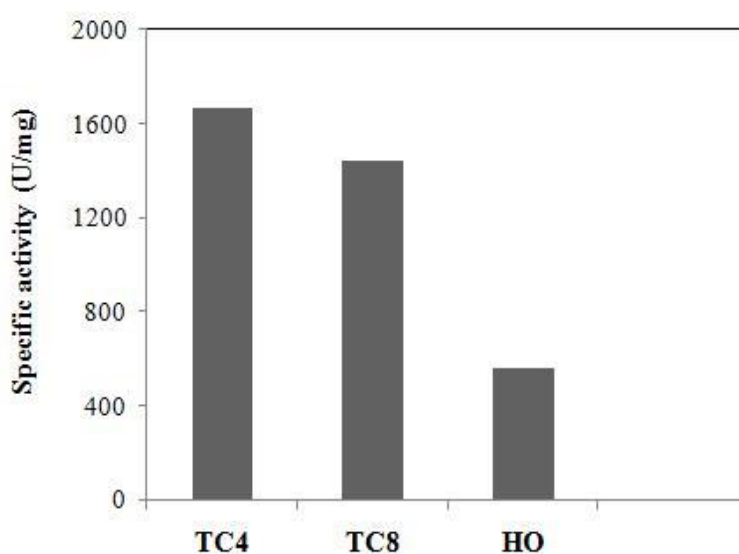


Figure 21: Dosage de l'activité lipasique de la SAL sur différents substrats à 40°C et à pH8. TC4 : Tributyrine, TC8 : Trioctanoïne et HO : huile d'olive.

4. Effet du calcium sur l'activité de la SAL

L'activité spécifique de la SAL purifiée a été mesurée en présence de concentrations croissantes de calcium. Comme la SSL (Sayari *et al.*, 2001) et contrairement à autres lipases de *Staphylocoque* déjà décrites (SAL1, SEL3, SHyL et SWL) (Roseinstein, 2000), la SAL est calcium indépendante. En effet, en absence de calcium et en présence de 10 mM d'EDTA ou d'EGTA, la SAL présente une activité spécifique de 445 U/mg sur une émulsion d'huile d'olive et atteint son maximum d'activité (555 U/mg) en présence de 1 mM de CaCl₂ (Figure 22).

Shah et Wilson (1965) ont décrit que les ions Ca^{2+} forment des sels de calcium avec les acides gras libérés empêchant ainsi l'inhibition de l'enzyme par les produits de réaction qui s'accumulent à l'interface. Verheij *et al.*, (1980) ont émis une hypothèse faisant impliquer les ions calciums directement dans la catalyse. Cependant, des travaux récents ont montré que les ions calciums sont nécessaire pour stabiliser la structure tridimensionnelle de ces lipases au cours de la catalyse (Simons *et al.*, 1996).

La structure tridimensionnelle de la lipase de *Pseudomonas glumae* a été résolue et un site de fixation du calcium a été identifié (Noble *et al.*, 1993). L'alignement de séquence de cette lipase avec la lipases de *Staphylocoques hyicus* a permis d'identifier deux résidus d'acide aspartique (Asp 354 et Asp 357) qui sont responsables de la fixation des ions Ca^{2+} (Simons *et al.*,1999). Ces différentes observations permettent de donner un rôle structural pour les ions calcium dans l'expression et la stabilisation de l'activité lipolytique des lipases de *staphylocoques*.

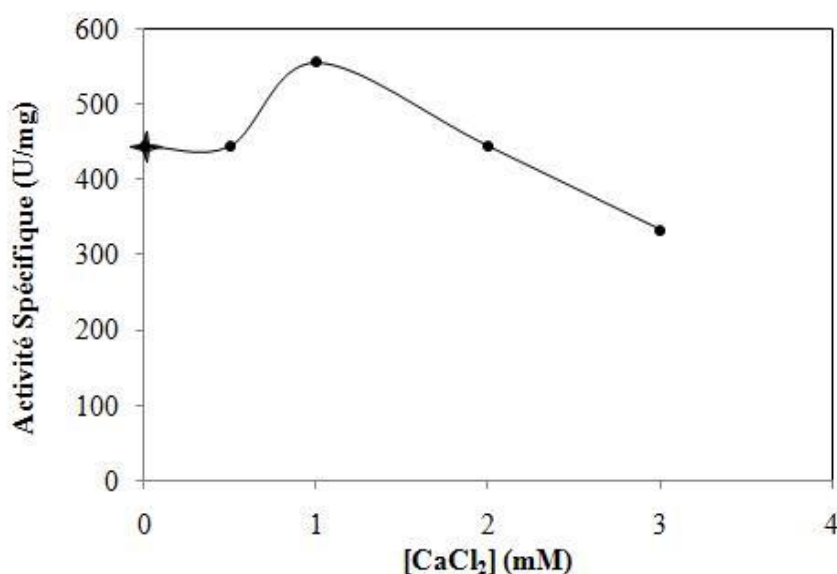


Figure 22: Effet du CaCl_2 sur l'activité lipasique de la SAL. L'activité lipasique est mesurée à 40°C et à pH 8 sur une émulsion d'huile d'olive comme substrat et en présence de concentrations croissantes de CaCl_2 . (★) Le dosage est effectué en présence de 10 mM EDTA.

5. Effet des sels biliaires sur l'activité de la SAL

Dans le but de tester le pouvoir de pénétration de la SAL, nous avons mesuré son activité en présence de certains composés amphipathiques. Les résultats obtenus montrent que l'optimum d'activité est mesuré en présence de 2mM NaDC sur l'émulsion d'huile d'olive et que la SAL est capable d'hydrolyser son substrat en présence de concentrations élevées de sels biliaires (5mM NaDC) (Figure 23). Ces résultats montrent que la SAL, similairement à la SSL et à la SAL3 et contrairement à plusieurs lipases de différentes origines déjà décrites, est capable de tolérer dans le milieu de lipolyse la présence des composés amphipathiques. La SAL présente donc un pouvoir de pénétration plus élevé que celui de certaines lipases pancréatiques et de microorganismes (Gargouri *et al.*, 1985). De ce fait, l'application industrielle de cette lipase pourrait être envisagée.

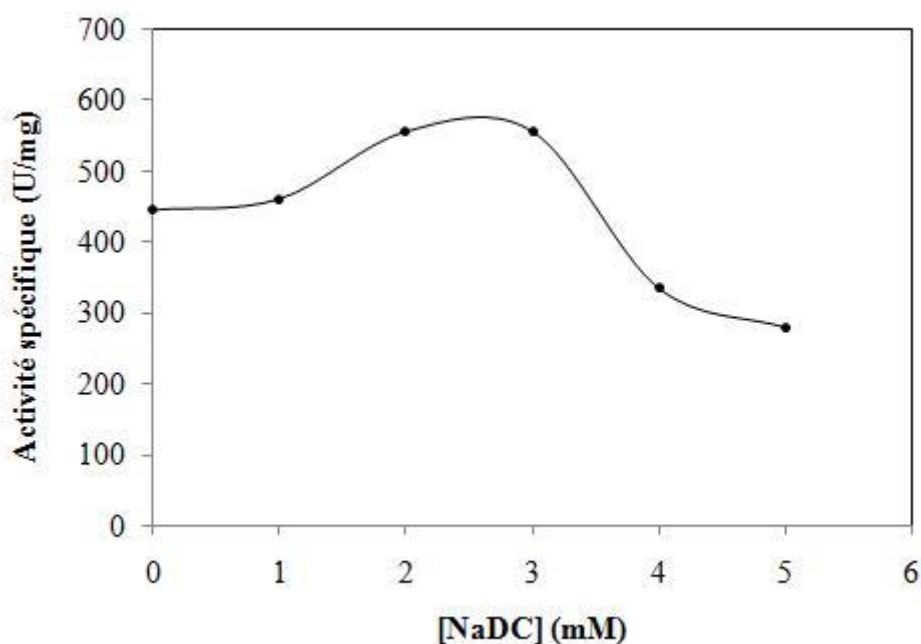


Figure 23 : Effet de NaDC sur l'activité de la SAL. L'activité lipasique est mesurée à 40°C et à pH 8 sur une émulsion d'huile d'olive comme substrat et en présence de concentrations croissantes de NaDC.

6. Effet du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de la SAL

L'étude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la SAL montre que cet enzyme présente un optimum d'activité à des pH alcalins entre 8 et 10 (Figure 24A) et reste stable dans une large gamme de pH compris entre 6 et 9 alors qu'elle perd 90% de son activité aux pH inférieurs à 5 durant 1heure d'incubation dans les tampons correspondants (Figure 24B). Ces résultats sont en concordance avec ceux des lipases de *S.hyicus* (SHyL) (Van Oort *et al.*, 1989) et *S.aureus* (SAL3) (Horchani *et al.*,2008) dont l'optimum d'activité est observé à pH 8,5. Cependant, les lipases SAL1 (lipase 1 de *S.aureus*) et la SEL3 (Lipase 3 de *S.epidermidis*) sont très stables en milieu acide avec un optimum d'activité à pH 6 (Simons *et al.*, 1998 ; Simons *et al.*,1996).

