

N° d'ordre : 03/2009-M/ S.N

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
« HOUARI BOUMEDIEN »

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En: SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Microbiologie de l'environnement

Par : Melle ADDOU Ammara Nariman

Sujet

*Les actinobactéries thermo-halophiles :
Isolement, systématique et production de
métabolites bioactifs*

Soutenu le 14/10/2009, devant le jury composé de :

Mme TOUIL BOUKOFFA. C	Professeur (FSB/USTHB)	Présidente
Mr HACENE. H	Professeur (FSB/USTHB)	Directeur de thèse
Mr KACI. Y	Maitre de Conférences (FSB/USTHB)	Examineur
Mr FORAR LAIDI. R	Maitre de Conférences (ENS)	Examineur
Mr BOUTAIBA. S	Maitre de Conférences / Université de Djelfa	Invité de jury

Résumé :

L'objectif principal de ce travail est l'isolement des actinobactéries thermo-halophiles susceptibles de produire de nouveaux métabolites bioactifs en vue d'applications en biotechnologie. Afin d'atteindre notre objectif, nous avons adopté l'approche d'exploration d'environnements extrêmes. A cet effet, nous avons choisis pour cette étude, un environnement hypersalin: les sebkhas Algériennes. Cinq sites ont été sélectionnés: chott Melghir, sebkha d'El-Goléa, sebkha d'Oran, sebkha de Djelfa, sebkha de Msila. Un total de cinq souches d'actinobactéries thermo-halophiles a été isolé après plusieurs enrichissements à partir d'un seul site à savoir le Chott Melghir, à une température 55°C et en présence d'une concentration de 10% de NaCl.

L'identification moléculaire a porté sur deux souches parmi les cinq isolées, désignées SAMIII et SMIIA. Les résultats du séquençage du gène codant pour l'ARN16S ont montré que ces deux souches appartiennent probablement à deux nouvelles espèces du genre *Saccharopolyspora*. Un ensemble de caractères phénotypiques, physiologiques et biochimiques, ont conforté le résultat du séquençage. Les deux souches se développent entre 40°C et 55°C, et tolèrent des concentrations en NaCl comprises entre 0M et 2,9M. Il s'agit donc de souches thermophiles et extrêmement halotolérantes. Ce résultat nous a incités à les sélectionner pour tester leur potentiel à produire des métabolites bioactifs. Nous avons focalisé notre étude sur les substances antibactériennes et les enzymes hydrolytiques (protéase, amylase, cellulase et lipases).

La souche SAMIII présente une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*. Par contre aucune activité n'a été détectée contre *Pseudomonas aeruginosa*. La souche SMIIA s'est révélée inactive contre les germes cibles. Les essais de production de la substance antibactérienne de la souche SAMIII en milieu liquide n'ont pas abouti. Ainsi nous n'avons pu aborder une étude approfondie.

Le criblage des activités enzymatiques nous a permis de mettre en évidence la production de deux enzymes hydrolytiques par les deux souches. En effet, elles produisent des enzymes protéolytiques et des enzymes lipolytiques.

Les enzymes lipolytiques produites par les deux souches SAMIII et SMIIA ont fait l'objet d'une caractérisation biochimique préliminaire. Ces enzymes se sont révélées particulièrement intéressantes. La souche SMIIA produit une estérase extracellulaire alcalophile et halotolérante avec une activité maximale à pH 9, à 40°C et à 2M NaCl. La souche SAMIII possède une activité lipase. La caractérisation de cette enzyme a montré qu'elle est alcalophile, hautement thermoactive, thermostable et halophile dépendante du sel. L'activité est optimale à pH 8, à 120°C, et à 3M NaCl. L'étude de l'influence des effecteurs montrent la présence d'une sérine dans le site actif des deux enzymes.

Ce travail nous a permis de décrire une lipase et une estérase pour la première fois à partir de deux espèces de *Saccharopolyspora*. L'ensemble des propriétés déterminées de ces extremozymes montre qu'elles sont particulières, et possèdent des potentialités biotechnologiques et scientifiques intéressantes.

Dédicaces

Je dédie cette thèse aux êtres les plus chers à mon cœur, ma grand-mère 'Mima', mon papa et ma maman. Merci à vous trois pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez transmises. Mima même si tu ne fais plus partie de ce monde, tu ne m'a jamais quitté, tu es toujours présente à mes côtés, comme tu l'as toujours été, je ressens toujours ton amour et ta tendresse et ça sera toujours ainsi. Ce travail est principalement dédié à toi mima 'RAHIMAKI ALLAH'. Papa et maman, cette thèse est pour vous ce n'est pas avec ces quelques mots que je pourrais exprimer ma gratitude envers vous. Merci pour l'amour et la tendresse que vous me portez, pour votre soutien et pour tous les sacrifices que vous avez fait pour moi, et qui m'ont emmené jusqu'ici, merci pour tout le bonheur que vous m'avez apporté. C'est grâce à vous et pour vous que j'ai fait ce travail. Aujourd'hui je vous le dédie.

Je dédie également cette thèse aux êtres qui me sont très chers, mon frère et ma sœur KAMEL et FARAH, qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de ce travail. Leur amour et leur affection sont les choses les plus précieuses pour moi. Recevez ce mémoire en témoignage de mon amour pour vous.

Je dédie ce travail à ma très chère et adorable regrettée grand-mère 'RAHIMAHA ALLAH', je n'oublierai jamais ta tendresse et ton affection, et à mon cher grand père dont le soutien a été constant, merci à vous pour tout.

Je dédie ce travail à mes oncles et tantes et à toute ma famille.

Ce travail est aussi dédié à ma meilleure amie et sœur NAWEL qui a toujours été à mes côtés dans les moments les plus difficiles, et qui a partagé avec moi les moments les plus inoubliables. Merci pour ta présence et ton soutien.

'Les mots manquent aux émotions'

Victor HUGO

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences biologiques (USTHB).

Mes remerciements vont tout d'abord à mon directeur de thèse, M. Hacène Hocine pour son soutien inconditionnel et ses conseils judicieux qui ont permis la réalisation de ce travail dans les conditions les meilleures.

Je remercie madame et messieurs les membres du jury, à qui j'exprime ma gratitude pour leur patience, et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je remercie Mme TOUIL BOUKOUFFA, pour sa gentillesse. Toute ma reconnaissance et ma gratitude de m'avoir fait l'honneur de présider l'honorable jury qui juge ce mémoire.

Je remercie Mr KACI et Mr FOURAR pour l'attention qu'ils ont bien voulu accorder à ce mémoire. Toute ma reconnaissance pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie particulièrement Mr BOUTAIBA, de m'avoir accueillie avec autant d'attentions, dans le laboratoire de l'université de Djelfa. Pour son soutien et son aide précieux, toute ma reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme BOUANANE pour son implication particulière dans l'aboutissement de ce travail. Sa gentillesse et sa patience sont remarquables. A elle va toute ma gratitude.

Je tiens à remercier Mme Marie-Laure FARDEAU, chercheur à l'IRD Marseille pour son aide précieuse. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma vive reconnaissance.

Je remercie très chaleureusement et en particulier Lila, Linda, Djalila, Lamia, qui ont mon amitié et ma sympathie. Je leur suis reconnaissante d'avoir été présentes à mes côtés, votre aide et soutien m'ont été précieux.

Je n'omettrai pas d'associer à ce travail tous les membres du laboratoire de microbiologie, et tous mes collègues Samia, Yamina, Rima, Nadia, et Okba à qui vont mes sincères remerciements.

Je remercie vivement Soumia, Meriem et Nabila pour leur soutien et leur encouragement.

Mes remerciements s'adressent aussi aux deux étudiants du laboratoire de l'université de Djelfa Najwa et Mohamed.

Ne pouvant citer chacun par son nom, mes remerciements s'adressent à tout ceux qui m'ont aidé pour la préparation de ce travail.

Table des matières.

Table des matières :

Introduction	1
Chapitre I : Étude bibliographique	
1- Les microorganismes halophiles.....	3
1-1 Adaptation des microorganismes halophiles à l'hyper-salinité (l'osmorégulation) ...	5
2- Les microorganismes thermophiles	6
2-1 Adaptation des microorganismes thermophiles aux hautes températures.....	7
3- Les actinobactéries	8
3-1 Taxonomie des actinobactéries	9
3-2 Les actinobactéries thermophiles	11
3-3 Les actinobactéries halophiles.....	11
3-4 Production des métabolites bioactifs par les actinobactéries.....	12
3-4-1 Les métabolites secondaires	12
3-4-2 Les enzymes.....	13
4 - Le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.....	14
4-1 Le métabolisme primaire.....	14
4-2 Le métabolisme secondaire.....	14
4-2-1 Régulation du métabolisme secondaire.....	15
4-2-2 Les antibiotiques.....	16
4-2-2-1 Historique et généralité sur les antibiotiques.....	16
4-2-2-2 Mécanisme d'action	17
4-2-2-3 Microorganismes producteurs	18
4-2-2-4 Resistances bactériennes aux antibiotiques	18
5- Enzymes et biocatalyse enzymatique.....	19
5-1 Classification des enzymes	22
5-2 Sélectivité des enzymes	22
5-3 Stabilité des biocatalyseurs	23
6- Les enzymes des extremophiles (extremozymes)	
6-1 Les enzymes halophiles (Les halozymes).....	24
6-1-1 Adaptation des protéines halophiles à l'hyper salinité	24

6-1-2	Importance biotechnologique des enzymes halophiles (halozymes).....	25
6-2	Les enzymes thermophiles (thermozymes)	26
6-2-1	Facteurs contribuant à la thermostabilité des thermozymes.....	27
6-2 -1-1	Rôle des substitutions des acides aminés dans la thermostabilité	27
6-2 -1- 2	Rôle des interactions intermoléculaires dans la thermostabilité	28
6-2 -1-3	Facteurs extrinsèques de thermo- stabilisation.....	29
6-2-1-4	Conformations des protéines thermophiles	30
6-2-2	Importance biotechnologique des enzymes thermophiles.....	30
7-	Les enzymes lipolytiques	32
7-1	Les lipases.....	32
7-1-1	Définition des lipases.....	32
7-1-2	Réactions catalysées par les lipases.....	32
7-1-3	Structure tridimensionnelle.....	33
7-1-4	Mécanisme catalytique.....	34
7-1-5	Phénomène d'activation interfaciale	36
7-1-5-1	Cinétique de l'activité interfaciale	38
7-1-5-2	Structure moléculaire de l'activation interfaciale	38
7-1-6	Spécificités des lipases.....	39
7-1-6-1	Spécificité vis-à-vis du type d'acide gras	39
7-1-6-2	La regio-spécificité	40
7-1-6-3	La Stéréo –sélectivité.....	40
7-2	Différence entre les lipases et les estérases.....	42
7-3	Les enzymes lipolytiques microbiennes et leurs applications.....	42

Chapitre II : Matériel et méthodes.

1-	Échantillonnage	44
1-1-	Description des sites de prélèvement	44
2-	Isolement des souches d'actinomycètes.....	47
2-1	Enrichissement en milieu liquide	47
2-2	Isolement sur milieu solide.....	47
2-3	Purification et conservation des souches	47

3-Identification des souches d'actinomycètes isolées	47
3-1 Détermination Caractères culturaux et morphologiques.....	48
3-2 Identification moléculaire	48
3-3 Détermination des caractères physiologiques et biochimiques.....	49
3-3-1 Détermination des caractères physiologiques.....	49
3-3-1-1Détermination des de la tolérance de température de salinité.....	49
3-3-2 Détermination des caractères biochimiques.....	50
4-Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	50
4-1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu solide.....	50
4-1-1 La méthode des disques d'agar.....	50
4-1-2 La méthode de la double couche d'agar.....	51
4-2 Mise en évidence de l'activité antibactérienne en milieu liquide.....	51
4-2-1 La méthode des disques en papier.....	51
5- Criblage des activités enzymatiques sur milieu solide.....	52
5-1 Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	52
5-2 Mise en évidence de l'activité amylolytique	52
5-3 Mise en évidence de l'activité cellulolytique	52
5-4 Mise en évidence de l'activité lipolytique	53
6- Etude des enzymes lipolytiques en milieu liquide.....	53
6-1Préparation de l'extrait enzymatique	53
6-2 Mesure de l'activité lipolytique.....	54
6-2-1 Test colorimétrique	54
6-2-2 Test de Duncombe	55
6-3 Effet du pH, de la température et du NaCl sur l'activité lipolytique	55
6 -3-1 Effet du pH sur l'activité lipolytique.....	55
6 -3-2 Effet de la température sur l'activité lipolytique et thermostabilité.....	55
6 -3-2 Effet du NaCl sur l'activité lipolytique et thermostabilité.....	56
6-4 Effet des effecteurs sur l'activité lipolytique.....	56

6-4-1 Effet du PMSF, de l'ésérine, du SDS et de l'EDTA sur l'activité lipolytique.....	56
6-4-2 Effet des ions métalliques sur l'activité lipolytique	56

Chapitre III : Résultats et discussion.

1-Isolement des souches d'actinobactéries thermo-halophile.....	57
2 - Identification des souches des souches d'actinobactéries isolées.....	59
2-1 Étude des caractères culturaux et morphologiques.....	59
2-2 Identification moléculaire	63
2-3- Etude des caractères physiologiques et biochimiques des souches SAMIII et SMIIA....	66
2-3-1 Etude des caractères physiologiques	66
2-3-1-1 Etude de la tolérance à la température	66
2-3-1-2 Etude de la tolérance à la salinité	66
2-3-2 Détermination des caractères biochimiques	70
3- Détermination de l'activité antibactérienne.....	72
3-1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu solide.....	72
3-2 Mise en évidence de l'activité antibactérienne milieu liquide (méthode des disques en papier).....	73
4- Criblage des activités enzymatiques	74
5- Caractérisation biochimique préliminaire des enzymes lipolytiques	76
5- 1 Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches SAMIII et SMIIA vis-à-vis des substrats synthétiques (<i>p</i> -NPP).....	76
5-2 Détermination de l'activité lipolytique des souches SAMIII et SMIIA vis-à-vis du substrat naturel la trioléine (Test de Duncombe).....	77
5-3 Caractérisation biochimique préliminaire de l'estérase de la souche SMIIA.....	77
5-3-1 Effet du pH sur l'activité estérase de la souche SMIIA	78
5-3-2 Effet de la température sur l'activité estérase de la souche SMIIA	78
5-3-3 Effet du NaCl sur l'activité estérase de la souche SMIIA.....	81
5-3-4 Effet du PMSF et de l'ésérine sur l'activité estérase de la souche SMIIA...	83
5-4 Caractérisation biochimique préliminaire de l'activité lipase de la souche SAMIII....	83
5-4-1 Cinétique de la croissance et de la production enzymatique	83

5-4-2 Effet du pH sur l'activité lipase de la souche SAMIII.....	84
5-4-3 Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la lipase de la souche SAMIII.....	86
5-4-4 Effet du NaCl sur l'activité lipase de la souche SAMIII	89
5-4-5 Effet des effecteurs sur l'activité lipase de la souche SAMIII.....	93
5-4-5-1 Effet du PMSF, de l'ésérine, du SDS et de l'EDTA sur l'activité lipase.....	93
5-4-5-2 Effet des ions métalliques sur l'activité lipase.....	94
Conclusion.....	97
Perspectives.....	99
Références bibliographiques.....	100

Abréviations :

ADN: Acide désoxyribonucleique.

AGL: Acides gras libres

Arg: arginine

ARN 16S: sous unité 16S de l'ARN ribosomal

ARN: acide ribonucléique

Asn : asparagine

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool.

Cys: cystéine

DO: densité optique

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

Gln : glutamine

Gly: glycine

His : histidine

Lys :lysine

M: molaire.

PCR: polymerase chain reaction

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride.

***p*-NPC4 :** para nitro phenyl butyrate.

***p*-NPP:** para nitro phenyl palmitate.

SDS: Sodium dodecyl sulfate.

Ser: Serine

Thr: thréonine

T_{opt} :Température optimale.

Liste des figures :

Figure 1 :a) secteurs industriels impliquant les produits issus des biotransformation enzymatiques b) les types d'enzymes utilisées en industrie	20
Figure2 : réactions de catalyse des triacylglycérol par les lipases en milieux aqueux, et la réaction inverse de synthèse dans des milieux organique à faible activité d'eau.....	35
Figure 3 : Les principales réactions catalysées par les lipases	35
Figure 4 : Diagramme schématique du repliement α/β hydrolase.....	35
Figure 5 : modèle cinétique de l'action de la lipase sur un substrat insoluble.....	37
Figure 6 : Hydrolyse de la triacétin par une lipase et une estérase en fonction de la concentration en substrat.....	37
Figure 7 : Classification des lipases bactériennes basée sur la spécificité de position (regio-spécificité).....	41
Figure 8 : Localisation des sites de prélèvement.....	46
Figure 9 : Aspect macromorphologique de la souche SAMIII sur milieu ISP2 additionné de 10%NaCl après 48 heures d'incubation à 55°c	61
Figure10 : Observation par microscopie électronique de la micromorphologie de la souche SAMIII se développant sur milieu ISP2 additionné de 10%NaCl après 48 heures d'incubation à 55°c.	61
Figure11 : Aspect macromorphologique de la souche SMIIA sur milieu ISP2 additionné de 10%NaCl après 48 heures d'incubation à 55°c.....	62
Figure12 : Observation par microscopie électronique de la micromorphologie de la souche SMIIA se développant sur milieu ISP2 additionné de 10%NaCl après 48 heures d'incubation à 55°c.....	62
Figure 13 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences de l'ARN 16s selon la méthode Neighbors-joining, montrant les relations phylogénétiques entre les deux souches SAMIII et SMIIA (SAM3 et SM2A), et avec les espèces du genre <i>Saccharopolyspora</i>	65
Figure 14 : Dégradation de la caséine par la souche SMIIA sur milieu caséine –agar	75
Figure 15 : Effet du pH sur l'activité estérase de la souche SMIIA.....	80
Figure 16 : Effet de la température sur l'activité estérase de la souche SMIIA.....	80

Figure 17: Effet du NaCl sur l'activité estérase de la souche SMIIA	82
Figure 18 : cinétique de croissance et de production de la lipase de la souche SAMIII.....	85
Figure 19 : Effet du pH sur l'activité lipase de la souche SAMIII.	85
Figure 20 : Effet de la température sur la lipase produite par la souche SMIIA.....	88
Figure 21 : Thermostabilité de la lipase produite par la souche SMIIA.....	88
Figure 22 : effet du NaCl sur l'activité lipase produite par la souche SAMIII.....	92

Liste des tableaux :

Tableau I : Classification des microorganismes halophiles par de Kushner (1978).....	4
Tableau II : Les enzymes bactériennes et leurs domaines d'application.....	20
Tableau III : Les caractéristiques essentielles des enzymes appliquées dans la biocatalyse industrielle.....	20
Tableau IV : Caractères généraux des différents sites de prélèvement	45
Tableau V: Caractères cultureux des souches isolées sur différents milieux.....	60
Tableau VI : Caractères différentiels entre les souches SAMIII et SMIIA et les autres espèces du genre Saccharopolyspora.....	69
Tableau VII : Caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques différentiels des souches SAMIII et SMIIA	71
Tableau VIII : Effet des effecteurs sur l'activité lipase de la souche SAMIII	95
Tableau IX : Effet des ions métalliques sur l'activité lipase de la souche SAMIII.....	95

Introduction.

Introduction :

La production des métabolites bioactifs suscite actuellement un intérêt grandissant, en raison de l'impact important de leurs utilisations pour des applications biotechnologiques. Des milliers de substances sont répertoriées, et la majorité d'entre elles sont destinées aux applications dans le domaine pharmaceutique. Mais certains composés sont également susceptibles d'être exploités dans divers domaines importants de la vie, notamment : alimentaire, agricole, cosmétique et enfin l'industrie des détergents.

La riche diversité métabolique et physiologique des microorganismes, en fait la source la plus importante des produits naturels biologiquement actifs.