L'étude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la SAL montre que l'optimum d'activité est obtenu à 40°C (Figure 24 C) et que l'enzyme garde 50% de son activité après 10 min d'incubation à 50°C (Figure 24 D).

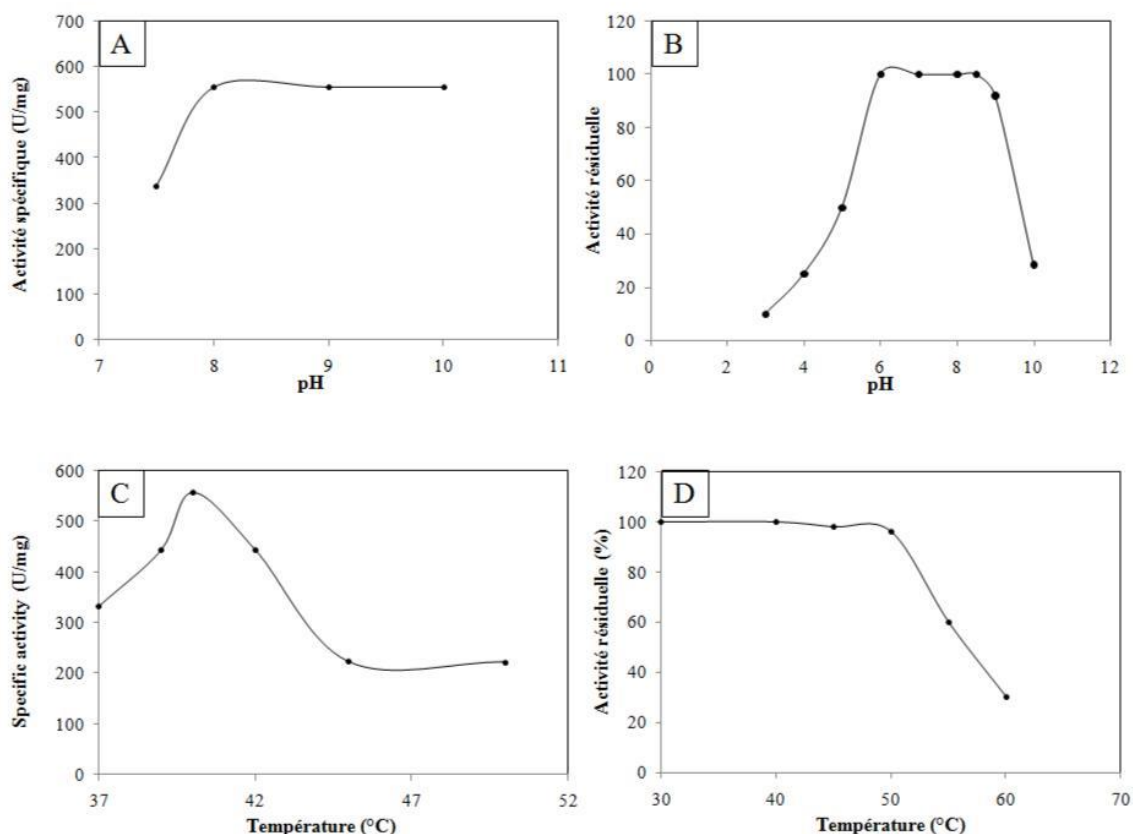


Figure 24 : Effet du pH sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la SAL. L'activité lipasique est mesurée à 40°C à différents pH sur une émulsion d'huile d'olive comme substrat en présence de 1mM CaCl₂ et 2 mM NaDC. Effet de la température sur l'activité (C) et la stabilité (D) de la SAL. L'activité lipasique est mesurée à pH 8 à différentes température sur une émulsion d'huile d'olive comme substrat en présence de 1mM CaCl₂ et 2 mM NaDC.

7. Cinétiques d'hydrolyse des différents triglycérides par la SAL

Pour avoir une idée sur les propriétés interfaciales de la SAL, nous avons suivi l'hydrolyse d'une émulsion de tributyrine, de trioctanoïne ou d'huile d'olive en fonction du temps (Figure 25).

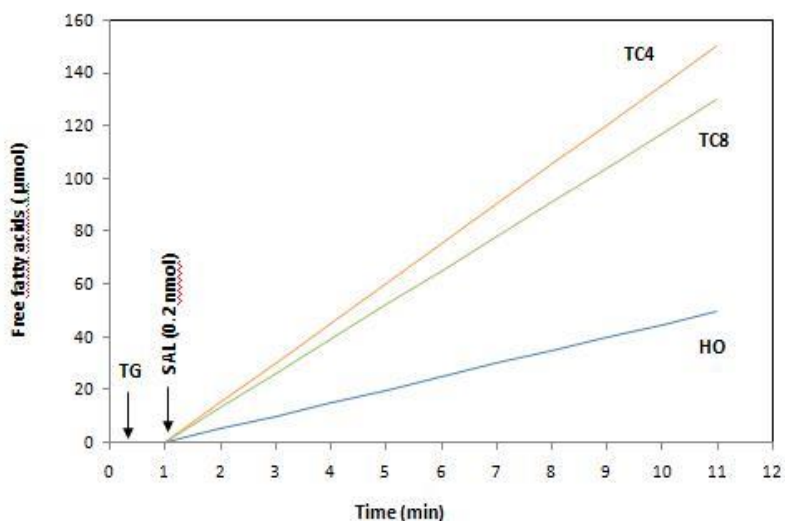


Figure 25: Cinétiques d'hydrolyse d'une émulsion d'huile d'olive (HO), de tributyrine (TC4) et de Trioctanoïne (TC8) par la SAL. L'activité lipasique est mesurée à pH 8 et à 40°C pendant 12 minutes.

Les résultats obtenus montrent que quelque soit la longueur de la chaîne acyle des triacylglycérols (TG), la SAL présente une cinétique d'hydrolyse qui reste linéaire pendant au moins 10 min. On peut donc conclure que malgré la tension interfaciale élevée à l'interface TC4/eau, et malgré l'accumulation des acides gras libres à chaînes longues à l'interface huile d'olive/eau, la SAL continue à hydrolyser efficacement ces deux substrats. Des résultats analogues ont été obtenus avec la SSL (lipase de *S. simulans*) (Sayari *et al.*, 2001b), la SXL (Lipase de *S. xylosus*) (Mosbah *et al.*, 2005) et la SAL3 (Horchani *et al.*, 2008) ce qui montre que les lipases de Staphylocoques sont plus stables aux interfaces que certaines lipases telles que les lipases pancréatiques et gastriques (Gargouri *et al.*, 1983 ; 1984a ; 1984b ; 1985).

8. Propriétés interfaciales de la SAL sur des films monomoléculaires

Les propriétés interfaciales des enzymes lipolytiques ne peuvent pas être étudiées en utilisant le système émulsifié classique (technique du pH-stat). Nous avons donc opté pour la technique des films monomoléculaires pour mieux caractériser les propriétés interfaciales de la SAL. En effet, avec cette technique il est possible, en contrôlant les paramètres physico-chimiques de l'interface, d'obtenir des informations concernant l'orientation, la densité superficielle et les interactions que les molécules amphiphiles peuvent contracter entre elles

dans un arrangement bidimensionnel. Cette méthode permet d'obtenir des cinétiques d'hydrolyse à tension interfaciale ou superficielle constante (Verger et de Hass, 1973, 1976; Gargouri *et al.*, 1985, 1989b; Piéroni *et al.*, 1990; Ransac *et al.*, 1991).

8.1. Cinétiques d'hydrolyse des différents isomères de dicaprine

Trois isomères de dicaprine ont été utilisés : *1,2-sn*-dicaprine (1,2diC10), *1,3-sn*-dicaprine (1,3diC10) et le *2,3-sn*-dicaprine (2,3diC10). Les résultats obtenus montrent que La SAL présente une préférence pour le 2,3diC10 par rapport aux deux autres isomères (Figure 26). Cette stéréosélectivité est plus marquée à des pressions de surface élevées. L'optimum d'activité est enregistré à 30mN/m pour le 1,3diC10 et 2,3diC10 et à 35mN/m pour le 1,2diC10. On remarque aussi que la SAL n'est active qu'à des pressions de surface supérieures à 20 mN/m⁻¹. L'absence d'activité à des faibles pressions de surface a été précédemment décrite pour les lipases gastriques (Gargouri *et al.*, 1995). En effet les faibles pressions de surface induisent une interface à haute énergie ce qui engendre une dénaturation interfaciale irréversible de l'enzyme. Ces résultats sont confirmés par le test d'activité de la SAL sur TC₄ en absence de sels biliaires.