Dans le domaine pharmaceutique par exemple, les antibiotiques disponibles pour l'utilisation en thérapeutique humaine sont issus, pour la plupart, de produits naturels isolés à partir des microorganismes (Pelaez, 2005). L'autre application majeure des métabolites bioactifs, est la production d'enzymes d'intérêt industriel. En effet, plus de 500 produits commerciaux sont synthétisés en utilisant des enzymes microbiennes (Johannes *et al.*, 2006).

Grâce au progrès des stratégies de screening et de recherche, de nouveaux métabolites bioactifs continuent d'être découverts à partir de producteurs prolifiques tels que les actinobactéries. Ces derniers occupent une place prépondérante parmi les microorganismes doués de potentiel biotechnologique, particulièrement pour la production de nouveaux antibiotiques et enzymes (Cook et Meyers, 2003). Ce groupe a fait l'objet de nombreuses recherches, et de nouvelles espèces et même de nouveaux genres sont découverts constamment (Hacène *et al.*, 2000; Pelaez, 2005).

Actuellement, les recherches sont orientées vers des espèces plus rares, et un intérêt particulier est porté aux microorganismes extrêmophiles, qui se développent dans des conditions extrêmes de température, de salinité, de pH etc. (Demirjian *et al.*, 2001). En raison de leur écologie et physiologie particulières, et grâce à leurs capacités d'adaptation aux conditions de leurs environnements, les extrêmophiles ont acquis des propriétés fascinantes (Margeisen et Schinner, 2001). Ainsi, ils font l'objet de recherches intensives, tant pour leur intérêt fondamental que biotechnologique.

La compréhension et l'élucidation des mécanismes qui régissent l'adaptation des biomolécules aux conditions extrêmes, est la raison principal de cet intérêt. Outre cet aspect fondamental, les particularités des extrêmophiles offrent également des perspectives en termes d'applications biotechnologiques. Les organismes de l'extrême ont donné accès à une diversité incomparable de métabolites bioactifs novateurs, particulièrement les enzymes (Ollivier, 1994 ; Gomes et Steiner, 2004). Ces derniers déploient une extraordinaire stabilité et des activités dans des conditions extrêmes, en adéquation aux exigences industrielles (Podar, 2006).

Les démarches récentes dans la découverte de molécules stables et plus efficaces à partir des extrêmophiles, offrent de nouvelles opportunités qui s'inscrivent dans le développement de la

recherche de nouvelles molécules au profit de la biotechnologie et de la science (Hough et Danson, 1999 ; Kelch *et al.*, 2007).

C'est dans ce contexte que se situent les perspectives de notre étude, qui a pour objectif principal la recherche de métabolites bioactifs chez un groupe particulier des actinobactéries rares, les actinobactéries thermo-halophiles. Pour cela, nous avons adopté l'approche de l'exploration d'un environnement extrême : les sebkhas (lacs salins), dans le but d'isoler des taxons originaux susceptibles de produire de nouvelles molécules. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux deux applications majeures de l'industrie, à savoir la production de substances antibactériennes et des enzymes.

Dans ce contexte, et pour atteindre notre objectif, la stratégie que nous avons adoptée consiste en :

- Prélèvement d'échantillon d'eau et de sol à partir de différentes sebkha algériennes (Sebkha d'Oran, de Djelfa, de Msila, chott Melghir, et sebkha d'El-Goléa)
- Isolement des souches d'actinobactéries thermo-halophiles (température de 55°C et en présence de différentes concentrations en NaCl).
- Identification des souches isolées par l'étude morphologique, physiologique, et moléculaire.
- Screening des souches isolées pour la mise en évidence de la production de substances antibactériennes et des enzymes.
- Caractérisation biochimique préliminaire d'enzymes lipolytiques chez deux souches sélectionnées.

Cette thèse s'articulera autour de trois chapitres.

Le premier chapitre de ce manuscrit consiste en une présentation des éléments bibliographiques relatifs à la description des organismes thermophiles et halophiles, ainsi qu'aux actinobactéries. Les métabolites bioactifs : métabolites secondaires et extrêmozymes, sont aussi décrits dans ce chapitre. Une dernière partie étant consacrée aux enzymes lipolytiques. Ce chapitre permet de conclure sur les enjeux scientifiques de la thèse.

Le deuxième chapitre quant à lui, est consacré à la description des différentes méthodes mises en œuvre au cours de cette étude.

Enfin, le troisième chapitre présente les résultats obtenus concernant l'isolement des souches d'actinobactéries thermo-halophiles et leur caractérisation. Les résultats de la mise en évidence des activités antibactériennes et d'enzymes hydrolytiques chez deux souches sélectionnées sont ensuite exposés. Enfin, une caractérisation biochimique préliminaire de deux enzymes lipolytiques est décrite.

Une conclusion des travaux réalisés et les perspectives dégagées clôturent ce manuscrit.

Etude bibliographique.

Parmi les 22500 métabolites bioactifs isolés à partir des microorganismes 45% sont produits par les actinomycètes, 38% par les champignons, et seulement 17% sont produits par les bactéries unicellulaires (Demain et Sanchez, 2009).

De ce fait, les espèces d'actinobactéries ont longtemps fait l'objet de différents programmes de screening afin de découvrir de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique et médical (Dairi, 2005).

Cependant l'exploitation intense des actinobactéries isolés du sol, a contribué à la diminution de la découverte de nouvelles molécules bioactives, et à la redécouverte des métabolites connus. Afin de remédier à ce problème, la recherche de nouvelles métabolites bioactifs s'est penchée sur l'isolement des genres plus rares d'actinobactéries, tels que les actinobactéries extrémophiles (Zhang *et al.*, 2006).

L'extrémophilie désigne l'aptitude de certains organismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants. Les extrémophiles comprennent les organismes qui se développent dans des conditions extrêmes de température, de salinité, de pH, de pression etc. Parmi les domaines les plus étudiés de l'extrémophilie se trouvent les hautes températures (thermophilie), mais aussi les fortes salinités (halophilie) (Adesmoh, 2005).

1-Les microorganismes halophiles :

La capacité de se développer dans des milieux à forte teneur en sel constitue une propriété captivante des microorganismes halophiles, qui a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Les microorganismes halophiles se retrouvent parmi les trois domaines du vivant : Bacteria, Archaea, et Eucarya (Madigan et Oren, 1999). Ils représentent un groupe hétérogène de microorganismes caractérisés par leur capacité à croître dans une large gamme de salinité. Cette gamme est difficile à déterminer, car elle est très variable et dépend des conditions de croissance (la température, le pH et les nutriments) (Ventosa *et al.*, 1982).

Les microorganismes halophiles colonisent les habitats hypersalins (Ventosa et Nieto, 1995). Les environnements hypersalins sont ceux dont la teneur en sel est supérieure à celle de l'eau de mer (Satayarayana *et al.*, 2005). Selon leurs origines, la composition en sel de ces habitats est différente de celle de l'eau de mer, sur cette base ils sont classés en deux catégories : (1) thalassohaline, si la quantité des différents sels inorganiques est approximativement égale à celle de l'eau de mer (2) athalassohaline si les proportions des différents sels sont nettement différentes de celles de l'eau de mer (Ventosa *et al.*, 2008).

Les habitats hypersalins regroupent les lacs salins comme la mer morte et le grand lac salé de l'Utah et les marais salants. Les sols salins, et les aliments salés sont également des habitats des microorganismes halophiles et halotolérants (Madigan et Oren, 1999)

Il est important de faire la différence entre l'halophilie obligatoire, et l'halo- tolérance. Les organismes halophiles exigent le sel pour leur développement (Tang *et al.*, 2002). En revanche, les microorganismes halotolérants, même si le sel n'est pas obligatoire pour leur croissance, ils se développent en présence de fortes concentrations en sel, et dans les milieux hypersalins (Rodriguez-Valera *et al.*, 1981).

Les microorganismes halophiles ont été classés en trois catégories par plusieurs auteurs : Kushner(1978), Larsen(1986), Ramos-Cormanzana (1989), selon la concentration en sel qui amène à une croissance optimale. Parmi toutes ces classifications celle de Kushner demeure la plus utilisée (tableau I) (Tang *et al.*, 2002). D'une manière générale, les bactéries halophiles extrêmes se développent en présence d'une concentration de sel comprise entre 20% et 30% (3,4 à 5,1M), et exigent un minimum de 12%-15% de sel pour la croissance (Johnson *et al.*, 1986a). Les microorganismes halophiles modérés ont une bonne croissance en présence de 0,5 à 2,5M de sel. Enfin, pour les microorganismes faiblement halophiles, la concentration en sel nécessaire pour une croissance optimale peut varier de 1 à 6% (Lefebvre, 2005)

Les exigences en sel des bactéries halophiles sont plutôt spécifiques. Pour certains organismes halophiles les ions Na⁺ peuvent être remplacés par les ions K⁺ ou Mg²⁺, et le Cl par d'autres anions, mais seulement dans une mesure limitée. En effet le NaCl est indispensable pour les halo- bactéries, et il est exigé en forte concentration (Mullakhanbhai et Larsen, 1975). A titre d'exemple, l'actinobactérie halophile extrême *Actinopolyspora halophila* requiert des concentrations élevées en NaCl pour sa croissance et ne se développe pas si le milieu contient du KCl au lieu du NaCl (Gochnauer, 1975).

Tableau I : classification des microorganismes halophiles par de Kushner (1978).

Microorganisme	Concentrations optimales en NaCl
Non halophile	≤0,2 mol /L (1,17%NaCl)
Faiblement halophile	0.2~0.5 mo l/L (1.17~2.93%NaCl)
Halophile modéré	0,5 ~2.5 mol/L (2.93~14.63%NaCl)
Halophile extrême	2.5~5.2mol/ l (14.63~30.4%NaCl)
Halotolerant	0.2~2.5mol/L (1.17~30.45%NaCl)

1-1 Adaptation des microorganismes halophiles à l'hyper-salinité (l'osmorégulation) :

A faible concentration, le sel est indispensable au fonctionnement de la cellule, mais de fortes concentrations peuvent être létales. Cela s'explique par le fait qu'en présence de teneurs élevées en sel, l'eau s'échappe de la cellule afin d'équilibrer l'activité de l'eau aux deux cotés de la membrane. Ceci conduit à la réduction du volume de la cellule, ce phénomène est appelé plasmolyse, provoquant ainsi l'altération des concentrations intracellulaires des métabolites et de l'activité des enzymes (Roberts, 2006).

Les organismes halophiles et halotolérants ont évolué de façon à s'adapter et à résister à la forte pression osmotique, et ont développé à cette fin divers mécanismes d'osmo-adaptation. Afin de pouvoir vivre en milieux hypersalins, les microorganismes halophiles maintiennent leurs cytoplasmes isotoniques avec le milieu environnant (Shindler *et al.*, 1977). Pour ce faire, chez les microorganismes halophiles, une stratégie d'osmorégulation a été décrite pour affronter un choc hyper-osmotique et qui consiste en l'accumulation de solutés intracellulaires.

Le rôle de ces solutés est d'équilibrer la pression osmotique interne avec la pression osmotique externe afin de maintenir l'intégrité cellulaire (Litchfield, 1998). Ces solutés, même à forte concentration n'interfèrent pas avec le métabolisme cellulaire, ils sont ainsi appelés solutés compatibles (Galinski, 1993).

Deux classes majeures de solutés sont accumulées par les bactéries halophiles pour compenser la pression osmotique :

- 1- Les solutés inorganiques particulièrement les cations K^+ , Na^+ et les anions comme le chlorure, le phosphate, le carbonate et le sulfate.
- 2- Les solutés organiques, qui sont des molécules très solubles douées de potentiel osmotique (Roberts, 2006).

Les Archaea aérobie halophiles de la famille des Halobacteriaceae et les bactéries anaérobies halophiles maintiennent la concentration ionique intracellulaire élevée en accumulant les solutés inorganiques. Le K^+ est présent en forte concentration, par contre la concentration du Na^+ est faible et gardent ainsi l'équilibre osmotique (Kerker, 2004).

En revanche, les organismes halophiles représentatifs des Bacteria, Eucarya, et les Archaea halophiles méthanogènes maintiennent une faible concentration en sel dans leur cytoplasme, mais accumulent des solutés compatibles organiques qui servent à garder l'équilibre osmotique. Ces solutés organiques ou osmolytes, sont transportés à partir du milieu ou bien synthétisés dans la cellule. En plus de leur rôle dans le maintien de l'équilibre osmotique, il a été démontré que les osmolytes augmentent la stabilité des protéines, et ont une fonction de protection des enzymes (Lippert et Galinski, 1991 ; Roberts, 2000).

Les osmolytes organiques sont répertoriés en trois groupes :

- (i) les solutés zwitterioniques.
- (ii) les solutés non chargés ou neutres.
- (iii) les solutés anioniques.

Ils se trouvent parmi les solutés compatibles zwitterioniques synthétisés et accumulés par les bactéries et Archaea halophiles, les molécules dérivées des acides aminés comme la betaine (Imhoff et Rodriguez-Valera, 1984). Mais aussi l'ectoïne et l'hydroxyectoïne (Lippert et Galinski, 1991), le N acétyl β lysine, et β glutamine, qui se retrouvent spécialement chez les méthanogènes (Roberts, 2005).

D'autres molécules polaires non chargées ou neutres ont été identifiées comme osmolytes chez les bactéries halophiles, bien qu'elles soient plus répandues chez les eucaryotes. Celles-ci incluent les carbohydrates, comme le tréhalose qui a une fonction d'osmorégulation chez certaines bactéries comme l'actinobactérie *Actinopolyspora halophila*, et le sucrose synthétisé par les cyanobactéries et les proteobacteria. Les polyols font aussi partie de cette classe d'osmolytes, tels que le glycérol chez *Dunaliella* et le myo-inositol utilisés par plusieurs eucaryotes (Roberts, 2005).

Les principaux solutés compatibles anioniques sont le β et le α glutamate, le β hydroxybutyrate et les polyols anioniques.

2-Les microorganismes thermophiles :

Les microorganismes thermophiles sont parmi les extrêmophiles les mieux étudiés. Ils appartiennent à divers groupes taxonomiques : les bactéries, les actinobactéries, les Archaea, et les protozoaires. Ils possèdent une grande diversité métabolique (Pimenov et Bonch-Osmolovskaya, 2006). Outre leur intérêt écologique et évolutif, ils ont été reconnus comme une source potentielle de biomolécules stables, destinées à de multiples applications industrielles (Godfroy *et al.*, 2006).

Les microorganismes sont décrits comme thermophiles s'ils sont capables de se développer à des températures auxquelles la majorité des espèces microbiennes sont incapables de croître (Srinivasan *et al.*, 1999). Ces derniers sont regroupés en trois classes selon la température maximale de croissance :

-Les thermophiles modérés (température optimale 50-60°).

-Les thermophiles extrêmes (60°-80°c).

-Les hyperthermophiles se développent à des températures supérieures à 80°c (Madigan et Oren, 1999).

Le domaine des Archaea regroupe la plus grande diversité des thermophiles. Ils colonisent les habitats les plus chauds (110°C) (Russell et Taylor, 1995).

2-1 Adaptation des microorganismes thermophiles aux hautes températures :

Les molécules biologiques, telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides des organismes qui se développent à des températures élevées, doivent être thermorésistantes. Pour ce faire, les organismes thermophiles ont développé différents mécanismes d'adaptation aux températures élevées.

Suite aux changements de températures, une altération des lipides membranaire survient comme réponse à ce stress (Russel, 1995). L'étude de la composition des lipides membranaires des thermophiles indiquent qu'elles sont riches en acides gras saturés. Ceci permet à la cellule de d'être plus rigide à des températures élevées (Gomes et Streiner, 2004).

Les organismes thermophiles s'adaptent aussi aux températures élevées en produisant des protéines du choc thermique, appelées les chaperonnes. Ces dernières préservent les protéines de la dénaturation et stabilisent leur repliement (Satyarayana *et al.*, 2005).

Afin de préserver l'intégrité des macromolécules, les organismes thermophiles accumulent des molécules de faibles poids moléculaires ou les osmolytes. La plupart sont neutres ou zwitterioniques, tels que les acides aminés et leurs dérivés, les polyols, l'ectoïne et la betaine (Santos et Costa, 2002).

3- Les actinobactéries :

Les actinobactéries représentent un groupe de bactéries à Gram positif, de morphologie et de physiologie très diversifiées, ayant un ADN dont la teneur en G+C est supérieure à 55 mol% (Stackebrandt, 1991). La plupart des actinobactéries sont aérobies, chimio-organotrophes hétérotrophes (Hogg, 2005). Les actinobactéries incluent des genres à croissance unicellulaire comme *Arthrobacter*, et *Corynebacterium*, d'autres ont une croissance mycélienne avec formation de spores (sporoactinomycètes) (Hodgson, 1992). La diversité physiologique des actinobactéries est reflétée par le nombre important des métabolites bioactifs qu'elles synthétisent et secrètent (Suihko *et al.*, 2006). La plupart sont des métabolites secondaires, dont les plus importants sont dotés d'activités antibactérienne, antifongique ou antitumorale. En effet dans le domaine pharmaceutique, les antibiotiques des actinobactéries sont prédominants, y compris la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines. (Thangapandian, 2007). D'autres métabolites essentiels sont aussi produits tels que les vitamines et les enzymes (Williams *et al.*, 1993).

Les actinobactéries ont principalement pour habitat le sol, et constituent une proportion importante de la microflore du sol (Hayakawa et Nonomura, 1989 ; Williams et Davies, 1970), où ils vivent de la décomposition d'une grande variété de composés organiques. De nombreux autres genres ont été isolés à partir de sédiments marins (Suihko *et al.*, 2006) et des habitats aquatiques (Glockner, 2000). Ils sont saprophytes, et peuvent être symbiotes des plantes ou des animaux (Wosten et Willey, 2000).

Les actinobactéries filamenteux ou sporoactinomycètes ont une morphologie fongique et ils ont un cycle de vie similaire à celui des champignons, de part la formation de mycélium qui porte des spores (El-Nakeeb et Lechevalier, 1963). Ils sont considérés comme les équivalents procaryotes des champignons (Lacey, 1997), et ce n'est qu'en 1950 qu'il a été établi que ces deux groupes de microorganismes appartiennent à deux règnes différents (Wosten et Willey, 2000).

Les actinobactéries filamenteux comprennent des genres ayant un cycle de vie complexe. Ils forment un mycélium qui se développe à la surface et à l'intérieur du milieu sur lequel se développe la colonie, c'est ce qu'on appelle le mycélium aérien et de substrat respectivement. Le mycélium aérien se développe en spores qui peuvent subsister pendant une longue période dans le sol (Schneider, 1996). Le mycélium de substrat quant à lui, a le rôle de promouvoir la solubilisation des polymères de haut poids moléculaire (protéines, polysaccharides etc.) par la sécrétion d'enzymes extracellulaires. Il facilite aussi l'absorption des produits résultants de cette dégradation (Hodgson, 1992).

La formation du mycélium aérien ainsi que la sporulation constituent deux événements cruciaux dans le cycle de vie des actinobactéries filamenteux. Cette différenciation est en relation étroite avec l'induction de la synthèse des métabolites secondaires comme les antibiotiques (Nastume *et al.*, 1989).

Des études ont démontré que des espèces d'actinobactéries mutantes qui ne sporulent pas, sont aussi déficientes en la régulation du métabolisme secondaire.

La différenciation morphologique est aussi accompagnée par la production d'enzymes hydrolytiques. A titre d'exemple, *Streptomyces coelicolor* produit des protéases extracellulaires lors de la croissance, et qui participe à l'assimilation de certaines protéines comme source d'azote (Kang et Lee, 1997).

La différenciation morphologique et physiologique, et le déclenchement de la production des métabolites secondaires résultent de l'action de différents éléments de régulations (Bibb, 2005).

Différentes substances de faible poids moléculaire sont impliquées dans la différenciation du mycélium aérien, comme la panamycine- 607 et le A-factor qui fait parti de la classe des γ -butyrolactones. Ces substances ont été isolées chez de nombreuses espèces de *Streptomyces* et d'autres actinobactéries. L'apport exogène de celles-ci stimule la formation du mycélium (Hashimoto *et al.*, 2003). Il a été aussi démontré que Ca^{2+} joue un rôle important dans la formation du mycélium. Cela a été observée chez *Streptomyces ambofaciens* qui forme le mycélium aérien abondant sur un milieu contenant le $Ca CO_3$, alors qu'il ne forme que le mycélium de substrat sur un milieu exempt d'une source des ions Ca^{2+} (Nastume *et al.*, 1989).

3-1 Taxonomie des actinobactéries :

Traditionnellement, la classification des actinomycètes reposait sur la détermination des caractères morphologiques, la forme des spores, leur disposition sur le mycélium aérien et de substrat, la présence de sporange, la mobilité des spores, et le mode de branchement des hyphes (Becker *et al.*, 1964). Par la suite, le développement des analyses des propriétés chimiotaxonomiques et des critères moléculaires, a démontré que la classification des taxons d'actinomycètes basée sur des critères purement morphologiques a limité l'établissement des relations phylogénétiques (Stackebrandt et Woese, 1981). L'identification des espèces basées sur la détermination des caractères morphologiques est difficile et très limitée. Elle a conduit à la description d'une très faible partie de la diversité bactérienne, notamment celle des actinobactéries. Par exemple, sur les 700 espèces de *Streptomyces* décrites, seulement 40 espèces ont pu être différenciées en fonction de la couleur du mycélium aérien, de la disposition et de la forme des spores, et de la production de la mélanine (Lacey, 1997)

L'ère moderne de la classification des genres de la classe des Actinobactéria tire ses origines de trois sources. Tout d'abord, l'établissement de la chimio- taxonomie qui repose sur la détection des différences chimiques dans la composition de la cellule. Par la suite la détermination des similarités entre les séquences de l'ARNr 16S, et finalement l'introduction des techniques d'hybridation ADN-ADN qui mesurent les similitudes entre des simples brins d'ADN d'espèces étroitement liées (Stackebrandt *et al.*, 1997).

La chimiotaxonomie est basée sur la détermination des caractères chimiques, tels que la présence des isoprenoides quinones, qui sont des constituants de la membrane cytoplasmique. Les plus communs sont les menaquinones et ubiquinones qui montrent des variations dans la longueur des chaînes et du degré d'insaturation, ces derniers jouent un rôle dans le transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative (Collins *et al.*, 1976).

D'autres caractères chimiques comme la présence des acides mycoliques, l'isomère de l'acide diaminopimelique DAP et des sucres dans la paroi, ont été utilisés pour classer les actinomycètes. Selon Lechevalier et Lechevalier (1970) 4 groupes ont été établis, possédant une paroi du type I à IV. Selon que le peptidoglycane contient : l'isomère L de l'acide diaminopimelique (L-DAP) et la glycine : le type I ; *méso* -DAP et la glycine : type II ; *meso* -DAP : type III ; ou *méso* -DAP galactose et l'arabinose : type IV (Chun *et al.*, 1995 ; Euverink, 1995). Les actinobactéries à paroi de type IV (chimiotype IV) comprennent deux familles selon la présence ou l'absence de l'acide mycolique (Ochi, 1995).

Ces caractères ont été utilisés pour classer les actinobactéries en plusieurs groupes chimiotaxonomiques. Toutefois, ces méthodes d'identification des actinobactéries ont montré leurs limites. Elles sont laborieuses, prennent un temps considérable, et dans la plupart des cas elles ne sont pas suffisantes pour identifier un isolat au niveau du genre (Cook et Meyers, 2003 ; Muramatsu, 2008). Ainsi, l'émergence des méthodes moléculaires fondées sur l'analyse phylogénétique des séquences d'ARNr 16S a révolutionné la taxonomie, et a abouti à des avancées considérables dans l'établissement des relations phylogénétiques entre les membres d'actinobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1983 ; Anderson et Wellington, 2001). Ces méthodes constituent des moyens rapides et précis pour l'identification (Cook et Meyers, 2003).

Les séquences nucléotidiques des gènes de l'ARNr 16S ont été établies pour la plupart des espèces d'actinobactéries ; ce qui a permis une meilleure identification des souches isolées (Muramatsu, 2008). Ces techniques ont abouti à restructurer la taxonomie des actinobactéries, et à distinguer ceux qui se sont révélés difficiles à classer par les méthodes basées sur les caractères phénotypiques (Chun et Goodfellow, 1995 ; Kim et Goodfellow, 1999). Les taxons décrits au préalable ont subi des changements fondamentaux. Par exemple, le genre *Thermoactinomyces* (Wacksman et Corck, 1953), de morphologie analogue à celle des actinobactéries filamenteux, s'est révélé phylogénétiquement différent, suite aux analyses des séquences d'ADNr 16S. Il a été transféré des actinobactéries à la famille des *Bacillaceae* (Stackebrandt et Woese, 1981 ; Yoon *et al.*, 2000). Le séquençage de l'ADNr 16S, a permis de regrouper les genres *Amycolata* et *Pseudonocardia* en un seul genre *Pseudonocardia* (Warwick *et al.*, 1994).

Le séquençage de l'ARNr 16S de l'espèce *Amycolatopsis rugosa* (Lechevalier *et al.*, 1986), a démontré que la classification de cette espèce dans le genre *Amycolatopsis* était incorrecte, et elle a été classée dans un nouveau genre *Prauserella* comme *Prauserella rugosa* (Kim et Goodfellow, 1999).

Quatre espèces du genre *Actinobispora* ont été transférées au genre *Pseudonocardia* suite aux séquençages des gènes codant pour l'ARNr 16S (Huang *et al.*, 2002).

Les techniques du séquençage des gènes codants pour l'ARNr 16S ont permis aussi la description de nouveaux genres et espèces des actinobactéries, et même de nouvelles familles (Cavaletti, 2006). Telles que les deux familles *Pseudonocardiaceae* et *Catenulisporaceae* (Embley *et al.*, 1988). Les espèces *Catenulispora acidiphila* (Busti *et al.*, 2006), *Streptomyces* sp (Forar *et al.*, 2008), *Saccharopolyspora flava*, *Saccharopolyspora thermophila* (Li *et al.*, 2001), ont été décrites comme nouvelles espèces sur la base des séquences de l'ADNr 16S.

3-2 Les actinobactéries thermophiles :

Les espèces d'actinobactéries thermophiles sont distribuées dans diverses niches écologiques, mais elles sont plus abondantes dans les compostes et dans les débris végétaux en décomposition (Unaogu *et al.*, 1994 ; Suihko *et al.*, 2006).

Les actinobactéries thermophiles, se développent à des températures entre 45°et 60°C. Des streptomycètes thermophiles se développent entre 25° et 55°C, avec un optimum de 50°C, ont été isolés à partir des échantillons de sol (Kim *et al.*, 1999). Grâce à des techniques moléculaires indépendantes de culture, il a été rapporté pour la première fois, la présence d'actinobactéries dans des sources thermales où la température excédent les 81°C, indiquant leur capacité à s'adapter à ce type d'environnements (Song *et al.*, 2009). Les actinobactéries thermophiles sont intéressants comme producteurs d'antibiotiques et d'enzymes en raison de leur croissance rapide et de l'autolyse rapide du mycélium (Xu *et al.*, 1998).

3-3 Les actinobactéries halophiles :

Les actinobactéries halophiles ont été découverts pour la première fois en 1970, par Gochnauer. Il a isolé un actinobactérie halophile, comme contaminant d'un milieu de culture contenant 25% de NaCl, qu'il nomma *Actinopolyspora halophila*. Celle-ci requière de fortes concentrations en sel et peut croître dans du NaCl à saturation. L'exigence en sel de l'espèce *Actinopolyspora halophila* est analogue aux exigences des bactéries et Archaea halophiles extrêmes tels que *Halococcus* et *Halobacterium*. Mais elle en diffère par sa sensibilité aux lysozymes, elle contient des phospholipides communs aux actinobactéries, et ne contient pas des liaisons éther phytanyl lipidiques caractéristiques des bactéries halophiles extrêmes (Gochnauer *et al.*, 1975).

Depuis, d'autres actinobactéries halophiles ont été isolés à partir de différents écosystèmes (Tang *et al.*, 2002). *Nocardiopsis kunsanensis*, *Nocardiopsis halophila* et *Nocardiopsis xinjiangensis* (Li, 2003a), *Prauserella halophila* et *Prauserella alba* (Li *et al.*, 2003b) ont été isolées de sols salins. D'autres genres d'actinobactéries halophiles ont été isolés des éponges marines tels que *Micromospora*, *Nocardia*, *Actinoalloteichus* (Zhang, 2006). Des espèces halophiles appartenant aux genres *Actinoplanes*, *Actinopolyspora* et *Spirillospora*, ont été isolées de lacs salins d'El-Goléa en Algérie (Hacène *et al.*, 2004).

3-4 Production des métabolites bioactifs par les actinobactéries :

3-4-1 Les métabolites secondaires :

Grâce à leur diversité métabolique importante, les actinobactéries produisent un nombre important de métabolites bioactifs qui déploient une extraordinaire diversité de structure, associée à un large spectre d'activités biologiques (Ismet *et al.*, 2004)..

Ces métabolites trouvent des applications comme anti-infectieux, anti-tumoraux, antifongiques et d'autres fonctions d'intérêt pharmaceutique (Bibb, 2005).

La découverte de nouvelles molécules des actinobactéries a marqué l'époque des recherches sur les antibiotiques (Lazarini *et al.*, 2000). La plupart des antibiotiques d'intérêt clinique sont des produits naturels ou des dérivés semi- synthétiques de produits issus des actinobactéries, (Baltz, 2007). Depuis la découverte de la streptomycine, un grand nombre d'antibiotiques, y compris les principaux agents thérapeutiques, tels que les aminoglycosides, les chloramphénicol, et les tétracyclines ont été isolés à partir du genre *Streptomyces* (Lazarini *et al.*, 2000).

Récemment, les recherches se sont focalisées sur des genres moins exploités qu'on appelle les actinobactéries rares, tels que : *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*. Ces actinobactéries représentent un potentiel intéressant pour la production de nouveaux composés plus diversifiés et plus exceptionnels, ayant des activités antibactériennes avec une moindre toxicité (Berdy, 2005).

L'importance de ces actinobactéries rares, est démontrée par le fait que la plupart des agents anti -infectieux disponibles sur le marché et utilisés avec succès en clinique, sont produits par ces actinobactéries rares. La rifamycine produite par *Amycolatopsis mediterranei* (August *et al.*, 1998), l'érythromycine par *Saccharopolyspora erythraea* , la vancomycine par *Amycolatopsis orientalis*, et la gentamicine par *Micromonospora purpurea*, en sont les exemples les plus pertinents (Lancini et Lorenzetti, 1993).

En plus des substances antibactériennes, les actinobactéries synthétisent les agents antifongiques appartenant à différentes classes, comme les macrolides polyéniques (Recio *et al.*, 2006). Les antitumoraux les plus importants utilisés en chimiothérapie sont des antibiotiques produits par les actinobactéries comme l'actinomycine D, la mitomycine, les anthracyclines (Demain et Lancini, 2006). D'autres métabolites secondaires ayant diverses activités sont issus des actinobactéries, à savoir les herbicides, les pesticides et les antiparasitaires (Oskay *et al.*, 2004).

3-4-2 Les enzymes :

Les actinobactéries isolés du sol sont doués d'activités importantes de biodégradation, et sont capables de métaboliser des molécules difficiles à dégrader en produisant une grande variété d'enzymes hydrolytiques (Sanglier *et al.*, 1993 ; McCarthy et Williams, 1993 ; Bormann *et al.*, 1999 ; Mitsuiki, 2002). De nombreuses molécules complexes sont hydrolysées par les membres d'actinobactéries telles que la ligno-cellulose, dégradée par les genres *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardiodes* (Abdulla et El-Shatoury, 2007). Des protéases sont aussi produites, comme les enzymes kératinolytiques de *Nocardiosis* sp. (Mitsuiki, 2002). Plusieurs espèces du genre *Streptomyces* ainsi que de nombreux autres genres produisent des chitinases qui ont connu des applications intéressantes (Watanabe *et al.*, 1999). La chitine étant un composant des parois des champignons, représente le substrat majeur pour les actinobactéries décomposant la chitine. Ces dernières présentent ainsi une action antifongique, et leur utilisation pour la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes est très répandue (Ames *et al.*, 1988 ;Gupta *et al.*, 1995). D'autres enzymes d'actinobactéries sont appliquées dans le domaine médical. Les hyaluronidases connues pour leur rôle dans l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sont utilisées pour faciliter la diffusion des médicaments et des anesthésiques. *Streptomyces hyalurolyticus* et *S. koganeiensis* sont les seules souches microbiennes utilisées dans la production des hyaluronidases (Azeredo *et al.*, 2001).

D'autres enzymes produites par les actinobactéries ont trouvées de multiples applications. Les xylanases sont utilisées en industrie alimentaire (Ball et Mc Carthy, 1989). L'activité cellulolytique est très répandue chez les actinobactéries mésophiles et thermophiles. Les cellulases des espèces appartenant à deux genre thermophiles *Microbispora bispora* et *Thermomonospora fusca* ont été bien étudiées (Wilson, 1992).

Les actinobactéries sont aussi une source d'extrêmzymes (enzymes extrêmophiles), comme les protéases alcalines et thermostables de l'espèce halotolérante *Streptomyces clavuligerus* (Thumar et Singh, 2007). Des cellulases thermostables avec un optimum d'activité à 50°C, et qui présentent une stabilité dans une large gamme de pH entre 6-10, sont produites par un actinobactérie alcalo-thermophile *Thermomonospora*. sp (George *et al.*, 2001). Des xylanases thermostables ont été isolées à partir d'actinobactéries thermophiles, particulièrement les genres *Saccharomonospora*, *Microbispora*, *Actinomadura* et *Streptomyces* (Holtz *et al.*, 1991). *Microbispora*. sp produit une chitinase thermophile et acidophile avec des optima de pH et température de 3et de 60°C respectivement (Nawani *et al.*, 2002) .

4 - Le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire :

4-1 Le métabolisme primaire :

Le métabolisme primaire implique une série de réactions anaboliques, cataboliques et amphiboliques interdépendantes catalysées par des enzymes. Il fournit à la cellule de l'énergie, et des intermédiaires biosynthétiques aboutissant à la conversion des monomères en macromolécules essentielles (Martin et Demain, 1980). Les métabolites primaires sont synthétisés durant la phase exponentielle, et leur synthèse est indispensable pour la croissance (Sergio et Demain, 2007)

Les principaux métabolites primaires microbiens d'intérêt industriel sont : les acides aminés (lysine, glutamate, thréonine, phénylalanine, tryptophane), les vitamines (riboflavine(B₂), cyanocobalamine (B₁₂), biotine), les acides nucléiques, les acides organiques (acétique, propionique, succinique, lactique), les polyols (glycérol, mannitol), les polysaccharides et les alcools (éthanol) (Demain, 2000).

4-2 Le métabolisme secondaire :

La distinction entre le métabolisme primaire et secondaire chez les microorganismes a été introduite par Bu'Lock en 1961(Haavik, 1979). La production des métabolites secondaires est limitée à certains groupes taxonomiques. Ces métabolites spéciaux, de structure originale, ne sont pas essentiels à la croissance des microorganismes producteurs. Leur rôle est encore mal connu mais des théories suggèrent que ces métabolites jouent probablement un rôle dans leur adaptation à certaines conditions de l'environnement (Demain, 1980).

Certains de ces métabolites seraient des signaux de communication entre le microorganisme producteur et les organismes du même écosystème tels que les plantes, les animaux ou encore d'autres microorganismes (Martin *et al.*, 2005). D'autres, ont une fonction antagoniste vis-à-vis des autres microorganismes compétiteurs (Stone et Williams, 1992), afin de favoriser l'accès aux nutriments pour le microorganisme producteur. De ce fait, la plupart des métabolites secondaires ont des activités antibactériennes ou d'autres activités inhibitrices (antifongiques, antitumorales) (Thangapandian, 2007)

Contrairement au métabolisme primaire, les voies du métabolisme secondaire ne sont pas encore élucidées. Les métabolites secondaires sont issus de voies métaboliques complexes et leur synthèse est influencée par les conditions de croissance, particulièrement par la composition du milieu en nutriments, le taux de croissance, l'induction ou l'inactivation enzymatique (Martin *et al.*, 2005; José, 2003). Ils sont synthétisés à partir des produits intermédiaires, ou finaux du métabolisme primaire (Aharonowitz et Demain, 1978 ; Euverink, 1995). En culture liquide, la synthèse est limitée à la phase stationnaire, mais en culture en surface elle coïncide avec la différenciation morphologique (Takano *et al.*, 2001).

4-2-1 Régulation du métabolisme secondaire :

Les facteurs du déclenchement de la synthèse des métabolites secondaires sont : un épuisement de nutriments dans le milieu, la biosynthèse ou l'addition d'inducteur, et /ou la réduction du taux de croissance. Les métabolites secondaires sont synthétisés via des mécanismes enzymatiques. Les enzymes fonctionnent soit autant qu'enzymes libres, ou bien sous forme de complexes multienzymatiques, réalisant une multitude de réactions ex. les polyketides synthases (Demain et Fang, 1995).

Des précurseurs stimulent la production des métabolites secondaires, par l'induction d'enzymes de synthèse (synthases). Parmi ceux-ci, les acides aminés, comme la lysine impliquée dans la synthèse de cephamicine ; ou d'autres molécules de faible poids moléculaire tels que N-acylhomosérine lactones des bactéries Gram négatif, et les oligopeptides des bactéries Gram positif (Demain, 1998). Les γ -butyrolactones des actinomycètes, comme le A-factor induit la différenciation morphologique, la production de pigment, et la synthèse de la streptomycine chez *Streptomyces griseus* et d'autres membres des actinobactéries (Makoto et al., 2003). Un autre type de γ -butyrolactones, appelé SCB1 régule la production d'antibiotique chez *Streptomyces coelicolor*. Les virginiae butanolides, qui sont impliqués dans la régulation de la production virginiamycin chez *Streptomyces virginiae* (Takano et al., 2001).

La source de carbone, d'azote, et de phosphate jouent un rôle important dans la régulation de la production des métabolites secondaires.

Le glucose étant une excellente source de carbone pour la croissance, peut interférer dans la formation de certains métabolites secondaires. Les polysaccharides (ex. amidon), les oligosaccharides (ex. lactose) et les lipides (ex. l'huile de soja) sont préférables pour la production des métabolites secondaires lors des fermentations industrielles.

Il en est de même pour certaines sources d'azote favorables pour la croissance comme les sels d'ammonium, et qui influent négativement sur la production des métabolites secondaires. Par conséquent, les protéines ainsi que certains acides aminés (ex. proline) sont ajoutés aux milieux de fermentations comme sources d'azote.

La régulation de la production des métabolites secondaires dépend largement de la source de phosphate. Le phosphate affecte le rôle de certaines enzymes de phosphorylation (kinases), ou de déphosphorylation (phosphatases) intervenant dans les voies de production de certains métabolites secondaires comme les aminoglycosides (Demain et Fang, 1995).

Les métabolites secondaires sont d'une extrême importance, vu leurs effets biologiques divers. Ils comprennent les antibiotiques, les pigments, les toxines, les pesticides, et les anti-tumoraux, ils constituent la moitié des produits pharmaceutiques commercialisés (Demain et Sanchez, 2009).

Les antibiotiques sont les plus connus de tous les métabolites secondaires. Ils représentent l'une des plus grandes découvertes en médecine. Depuis la découverte de la pénicilline par Fleming, et l'utilisation intense de cet antibiotique en thérapie, commence une nouvelle ère en médecine qualifiée de « l'âge d'or » des antibiotiques. Ainsi les investigations sur les produits naturels se sont intensifiées (Cragg *et al.*, 1999).