Les cinétiques d'hydrolyse des isomères de dicaprin par la SAL montrent que cet enzyme appartient au groupe B selon la classification de Rogalska *et al.*, (1995) dont l'activité augmente d'une façon continue avec la pression interfaciale.

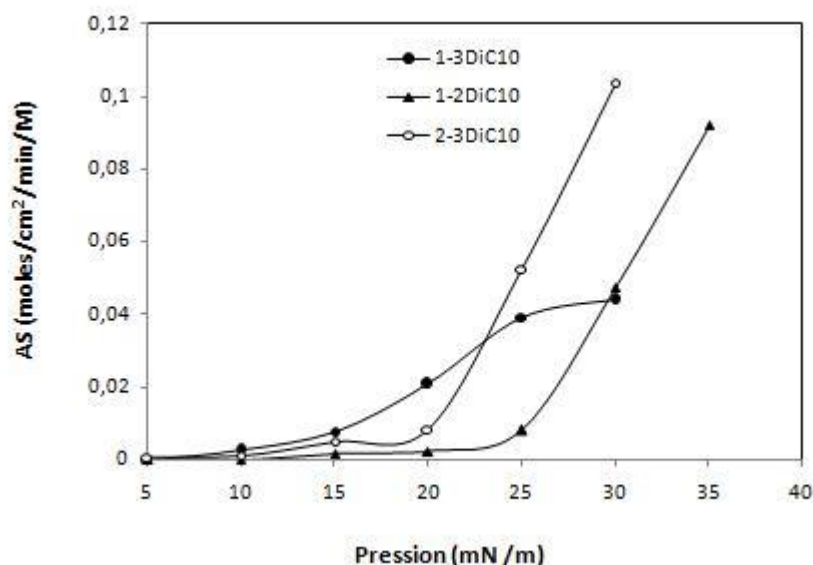


Figure 26 : Variation de la pression de surface de la lipase de *Staphylococcus aureus*(SAL) sur trois isomères de dicaprine: 1.2-*sn*- (▲), 1.3-*sn*-diC10 (●), and 2.3-*sn*-diC10 (○). Les essais sont réalisés à température ambiante dans un compartiment d'ordre zéro (volume, 130 ml; surface, 120 cm²). Tampon: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 21 mM CaCl₂ et 1mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA). Les activités sont exprimées en nombre de moles de substrats hydrolysés par unité de temps et unité de surface.

La préférence pour unisomère donné est quantitativement décrite par l'indice de stéréosélectivité (SI) et l'indice de régiosélectivité (VI) définis par les formules (1) et (2), respectivement.

$$SI = \frac{(A_{2,3} - A_{1,2})}{(A_{2,3} + A_{1,2})} \quad (1)$$

$$VI = \frac{[A_{1,3} - (1/2)(A_{2,3} + A_{1,2})]}{[A_{1,3} + (1/2)(A_{2,3} + A_{1,2})]} \quad (2)$$

où A_{1,3}, A_{2,3} et A_{1,2} sont les activités mesurées respectivement sur le 1,3-*sn*-dicaprine, le 2,3-*sn*-dicaprine et le 1,2-*sn*-dicaprine. Les valeurs de SI et VI sont calculées à des pressions de surface de 20 et 30 mN.m⁻¹.

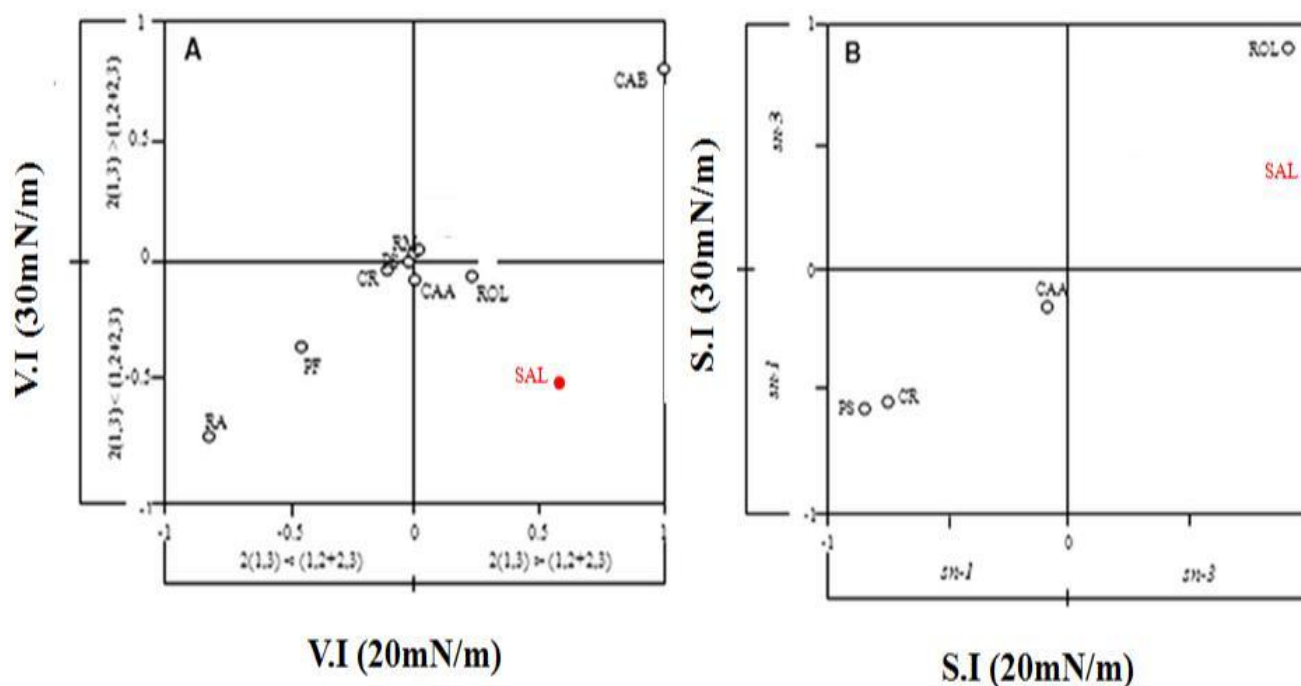


Figure 27: (A) Indice de regioselectivité (VI) calculé à partir des activités spécifiques de la SAL à 20 et 30 mN/m. (B) L'indice de stéréosélectivité calculé à 20 et 30 mN/m. Cutinase de *Fusarium solani* (FSC), *Candida antarctica* B lipase (CAB), *Candida antarctica* A lipase (CAA), *Candida rugosa* lipase (CR), *Pseudomonas fluorescens* lipase (PF), *Penicillium simplissimum* lipase (PS), *Rhizopus arrhizus* (RA), *Rhizopus orrhizus* lipase (ROL), *Rhizomucor miechei* lipase (RM) (Rogalska et al., 1995).

L'indice V.I. montre que la SAL à haute pression présente une préférence absolue pour les groupes esters adjacents et une préférence pour les groupes d'esters distals à faible pression (Figure 27A). D'autre part, le calcul de l'indice S.I. montre que la SAL est stéréospécifique pour la position *sn-3* quelque soit la pression utilisée (Figure 27B).

7.2. Mesure de la pression critique de la SAL sur des films monomoléculaires de phosphatidylcholine du jaune d'œuf (Egg-PC).

Dans le but d'apprécier la capacité d'interaction de la SAL avec des films monomoléculaires de phosphatidylcholine de jaune d'œuf (Egg-PC), nous avons mesuré la pression critique (π_c) de cet enzyme. Pour cela, nous avons injecté 5nM de l'enzyme pure sous un film monomoléculaire d'Egg-PC à différentes pressions initiales (π_i) allant de 5 à 22 mN/m. A l'équilibre, la variation de la pression de surface maximale ($\Delta\pi_{\max}$) est déterminée pour chaque valeur de π_i . Par extrapolation à $(\Delta\pi) = 0$, on détermine la pression critique. La π_c de la SAL est estimée à 32 mN/m (Figure 28).