4-2-2-les antibiotique :

4-2-2-1 Historique et généralité sur les antibiotiques :

En 1928, a commencé l'époque de la l'utilisation des médicaments produits à partir des molécules d'origine microbienne, suite à la découverte de Fleming. Ce dernier a remarqué qu'une culture sur boîte de Petrie de *Staphylococcus aureus*, a été inhibée par une substance secrétée par un champignon : *Penicillium notatum*. Le produit fut nommé la pénicilline. Ce produit a été ensuite utilisé comme agent antibactérien durant la deuxième guerre mondiale (Demain et Zhang, 2005). Le succès de l'utilisation de la pénicilline a incité de nombreux chercheurs à la découverte de nouveaux antibiotiques. Le microbiologiste Selman Waksman était l'un des plus éminents dans ce domaine. Entre 1939 et 1945, Waksman et ses collaborateurs ont testé des centaines de microorganismes isolés à partir du sol, pour leur potentiel à produire des substances antibactériennes. A partir de ce travail, il a été conclu que les bactéries sporulées du sol, et notamment le genre d'actinobactérie *Streptomyces* sont une source très riche d'antibiotiques. Waksman a par la suite isolé et caractérisé de nombreux antibiotiques importants, tels que streptomycine, la néomycine et l'actinomycine. La streptomycine introduite pour la première fois en 1944, a été largement utilisé pour le traitement de la tuberculose, et d'autres infections causées par les bactéries résistantes à la pénicilline (Rosenberg, 2006). Depuis, un grand nombre d'antibiotiques d'origine microbienne a été découvert, particulièrement à partir des membres des actinomycètes et des champignons.

Les antibiotiques sont des substances de faible poids moléculaire, de structure chimique très variable, et qui inhibent à faible concentration la croissance de différents microorganismes. La caractéristique principale des antibiotiques est la sélectivité du mécanisme de l'action antimicrobienne, ce qui les différencie des autres désinfectants, et germicides (Demain et Lancini, 2006). En chimiothérapie anti-infectieuse, les antibiotiques utilisés doivent répondre à certains critères : (1) l'antibiotique doit posséder une toxicité sélective pour les microorganismes sans altérer les cellules ou les fonctions métaboliques de l'hôte, (2) il doit pénétrer dans tous les tissus et les cellules, (3) son activité ne doit pas être altérée en présence d'autres médicaments (Bergogne, 1999).

Les antibiotiques sont classés en familles. Une famille renferme les substances de structure chimique similaire, et qui montrent le même mécanisme d'action. Les enzymes, telles que les

lysozymes, et d'autres protéines complexes ayant une activité antimicrobienne ne font pas partie des antibiotiques. Seulement les produits naturels d'origine microbienne sont considérés comme antibiotiques (Lancini *et al.*, 1995).

En pratique, les substances obtenues par modification chimique peuvent être incluses dans cette catégorie, sous le nom d'antibiotiques semi-synthétiques (Lancini, 1993). Les antibiotiques ont pour cet effet deux sources : les produits naturels ou des composés synthétiques.

Les antibiotiques d'origine naturelle incluent les β -lactamines (pénicilline), les céphalosporines (une deuxième classe des β -lactamines). Les carbapenems tel que l'imipenème (une troisième classe des β -lactamines découverte vers les années 1970). Les phényles propanoïdes (chloramphénicol), les polyketides (tétracycline), les aminoglycosides (streptomycine, gentamycine), les macrolides (érythromycine), les glycopeptides (vancomycine), et les streptogramines (quinpristin) (Singh et Barrett, 2006).

Avant les années 1980, les antibiotiques d'origine naturelle produits par les microorganismes étaient les plus utilisés pour le traitement des maladies infectieuses. Malgré cela, la production d'antibiotiques avec de nouvelles structures était nécessaire pour plusieurs raisons :1) le développement des résistances bactériennes, 2) l'évolution de nouvelles maladies infectieuses 3) la toxicité de certains antibiotiques. Des techniques de synthèse et de semi synthèse ont été élaborées pour l'amélioration des antibiotiques. Les classes d'antibiotiques synthétiques ayant connu un grand succès sont représentées par les sulfamides, et les quinolones parmi lesquels figure l'acide nalidixique (Demain, 2006).

4-2-2-2 Mécanisme d'action :

Les mécanismes d'action des antibiotiques sont divers. L'inhibition de la croissance des microorganismes sensibles se fait par l'altération d'une molécule essentielle à la multiplication cellulaire telle qu'une enzyme ou l'acide nucléique, en se fixant sur un site spécifique de la molécule cible formant un complexe inactif (Lancini, 1995). La plupart des antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi bactérienne, ou la synthèse des protéines. D'autres tels que les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN et les sulfonamides (sulfamide) inhibent les métabolites intervenant dans la synthèse de l'ADN (Singh et Barrett, 2006). Certains antibiotiques agissent comme des inhibiteurs compétitifs, ils sont de structures similaires aux métabolites cellulaires comme les acides aminés ou les cofacteurs, et se fixent sur les enzymes spécifiques à ces métabolites, aboutissant à l'inactivation de ces enzymes (Lancini, 1995).

Les antibiotiques sont aussi utilisés en chimiothérapie comme agent anti tumoraux, ces derniers agissent tous sur la réplication de l'ADN. Ils sont produits principalement par les actinobactéries tels que l'actinomycine D, la mitomycine, la bleomycine et l'anthracycline (Demain, 2006).

4-2-2-3 Microorganismes producteurs :

Bien que la production des antibiotiques soit un phénomène répandue dans la nature, celui-ci ne constitue pas une activité commune chez tous les groupes taxonomiques des microorganismes, quelques genres seulement sont de potentiels producteurs. Le groupe taxonomique le plus prolifique est représenté par les actinomycètes, ils produisent près de 8700 antibiotiques, dont approximativement 6500 dérivent du genre *Streptomyces*, et 2200 par ce qu'on appelle les actinomycètes rares. En revanche les bactéries unicellulaires tels que les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* ne produisent que 1200 antibiotiques (Berdy, 2005).

Comment les microorganismes producteurs se préservent-ils de l'action de leurs antibiotiques ?

Les microorganismes producteurs doivent être résistants aux antibiotiques qu'ils produisent, à cet effet les espèces productrices, possèdent différents mécanismes pour se préserver l'action létale de leurs propres antibiotiques. Ces mécanismes sont : (a) la détoxification de l'antibiotique par des processus enzymatiques (b) l'altération de la cible de l'antibiotique dans la cellule productrice (c) la modification de la perméabilité de la paroi, associée à des mécanismes d'efflux afin de permettre l'excrétion de l'antibiotique vers l'extérieur et empêcher le retour dans la cellule. Ces mécanismes sont inductibles mais dans certains cas ils peuvent être constitutifs (Demain et Fang, 1995 ; Martin *et al.*, 2005)

4-2-2-4 Résistances bactériennes aux antibiotiques :

Les bactéries ont développé plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques, ces derniers sont devenus inefficaces pour le traitement des maladies infectieuses. Parmi les mécanismes de résistance, sont cités : (1) l'efflux des antibiotiques de la cellule à travers des canaux intégrés à la membrane ; (2) la modification de la cible de l'antibiotique (ex. mutation du site de fixation de l'antibiotique tel que l'ARN ribosomale) ; (3) la synthèse d'enzymes inactivant l'action de l'antibiotique (Wright, 2005).

La recrudescence des résistances bactériennes aux antibiotiques est devenue un véritable conflit pour le traitement des maladies infectieuses, incitant à la recherche de nouveaux antibiotiques plus performants.

Des stratégies ont été suivies pour atténuer ce phénomène. Parmi lesquelles, l'association des antibiotiques à des agents inhibiteurs des enzymes qui confèrent la résistance, en convertissant les souches résistantes en souches non résistantes. Cette stratégie s'est révélée très efficace, et a été considérablement utilisée. Les β -lactamines ont été associées aux inhibiteurs des β -lactamases (enzymes qui affectent l'action des β -lactamines), tels que l'acide clavulanique, sulbactam, et tazobactam. Les exemples les plus connus sont l'association de l'acide clavulanique à l'amoxicilline (Augmentin®), ou à la ticarcilline (timentin), qui sont des antibiotiques très efficaces pour le traitement de nombreuses infections (Brown, 1986).

5- Enzymes et biocatalyse enzymatique :

Les enzymes sont de remarquables biocatalyseurs du métabolisme cellulaire, et ont la capacité d'agir sur une multitude de molécules complexes (Schmid *et al.*, 2001). Elles sont indispensables pour catalyser les réactions biochimiques nécessaires à la synthèse, à la dégradation ou à la modification des molécules organiques essentielles des cellules vivantes, et requises pour leur différenciation, et leur reproduction. Les enzymes sont aussi produites par les microorganismes dans le milieu extérieur pour leur protection (Held *et al.*, 2000).

Une question a été longtemps soulevée à l'effet de savoir si les enzymes avaient l'aptitude à fonctionner en dehors de leur milieu naturel. En effet il a été prouvé que cela était possible, et leurs applications ont été réalisées dans différents domaines de biocatalyse (Buchholz *et al.*, 2005). La production des composés chimiques par l'utilisation des enzymes d'origine microbienne, occupe actuellement une place importante parmi les innovations biotechnologiques (Jaeger, 2004).

Ainsi, les enzymes ont été introduites d'une manière importante dans des secteurs industriels d'importance capitale dans la société, comme la production de détergents, les textiles, et les produits alimentaires. Mais aussi, la production d'intermédiaires pharmaceutiques et de médicaments (figure 2) (Zaks, 2001). Des domaines où la sélectivité des réactions de catalyse sur des molécules complexes est un point crucial (Schmid *et al.*, 2001).

Les microorganismes constituent une source riche d'enzymes, avec des propriétés catalytiques exceptionnelles (Nidetzky et Schwab, 2007). La majorité des enzymes actuellement commercialisées dérivent de bactéries ou des champignons isolés à partir de différentes niches écologiques (Schafer et Borchert, 2004).

Les enzymes d'origine microbienne ont connu des applications depuis des décennies notamment pour la fabrication des fromages, les boissons, le vinaigre etc. Ces processus reposaient essentiellement sur les activités des microorganismes, tout en ignorant l'existence d'enzymes. Le développement des fermentations industrielles, où les souches productrices sont spécifiquement sélectionnées, a permis la production à grande échelle d'enzymes pures, et bien caractérisées (Kirk *et al.*, 2002).

Les enzymes microbiennes sont plus exploitées que les enzymes issus de plantes ou d'animaux. La grande variété de réactions catalysées par les enzymes microbiennes avec une plus grande productivité, et la croissance rapide des microorganismes sur des milieux moins onéreux, en sont les raisons principales. D'autre part, elles sont plus facilement manipulées génétiquement et plus stables que les enzymes végétales ou animales (Hasan *et al.*, 2005).

Tableau II : Les enzymes bactériennes et leurs domaines d’application.

	Amidon	Détergents	Produits alimentaires	Textiles	Chimie fine	Boissons	papier
Amylases	+++++	++	++	–	–	–	–
Protéases	–	+++++	++	+	–	+	–
Lipase	–	++	+	–	++++	–	–
Estérase	–	++	+	+++	–	–	+
Cellulase	–	++	+	+++	–	–	+
Glucanase	–	+	–	–	–	+++	–
Xylanases	–	–	+	–	–	++	++

Tableau III : Les caractéristiques essentielles des enzymes appliquées dans la biocatalyse industrielle.

Activité enzymatique

- ✓ **Activité spécifique**

Stabilité durant :

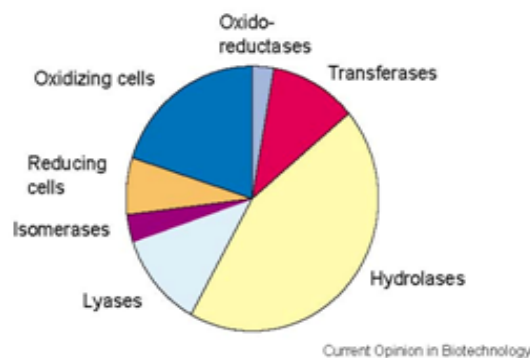
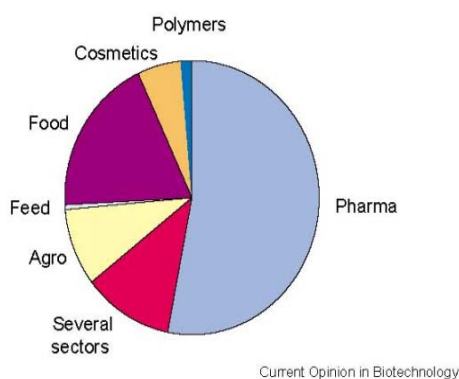
- ✓ **Stockage**
- ✓ **Immobilisation pour de multiples utilisations**
- ✓ **Large gamme de pH pour l’activité et la stabilité.**

Allergénicité

- ✓ **Non toxique pour l’homme et l’environnement**
- ✓ **Non allergénique**

Productivité

- ✓ **Haute productivité et expression dans une bactérie hôte**
- ✓ **Sécrétion en taux élevé pour une purification facile**



a)

b)

Figure 1 :a) secteurs industriels impliquant les produits issus des biotransformation enzymatiques b) les types d’enzymes utilisées en industrie (Strathoff *et al.*, 2002).

L'utilisation des enzymes en biocatalyse s'avère plus avantageuse que les processus chimiques pour plusieurs raisons parmi lesquelles :

1- la biodégradabilité des enzymes.

2- les enzymes catalysent les réactions avec une haute sélectivité (stéréo-sélectivité, et régio-sélectivité) favorisant la synthèse de produits purs avec minimisation de la formation de sous produits.

3- Les enzymes s'adaptent avec les conditions environnementales de température, de pH et pression (Johannes et Zhao, 2006; Schafer et Borchert, 2004).

4- les enzymes peuvent être immobilisées et réutilisées pendant plusieurs cycles, et peuvent être surproduites afin d'améliorer l'aspect économique des processus biocatalytiques (Patel, 2002).

5- L'utilisation des enzymes contribue à la réduction des risques de pollution par rapport aux catalyses chimiques, particulièrement ceux des métaux toxiques (Bull *et al.*, 1999).

6- Les biocatalyseurs sont utilisés dans les milieux organiques comme dans les milieux aqueux. De ce fait les composés apolaires ainsi que les composés hydrosolubles peuvent être modifiés de façon sélective et efficace par les enzymes (Schmid *et al.*, 2001).

L'importance de ces propriétés a contribué à promouvoir l'utilisation des enzymes dans différentes branches de l'industrie, en offrant les avantages suivants :

- ◆ Le développement de nouvelles applications et de nouveaux procédés.
- ◆ L'amélioration de la compétitivité des procédés de fabrication existant, par la réduction du coût de production.
- ◆ L'amélioration de la qualité de production et la réduction de la quantité des produits secondaires.
- ◆ La réduction des dépenses liées à l'élimination des déchets.
- ◆ Fournir des substances qui sont difficiles, voire impossibles à produire en utilisant uniquement des procédés chimiques.

Les hydrolases (protéases, amylases, ou lipases) grâce à leurs haute stéréosélectivité, représentent la classe d'enzymes les plus performantes pour les transformations biocatalytiques. (Figure 2.b) (Straathof *et al.*, 2002). Celles-ci ne requièrent pas cofacteurs, et sont sans exigences particulières, ce qui permet leurs applications dans des conditions très diverses et non complexes pour la dégradation d'une multitude de produits naturels (Quaks, 2006 ; Kirk *et al.*, 2002). De plus la plupart d'entre elles ont l'aptitude à fonctionner en présence de solvants organiques (Wubbolts et Witholt, 1999), où elles catalysent les réactions de synthèse (Held *et al.*, 2000).

Les hydrolases sont appliquées pour la production de molécules énantiopures, qui sont d'une importance primordiale dans la synthèse des produits pharmaceutiques, agrochimiques et cosmétiques (Schulze et Wubbolts, 1999 ; Jaeger et Eggert, 2004). Dans ces domaines il est important de séparer les énantiomères d'un mélange racémique pour la production des produits énantiomériquement purs (Yasufuku et Ueji, 1997). Il est admis qu'un seul énantiomère d'une molécule chirale possède l'activité biologique désirée, alors que l'autre pourrait n'avoir aucune activité ou bien une activité antagoniste (Belien et Li, 2002). Par exemple, le naproxène est un anti-inflammatoire non-stéroïdien dont l'énantiomère (S) est 28 fois plus actif que l'énantiomère (R) (Fickers *et al.*, 2008).

5-1 Classification des enzymes :

Les enzymes sont classées selon une nomenclature établie par la commission des enzymes, en leur attribuant un nombre à 4 chiffre appelé le chiffre EC (Enzyme Commission number). Les enzymes sont groupées en six classes majeures. Le premier chiffre du nombre EC correspond à l'une des six classes suivantes (1) les oxydoréductases ; (2) les transférases ; (3) les hydrolases ; (4) les lyases ; (5) les isoméras et (6) les ligases. Ces classes sont elles même subdivisées en sous classes et en sous-sous classes. Les autres chiffres du nombre EC sont attribués pour faire référence à plus de détails sur les réactions spécifiques qu'elles peuvent catalyser (Pantaleone, 1999).

5-2 Sélectivité enzymatique :

La sélectivité enzymatique peut intervenir à quatre niveaux :

- La sélectivité de substrat : c'est la capacité d'une enzyme à distinguer et à agir sur un composé distinct parmi un groupe étendu de composés chimiques.
- La stéréosélectivité : c'est la capacité d'agir sélectivement sur un énantiomère ou diastéréoisomère.
- La régiosélectivité : c'est la capacité d'agir sélectivement avec un site précis de la molécule parmi plusieurs sites possibles.
- La chimiosélectivité : c'est la capacité d'agir sur un groupement fonctionnel parmi plusieurs autres sur la même molécule (Rozzel, 1999).

5-3 Stabilité des biocatalyseurs :

Le terme “stabilité des protéines” se réfère à la préservation de la structure primaire et tridimensionnelle de la dénaturation et de la dégradation dans des conditions extrêmes (Jaenicke, 1999). Le screening des biocatalyseurs stables est d’une grande importance pour la recherche dans le domaine de biocatalyse. Ce qui permet de répondre aux exigences requises pour leurs applications (Illanes, 1999).

Le succès des processus biocatalytiques industriels repose sur l’exploitation des enzymes qui doivent répondre à certains critères suivants :

- ◆ Les enzymes doivent être fonctionnels sur des substrats non naturels (synthétiques)
- ◆ Elles doivent fonctionner dans des conditions où les enzymes sont habituellement instables ou inactives, telles que les conditions extrêmes de températures, de pH, et de pression.
- ◆ Après utilisation prolongée ou répétée de l’enzyme, et en présence de solvants organiques qui facilite la solubilisation des substrats ou l’extraction du produit (Dalby, 2007).

Malgré les nombreux avantages que présentent les enzymes, leur instabilité vis-à-vis des conditions dans lesquels se déroulent les processus industriels, entrave leurs applications dans ce domaine (Polizzi *et al.*, 2007). La grande majorité de celles ci sont cependant fragiles et peu résistantes dans les conditions d’usage industriel, d’où la recherche d’enzymes de substitution plus robustes (température, pH et pression).

L’exploitation de la biodiversité microbienne, reste l’alternative la plus prometteuse pour faire face aux problèmes liés à l’instabilité des enzymes dans des conditions hostiles des processus industriels. Cette biodiversité offre une opportunité intéressante grâce aux extrémophiles (Illanes, 1999). Ces microorganismes qui vivent et se développent dans des conditions extrêmes similaires aux conditions hostiles des processus industriels, sont alors appropriés pour la production d’enzymes hautement stables, qu’on appelle les “extrêmozymes ” (Quax, 2006).