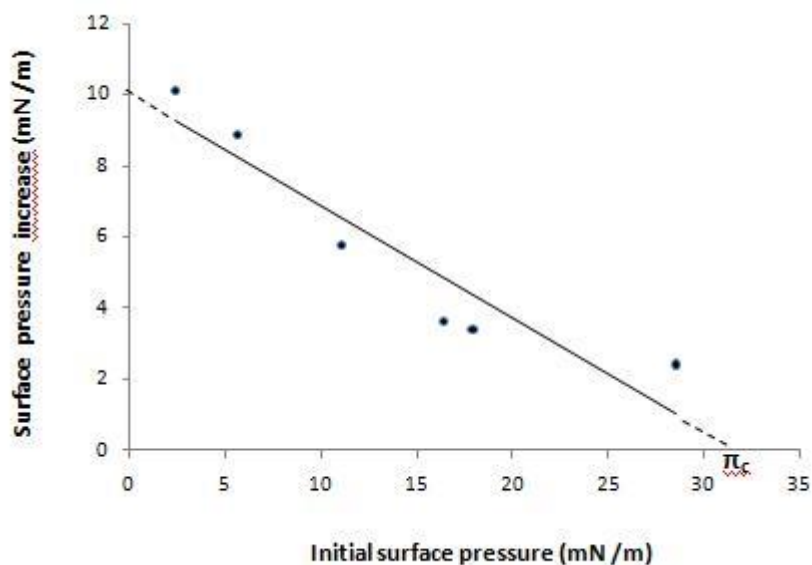


Figure 29: Mesure de la pression critique de la SAL sur des films monomoléculaires de PC de jaune d'œuf (Egg-PC).

III. Clonage du gène de la lipase mature de *Staphylococcus aureus*

Clonage et séquençage du gène qui code pour la SAL mature

Dans le but de déterminer la séquence complète de la SAL mature, nous avons amplifié par PCR, la partie du gène qui code pour la lipase mature à partir de l'ADN génomique de *S. aureus*. Les oligonucléotides utilisés ont été déterminés respectivement à partir des séquences de l'extrémité N-terminale de la SAL purifiée et de l'extrémité C-terminale de la SAL3 (Horchani et *al.*, 2008). Le fragment amplifié, qui présente une taille de 1,2 Kb, a été cloné dans le vecteur de clonage pGEM-T (Figure 30).

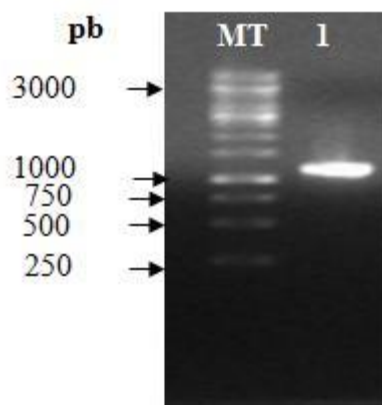


Figure 30: Résultat d'amplification du gène codant la SAL. MT :Marqueur de taille, 1 : produit PCR.

Le vecteur recombinant a été utilisé pour transformer les souches d'*E. coli XLI Blue*. Le clonage a été vérifié par digestion enzymatique par EcoRI qui libère un fragment de 1200pb correspondant au taille de la SAL.

Le séquençage du gène qui code pour la SAL mature a été effectué plusieurs fois sur le plasmide recombinant (pSAL). Cette séquence est constituée de 1185 nucléotides correspondant à 394 aminocides. L'alignement de séquence montre que la SAL présente une identité de 99% avec une lipase de *S.aureus* (Reference Sequence: WP_000943824.1) et 90% avec la SAL3 (Horchani *et al.*, 2001). Par comparaison avec la SAL3, on remarque la délétion de 3 résidus du côté NH₂-terminale qui sont LKA ainsi qu'une substitution de la glycine 208 et l'isoleucine 226 par une arginine et une leucine, respectivement (Figure 31). Par contre en comparant les séquences protéiques de la SAL et la SXL, on remarque la délétion d'un Alanine du côté NH₂-terminale. Ces différences pourraient être expliquées par les différentes étapes de protéolyse survenues lors du processus de maturation des lipases des *Staphylocoques* après leurs sécrétions dans le milieu de culture.

Une étude comparative entre la SAL3 et la SXL (lipase de *S. xylosus*) (Mosbah *et al.*, 2010) montre que la présence de deux résidus LK au niveau de la séquence primaire de la SAL3 est probablement responsable de l'amélioration de l'activité et la stabilité de cet enzyme par rapport à la SSL. En effet, le clonage et l'expression de la SXL et son mutant LK-SXL montre que La SXL sauvage purifiée présente une activité spécifique de 2000 U/mg et 1300 U/mg, respectivement, en utilisant la tributyrine ou une émulsion d'huile d'olive comme substrat à 45°C en présence de 2 mM de CaCl₂. Par contre le mutant LK-SXL qui présente une préférence vis-à-vis des TG à chaînes courtes, a une activité spécifique de 5900 U/mg et 1100 U/mg respectivement, en utilisant la tributyrine ou une émulsion d'huile d'olive comme substrat à 50°C en présence de 2 mM de CaCl₂.

```

SAL3      LKANQVQPLNKYPVVFVHGFLGLVGDNAPALYPNYWGGNKFVKVIEELRKQGYNVHQASVS
SAL      ---NQVQPLNKYPVVFVHGFLGLVGDNAPALYPNYWGGNKFVKVIEELRKQGYNVHQASVS
          *****

SAL3      AFGSNYDRAVELYYYIKGGRVDYGAHAHAAYGHERYGKTYKGIMPNWE PGKKVHLVGHSM
SAL      AFGSNYDRAVELYYYIKGGRVDYGAHAHAAYGHERYGKTYKGIMPNWE PGKKVHLVGHSM
          *****

SAL3      GGQTIRLMEEFLRNGNKEEIAYHKAHGGEISPLFTGGHNNMVASITTLATPHNGSQAADK
SAL      GGQTIRLMEEFLRNGNKEEIAYHKAHGGEISPLFTGGHNNMVASITTLATPHNGSQAADK
          *****

SAL3      FGNTAVRKIMFALNRFMGNKYSNIDLGLTQWGFQKQLPNESYIDYIKRVSKSKIWTSDDN
SAL      FGNTAVRKIMFALNRFMGNKYSNIDLRLTQWGFQKQLPNESYIDYLKRVSKSKIWTSDDN
          *****

SAL3      AAYDLTLDGSAKLNMTSMNPNIYTTYTGVSSTGPLGYENPDLGTFFLMDTTSRIIGH
SAL      AAYDLTLDGSAKLNMTSMNPNIYTTYTGVSSTGPLGYENPDLGTFFLMDTTSRIIGH
          *****

SAL3      DAREEWRKNDGVVPVISSLHPSNQPFVNVNTNDEPATRRGIWQVKPIIQGWDHVDFIGVDF
SAL      DAREEWRKNDGVVPVISSLHPSNQPFVNVNTNDEPATRRGIWQVKPIIQGWDHVDFIGVDF
          *****

SAL3      LDFKRKGAELANFYTGIIINDLLRVEATESKGTQLKAS
SAL      LDFKRKGAELANFYTGIIINDLLRVEATESKGTQLKAS
          *****

```

Figure 31 : Alignement de séquence protéique de la SAL avec la SAL3.

Conclusion

&

Perspectives

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les lipases microbiennes sont des enzymes très utilisées dans de nombreuses applications biotechnologiques et industrielles grâce à leur large spectre d'action sur divers substrats. En plus de leur importance en biotechnologie, plusieurs lipases de microorganismes sont impliquées dans la virulence de certaines souches et sont associées à plusieurs types de maladies.

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à l'isolement de souches lipolytiques à partir de biotopes Algériens. L'identification moléculaire et biochimique d'une souche isolée montre qu'il s'agit de *Staphylococcus aureus*.

Dans cette thèse on s'est intéressé à la purification, à la caractérisation biochimique d'une lipase de cette souche et le clonage du gène codant pour cette lipase qu'on a nommé SAL : « Lipase de *Staphylococcus aureus* ».

L'enzyme, nommé SAL, a été purifié à homogénéité à partir du milieu de culture en optimisant le protocole d'extraction composée en quatre étapes : Précipitation au sulfate d'ammonium à 65 μ suivis par une chromatographie de filtration S200 ; les fractions actives à la sortie de cette étapes sont concentrées puis déposée sur une chromatographie d'échange cationique où un gradient de NaCl de 200 à 600mM a été utilisé pour éluer l'enzyme fixée. De meme les fractions actives, concentrées à un volume final de 1 ml est déposée sur une deuxième colonne chromatographique de filtration G75. A la fin des étapes de purification les différentes fractions ont fait l'objet d'une migration sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. La SAL pure possède une masse moléculaire apparente d'environ 45kDa. Son activité maximale sur une émulsion d'huile d'olive est mesurée à des pHs basiques entre 8 et 10, à 40°C, en présence de 1 mM Ca²⁺ et de 2 mM de sels biliaires. Les activités spécifiques de la SAL mesurées sur la tributyrine, un TG à chaînes courtes, la trioctanoïne, un TG à chaînes moyennes, et l'huile d'olive, un TG à chaînes longues montrent que cette lipase hydrolyse plus efficacement les TG à chaînes courtes que les TG à chaînes longues avec des activités spécifiques de 1600 U/mg et de 555 U/mg mesurée sur la tributyrine et l'huile d'olive, respectivement. La capacité de la SAL d'hydrolyser les TG à chaînes longues permet de dire que la SAL est une vraie lipase.