Les extrémophiles font l’objet d’intenses recherches à présent, pour établir les perspectives de l’exploitation des extrêmozymes pour de potentielles applications industrielles, par une lucrative substitution des catalyseurs existants, ou bien comme catalyseurs pour de nouvelles opportunités. L’accélération de la découverte des extrêmozymes suite au développement des stratégies de screening, a favorisé le progrès de nouvelles transformations biocatalytiques, ainsi qu’à la conception de processus plus économiques et plus efficaces (Fessner et Jones, 2001).

6- Les enzymes des extrêmophiles (extrêmozymes) :

La majorité des enzymes utilisées en biotechnologie sont issus de bactéries ou de champignons non- extrêmophiles. Des changements dans les propriétés de ces enzymes afin d'améliorer leur thermostabilité par exemple, sont effectués par l'ingénierie des protéines. En outre des enzymes aux propriétés particulières existent chez les microorganismes des environnements extrêmes (Wejse *et al.*, 2003).

Les protéines des extrêmophiles ont évolué de manière à rester stables et fonctionnelles dans des conditions hostiles (Kelch *et al.*, 2007). Les extrêmozymes qui fonctionnent sous des conditions extrêmes de température, de salinité, de pression et de pH. Elles nécessitent autant que leurs organismes producteurs, des conditions spécifiques à leurs activités et à leurs stabilités, et elles sont bien adaptées aux conditions physico-chimiques extrêmes (Ferrer, 2007). Ces extrêmozymes montrent une stabilité élevée dans ces conditions, et catalysent les réactions avec une vitesse supérieure comparée à leurs homologues mésophiles (Evans *et al.*, 1998). Ces enzymes isolées à partir des extrêmophiles ont des propriétés particulières. Elles sont extrêmement thermostables et résistants aux agents dénaturants chimiques, tels que les détergents, les agents chaotropiques, les solvants organiques, et elles sont résistantes aux valeurs extrêmes de pH (Niehaus *et al.*, 1999).

Les extrêmozymes ainsi que les extrêmophiles qui les produisent, ont un potentiel économique important, tant par leur application direct dans la biocatalyse dans des conditions extrêmes, que pour leurs utilisation comme modèle pour la modification des enzymes non extrêmophiles afin d'améliorer leurs propriétés et leur stabilité dans les conditions hostiles (Tehei, 2005).

Deux stratégies potentielles sont utilisées pour la production des extrêmozymes (1) L'optimisation de la production du biocatalyseurs par l'augmentation de la production de la biomasse du microorganisme extrêmophile (2) le clonage du gène codant pour le biocatalyseur et son expression dans une cellule hôte (Van den Burg, 2003).

6-1 Les enzymes halophiles (halozymes) :

6-1-1 Adaptation des protéines halophiles à l'hypersalinité :

Les enzymes halophiles sont définies selon deux critères : (1) soit en fonction de nature halophile de l'organisme producteur (2) soit en fonction de leurs propres exigences en sel pour leur activité, stabilité, et solubilité (Marden *et al.*, 1999).

Les sels ont la capacité de changer la tension de surface entre l'eau et la protéine, affectant ainsi leurs conformations, et à de fortes concentrations, ils provoquent la précipitation de la protéine (Danson et Hough, 1997).

Les enzymes halophiles ne semblent pas connaître ce stress, mais au contraire elles exigent de fortes concentrations en sel allant de 1 à 4M pour leurs activités et stabilité. Cette propriété est importante, car l'environnement intracellulaire des microorganismes halophiles est isotonique avec le milieu où ils se développent (Hough et Danson, 1999). En outre, les halozymes sont instables et se dénaturent dans des milieux à faible teneur en sel (Mevarech, 2000).

Pour faire face au stress osmotique provoqué par l'abaissement de l'activité de l'eau (a_w), comme c'est le cas dans des solutions hypersalées, tous les composés de la cellule tendent à maintenir leur hydratation pour contrecarrer les concentrations internes et externes élevées en électrolytes (Jaenicke, 1999). Les protéines halophiles se sont adaptées à la vie dans un environnement hyper salé en développant des stratégies afin de supporter de fortes concentrations en ions.

Tout d'abord, les protéines halophiles concentrent le sel près de la surface caractérisée par une abondance d'acides aminés acides (Lanyini, 1974 ; Mevarech, 2000), ceci leur confère une charge négative (Dominy, 2002). Le rôle de cette charge négative est d'interagir avec les cations, favorisant la capture des molécules d'eau à la surface, éventuellement sous forme d'ions de sel hydratés (Danson et Hough, 1998). Cette stratégie est importante pour conserver une couche d'hydratation, et éviter l'agrégation à de forte teneur en sel (Hough et Danson, 1999). La présence de sel aura pour conséquence (i) de stabiliser la protéine en réduisant les forces de répulsions entre les charges négatives (ii) d'augmenter l'hydratation de la protéine (Zaccai *et al.*, 1989).

Le maintien de la flexibilité et de la stabilité des protéines halophiles en présence de forte concentration en sel, est également accompli par la diminution de l'hydrophobicité de la surface (Jaenicke, 1991). A cet égard, dans les protéines halophiles, les acides aminés non polaires sont déplacés vers l'intérieur de la protéine, et les acides aminés chargés et polaires (hydrophiles, tel que le glutamate qui a parmi tous les acides aminés, la plus grande capacité de se lier à l'eau) tendent à couvrir la surface des protéines. Grâce à ce mécanisme, il résulte la formation d'une couche d'hydratation nécessaire au repliement des protéines, leur permettant d'accomplir leurs fonctions (Litchfield, 1998 ; Madigan et Oren, 1999 ; Jaenicke, 2000).

6-1-2 Importance biotechnologique des enzymes halophiles (halozymes) :

Les milieux aqueux sont les milieux usuels pour la biocatalyse (Sellek et Chaudhuri, 1999). Malgré cela, l'eau demeure un solvant marginal pour la plupart des applications en industrie. La raison principal est la faible solubilité des composés organiques généralement hydrophobes, et qui sont parfois instables dans des solutions aqueuses. Ces limitations ont incité les chercheurs à développer des procédures enzymatiques en milieux organiques (Ghanem, 2007).

Les milieux organiques ou non aqueux, représentent un environnement extrême d'un intérêt grandissant en biotechnologie. Quoique ces milieux soient élaborés par l'homme, ils existent dans la nature et abritent des extrémophiles adaptés à vivre à de faible activité de l'eau, ces organismes qualifiés d'halophiles (Dordick *et al.*, 1998).

En effet, les stratégies adoptées par ces organismes et par leurs protéines pour maintenir leur stabilité et contrecarrer les effets délétères due à la diminution de l'activité de l'eau provoquée par l'excès de sel, comme discuté précédemment, leur confèrent une adaptabilité dans les solvants organiques par les mêmes principes (Dordick *et al.*, 1998). De là, les enzymes halophiles sont d'excellents candidats pour les biotransformations en milieux organiques ou biphasiques (Marhuend-Egea et Bonete, 2001).

L'utilisation des enzymes en milieux organiques est l'une des approches les plus captivantes des recherches récentes en enzymologie, et a connu de nombreuses applications (Gupta, 1991 ; Gupta et Roy, 2004). Les principaux avantages liés à la biocatalyse en milieux organiques sont :

- ✓ Une augmentation de la vitesse des réactions consécutives à une plus grande solubilité des substrats non polaires.
- ✓ Le risque de contamination microbienne est réduit en raison de la diminution de l'activité de l'eau.
- ✓ Une augmentation de la thermostabilité des enzymes dans les milieux non polaires (Sellek et Chaudhuri, 1999).
- ✓ Facilité du contrôle de la spécificité vis-à-vis du substrat
- ✓ La réutilisation et la récupération de l'enzyme ne nécessite pas l'immobilisation (Gupta, 1991).
- ✓ Une récupération facilitée du substrat par simple évaporation du solvant (Sheldon, 1996).

6-2 Les enzymes thermophiles (thermozymes) :

De toutes les extrêmzymes, les enzymes thermophiles sont ceux qui ont suscité le plus d'attention (Gomes et Steiner, 2004). Ces enzymes ont des propriétés structurales et fonctionnelles uniques. Alors que les enzymes mésophiles se dénaturent à des températures supérieures à 60°C (Postec, 20005), les thermozymes sont extrêmement thermostables et thermoactives de façon optimale à des températures supérieures aux températures optimales de croissance des microorganismes producteurs (Bora et Kalita, 2007). Certaines enzymes découvertes sont actives à des températures supérieures à 110°C (Epting, 2005), tel que l' α -amylase de *Pyrococcus woesei* active jusqu'à 130°C (Koch *et al.*, 1991).

Les enzymes thermophiles ont tendance à remplacer les enzymes mésophiles dans plusieurs procédés biotechnologiques, notamment après le succès de l'enzyme *Taq* polymérase, isolée de *Thermus aquaticus* (Brock et Freeze, 1969), et utilisée dans les techniques de PCR pour l'amplification de l'ADN (Shandilya *et al.*, 2004).

A l'exception de certaines différences phylogénétiques, les thermozymes sont similaires aux mésozymes, et ne présentent pas de différences notables : (1) Les séquences en acides aminés sont similaires de 40 à 85% à celle des mésozymes, (2) les structures tridimensionnelles sont superposables, (3) Elles présentent les mêmes mécanismes catalytiques (Vielle et Zeikus, 1996). De plus, les facteurs qui contribuent à la stabilité et à la fonctionnalité des protéines thermophiles et hyperthermophiles et ceux des protéines mésophiles sont similaires (Kumar et Nussinov, 2001). L'unique différence entre ces deux types d'enzymes se résume à la gamme de température d'activité et de stabilité (Vielle, 2001_a).

Cela dit quelques changements mineurs dans la structure et dans la séquence des protéines thermophiles sont à l'origine de cette thermostabilité (Adam et Kelly, 1998). Ces variations incluent : des interactions intramoléculaires supplémentaires, une meilleure conformation (la rigidité, compacité, stabilité de l'hélice) (Chakravarty et Varadarajana, 2000). Mais il n'existe aucun mécanisme universel adopté pour la stabilité de toutes les protéines thermophiles. Les mécanismes moléculaires sur lesquelles est basée la thermostabilité varient entre les enzymes spécifiques (Li *et al.*, 2001).

Les thermozymes clonées et exprimées dans des cellules hôtes mésophiles, conservent leurs propriétés thermophiles, indiquant que ces propriétés sont codées génétiquement (Vielle, 2001_a).

Les thermozymes ont été utilisées dans de nombreuses investigations afin de déterminer les facteurs qui régissent la stabilité de leurs conformations. Dans la plupart de ces travaux les enzymes stables issues des thermophiles sont comparées à leurs homologues mésophiles.

6-2-1 Facteurs contribuant à la thermostabilité des thermozymes :

6-2-1-1-Rôle des substitutions des acides aminés dans la thermostabilité :

L'impact des substitutions des acides aminés sur la thermostabilité des protéines a fait l'objet de nombreuses investigations. Ces substitutions contribuent à l'amélioration de la thermostabilité en améliorant le repliement et la rigidité des protéines (Field ,2001).

La comparaison des séquences d'acides aminés des enzymes mésophiles et thermophiles révèle des substitutions du genre Gly → Ala, Lys → Arg. Une teneur élevée en alanine dans les protéines thermophiles est supposée refléter le fait que 'Ala' est le meilleur acide aminé qui participe au maintien de la conformation de l'édifice protéique (Vielle et Zeikus, 2001). Certains acides aminés thermolabiles (Cys, Asn, Gln), en raison de leurs tendance à être

oxyder à une température élevée, sont potentiellement exclus des séquences (Russell et Taylor, 1995).

D'autres modifications dans les structures primaires des acides aminés des protéines thermophiles sont observées :

- ◆ Une réduction des acides aminés polaires non chargé (His, Ser, Thr, Gln) et une augmentation des résidus non-polaires qui participent aux interactions hydrophobes.
- ◆ Une augmentation des acides aminés chargés (Glu, Arg) impliqués dans les liaisons ioniques en surface de la protéine (Fields, 2001).
- ◆ Dans certaines enzymes thermophiles le nombre des résidus asparagine et de glutamine est réduit. Chez d'autres, ces deux acides aminés sont localisés dans des endroits où ils ne sont pas susceptibles à la désamination. Il en résulte une résistance aux problèmes de désamination de l'asparagine et de la glutamine qui survient à des températures élevées.

6-2-1- 2 Rôle des interactions intermoléculaires dans la thermostabilité :

Une augmentation des interactions intramoléculaires, établies entre les acides aminés, joue un rôle important dans la thermostabilité (Vielle, 2001b). Parmi ces interactions figurent :

◆ Les liaisons disulfures :

Les ponts disulfures sont connus pour leur rôle dans la stabilisation des protéines. La présence des résidus de Cys en proportions élevées dans les protéines stables et actives à des températures supérieures à 100°, confirme le rôle de la Cys dans la thermo-stabilisation par l'établissement de ponts disulfure. La Cys étant susceptible à l'oxydation à des températures élevées, afin de lever ce compromis, les résidus Cys impliqués dans les ponts disulfures sont localisés dans des endroits de la protéine inaccessibles aux solvants (Porcelli, 2009).

◆ Les liaisons hydrogènes :

De nombreuses études stipulent qu'il y'a une corrélation entre liaisons hydrogènes et la thermo-stabilisation, en raison du nombre des liaisons H qui est de loin plus élevés dans les protéines thermophiles que dans les protéines mésophiles (Argos, 1997).

◆ Les interactions électrostatiques :

Les interactions électrostatiques entre les paires d'ions sont encore connues sous le nom de liaisons ioniques ou salines. L'augmentation du nombre de ces interactions établies entre les résidus chargés à la surface des protéines thermophiles contribue largement à la thermostabilité (Alsop, 2003 ; Li *et al.*, 2005 ; Matsui, 2007).

◆ **Les liaisons hydrophobes :**

Les interactions hydrophobes représentent un mécanisme important de thermo-stabilisation chez les protéines thermophiles (Szlanyi et Zavodszky, 2000).

◆ **La liaison aux métaux :**

Certaines enzymes thermophiles contiennent dans leurs structures ou au niveau du site actif, un atome de métal tels que le Zn, Mg, Mn, contrairement à leurs homologues mésophiles. Ceci est confirmé par plusieurs exemples, parmi lesquelles l'enzyme xylose isomérase thermophiles dont la thermostabilité dépend largement de sa liaison aux ions métalliques Co^{2+} et Mg^{2+} (Epting, 2004). La stabilisation de certaines enzymes thermophiles par le Ca^{2+} telles que les hydrolases est démontrée dans plusieurs expériences (Cowan, 1997).

6-2-1-3 Facteurs extrinsèques impliqués dans thermo- stabilisation :

En plus de tous les facteurs intrinsèques de stabilisation, des facteurs extrinsèques jouent aussi un rôle dans la stabilité des protéines thermophiles. Les protéines "chaperonnes" ont été caractérisées chez de nombreux microorganismes thermophiles et hyper thermophiles. Ces chaperonnes remplissent deux fonctions. D'abord elles protègent les protéines de l'agrégation provoquée par dépliement de la structure tridimensionnelle suite à l'exposition à une température élevée. D'autre part, elles rétablissent la structure d'une protéine dénaturée en sa forme native, restaurant ainsi ses fonctions (Sternier et Liebl, 2001).

D'autres facteurs intracellulaires semblent contribuer à la thermostabilité, tels que le sel, les coenzymes, les activateurs, et les substrats (Vielle et Zeikus, 2001).

Les organismes thermophiles accumulent des solutés organiques compatibles particulièrement lorsqu'ils se développent à des températures supraoptimales. Ces solutés ont un effet important sur la thermostabilité des protéines, et jouent également le rôle de thermoprotection (Danson et Hough, 1998).

6-2-1-4 Conformations des protéines thermophiles :

-La rigidité et flexibilité :

Les enzymes thermophiles et hyperthermophiles sont plus rigides que les enzymes mésophiles, ce qui est essentiel pour préserver leurs structures catalytiques, et les protéger du dépliement. La rigidité est la conséquence d'une augmentation de la compacité de la protéine (Vielle et Zeikus, 1996), et est démontrée par la résistance des thermozymes à la dégradation protéolytique ou à la dénaturation chimique et thermique (Li *et al.*, 2001).

Les études basées sur la comparaison des séquences de protéines de 8 microorganismes thermophiles et 12 mésophiles, a montré que le nombre des résidus d'acides aminés contenus dans les protéines thermophiles est nettement inférieur au nombre des acides aminés contenu dans les protéines mésophiles. Cette différence est significative, car il est prouvé que les protéines plus courtes sont plus stables à haute température. (Chakravarty et Varadarajana, 2000)

En outre, l'hydrophobicité est considérée comme le facteur majeur contribuant à la force du repliement de la protéine et par la même à sa stabilité (Burdette, 2000). Une augmentation de l'hydrophobicité du centre des protéines thermophiles leur confère une résistance au dépliement (Medigan et Oren, 1999).

En règle générale et selon de nombreuses recherches basées sur la comparaison des séquences et des structures de protéines thermophiles et leurs homologues mésophiles, il a été conclu que :

- (1) plusieurs mécanismes peuvent intervenir pour la thermostabilité.
- (2) les stratégies adoptées pour la thermostabilité chez une famille de protéine ne sont pas communes à toutes les autres familles.
- (3) toutes les différences entre les protéines thermophiles et mésophiles ne sont pas forcément en relation significative avec la thermostabilité.

Certaines de ces différences peuvent être en relation avec les différences phylogénétiques entre les thermophiles et les mésophiles. Il est important de signaler que l'hydrophobicité, la compacité, l'aspect polaire /non polaire de la surface sont des facteurs peu variables entre les mésophiles et thermophiles. Par contre les stratégies de substitution/ délétion des acides aminés et la stratégie de la substitution de la proline, sont propres à certaines protéines thermophiles, à l'exclusion de toutes les autres. Il faut noter aussi qu'une protéine thermophile peut utiliser plus d'un mécanisme pour assurer sa thermostabilité (Kumar *et al.*, 2000).

6-2-2 Importance biotechnologique des enzymes thermophiles :

Les enzymes produits par les microorganismes thermophiles, ont des caractéristiques remarquables tels que la stabilité aux températures élevées, aux variations du pH, et aux produits chimiques (Bruins *et al.*, 2001)

Grâce à ces facultés uniques, les enzymes thermostables ont suscité un grand intérêt biotechnologique, en raison de leur compatibilité avec les conditions hostiles dans lesquelles s'effectuent les processus industriels (Turner, 2007).

Les thermozymes ont connu de larges applications industrielles, plus particulièrement les protéases, les lipases et les enzymes de dégradations de polymères (van den Burg, 2003), telles que les amylases, les xylanases, les chitinases et les cellulases.

Elles jouent un rôle important dans industries alimentaires, chimiques, pharmaceutiques, et dans la bioremediation (Bruins *et al.*, 2001)

La réalisation des processus biotechnologiques à des températures élevées offre des avantages précieux. Les plus importants sont les suivants :

- La réduction du risque de contamination par les mésophiles.
- Catalyse des réactions à un taux élevée, en raison de la diminution de la viscosité et une augmentation du coefficient de diffusion des substrats à des températures élevées.
- Une amélioration de la productivité, grâce à une meilleure solubilité des substrats et des produits (Haki et Rakshit, 2003).
- Une purification facile des thermozymes, par traitement thermique, lors de leur expression dans un hôte mésophile.
- Grâce à leur thermostabilité, les thermozymes sont très résistants aux dénaturants chimiques tels que les solvants organiques utilisés particulièrement lorsque les substrats sont insolubles dans l'eau (Bora et Kalita, 2007).

Outre cet aspect biotechnologique, les thermozymes peuvent servir de model pour élucider les mécanismes qui régissent la thermostabilité et la thermo-activité pour la conception des stratégies d'ingénierie des protéines dans le but de parfaire leurs propriétés, notamment la stabilité (Haki et Rakshit, 2003).

7- Les enzymes lipolytiques :

Les enzymes lipolytiques incluent les lipases et les estérases, qui hydrolysent de longues et de courtes chaînes d'ester d'acides carboxyliques respectivement (Singh *et al.*, 2006). La différence entre les deux enzymes réside dans le fait que les lipases sont actives sur des substrats émulsifiés, par contre les estérases sont actives sur les substrats solubles dans l'eau (Arnold *et al.*, 1974).

7-1 Les lipases :

Les lipases sont largement répandues dans la nature. Elles sont retrouvées chez les animaux, les plantes et les microorganismes (Labuschagne *et al.*, 1997). La source des lipases la plus utilisée en industrie, est représentée par les microorganismes (Labuschagne *et al.*, 1997 ; Schmidt-Dennert, 1999). Les lipases sont utilisées pour l'hydrolyse des liaisons esters, mais elles sont également capables de catalyser les réactions de synthèse. Elles présentent un panel de spécificités plus large par rapport à d'autres classes d'enzymes (Husson, 2008). Les réactions sont catalysées sur des substrats non polaires, avec une grande activité, régiosélectivité, et stéréosélectivité (Pleiss, 2004).

7-1-1 Définition des lipases :

Les lipases (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) catalysent l'hydrolyse des esters carboxyliques (triacylglycerol) ayant une longueur de chaîne >10 atomes de carbone (Rahman *et al.*, 2006), telles que la trioléine et la tripalmitine (Sharma *et al.*, 2001) en diacylglycérol, monoacylglycérol, acides gras libres et le glycérol (Stamatis, 1999 ; Ko *et al.*, 2005).

Deux critères sont utilisés pour définir une véritable lipase : (1) elle doit être activée par la présence d'une interface entre le substrat insoluble et l'eau (une interface huile-eau) et son activité est accentuée dès que le substrat (triglycérides) forment une émulsion. Ce phénomène est appelé "activation interfaciale". (2) elle doit contenir un "couvercle" ou "Lid" qui est un oligopeptide en forme d'hélice qui couvre le site actif de l'enzyme, et qui s'écarte au contact de l'interface (Jaeger *et al.*, 1999). Cependant cette définition n'est pas totalement appropriée, dès lors que certaines exceptions à cette définition ont été rapportées. En effet, le phénomène d'activation interfaciale n'est pas observé chez certaines lipases. La définition des lipases pourrait donc se résumer à : une lipase est une carboxylestérase catalysant l'hydrolyse (et la synthèse) des acylglycérols à longues chaînes (Jaeger *et al.*, 1999)

7-1-2 Réactions catalysées par les lipases :

Les lipases catalysent non seulement des réactions d'hydrolyse, mais elles sont aussi capables de catalyser les réactions inverses en fonction du microenvironnement dans lequel elles se trouvent (Aracil *et al.*, 2006). En milieu aqueux, elles agissent en tant qu'hydrolases, et en milieu organique elles catalysent la synthèse des liaisons esters. Les réactions de synthèse comprennent les réactions d'estérification, et les réactions de transestérification qui

regroupent l'alcoolyse, l'acidolyse, et l'interestérisation (Reis *et al.*, 2009). L'équilibre entre l'hydrolyse et la synthèse est contrôlé par l'activité d'eau dans le milieu réactionnel, et une activité d'eau faible favorise les réactions de synthèse (Bornscheuer, 1995).

Les deux catégories majeures de réactions catalysées par les lipases sont représentées sur la figure 3.

✓ Hydrolyse :

Cette réaction se réfère à la dégradation des lipides et des huiles, en acide gras et glycérol (alcool). Cette réaction aboutit à la formation de produits importants pour de multiples applications, il en résulte la formation d'acides gras libres, de monoglycérides, et de diglycérides (Gandhi, 1997).

✓ La synthèse :

-L'estérisation :

Le terme estérisation fait référence à la réaction entre les alcools polyhydrique et les acides gras libres. Cette réaction est catalysée par les lipases dans les solvants organiques. Des composés d'intérêt particulier sont obtenus par ces réactions d'estérisation, tels que les esters d'acide oléique (Villeneuve *et al.*, 2000).

-La transestérisation :

Les réactions de transestérisation sont les réactions d'échange d'un radical acyle : entre un ester et un acide (acidolyse) ; entre un ester et un autre ester (interestérisation), ou bien entre un ester et un alcool (alcoolyse). Cette réaction est utilisée par exemple dans la synthèse du beurre de cacao, où la lipase catalyse la transestérisation, entre l'huile de palme et l'acide stéarique (Villeneuve, 2000).

7-1-3 Structure tridimensionnelle :

Les lipases appartiennent à la famille des α/β hydrolases (Svendsen, 2000). La structure tridimensionnelle des lipases est établie selon un mode de repliement typique qu'on appelle le repliement α/β . Les lipases présentent un domaine structural commun constitué par 8 feuillets β ($\beta 1$, $\beta 8$) centraux parallèles ou non, reliés entre eux par 6 hélices α (figure 4) (Rahman *et al.*, 2006 ; Stadler *et al.*, 1996).

Les lipases ont toute en commun, au niveau de leur site actif une triade catalytique, similaire à celle des protéases à serine. Cette triade est constituée d'un nucléophile formée par trois acides aminés : (1) un acide aminé **nucléophile** (sérine, cystéine ou aspartate), (2) un **acide aminé acide** catalytique (aspartate ou glutamate) et (3) **l'histidine** qui est toujours conservé dans cette triade.

Le résidu sérine est localisé au niveau de l'extrémité C terminal du volet $\beta 5$, incluse dans un pentapeptide Gly-X-Ser-X-Gly. Cette séquence est exceptionnellement hautement conservée chez les enzymes lipolytiques, quoique certaines exceptions ne sont pas à exclure (Akoh *et al.*, 2004). L'acide aminé acide est situé après le volet $\beta 7$. L'histidine est situé à l'extrémité C terminal du dernier volet β . Dans les lipases le nucléophile est généralement la sérine (Nardini et Dijkstra, 1999).

7-1-4 Mécanisme catalytique :

L'hydrolyse du substrat commence par l'attaque du nucléophile via l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle du résidu sérine, sur l'atome de carbone du groupement carbonyle impliqué dans la liaison ester du substrat. Se forme ainsi un intermédiaire tétraédrique (complexe enzyme- substrat) caractérisé par une charge négative (Jaeger *et al.*, 1999). Ce dernier est stabilisé par des liaisons hydrogènes, établies entre la charge négative sur l'oxygène du groupement carbonyle, ce que l'on dénomme un "oxyanion", et les atomes d'azote 'N' de deux groupements NH (le trou oxyanion) (Nardini et Dijkstra, 1999). Au cours de cette catalyse, un proton est transféré du groupement OH de la sérine nucléophile à l'histidine, puis à l'oxygène de la liaison ester cible, qui est ainsi clivée. Les composés acides du substrat sont estérifiés par le nucléophile Ser, avec la formation d'un complexe lipase-acyle et libération d'alcools (R'-OH). C'est l'étape d'acylation (Muralidhar, 2002). L'étape suivante est celle de la deacylation. Au cours de cette étape, le complexe lipase- acyle est hydrolysé à son tour par une molécule d'eau avec libération des acides gras et régénération de l'enzyme, qui sera impliquée dans un autre cycle de catalyse (Jaeger *et al.*, 1999; Jaeger *et al.*, 1998).

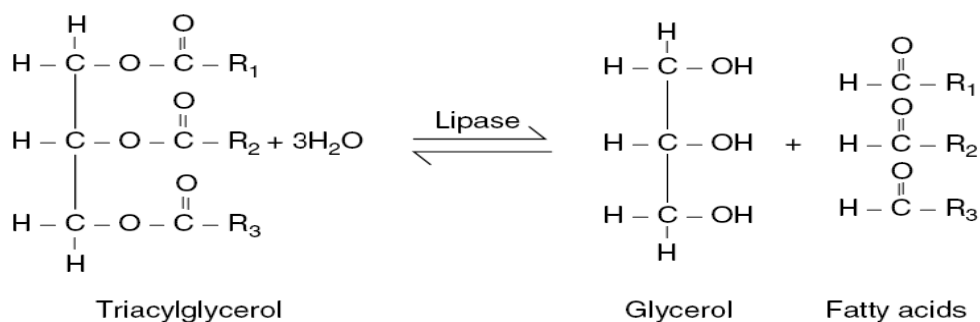
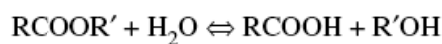


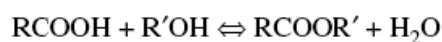
Figure 2 : Réactions de catalyse des triacylglycérols par les lipases en milieux aqueux, et la réaction inverse de synthèse dans des milieux organiques à faible activité d'eau (Salameh et Wiegel, 2006).

(i) Hydrolysis:

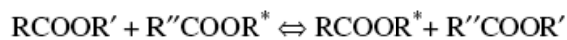


(ii) Synthesis:

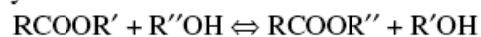
(a) Esterification



(b) Interesterification



(c) Alcoholysis



(d) Acidolysis

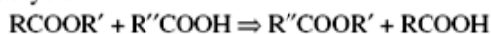


Figure 3 : Les principales réactions catalysées par les lipases (Reis, 2009)

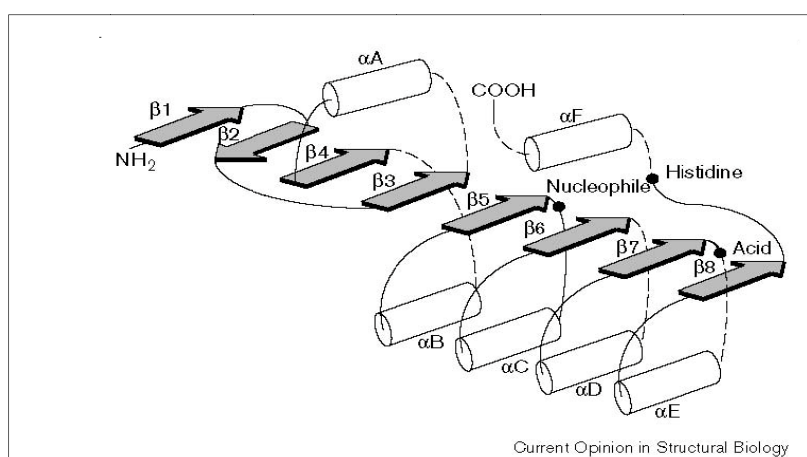


Figure 4 : Diagramme schématisé du repliement α/β hydrolase. Les feuillets β et les hélices α , sont représentés par des flèches grises et des cylindres blancs respectivement. La localisation de la triade catalytique est représentée par des points noirs (Nardini et Dijkstra, 1999)

7-1-5 Phénomène d'activation interfaciale :

7-1-5-1 Cinétique de l'activité interfaciale :

Les lipases hydrolysent les longues chaînes d'acyle glycérol insolubles. Leur activité est améliorée considérablement à l'interface eau/lipide, un phénomène appelé activation interfaciale, qui est une caractéristique typique des lipases (Helisto et Korpela, 1998). La cinétique d'hydrolyse n'obéit donc pas au modèle Michaelis-Menten, qui n'est valide que pour les réactions de biocatalyse dans une phase homogène dans laquelle l'enzyme et le substrat sont solubles (Houde *et al.*, 2004). Il a été démontré dans les premières études sur les lipases, que la lipase pancréatique était faiblement active lorsque un triglycéride (Triacetin TC2) à courte chaîne et soluble dans l'eau est sous une forme monomérique. Cependant, une fois que la concentration du substrat dépasse la limite de la solubilité, la réaction d'hydrolyse s'accroît, avec le même substrat mais présent sous forme de micelle ou en émulsion. L'activité lipolytique est contrôlée par la concentration du substrat à l'interface (figure 5). La plupart des lipases, y compris les lipases bactériennes sont fortement activées de cette manière (Reis, 2009). Les estérases, par contre agissent sur les substrats solubles dans l'eau et montrent une cinétique qui suit le modèle de Michaelis-Menten (Nini *et al.*, 2001).

De nombreux modèles de cinétiques ont été proposés pour décrire le mécanisme interfacial des lipases. Le modèle le plus simple est celui de Verger et de Haas (1976) pour l'adaptation de la cinétique de Michaelis-Menten à la lipolyse interfaciale et qui consiste en deux étapes (Figure 4). Tout d'abord, l'enzyme hydrosoluble (E) est adsorbée de l'interface lipide/ eau. Celle-ci acquiert un état d'énergie plus favorable (E*). L'enzyme présente à l'interface, se lie à un substrat (S), il en résulte la formation du complexe enzyme-substrat (E*S) (Houde *et al.*, 2004). Ce deuxième équilibre peut être décrit par un modèle de Michaelis-Menten pour le complexe (E*S). Ensuite, après plusieurs étapes catalytiques le produit est formé et l'enzyme est régénérée sous sa forme (E*). Dans ce modèle l'enzyme reste adsorbée et n'est libérée qu'après plusieurs cycles catalytiques (Aloulou *et al.*, 2006).

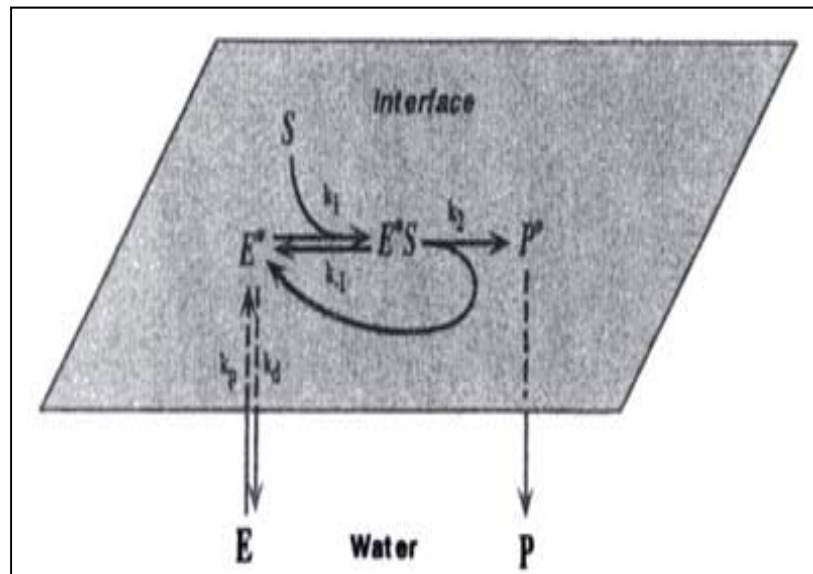


Figure 5: Modèle de la cinétique d'action de la lipase sur un substrat insoluble dans l'eau (triglycéride) (Panaiotov et Verger, 2000).

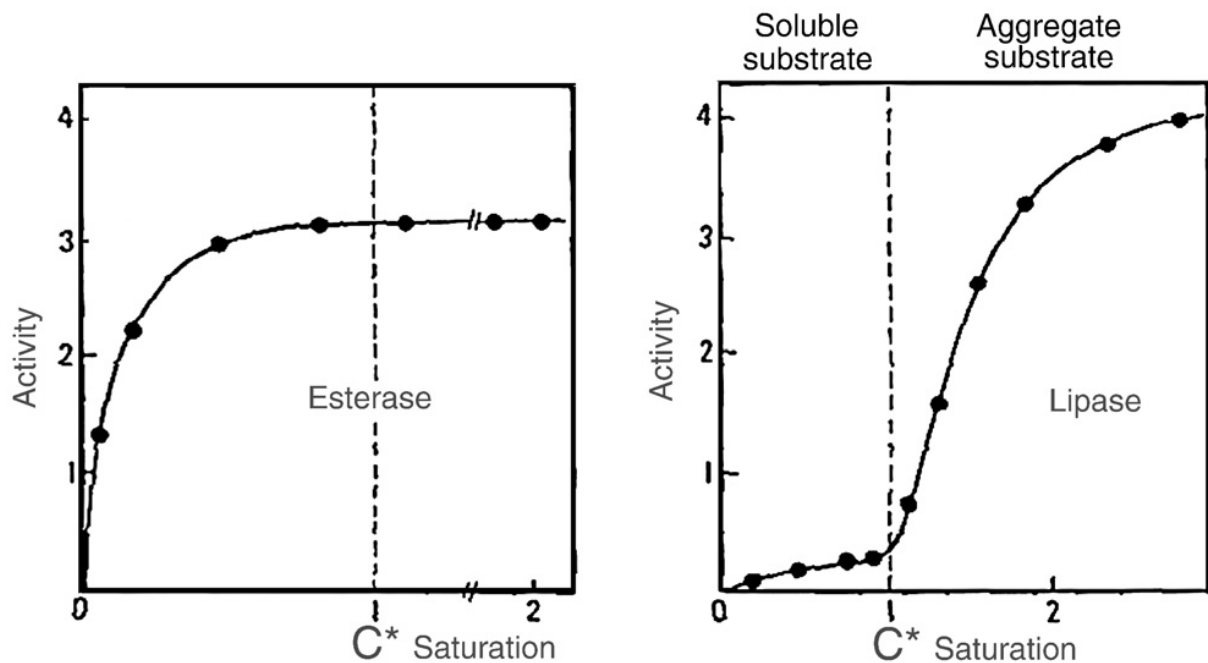


Figure 6: Hydrolyse de la triacetin par une lipase et une estérase en fonction de la concentration en substrat (Reis, 2009).

7-1-5-2 Structure moléculaire de l'activation interfaciale :

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer le phénomène de l'activation interfaciale. Ces théories se divisent en deux catégories : « la théorie du substrat » et « la théorie de l'enzyme ».

La théorie du substrat stipule que l'activation interfaciale est liée à la concentration du substrat, à l'état d'hydratation du substrat, et à l'organisation des molécules du substrat à l'interface (Muderhwa et Brockman, 1992). Les lipases sont faiblement actives sur les solutions monomériques des lipides, mais leur activité s'accroît dès que la concentration du substrat augmente et des structures organisées des lipides se forment. Quand les lipides sont organisés sous forme de liposomes, de micelles, ou d'émulsions huile dans l'eau (oil-in-water), les fonctions chimiques spéciales de ces systèmes jouent un rôle important dans la cinétique d'hydrolyse. Dans de tels systèmes le ratio interface/ volume est grand, et le phénomène qui a lieu à l'interface s'amplifie. D'autres paramètres sont à prendre en considération : l'échange de molécules de l'enzyme entre les particules du lipide, la reconstitution des micelles après l'hydrolyse d'une molécule pour former un produit hydrosoluble, et la réorganisation des produits réactionnels dans la bicouche des lipides causant la déstabilisation et l'altération du liposome etc. (Panaiotov et Verger, 2000).

« La théorie de l'enzyme » quant à elle, stipule que le phénomène d'activation interfaciale est en relation avec un changement de la conformation de l'enzyme lors de son adsorption à l'interface. Les structures tridimensionnelles des lipases établies par les méthodes de cristallographie aux rayons X montre la présence d'un peptide amphiphile 'lid' ou couvercle qui recouvre le site actif de l'enzyme quand elle est sous sa forme inactive (Herrgård, 2000, Pleiss *et al.*, 1998). Le couvercle est sous forme d'une seule hélice, de deux hélices ou bien d'une région en boucle (Jaeger, 1999). Lorsque l'enzyme est dissoute dans l'eau sous sa forme inactive, ce couvercle est fermé et la partie hydrophile est orientée vers le solvant (l'eau), probablement pour préserver l'enzyme de l'agrégation. Une fois la lipase adsorbée sur une interface eau/lipide, en présence de substrats hydrophobes, le passage de la forme inactive à la forme active s'accompagne d'un mouvement du couvercle (lid). Ce dernier, s'ouvre et la partie hydrophobe est exposée à l'interface. Le site actif est dès lors accessible au substrat (Overbeeke, 2000). L'ouverture du couvercle engendre la formation d'une large surface hydrophobe autour du site actif de la lipase. Il a été suggéré que cette surface est le site le plus important de l'interaction avec l'interface lipide/eau (Yahia *et al.*, 1998). Des études cristallographiques des lipases de *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*, et *Mucor miehi*, menées en présence et en absence de substrats analogues ou inhibiteurs, ont confirmé l'importance du mouvement du couvercle (Overbeeke, 2000).