La séquence NH₂-terminale de la SAL présente une forte homologie avec une lipase de la même souche nommée SAL3 (97%). Une délétion de 3 résidus (LKA) du côté NH₂-terminale est observée dans la séquence de la SAL par comparaison avec la SAL3.

La caractérisation biochimique de la SAL a été effectuée aussi en utilisant la technique des films monomoléculaires (Baro-stat). Les résultats obtenus montrent que la SAL hydrolyse préférentiellement les diacylglycérols à groupements esters adjacents à hautes pressions et les diacylglycérols à groupements esters distals à faible pression. D'autre part, le calcul de l'indice S.I. montre que la SAL est stéréospécifique pour la position *sn-3* quelque soit la pression utilisée. Le pouvoir de pénétration de la SAL est de 32mN/m qui est plus élevé par rapport aux lipases pancréatiques.

En perspective et pour compléter ce travail, nous envisageons de :

- Exprimer la lipase de *S. aureus* afin de produire facilement cette lipase et d'étudier l'importance de la délétion de ces 3 résidus à l'extrémité N-terminale
- Etudier l'effet de l'ajout d'acides aminés (basiques ou acides) à l'extrémité N-terminale et/ou C-terminale des lipases de staphylocoques pour voir si on peut améliorer d'avantage leurs activités et leurs stabilités afin de sélectionner l'enzyme le plus fiable dans des réactions de synthèses de molécules à hautes valeurs ajoutées.

- Approfondir l'étude de la relation structure-fonction des lipases de staphylocoques.
- Faire un passage au crible pour sélectionner, à partir de biotopes algérien, des lipases *sn-2*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abrams C.K., Hamosh M., Dutta S.K., Hubbard V.S., Hamosh P.1987. Role of nonpancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology* 92: 125-129.

Akoh C.C.1995. Structured Lipids-Enzymatic Approach. *INFORM* 6: 1055-1061.

Alloue W. A. M., Aguedo M., Destin J., Ghalfi H., Blecker C., Wathelet J. P. et Thonart P.2008. Les lipases immobilisées et leur application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 57-68.

Anthonsen H.1995.Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnol.Annu. Rev.* 1 315-371.

Arpigny J.L., Jaeger K.E.1999.Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.

Ayora S., Götz F.1994a. Genetic and biochemical properties of an extracellular neutral metalloproteas from *Staphylococcus hyicus*. *Mol. Gen. Genet.* 242: 421-430.

Ayora S., Lindgren P.E., Götz F.1994b.Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus subsp.* *Hyicus* involved in extracellular lipase processing. *J. Bacteriol.* 176: 3218-3223.

Aloulou A., RodriguezJ.A., Pucinelli D., Mouz N., Leclaire J., Leblond Y., CarrièreF. 2007.Purification and biochemical characterization of LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1771: 228-237.

Altschul, S.F., Gidh W., Miller W., Myers E.W. et Lipman D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

B

Bangham, A. D. et Horne, R. W. 1964. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol* 12:660-8.

Beer, H. Wohlfahrt, G. McCarthy, J.E. Schomburg, D. Schmid, R.D. 1996. Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein. Eng.* 6 : 507-517.

Ben Ali Y., Carriere F., Verger R., Petry S., Muller G., Abousalham A. 2005 Continuous monitoring of cholesterol oleate hydrolysis by hormone-sensitive lipase and other cholesterol esterases. *J. Lipid Res.* 46: 949-1000.

Bénarouche, A. Point, V. Carrière, F. Cavalier, J.F. 2014. Using the reversible inhibition of gastric lipase by Orlistat for investigating simultaneously lipase adsorption and substrate hydrolysis at the lipid-water interface. *Biochimie.* 101: 221-231

Benzonana, G. et Desnuelle, P. 1968. Action of some effectors on the hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic Lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 164:47-58.

Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2: 133-153.

Berg O., Cajal Y., Butterfoss G., Grey R., Alsina M., Yu B., Jain M. 1998. Interfacial activation of triglyceride lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*: kinetic parameters and a basis for control of the lid. *Biochemistry* 37: 6615-6627

Bezzine, S., Ferrato, F., Ivanova, M. G., Lopez, V., Verger, R. et Carriere, F. 1999. Human pancreatic lipase: colipase dependence and interfacial binding of lid domain mutants. *Biochemistry* 38:5499-510.

Blow D.M., Birktoft J.J., Hartley B.S. 1969. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 221: 334-337.

Borgdorf R., Warwel S. 1999. Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis- and trans-9-octadecenoic acid. *Appl. Microb. Biotechnol.* 51: 480-485.

Borgström, A., Erlanson-Albertsson, C. et Borgström, B. 1993. Human pancreatic proenzymes are activated at different rates in vitro. *Scand. J. Gastroenterol.* 28:455-459.

Borgström, B. 1975. On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. *J. Lipids Res.* 16:411-417.

Bornscheuer U.T. 1995. Lipase-catalyzed synthesis of monoglycerols. *Enzym. Microb. Technol.* 17: 578-586.

Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J. 1999. *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations.* Wiley-VCH, Weinheim.

Bou Ali, M. Ben Ali, Y. Aissa, I Gargouri, Y. 2014. Eukaryotic expression system *Pichia pastoris* affects the lipase catalytic properties: a monolayer study. *Plos. One.* 18.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Huges-Jensen B., Norskov L., Thim L. et Menge U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of triacylglycerol lipase. *Nature.* 343: 767-770.

Brune, AK. Gotz, F. 1992. Degradation of lipids by bacterial lipases. In: Winkelman G (ed) Microbial degradation of natural products. VCH, Weinheim, pp 243–266.C

Brzozowski A.M., Derwenda U., Derwenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenberg J.P., Biorkling F., Høge-Jensen B., Patkar S.A., Thim L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351: 491-494.

Brzozowski A.M. 1993. Crystallization of a *Humicola lanuginosa* lipase-inhibitor complex with the use of polyethylene glycol monomethylether. *Acta Cryst. D* 49: 352-354.

Brzozowski A.M., Savage H., Verma C.S., Turkenburg J.P., Lawson D.M., Svendsen A., Patkar S.A. (2000). Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39: 15071-15082.

C

Cajal Y., Svendsen A., Girona V., Patkar S.A., Alsina M.A. 2000. Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39: 413-423

Calderone R.A., Fonzi W.A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 7: 327-335.

Canioni, P., Julien, R., Rathelot, J. and Sarda, L. 1976a. Inhibition of sheep pancreatic lipase activity against emulsified tributyrin by non-ionic detergents. *Lipids* 12: 393-397.

Canioni, P., Julien, R., Rathelot, J. and Sarda, L. 1976b. Inhibition of sheep pancreatic lipase activity against emulsified tributyrin by non-ionic detergents. *Biochimie* 58: 751-3.

Canoni, P., Julien, R., Rathelot, J. and Sarda, L. 1977. Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids* 12 :393-7

Carrière F., Barrowman, J.A., Verger R. et Laugier R. 1993. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*. 105: 876-888.

Carriere F., Thirstrup K., Hjorth S., Ferrato F., Nielsen P.F., Withers-Martinez C., Cambillau, C., Boel E., Thim L. Verger R. 1997. Pancreatic lipase structure-function relationships by domain exchange. *Biochemistry* 36: 239-248.

Carriere F., Grandval P., Renou C., Palomba A., Prieri F., Giallo J., Henniges F., SanderStruckmeier S., Laugier R. 2005b. Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 3 : 28-38.

Chapus, C., Sari, H., Semeriva, M. et Desnuelle, P. 1975. Role of colipase in the interfacial adsorption of pancreatic lipase at hydrophilic interfaces. *FEBS Lett* 58: 155-8.

Cherif S., Miled N., Kammoun M., Mejdoub H., Gargouri Y. 2006. Purification and biochemical characterization of a turkey preduodenal esterase. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 145: 358-364.

Christensson B., Fehrenbach F.J., Hedström S.A. 1985. A new serological assay for *Staphylococcus aureus* infections: detection of IgG antibodies to *Staphylococcus aureus* lipase with an enzyme linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 152: 286-292.

Claon P.A., Akoh C.C. 1993. Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in n-hexane. *Biotechnol. Lett.* 15: 1211-1216.

Clarke, S. 1975. The size and detergent binding of membrane proteins. *J Biol Chem* 250: 5459-69

Cygler M., Schrag J.D.1999. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosalipase*. *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 205-214.

D

Dennis, E. A. 1973. Kinetic dependence of phospholipase A2 activity on the detergent Triton X-100. *J Lipid Res* 14: 152-9.

Dennis E.A.1983. Phospholipases. *In the enzymes. P. Boyer, editor. Academic Press, New York.* 307-353.

Demleitner G., Götz F.1994. Evidence for importance of the *Staphylococcus hyicus* lipase propeptide in lipase secretion, stability and activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 121 : 189-197.

Derwenda Z.S., Derwenda U. & Dodson G.G. 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehi* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227: 818-839.