L'établissement des structures 3D de nombreuses lipases purifiées, a montré que certaines d'entre elles ne présentent pas le phénomène d'activation interfaciale. Parmi celles-ci les lipases de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica*. Bien qu'elles possèdent toutes le couvercle amphiphile couvrant le site actif.

Ceci est également observé chez la lipase pancréatique du cochon d'inde, à l'opposé de la lipase pancréatique de l'homme (Verger, 1997).

7-1-6 Spécificités des lipases :

La spécificité des enzymes lipolytique est contrôlée par 3 éléments : (1) les propriétés moléculaire de l'enzyme, (2) la structure du substrat, et (3) les facteurs influençant la liaison de l'enzyme au substrat (Jensen *et al.*, 1983). Les lipases bactériennes catalysent les réactions avec une grande regio- et stéréosélectivité (Jeager et al., 1999)

La spécificité d'action des lipases sur les triacylglycérols est donc définie à trois niveaux :

- La spécificité vis-à-vis le type d'un acide gras.
- La regio-sélectivité : c'est la capacité de la lipase d'hydrolyser les liaisons ester carboxyliques externes localisées en position 1 et 3 (esters primaires). Par opposition aux liaisons ester carboxyliques internes localisées en position 2 (esters secondaires).
- La stéréo-sélectivité : c'est la capacité de la lipase à distinguer deux énantiomères dans le cas des substrats racémiques (Ransac *et al.*, 1998).

7-1-6- 1 Spécificité vis-à-vis du type d'acide gras :

Il existe des différences entre les lipases quant à leur capacité à hydrolyser les esters d'acides gras de longueurs de chaînes carbonées différentes. Les lipases hydrolysent les esters d'acides gras à chaînes carbonées de longueurs variables allant de courtes chaînes(C4), à longues chaînes (C16). Certaines lipases hydrolysent de manière efficace les esters d'acides gras d'une longueur de chaîne carbonée allant jusqu'à C22 (Pleiss *et al.*1999). Afin de déterminer ce type de spécificité, des substrats synthétiques sont utilisés. Par exemple chez *Streptomyces rimosus* la lipase montre un plus fort taux d'hydrolyse avec des esters d'acides gras à *p*-NP caprylate (C8), *p*-NP caprate (C10), et le *p*-NP laurate (C12), indiquant que cette lipase à une préférence pour les acides gras à longueur moyenne. Par contre l'hydrolyse des esters à courte chaîne est faible (Abramic *et al.*, 1999). Cette spécificité est en relation avec la forme et les propriétés physico-chimiques du site de liaison au substrat. Il admet que le site de liaison aux esters d'acides gras des lipases est plus large que celui des estérases. Ceci pourrait expliquer la spécificité des lipases vis- à- vis des esters à longues chaînes (Pleiss, 1998).

Une étude a démontré que la forme du site de liaison des lipases est hydrophobe et profond et la forme varie considérablement. Trois formes principales ont été décrites pour les lipases : la forme en entonnoir, en tube ou en fente. Ainsi, les dimensions de ces sites sont en corrélation avec la longueur des chaînes carbonées, ce qui détermine la spécificité vis-à-vis d'un acide gras de longueur donnée (Svendsen, 2004).

7-1-6-2 La regio-sélectivité des lipases :

Les lipases sont classées en trois groupes selon la spécificité vis-à-vis de la position de la liaison ester. Le premier groupe hydrolyse indifféremment tout types de liaisons ester des triglycérides. Les lipases de ce groupe libèrent des acides gras libres (AGL) à partir des trois positions de la liaison ester sur l'acylglycérol. Par conséquent, les triacylglycérols sont complètement hydrolysés en glycérol et AGL (Saxena *et al.*, 1999).

Le second groupe renferme les lipases spécifiques des liaisons esters en position 1et 3, libérant des acides gras en position 1,3 sur le triacylglycérol. Il en résulte la formation des AGL, de 1,2 diacylglycérol, ou de 2,3 diacylglycérol, et 2-monoacylglycérol. Ces produits sont instables, et le groupement acyle peut changer de position. Ainsi les produits finaux des lipases 1,3 spécifiques pourraient être le 1,3 diacylglycérol, le 1, monoacylglycérol, et des AGL. L'incubation prolongée des lipases 1,3 spécifiques avec le triacylglycérol pourrait aboutir à l'hydrolyse complète des triacylglycérols et des AGL (Chen *et al.*, 2003).

Les lipases du troisième groupe ont des préférences pour de acides gras particuliers. A titre d'exemple la lipase de *Geotrichum candidum*, qui est spécifique de la double liaison entre le C9 et C10 de l'acylglycérol (Tombs, 1995). Néanmoins aucune lipase bactérienne ne semble appartenir à ce groupe (Chen *et al.*, 2003).

Les lipases sont très exploitées pour leur regio-sélectivité, notamment pour les réactions d'estérifications et de transestérification dans les solvants organiques (Ottolina, 1992)

7-1-6-3 La Stéréo –sélectivité :

La stéréosélectivité des lipases dépend largement de la structure du substrat, de l'interaction au niveau du site actif, et les conditions de la réaction. Les lipases sont capables de reconnaître aussi bien les énantiomères que les énantiotropes des molécules pro-chirales. Les propriétés d'énantio-sélectivité sont attribuées aux conformations tridimensionnelles particulières des résidus catalytiques du site actif (Muralidhar *et al.*, 2002 ; Husson, 2005). La forme et les dimensions du site actif sont adaptées de manière à sélectionner l'énantiomère qui se lie à la lipase. C'est le cas par exemple de certaines lipases qui possèdent au niveau du site actif deux poches, une grande et l'autre de taille plus restreinte (Ghanem et Aboul-Enein, 2005).

L'énantio-sélectivité des lipases est utilisée pour séparer les esters chiraux d'un mélange racémique, par l'hydrolyse d'un seul énantiomère d'un ester. Ou bien, dans les réactions d'estérification des alcools et/ ou acides chiraux (Zuegg *et al.*, 1997).

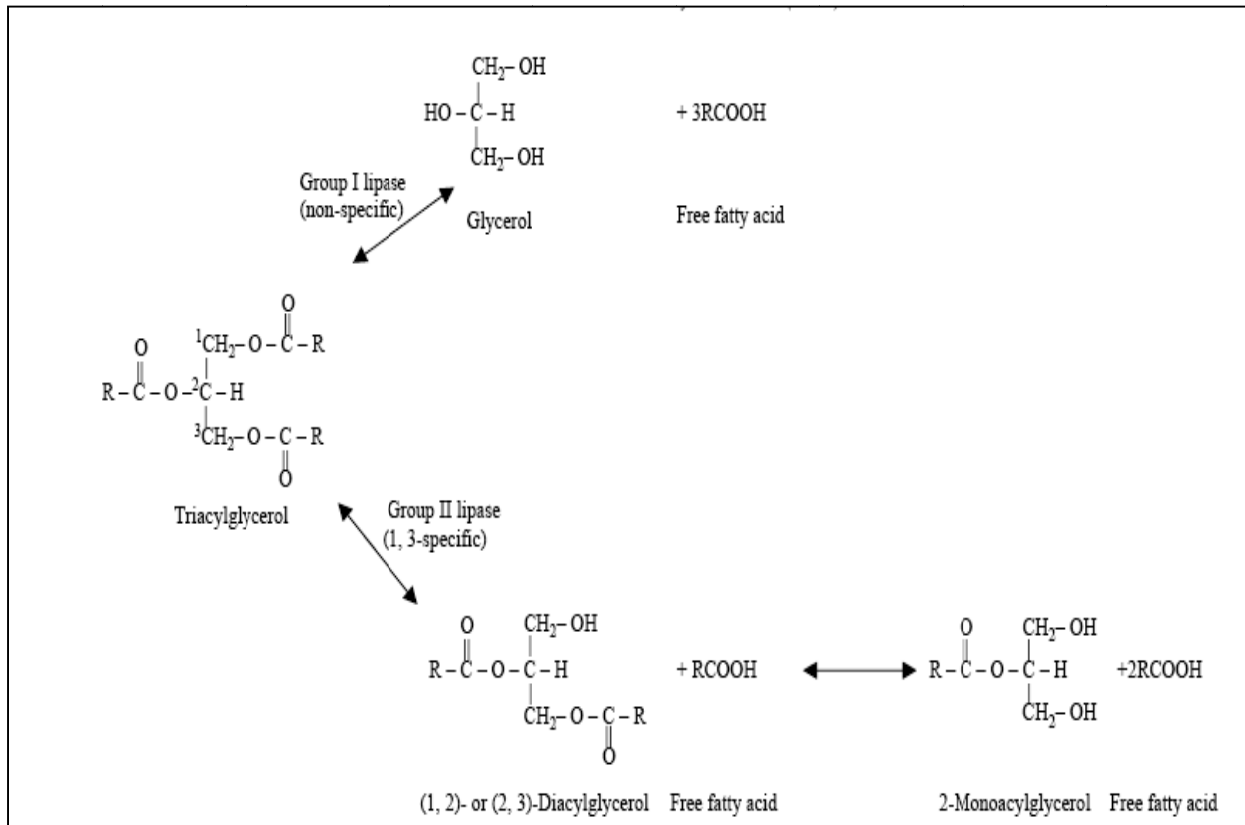


Figure 7 : Classification des lipases bactériennes basée sur la spécificité de position (regio-spécificité).

7-2 Différence entre les lipases et les estérases :

Les lipases et les estérases sont de structure tridimensionnelle semblable et appartiennent à la même famille des α/β hydrolases. Le phénomène de l'activation interfaciale représente la principale différence entre les lipases et les estérases. En effet, ce phénomène n'est observé que chez les lipases seulement (Chahinian *et al.*, 2002).

Les estérases sont actives sur les substrats hydrosolubles et le maximum d'activité est observé lorsque la concentration du substrat est bien au dessous de la limite de la solubilité. L'activité estérase n'augmente pas en présence des particules émulsifiées, ainsi elle suit la cinétique de Michaelis-Menten. Contrairement aux lipases dont l'activité sur les esters solubles est très faible. Celle-ci est maximale en présence de substrats émulsifiés et dans des solutions saturées, à l'interface eau/lipide (Figure 6). Cette caractéristique est unique à la lipase, et connue sous le nom de l'activation interfaciale, qui est en relation avec la présence du couvercle au niveau de la triade catalytique du site actif, et qui est absent chez les estérases (Nini *et al.*, 2001).

L'autre différence entre les lipases et les estérases réside dans la spécificité vis-à-vis du substrat (Panda, 2005). Les lipases préfèrent les substrats insolubles dans l'eau, plus précisément les triglycérides composés d'acides gras à longues chaînes. Alors que les estérases hydrolysent les triglycérides composés d'acides gras dont la longueur de la chaîne carbonée est \leq C6 (Bornscheuer, 2002 ; Holland *et al.*, 2005). Les deux enzymes sont stables et actives dans les solvants organiques, mais cette caractéristique est plus marquée chez les lipases (Bornscheuer, 2002)

7-3 Les enzymes lipolytiques microbiennes et leurs applications :

Les bactéries et les champignons, sont une source riche des lipases. Le nombre de lipases microbiennes isolées ne cesse de croître. La classification des enzymes lipolytiques microbiennes basées sur la comparaison des séquences d'acides aminés et des propriétés biologiques, a permis de les regrouper en huit familles différentes (Arpigny et Jaeger, 1999).

Les lipases microbiennes sont souvent perçues comme une des plus importantes et des plus intéressantes classes d'enzymes en biotechnologie. Cet intérêt provient principalement du fait d'une part, que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypiques et que d'autre part, les technologies à mettre en œuvre pour les produire sont relativement simples (Fickers *et al.*, 2007). Cet intérêt provient également du fait de leur haute stabilité, notamment dans divers types de solvants organiques et à des températures élevées (Salameh et Wiegel, 2006). Les lipases extracellulaires microbiennes particulièrement celles des thermophiles, sont plus thermostables que les lipases animales ou végétales (Leow, 2006). Elles sont également actives sur une large gamme de température et de pH, comparées aux lipases des eucaryotes. Elles catalysent des réactions sur une diversité incomparable de substrats avec une haute regio- et stéréosélectivité (Fischer et Pleiss, 2003).

Un autre avantage intéressant est que les lipases ne requièrent pas de co-facteurs pour leur activité. Leurs domaines d'applications sont donc très vastes et variés (Fickers *et al.*, 2007)

Le potentiel biotechnologique des lipases et des estérases est dû non seulement à leur capacité d'hydrolyser les triglycérides, mais aussi à les synthétiser à partir du glycérol et des acides gras en milieu organique (Jaeger *et al.*, 1997).

La demande des produits énantiopures s'accroît constamment, ainsi les catalyseurs efficaces occupent une place importante dans les transformations énantio-sélectives (Yoshitaka et Ueji, 1997). Les lipases et les estérases sont les biocatalyseurs dont l'intérêt a largement été démontré pour la catalyse des réactions énantiosélectives, un intérêt majeur pour le développement de nouvelles voies de synthèse chimio-enzymatique de molécules énantiomériquement pures (Demirjian *et al.*, 2001). Ces molécules sont utilisées dans plusieurs domaines : (1) pharmaceutiques pour la synthèse d'une multitude de produits, car un seul énantiomère d'un médicament possède l'effet thérapeutique désiré ; (2) agrochimique, pour la production des herbicides ; et (3) cosmétique (Jaeger et Eggert, 2002).

En raison de leur capacité à hydrolyser les lipides, l'exploitation des lipases dans l'industrie des détergents, demeure l'application la plus importante de ces enzymes, autant qu'agents dégraissants (Houde *et al.*, 2003). Les lipases utilisées comme additifs dans les détergents sont sélectionnées de façon à répondre à certaines exigences (1) elles doivent présenter une faible spécificité vis-à-vis du substrat, afin d'hydrolyser les lipides de compositions différentes, (2) une résistance aux températures élevées et à des pH alcalins, (3) une résistance aux surfactants et aux enzymes protéolytiques qui sont les composants essentiels de plusieurs détergents (Sharma *et al.*, 2001).

Les lipases trouvent aussi des applications en industrie agro-alimentaire. Elles interviennent dans l'amélioration des saveurs des aliments (fromage, beurre, margarine, chocolats), grâce à la libération des acides gras libres par l'hydrolyse sélective des triglycérides (Jaeger et Reetz, 1998).

Les réactions d'estérification et transestérifications en milieux organiques sont d'une grande importance en industries (Huang *et al.*, 1998). Ces réactions catalysées par les lipases sont mises en œuvre pour la synthèse des monoacylglycérol à longues chaînes d'acides gras utilisés comme agents émulsifiants dans les industries alimentaire (Mc Kay, 1992), pharmaceutique, et cosmétique (Bornscheuer, 1995).

Les lipases sont également couramment utilisées pour les réactions de transestérification des triglycérides avec le méthanol/éthanol. Elles présentent un avantage pour la fabrication du biodiesel qui a suscité beaucoup d'attention, autant que carburant biodégradable, renouvelable et non toxique (Rahman *et al.*, 2006).

Matériel et méthodes.

II- Matériel et méthodes :

1-Echantillonnage :

Dans le but d'isoler des actinobactéries thermo-halophiles, différents échantillons de sols et d'eau ont été prélevés à partir de sebkhas et de chotts. Ces derniers ont été sélectionnés en raison de leur forte salinité. Les prélèvements ont été effectués durant le mois de janvier de l'année 2006. Concernant les échantillons de sol, une quantité de 1Kg a été prélevée de la couche superficielle de chaque sebkha. Ces échantillons sont transportés dans des sachets en plastique. Pour ce qui est des échantillons d'eau, un volume de 1l a été prélevé à partir de la sebkha, et récupéré dans des flacons stériles.

Les sebkhas étudiées sont les suivantes :

- Sebkha d'Oran
- Sebkha de Zahrez chergui.
- Chott el Hodna.
- Chott Melghir.
- Sebkha d'El-Goléa.

1-1 Description des sites :

Les caractères généraux des différents sites sont résumés dans le tableau 1. La localisation des sites de prélèvement est représentée sur la figure 8.

Tableau IV : Caractères généraux des différents sites de prélèvement.

	Localisation générale	superficie	climat	Cordonnées géographiques	Altitude
Chott Melghir	Sud-est de la ville de Biskra	523.426 hectares	sites humides les plus arides	Longitude : 34°00'00'' et 34°30'01'' Nord Latitude : 6°07'30'' et 6°30'02'' Est	Moyenne : -24 maximale : -9 m minimale : -35 m
Sebkha d'Oran	distante de 12 km de la mer méditerranéenne et de 15 Km de la ville d'Oran	56 870 hectares	méditerranéen semi aride à variante chaude	Latitude 35°32'N, Longitude 00°48' E	110 mètres
Sebkha Zahrez chergui	50 km au Nord-est du de la Wilaya de Djelfa	50.985 hectares	type aride	Latitude 35°15N Longitude 3°30E	Maximale 840 m Minimale 827 m
Chott el Hodna	chevauche deux wilaya, M'Sila, sur 1000 Km ² , et Batna sur 100 Km ²	110.000 hectares	Type méditerranéen subaride	Latitude : 35° 18' / 35° 32' Longitude 4° 15' / 5° 06'	Minimale : 390 m. Moyenne : 392 m Maximale : 400 m.
Sebkha d'El Goléa Sebkha el Malah	12 kilomètres d'El Meniâa (El Goléa	18.947 hectares	type aride	Latitude 20°25'00'' N Longitude 02°75' à 02°95' Est	Mini 330 mètres Maxi 387 mètres

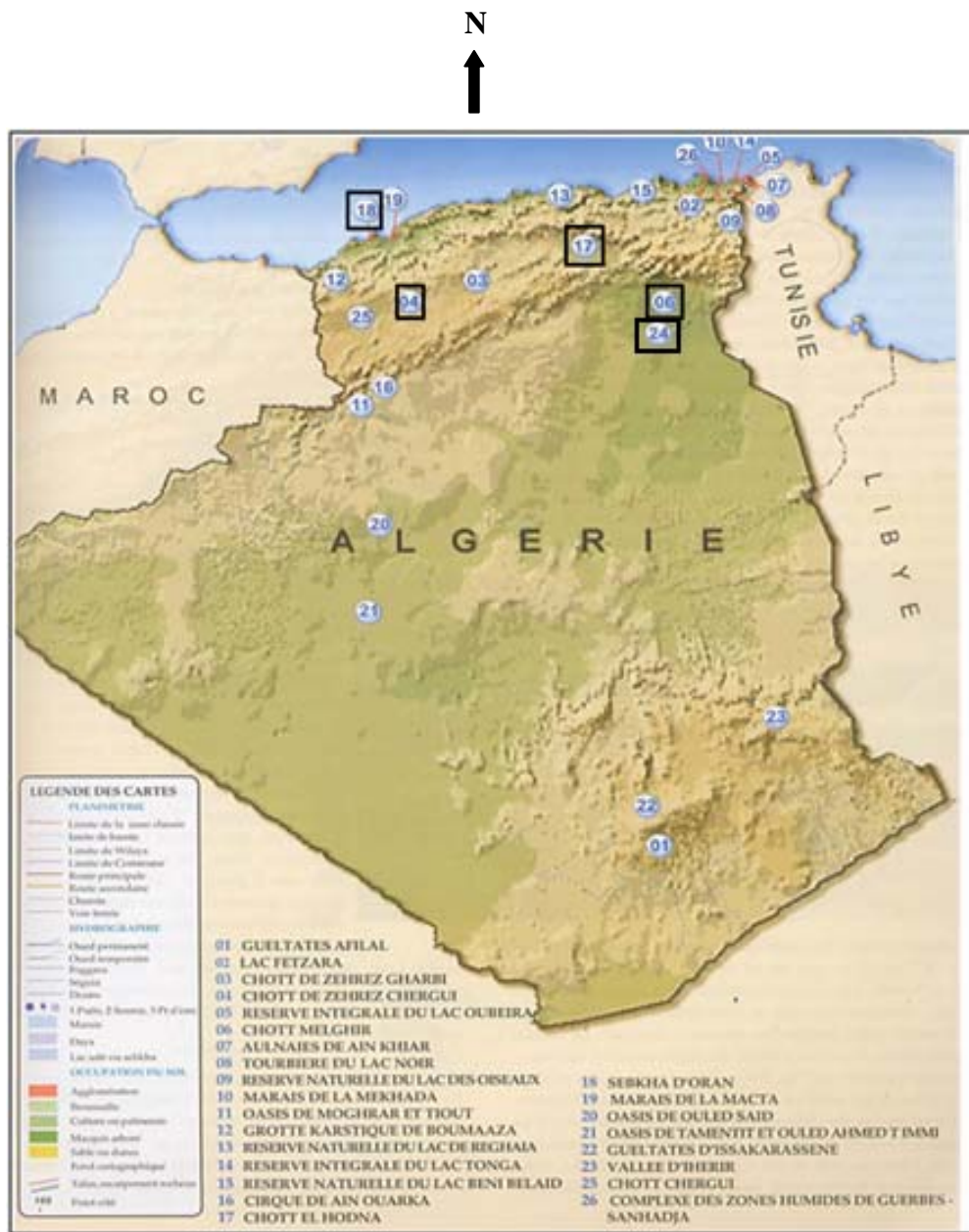


Figure 8 : Localisation des sites de prélèvement.