Derwenda U., Swenson L., Green R., Wei Y.Y., Yamaguchi S., Joerger R., Haas M.J., Derwenda Z.S.1994a. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng.* 7: 551-557.

Derwenda U., Swenson L., Wei Y.Y., Green R., Kobos P.M., Joerger R., Haas M.J., Derwenda Z.S.1994b. Conformational lability of lipases observed in the absence of an Oil-Water interface. Crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid Res.* 35 : 524-534.

Desnuelle P., Sarda L., Ailhaud G.1960. Inhibition de la lipase pancréatique par le diéthyl-p-nitrophényl phosphate en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 37 : 570-571

Deveer A.M.T.J., Dijkman R., Leuveling-Tjeenk M., van den Berg L., Ransac S., Batenburg M., Egmond M., Verheij H.M., de Haas G.H.1991. A monolayer and bulk study on

the kinetic behavior of *Pseudomonas glumae* lipase using synthetic pseudoglycerides. *Biochemistry* 30: 10034-10042

Deveer A. 1992. Mechanism of activation of lipolytic enzymes. University of Utrecht Netherlands.

Doderer, K. Hollmann, F. Thum, O. Pleiss, J. 2010. Engineering of *Candida antarctica* lipase B for hydrolysis of bulky carboxylic acid esters. *J. Biotechnol.* 150:474–480.

Dominguez, A., Ferminan, E. and Gaillardin, C. 2000. *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contrib Microbiol* 5:151-72

Domínguez de María, P., Carboni-Oerlemans C., Tuin B., Bargeman G., van der Meer A.B., van Gemert R.W. 2005. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State of the art. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 37: 36-46.

Döring G. 1993. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients, in: Campa M., Bendinelli M., Friedman H. (Eds), *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Plenum Press, New York, pp. 245-273.

Drablos F., Petersen S. 1997. Identification of conserved residues in family of esterase and lipase sequences. *Methods. Enzymol.* 284:28-61

Douchet, I. De Haas, G. Verger, R. 2003. Lipase regio- and stereoselectivities toward threenantiomeric pairs of didecanoyl-deoxyamino-O methyl glycerol: a kinetic study by the monomolecular film technique. *Chirality.* 15: 220-226.

E

Edman, P. Högfeldt, E. Sillén, Lars, G. Kinell, PO. 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta. Chem. Scand.* 4: 283–293.

Eggert T., van Pouderooyen G., Pencreac'h G., Douchet I., Verger R., Dijkstra B.W., Jaeger K-E.2002. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surface B.Biointerfaces* 26: 37-46.

Eijkmann C.1901 Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Zentralbl. Bakt. Parasitenkd. Infektionskr. 29: 841-848.

Ericsson D.J., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandström A.G; Bäckvall J.E, Mowbray S.L. 2008. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *J. Mol. Biol.* 376: 109-119.

F

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L. et Dennis, E. A. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46:839-62.

Farrell A.M., Foster T.J., Holland K.T.1993. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 267-277.

Fayolle F., Marchal R., Monot F., Blanchet D., Ballerini D.1991. An exemple of production of naturel esters: synthesis of butyl butyrate from wheat flower.*Enzyme Microb. Technol.* 13: 215-219.

Ferrato F., Carrière F., Sarda L., Verger R. 1997. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation.*Methods Enzymol.* 286:327-347.

Fickers, P., Le Dall, M. T., Gaillardin, C., Thonart, P. and Nicaud, J. M. 2003a. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods* 55:727-37.

Fickers, P., Nicaud, J.M., Destain, J. et Thonart, P. 2003b. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:136-42.

Fuji T., Tartara T., Minagawa M. 1986. Studies application of lipolytic enzymes in detergency I., Effect of lipases from *Candida Cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabrics. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 796- 799.

G

Gao, X. G., Cao, S. G. et Zhang, K. C. 1997. The Influence of Different Physicochemical Parameters of the Solvent On The Activity and Selectivity of Lipase. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 29: 337-342.

Gargouri, Y. Piéroni, G. Rivière, C. Sugihara, A. Sarda, L., Verger, R. 1985. Inhibition of lipases by proteins. A kinetic study with dicaprin monolayers. *J. Biol. Chem.* 260: 919-925.

Gargouri, Y., Pieroni, G., Lowe, P. A., Sarda, L. and Verger, R. 1986a. Human gastric lipase. The effect of amphiphiles. *Eur J Biochem* 156: 305-10.

Gargouri, Y., Pieroni, G., Riviere, C., Saunier, J. F., Lowe, P. A., Sarda, L. et Verger, R. 1986c. Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology* 91: 919-25.

Gargouri, Y. Moreau, H. Piéroni, G. Verger, R. 1989b. Role of a sulfhydryl group in gastric lipases. A binding study using the monomolecular film technique. *Eur. J. Biochem.* 180: 367-371.

Gargouri Y., Curdey C., Mejdoub H. Verger R. 1992. Inactivation of Human Pancreatic Lipase by 5-dodecylthio-2-nitrobenzoic acid. *Eur. J. Biochem.* 204 : 1063-1067.

Gargouri, Y. Bensalah, A. Douchet, I. Verger, R. 1995. Kinetic behaviour of pancreatic lipase in five species using emulsions and monomolecular films of synthetic glycerides. *Biochim. Biophys. Acta.* 223-229

Gillies B., Yamazaki H., Armstrong D.W. 1987. Natural flavour esters: production by *Candida cylindracea* lipase adsorbed to silica gel, in: Laane C., Tramper J., Lilly M.D. (Eds.). *Biocatalysis in organic media*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 227-232.

Götz F., Popp F., Korn E., Schleifer K.H. 1985. Complete nucleotide sequence of the lipase from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. *Nucleic Acids Res.* 13: 5895-5906

Götz F., Verheij H.M., Rosenstein R. 1998. Staphylococcal lipases: Molecular characterization, secretion and processing. *Chem. Phys. Lipids* 93: 15-25.

Gormsen E., Malmos H. 1991. A new lipase for the detergent industry. *H.A.P.P.I.* 28: 122-125.

Granon, S. and Semeriva, M. 1980. Effect of taurodeoxycholate, colipase and temperature on the interfacial inactivation of porcine pancreatic lipase. *Eur J Biochem* 111:117-24.

Gribbon E.M., Cunliffe W.J., Holland K.T. 1993. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skinlipids in vitro. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1745-1751.

Grochulski, P. Li, Y. Schrag, J.D. Bouthillier, F. Smith, P. Harrison, D. Rubin, B. Cygler, M. 1993. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268: 12843-12847

Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R. J., Serreqi, A. N., Schrag, J. D., Ziomek, E. and Cygler, M. 1994a. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* 33: 3494-3500.

Gubicza L., Kabiri-Badr A., Keoves E., Belafi-Bako K.2000. Large-Scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal.*J. Biotechnol.* 84:193-196.

Gurr, MI. James, AT. 2007. Lipid Biochemistry: An Introduction. *J.Basic. Microbiol.* 13 : 454-1973.

H

Hari K.S., Divakar S., Prapulla S.G., Karanth N.G.2001.Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*.*J. Biotechnol.* 87:193-201.

Haraldsson G.G., Gudmundsson B.O., Almarsson O. 1993. The preparation of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron Lett.*34: 5791-5794.

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

Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E. et Tanford, C. 1979. Properties of detergents. *Methods Enzymol* 56: 734-49

Hewick R.M., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Dreyer W.J.1981.A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256: 7990-7997.

Hoffmann, A. F. and Small, D. M. 1967. Detergent properties of bile salts: Correlation with physiological function. *Ann. Rev. Med.* 18:333-376.

Holemans P.M.J., Schijf R., Van Putte K.P., De Man T.1987.Fats and edible emilsions with a high content os cis-plyunsaturates fatty acids Brevet EP0209176.

Holmquist M., Martinelle M., Berglund P., Clausen I.G., Patkar S., Svendsen A., Hult K.1993.Lipases from *Rhizomucor miehei* and *Humicola lanuginosa*. Modification of the lid covering the active site alters enantioselectivity. J. Protein Chem. 12: 749-757

Holmquist M., Martinelle M., Clausen I.G. Svendsen A., Hult K.1994.Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase is important for efficient hydrolysis of tributyrin. Lipids 29: 599-603.

Horchani,H. Lignon, S. Lebrun, R. Sayari, A. Gargouri, Y. Verger,R. 2010. Heterologous expression and N-terminal His-tagging processes affect the catalytic properties of staphylococcal lipases: A monolayer study. J. Coll. Inter. Sci. 350: 586-594.

Hu Z., Zhu X., Jordan F., Inouye M. 1994. A covalently trapped folding intermediate of subtilisinE: spontaneous dimerization of a prosubtilisin E Ser49Cys mutant *in vivo* and its autoprocessing *in vitro*. Biochemistry 33: 563-569.

Huebner J. Goldmann G.A.1999.Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. Annu Rev Med. 50: 223-236.

I

Ingham E., Holland K.T., Gowland G., Cunliffe W.J.1981. Partial purification and characterization of lipase (EC 3.1.1.3) from *Propionibacterium acnes*. J. Gen. Microbiol. 124: 393-401.

Ishimoto R., Sugimoto M., Kawai F.2001. Screening and characterization of trehalose-oleate hydrolyzing lipase. FEMS Microbiology letter 195: 231-235.

J

Jaeger K.E., Ransan S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W.1993. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 332: 143-149.

Jaeger, K.E.1994.Extracellular enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* as virulence factors. *Immun Infekt* 22: 177-80.

Jaeger,KE. Ransac, S. Dijkstra, BW. Colson, C. van Heuvel, M. Misset, O. 1994. Bacteriallylipases. *FEMS. Microbiol. Rev.* 15:29–63.

Jaeger, KE. Reetz, TM. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends. Biotechnol.*16: 396–403.

Jaeger K.E., Wohlfarth S., Winkler U.K., Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*. InAlberghina L., Schmid R.D., Verger R. 1991. Lipases: Structure, Mechanism and genetic Engineering, GBF-Monographs Verlag Chemie. Weinheim 16: 381-384.

Jaeger K.E., Kinscher D.A., König B., König W. 1992b. Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemistry and potential role as a virulence factor. In: Hoiby, N. and Pedersen S.S. (Eds.) *Cystic Fibrosis, Basic and Clinical Research*, Elsevier, Amsterdam 113-119.

James, L.K. Augenstein L.G. 1966. Adsorption of enzymes at interfaces: film formation andtheeffect on. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 28 : 1-40.Juhl, PB.

Jensen, R. G., Dejong, F. A. and Clark, R. M. 1983. Determination of lipase specificity. *Lipids* 18:239-252.

Jennens, M. L. and Lowe, M. E. 1994. A surface loop covering the active site of human pancreatic lipase influences interfacial activation and lipid binding. *J Biol Chem* 269: 25470-25474.

Jutila A., Zhu k., Patkar SA., Vind J., Svendsen A., kinnunen P.K.J. 2000. Detergent – induced conformational changes of *Humicola lanuginosa* lipase studied by fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* 78 : 1634-1642.

Julien, R., Rathelot, J., Canioni, P. et Sarda, L. 1979. Etude comparée de l'effet de la colipase pancréatique sur l'activité des lipases de mammifères et de champignons. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 19:819-823.

K

Kanerva L.T., Csomos P., Sundholm O., Bernath G., Fulop F.1996. Approach to highly enantiopure beta-amino acid esters by using lipase catalysis in organic Media. *Tetrah. asym.* 7: 1705-1716.

Kanwar S.S., Ghazi I.A., Chimni S.S., Joshi G.K., Rao G.V., Kaushal R.K., Gupta R., Punj V. 2006. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein Exp. Purif.* 46: 421-428.

Kambourova M., Kirilova N., Mandeva R., Derekova A.2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 22: 307-313.

Kloos W., Schleifer K.H. et Götz F. 1991. The genus *Staphylococcus*, in *The prokaryotes*

Balows A., Trüper H.G, Dworkin M., Harder W. & Schleifer K.H., eds pp. 1369-1420,

Springer-Verlag, London.

Knorr R. 1992. Produktion von recombinantem proinsulin in einem *Staphylococcus carnosus* sekretionssystem. PhD thesis, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

König B., Jaeger K.E., König W. 1994. Induction of inflammatory mediator release (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa*. Int. Arch. Allergy Immunol. 104: 33-41.

Kourist R., Nguyen G.S, Strübing D., Böttcher D., Liebeton K., Naumer C., Eck J., Bornscheuer U. T. 2008. Hydrolase-catalyzed stereoselective preparation of protected α , α - dialkyl- α -hydroxycarboxylic acids. Tetrahedron: Asymmetry 19: 1839-1843.

Kuncová G., Maléterová Y., Lovecka P. 1994. Hydrolysis of rapeseed oil by lipase immobilized on inorganic oxide supports. *Biotechnol. Tech.* 8: 535-540.

L

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lawson D.M., Brzozowski A.M., Rety S., Verma C., Dodson G.G. 1994. Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-Ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Eng.* 7: 543-550.

Lelie D.C-O., Citlali R-G., Gerardo V-A., Rosamaria OR. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb. Technol.* 37: 648-654.

Liebl W., Götz F. 1986. Studies on lipase directed export of *Escherichia coli* β -lactamase in *Staphylococcus carnosus*. Mol. Gen. Genet. 204: 166-173.

Linthorst, J. M., Bennet Clark, S. et Holt, P. R. 1977. Triglyceride emulsification by amphipaths present in the intestinal lumen during digestion of fat. J Coll Interface Sci 60 :1-10.

M

Machy, P. et Leserman, L. 1987. Composition, propriétés et préparation des liposomes. Les liposome en biologie cellulaire et pharmacologie. INSERM, 1-25

Martinelle M., Holmquist M., Hult K. 1995. On the interfacial activation of *Candida Antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. Biophys. Biochem. Acta. 1258: 272-276.

Martinelle M., Holmquist M., Clausen I.G., Patkar S., Svendsen A., Hult K. 1996. The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase. Prot. Engineering 9: 519-524.

Matsukura M., Fujita Y., Itami R. 1992. Method for avoiding pitch troubles by use of thermostable lipase WO 92/13130.

Mazer, N. A., Benedek, G. B. et Carey, M. C. 1980. Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. Biochemistry 19:601-15.

McLaren, AD. Packer, L. 1970. Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 33: 245-308.

McNeill G.P., Sonnet P.E. 1995. Low-calorie triglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification of monoglycerides. J. Am. Oil Chem. Soc. 72:1301-1307.

Momsen, W. E. et Brockman, H. L. 1976a. Effects of colipase and taurodeoxycholate on the catalytic and physical properties of pancreatic lipase B at an oil water interface. *J Biol Chem* 251: 378-83.

Momsen, W. E. et Brockman, H. L. 1976b. Inhibition of pancreatic lipase B activity by taurodeoxycholate and its reversal by colipase. *J Biol Chem* 251:384-8.

Moore H. 1987. Margarine fat Brevet GB2185990.

Mosbah H., Sayari A., Mejdoub H., Dhouib H., Gargouri Y. 2005. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1723: 282-291.

Muraoka T., Ando T., Okoda H. 1982. Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *J. Biochem.* 92: 1933-1939.

N

Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. et Dijkstra, B. W. 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* 275: 31219-25.

Nieuwenhuissen W., Kunze H., de Haas G.H. 1974. Phospholipase A₂ (phosphatide acylhydrolase EC 3.1.1.4) from porcine pancreas. *Methods in Enzymology.* 32: 147-154.

Nikoleit K., Rosenstein R., Verheij H.M., Götz F. 1995. Comparative biochemical and molecular analysis of the *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* and a hybrid lipase. Indication for a C-terminal phospholipase domain. *Eur. J. Biochem.* 228: 732-738.

Nini L., Sarda L., Comerau L.C., Boilard E., Dubes J.P., Chahinian H. 2001. Lipase catalysed hydrolysis of short-chain substrates in emulsion: a kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1534: 34-44.

Noble M.E.M., Cleasby A., Johnson L.N., Egmond M.R., Frenken L.G.J.1993. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* 331:123-128.

Novick R., Staphylococcus, in: Sonsheim A.L.1993. *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Biochemistry, physiology, and molecular genetics, American Society for Microbiology, Washington D.C. pp. 17-33.

O

Oh B., Kim H., Lee J., Kang S., Oh T.1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 385-392.

Okkels J.S., Svendsen A., Patkar S.A., Borch K.1996. Protein engineering of microbial lipases with industrial interest. In: Engineering of/with Lipases. Ed. F. Xavier Malcata.. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 317: 203-17.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5: 197-211.

Osterlund T., Danielsson B. 1997. Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. *Biochem. J.* 319 : 411-420.

P

Pièroni, G. Gargouri, Y. Sarda, L. Verger, R. 1990. Interaction of lipases with lipid monolayers. Facts and questions, in: Trados Th.F. (Ed), *Adv. Colloid Interface Sci.* pp. 341-378.

Pleiss J., Fischer M.2000. Lipase engineering database understanding and exploiting sequence structure relationship. *J. Mol. Catal. Part B: Enzymatic* 10: 491-508.

Plewig G., Kligman A.M. 1993. Acne and Rosacea, in: Plewig G., Kligman A.M. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p.p. 5.

Point, V. Kumar, P. Marc, S. Delorme, V. Parsiegla, G. Amara, S. Carrière, F. Buono, G. Fotiadu, F. Canaan, S. Leclaire, J. Cavalier, J.F. 2012. Analysis of the discriminative inhibition of mammalian digestive lipases by 3-phenyl substituted 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones. Eur. J. Med. Chem. 58: 452-463.

R

Rahman R.N.Z.R.A., Baharum S.N., Basri M., Salleh A.B. 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* Strain S5, Anal. biochem. 341:267–274

Ransac, S. Moreau, H. Rivière, C. Verger, R. 1991. Monolayer techniques for studying phospholipase kinetics, in : Dennis E. (Ed), Methods Enzymol., Academic press, New York.

Rathelot J., Julien R., Canioni P., Coeroli C., Sarda L. 1975. Studies on the effect of bile salt and colipase on enzymatic lipolysis. Improved method for the determination of pancreatic lipase and colipase. Biochimie 57: 1117-1122.

Rogalska, E., Bilewicz, R., Brigaud, T., El Moujahid, C., Foulard, G., Portella, C. and Stebe, M. J. 2000. Formation and properties of Langmuir and Gibbs monolayers: a comparative study using hydrogenated and partially fluorinated amphiphilic derivatives of mannitol. Chem Phys Lipids 105:71-91.

Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F. and Verger, R. 1993. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. Chirality 5: 24-30.

Rogalska E., Nury S., Douchet I., Verger R. 1995. Lipases stereoselectivity and regioselectivity toward three isomers of dicaprin: A kinetic study by the monomolecular film technique. *Chirality* 7: 505-515.

Rollof J., Braconier J.H., Söderström C., Nilsson-Ehle P. 1988. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 505-510

Rollof J., Normak S. 1992. *In vitro* processing of *Staphylococcus aureus* lipase. *J. Bacteriol.* 174: 1844-1847.

Rosenstein R., Götz F. 2000. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. *Biochimie* 82: 1005-1014

S

Safari M., Kremasha S. 1994. Interesterification of butterfat by commercial microbial lipases in a cosurfactant-free microemulsion system. *Am. Oil Chem. Soc.* 71: 951-654.

Salleh A.B., Musani R., Basri M., Ampon K., Yunus W.M.Z., Razak C.N.A. 1993. Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopusoryzae* and factors affecting their production. *Can. J. Microbiol.* 39: 978-981.

Sambrouk J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuelson P., Hansson M., Ahlborg N., Andreoni C., Götz F., Bachi T., Nguyen T.N., Binz H., Uhlen M., Stahl S. 1995. Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* 177: 1470-1476.

Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A. 1990. The P-loop-a common motif in ATP and GTP binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15 : 430-434.

Sarda L., Desnuelle P. 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta.* 30: 513-521.

Sayari, A. Agrebi, N. Jaoua, S. Gargouri, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase 2001. *Biochimie.* 83 : 863–871.

Sayari A., Verger R., Gargouri Y. 2001a. Comparative kinetic studies of two staphylococcal lipases using the monomolecular film technique. *J. Biochem. Mol. Biol.* 34:457-462.

Sayari, A. Mosbah, H. Verger, R. Gargouri, Y. 2007. The N-terminal His-tag affects the enantioselectivity of staphylococcal lipases: A monolayer study. *J. Coll. Inter. Sci.* 313: 261-267.

Schmid R.D., Verger R. 1998. lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-1633.

Schrag, J.D. Li, Y.G. Wu, S. Cygler, M. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature.* 351: 761-764.

Sekhona A., Dahiya N., Tiwari R.P., Hoondal G.S. 2005. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1. *J. Basic Microbiol.* 45: 621-658.

Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-62.

Shieh C.J., Akoh C.C., Yee L.N. 1996. Optimized enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase A Y from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Bioeng.* 51: 371-374

Simons J.W., Adams H., Cox R.C., Dekker N., Götz F., Slotboom A.J., Verheij H.M.1996. The lipase from *Staphylococcus aureus*. Expression in *Esherichia coli*, large-scale purification and comparaison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase, Eur. J. Biochem. 242: 760-769.

Simons J.W.F.A., van Kampen M.D., Riel S., Götz F., Egmond M.R., Verheij H.M.1998. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*. Comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. Eur. J. Biochem. 253: 675-683.

Simons J.W., van Kampen M.D., Ubarretxena-Belandia I., Cox R.C., Alves dos Santos C.M., Egmond M.R., Verheij H.M.1999. Identification of a calcium binding site in *Staphylococcus hyicus* lipase: generation of calcium-independent variants. Biochemistry 38: 2-10.

Singh S., Banerejee U.C.2005. Enantioselective hydrolysis of methoxyphenyl glycidic acid methyl ester [(±)-MPGM] by a thermostable and alkalostable lipase from *Pseudomona aeruginosa*. J. Mol. Catal. B: Enzymatic 36: 30-35.

Small, D. M. 1968. A classification of biological lipids based upon their interaction in aqueous systems. J. Amer. Oil Chemists Soc. 45:108-119.

Sugiugara M., Isobe M.1974a. Studies of the lipase of *Chromobacterium viscosum*.III. Purification of a low molecular weight lipase and its enzymatic properties. Biochim. Biophys. Acta: Enzymatic 341:195-200

Sugiugara M., Isobe M., Muroya N., Yamaguchi T.1974b. Purification and properties of a *Chromobacterium* lipase with a high molecular weight. Agricol. Biol. Chem. 38:947-952.

Stehr F., Kretschmar M., Kröger C., Hube B., Schäfer W.2003. Microbial lipases as virulence factors. J. Mol. Catal. B: Enzymatic 22: 347-355.

T

Talon, R., Dublet N., Montel M.C., Cantonnet M. 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Curr. Microbiol.* 30: 11-16.

Titball R.W.1993. Bacterial phospholipase C. *Micobiol. Rev.* 57: 347-366.

U

Undurraga D., Markovits A.,Erazo S. 2001. Cocoa butter equivalent through enzymatic interesterification of palm oil midfraction. *Proc. Biochem.*36:933-939.

Uppenberg J., Hansen M.T., Partkar S., Jones T.A.1994. Sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2:293-308.

V

Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Rathé, J. et Christophe, J. 1975.Effect of colipase on adsorption and activity of rat pancreatic lipase onemulsified tributyrin in the presence of bile salts. *FEBS Lett.* 49:334-337.

Van Oort M.G., Deveer A.M.T.J., Dijkman R., Tjeenk M.L., Verheij H.M., de Haas G.H., Wenzig E., Götz F.1989.Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* 28:9278-9285.

Van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Martinez C., Rugani N., Verger R. et Cambillau C. 1993. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed byX-ray crystallography. *Nature.* 362: 814-820

Verger, R. et De Haas, G. H. 1973. Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem Phys Lipids* 10:127-36.

Verger, R. 1976. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annu Rev Biophys Bioeng* 5:77-117.

Verger R. 1984. Pancreatic lipases, in: Borgström B., Brockman H.L. (Eds.), *Lipases, Elsevier, Amsterdam* : 83-149.

Verger, R. de Haas, GH. 1976. Interfacial enzyme kinetic of lipolysis. *Annual Review Biophys. Bioeng.* 5 : 77-117.

Verger, R. 1997. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *TIBS TECH.* 15:32-38.

W

Wenzig E., Lottspeich F., Verheij B., de Haas G.H., Götz F. 1990. Extracellular processing of the *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochem. Life Sci. Adv.* 9: 47-56.

Wertheim H.F.L., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5:751-762.

Winkler F.K., D'Arcy A., Hunziker W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature.* 343: 771-774.

Y

Yang D., Rhee J.S. 1992. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 748-752.

Yang T.H., Jang Y., Han J.J., Rhee J.S.2001. Enzymatic synthesis of low-calorie structured lipids in a solvent-free system.*J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 291-296.

Youngberg C.A, Berardi R.R., Howatt W.F., Hyneck M.L., Amidon G.L., Meyer J.H., Dressman J.B. 1987. Comparison of gastrointestinal pH in cystic fibrosis and healthy subjects. *Dig. Dis. Sci.* 32: 472-480.

Z

Zaliha RN., Rahman RA., Baharum SN., Basri M., Salle AB.2005.High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain S5. *Analytical Biochemistry* 341: 267-274.

Ziehbuhr W., Hellman C., Götz F., Meyer P., Wilms K., Straube E & Hacker J.1997.Detection of an intercellular adhesion (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates, *Infect. Immun.* 65: 890-896.

ZimmermannR., Straus J.G ; Haemmerle G., Schoiwohl G., ; Birner- Gruenberger R., Riederer H.,Lassa., Neuberger G.,EisenhaberF., Harmetter A., Zahner R.2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383-1386;

Zentler-Munro P.L., Assoufi B.A., Balasubramanian K., Cornell S., Benoliel D., Northfield, T. C., Hodson, M.E.1992.Therapeutic potential and clinical efficacy of acid-resistant fungal lipase in the treatment of pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis. *Pancreas* 7: 311-319.