2-Isolement des souches d'actinobactéries :

2-1 Enrichissement en milieu liquide :

Compte tenu du contexte de notre recherche, à savoir l'isolement des souches d'actinobactéries thermo-halophiles des cultures d'enrichissement ont été réalisées. Pour ce faire, des Erlenmeyers de 500ml contenant 100ml d'un des milieux liquides ISP2 ou ISP5 (International *Streptomyces* Project 2 et5), préconisés par Shirling et Gottlieb (1966), pour la croissance et la sporulation des actinomycètes, ont été utilisés.

Les compositions des milieux sont les suivantes :

Le milieu extrait de malt-extrait de levure (ISP2) (glucose 4g/l, extrait de levure 4g/l, extrait de malt 10g/l, CaCO₃ 2g/l).

Le milieu glycérol –asparagine (ISP5) (glycérol 10g/l, K₂HPO₄ 1g/l, asparagine 1g/l, solution saline : FeSO₄.7H₂O 0,1%, MnCl₂. 4H₂O 0,1% ZnSO₄.7H₂O 0,1%).

Les milieux sont additionnés de 10% ,15%, 20% , 25% de NaCl.

Les milieux ont été inoculés par des échantillons de sol à raison de 1g /100ml du milieu, ou d'eau à raison de 10ml /90 ml du milieu. Les cultures sont incubées dans un agitateur incubateur (New brunswick Scientific classic series edison) 150 rpm, à 55°C, pendant 15jours.

2-2 Isolement sur milieu solide :

Un volume de 0,1ml de chaque culture d'enrichissement est prélevé quotidiennement et ensemencé par étalement à la surface des milieux gélosés correspondants ISP2 ou ISP5 additionnés de différentes concentrations en NaCl (10% ,15%,20% ,25%).

Les boîtes sont incubées à 55°C pendant 5, 7 et 15 jours, dans des sachets en plastique afin d'éviter le dessèchement de la gélose.

2-3 Purification et conservation des souches :

Les souches d'actinobactéries isolées ont été purifiées par repiquages successifs sur les milieux qui ont servi à leur isolement, et conservées sur les mêmes milieux gélosés et inclinés à 4°C.

3- Identification des souches d'actinobactéries isolées :

L'étude taxonomique des souches d'actinomycètes isolées, est basée sur la détermination des caractères cultureux, morphologiques, physiologiques et moléculaires.

3-1 Détermination des caractères cultureux et morphologiques :

L'étude des caractères cultureux et morphologiques a été menée selon la méthode décrite par Shirling et Gottlieb (1966). La couleur du mycélium aérien et du mycélium de substrat, est déterminé, par l'observation à l'œil nu des cultures des souches après 2 à 5 jours d'incubation à 55°C sur les différents milieux solides suivants :

Tryptone- extrait de levure agar (ISP1) (tryptone 5g/l, extrait de levure 3 g/l, agar 20g/l) ; extrait de malt –extrait de levure agar (ISP2), inorganic salts -starch agar (ISP4) (amidon 10g/l, KH₂PO₄ 1g/l, MgSO₄.7H₂O 1g/l, (NH₄)₂SO₄ 2g/l, CaCO₃ 2g/l, agar 20g/l) , et glycérol-asparagine agar (ISP5) additionnés de 10% NaCl.

Sur chaque milieu sont observées : l'importance de la croissance, la couleur du mycélium aérien et du mycélium du substrat, et la production de pigments diffusibles.

La micromorphologie a été déterminée au microscope électronique environnemental l'ESEM, (Environmental Scanning Electronic Microscope) (Philips). Cette étude microscopique nous renseigne sur la forme, l'ornementation et la disposition des spores, ainsi que le type du mycélium (fragmenté ou pas). L'échantillon représenté par une portion de la culture solide est déposé sur une platine porte –échantillon et introduit dans une chambre du microscope électronique environnemental. Les images sont observées sur écran ordinateur.

3-2 Identification moléculaire :

Pour l'identification moléculaire des souches, les techniques de séquençage du gène codant pour l'ARN 16S ont été employées. Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire Biotechnologie Microbienne des environnements chauds à l'I.R.D Marseille, France ; et au laboratoire de microbiologie de l'université Warwick, Angleterre.

Les souches sélectionnées pour le séquençage, ont été cultivées sur milieu ISP2 additionné de 10% NaCl, à 55°C pendant 48 heures.

Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S s'effectue selon plusieurs étapes :

1-L'extraction de l'ADN : Les cellules sont récupérées par centrifugation d'une culture dense de la souche à identifier. Le culot est transféré dans des tubes Eppendorff et mélangé à 140µl de la solution TE (10mM Tris, 1mM EDTA) et 40µl du lysozyme. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30mn, puis centrifugé.

- Lyse des cellules : le mélange est additionné est de 600µl de la solution de lyse, incubé à 80°C, 5mn, puis 3µl de la solution Rnase est ajoutée, incubée à 37°C pendant 15mn. Par la suite 200µl de la solution de précipitation des protéines est ajoutée, et mise pendant 5mn dans de la glace, puis centrifugé 13000g pendant 3mn.

- Le surnageant est récupéré dans un tube propre et mélangé avec 600µl de l'isopropanol. Ce mélange est centrifugé, le surnageant est jeté puis 600µl d'éthanol à 70% est ajouté. L'éthanol est ensuite aspiré et laissé sécher à l'air libre pendant 15mn. L'ADN est réhydraté en ajoutant 50µl de tris 10mM, et incubé toute la nuit à 4°C.

2- Amplification par PCR de l'ADNr16S :

L'ADNr 16S recueilli est amplifié par PCR. 50µl de la solution PCR (0,5µl dNTP, 5µl tampon, 5µl MgCl₂ (25mM), Amorcel 50pmol/µl, Amorce2 50pmol/µl, Taq polymerase 5 U/µl, H₂O 37,7µl), est mélangé avec 0,5µl d'échantillon d'ADN. Les préparations sont placées dans l'appareil PCR, et l'amplification est effectuée selon le programme suivant : une dénaturation initiale 95°C pendant 1mn, suivie par 30 cycles d'amplification : dénaturation 95°C, 20s ; hybridation 55°C, 30s ; élongation 72°C 1,5mn ; et une élongation finale 72°C, 5mn. Les produits d'amplification sont détectés par électrophorèse sur gel d'agarose, et visualisés par la lumière UV.

3- Les fragments amplifiés sont utilisés pour le séquençage.

Les séquences obtenues sont alignées manuellement, et comparées aux séquences nucléotidiques disponibles au Gen Bank, en utilisant le BLAST. Le taux de similitude est déterminé entre les souches identifiées et les espèces les plus proches.

L'alignement des séquences obtenues permet l'élaboration d'un arbre phylogénétique, selon la méthode Neighbors-joining (Saitou et Nei, 1987), afin de déterminer le genre et l'espèce de la souche isolée.

3-3 Détermination des caractères physiologiques et biochimiques :

3-3-1 Détermination des caractères physiologiques :

3-3-1-1 Détermination de la tolérance à la température et à salinité :

-Pour l'étude de la tolérance des souches isolées au NaCl, les milieux ISP2 et ISP5 de différentes salinités ont été préparés. Les concentrations en NaCl testées sont : 0, 2, 5, 7, 10, 12,15, 20%. La température d'incubation est maintenue à 55°C (température d'isolement).

- Pour l'étude de la tolérance des souches à la température, seulement la température de la culture varie, alors que la concentration en NaCl est maintenue fixée à 10% (concentration à laquelle l'isolement a été fait). Les souches isolées ont été incubées à différentes températures dans une gamme comprise entre 30°C et 60°C (30°,40°,50°, 55°,60°C).

3-3-2 Détermination des caractères biochimiques :

- Le test de dégradation des sucres a été mené selon la méthode de Pridham et Gottlieb (1948). Le milieu minéral ISP9 recommandé par les auteurs dans cette technique a été remplacé par le milieu ISP4 modifié, par la suppression de la source de carbone (amidon) et additionné de 10% NaCl. Cinq sucres ont été testés : le glucose, le xylose, le mellobiose, le sorbitol et l'adonitole. Un milieu ISP4 sans source de carbone est utilisé comme témoin. L'utilisation des sucres est révélée par la croissance de la souche testée sur milieu contenant le sucre, et l'absence de la croissance sur milieu minéral témoin.

- La dégradation de l'urée a été déterminée sur milieu urée indole.

- La production de l'arginine dihydrolase, de la lysine décarboxylase, et de l'ornithine décarboxylase a été testée sur milieu Moeller.

- La dégradation de la tyrosine a été testée selon la méthode de Staneck et Roberts (1974). La tyrosine est ajoutée à raison de 0,5% (wt/v) à la gélose nutritive additionnée de 10% NaCl. Les souches sont ensemencées en spot de 1cm de diamètre au centre de la boîte. Les boîtes sont incubées pendant 7 à 10 jours. Une zone d'éclaircissement autour des spots indique la dégradation de la tyrosine.

4-Mise en évidence de l'activité antibactérienne :

L'aptitude des souches à produire des substances antibactériennes a été testée par trois méthodes. Deux méthodes menées par culture sur milieu solide à savoir la méthode des disques d'agar, et la méthode de la double couche d'agar. La troisième méthode est réalisée par culture en milieu liquide.

Les germes cible utilisés sont : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* MRSA + (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* MRSA- (ATCC 43300), *Micrococcus luteus* (collection du laboratoire de microbiologie)

4-1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu solide :

4-1-1 La méthode des disques d'agar (Patel et Brown ,1969)

Les souches d'actinobactéries testées pour leur potentiel à produire des substances antibactériennes, sont ensemencées par stries très serrées sur le milieu ISP 2 et ISP5 additionnés 10% en NaCl et incubés à 55°C. Après développement des cultures, un disque d'agar est prélevé de chaque culture, et placé sur le milieu gélose nutritive ensemencée par l'un des germes cibles.

Un disque d'agar prélevé des milieux ISP2 et ISP5 additionnés de 10% de NaCl et non ensemencés est utilisé comme témoin. Les boîtes sont ensuite mises à 4°C pendant 4 heures afin de permettre la diffusion de la substance active, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est évaluée pour les deux méthodes par la mesure du diamètre des zones d'inhibition.

4-1-2 La méthode de la double couche d'agar :

La détermination de l'activité antibactérienne a été menée sur différents milieux solides : M1, M2, M3, M4. Afin de déterminer le meilleur milieu pour la production la substance antibactérienne (Ismet *et al.*, 2004).

Le milieu de base contient peptone 0,5% (w/v), extrait de levure 0,2%, CaCO₃ 0,3%, auquel on ajoute 1% (w/v) d'un des composants suivants : glucose, glycérol, amidon, et glucose+glycérol pour obtenir les milieux M1, M2, M3 et M4 respectivement. Chacun des milieux est additionné de 5% et de 10% en NaCl.

Les souches d'actinobactéries testées sont ensemencées par touche au centre d'une boîte de Petri contenant l'un des milieux cités précédemment. Après 48 heures d'incubation à 55°C, la culture est recouverte par 8ml de la gélose nutritive molle (contenant 8g/l d'agar) inoculée avec le germe cible. Après solidification de la deuxième couche les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures.

L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition.

4-2 Mise en évidence de l'activité antibactérienne en milieu liquide :

4- 2-1 La méthode des disques en papier :

On effectue une extraction de la substance antibactérienne avec un solvant organique à partir des cultures de la souche active. La souche testée est tout d'abord cultivée en milieu ISP 2 liquide (100ml) additionné de 10% en NaCl et incubée à 55°C pendant 48 heures. La culture est ensuite récupérée, et mélangée dans une ampoule à décanter à un solvant organique le n-butanol (1 :1 v/v). L'extraction est menée pendant 2 heures, et favorisée par agitation énergique et répétée chaque fois qu'il y a formation de deux phases. Ensuite l'extrait organique est récupéré. On refait la même opération une deuxième fois pendant 2heures. Les deux extraits organiques obtenus sont mélangés, filtrés et évaporés sous vide.

Le résidu sec est ensuite repris et dissout dans 1ml de méthanol. Cette solution servira à imprégner des disques de papier stériles de 6mm de diamètre. Les disques sont séchés puis déposés sur le milieu gélose nutritive ensemencé avec l'un des germes-cible. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 4 heures et incubées par la suite à 30°C pendant 24heures.

L'activité antibactérienne était évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition.

5- Criblage des activités enzymatiques sur milieu solide :

Dans un objectif de tester l'aptitude des souches à la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, les cultures ont été menées sur milieu solide. Les milieux sont additionnés de 10% NaCl et ajustés à pH 7. Quatre activités enzymatiques ont été recherchées : l'activité protéolytique, l'activité amylolytique, l'activité cellulolytique et l'activité lipolytique.

5-1 Mise en évidence de l'activité protéolytique :

L'activité protéolytique des souches a été mise en évidence qualitativement par la dégradation de la caséine selon la méthode de Staneck et Roberts (1974). Deux solutions sont préparées. La première solution est obtenue par dissolution de 10g de lait écrémé dans 100ml d'eau distillée. La deuxième solution est celle d'eau distillée à 2% (wt/v) d'agar additionné de 10% NaCl. Les deux solutions sont stérilisées par autoclavage séparément. Après autoclavage, les deux solutions sont mélangées aseptiquement et coulées sur boîtes.

Les souches testées sont ensemencées en spot au centre de la boîte et incubée à 55°C. Les zones d'éclaircissement autour du point d'inoculation indiquent la présence d'activité protéolytique.

5-2 Mise en évidence de l'activité amylolytique :

L'hydrolyse de l'amidon a été déterminée sur milieu gélose nutritive additionné de 1% d'amidon. Les milieux ont été ensemencés par strie ou par touche. Après incubation à 55°C pendant 5 à 7 jours, les cultures ont été recouvertes d'une solution de lugol. L'amidon en présence d'iodure prend la couleur bleu sombre. L'hydrolyse de l'amidon se manifeste par la disparition de la couleur autour des colonies.

5-3 Mise en évidence de l'activité cellulolytique :

Afin de connaître l'aptitude des souches à produire des cellulases, nous avons suivi la méthode Demain et Davies (1999). Le milieu utilisé contient : cellulose 5 g, extrait de levure 1g, K_2HPO_4 , 0.7 g KH_2PO_4 , 0.3 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g ; $ZnSO_4$ 0.001 g ; agar, 20 g ; eau distillée, 1000ml. Le milieu est ensemencé par stries séparées. Les boîtes sont incubées à 55°C et observées après différentes périodes d'incubation 5, 7, et 10 jours. L'apparition de zones claires autour des colonies est considérée comme résultat positif pour la production de la cellulase.

5-4 Mise en évidence de l'activité lipolytique :

Le criblage des souches pour la production d'enzymes lipolytiques a été mené sur milieu minéral solide additionné de 1% d'huile d'olive comme seule source de carbone. La composition du milieu est la suivante : KH_2PO_4 1g /l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/l, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 2g/l, NaCl 100g/l, et l'agar 20g/l.

Le milieu minéral et l'huile d'olive sont stérilisés séparément, et mélangés après autoclavage par l'ultraturax et coulé immédiatement sur boîte de Petri. Un milieu minéral de même composition et exempt de toute source de carbone est utilisé comme témoin.

Les souches sont ensemencées par strie sur les deux milieux et incubés à 55°C pendant 48h à 72h. Le résultat positif se traduit par la croissance des souches uniquement sur milieu minéral additionné d'huile d'olive.

6- Etude des enzymes lipolytiques en milieu liquide :

6-1 Préparation de l'extrait enzymatique :

Les souches performantes quant à la production d'enzymes lipolytiques sont cultivées en milieu liquide.

Celles-ci sont inoculées dans des Erlenmeyers de 500ml contenant 100ml d'un milieu minimum dont la composition est la suivante : KH_2PO_4 1g /l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/l, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 2g/l, et NaCl 100g/l, auquel on a ajouté 1% (v/v) de tween80 (polysorbate 80) comme inducteur, et 1% (v/v) de l'huile d'olive comme substrat. L'incubation a été faite à 55°C, sous agitation (160 rpm).

Après 48 heures d'incubation les cultures sont récupérées, centrifugées à 6000 tours et à 4°C pendant 30 mn. Le surnageant ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique brut, sur lequel les essais de l'activité lipolytique sont réalisés.

La croissance cellulaire a été suivie pendant une période de 12 jours, sur le même milieu et dans les conditions analogues à celles décrites ci-dessus. La croissance cellulaire est estimée par la mesure du poids sec du mycélium. Le milieu est réparti à raison de 50ml dans 12 Erlenmeyers de 250 ml.

Quotidiennement un Erlenmeyer est prélevé. Un volume de 5ml est centrifugé à 6000 tours et à 4°C pendant 30mn. Les surnageants sont récupérés pour la mesure de l'activité lipolytique. Les culots obtenus après centrifugation, subissent deux lavages avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer le sel. Ensuite le culot est séché à 105°C pendant 1heure à 1h30. La masse sèche est pesée à l'aide d'une balance à précision. Le poids sec est exprimée en gramme de matière sèche / litre.

6-2 Mesure de l'activité lipolytique :

6-2-1 Test colorimétrique :

L'évaluation de l'activité lipolytique chez les souches testées, a été réalisée conformément à la méthode proposée par Winkler et Stuckmann (1979) modifiée par Kordel *et al.*, (1991). Cette méthode colorimétrique est basée sur la mise en évidence de l'activité lipolytique par l'hydrolyse des substrats synthétiques de la lipase, que sont les esters de para nitro phényle le *p*-NPC, dont l'hydrolyse donne le *para*- nitrophénol et l'acide gras correspondant. L'estimation de l'activité lipolytique se fait par dosage du *para*- nitrophénol apparu lors de la lyse enzymatique, et qui se traduit par une coloration jaune détectée à 410nm. Dans cette étude le substrat utilisé est le *p*-NPP (para nitro phenyl palmitate) hydrolysé en para nitrophenol et l'acide palmitique.

Le substrat est mis en émulsion dans une solution réactionnelle préparée ainsi :

La solution 1 : contient le substrat *p*-NPP à 1,65mM solubilisé dans l'isopropanol.

La solution 2 : qui est une solution tampon de Tris-HCl 50mM, pH 8 contenant 0,4% (w/v) de triton X100 et 0,1% (w/v) de la gomme arabique. Ces deux derniers composants permettent la mise en émulsion du substrat, et la stabilité de cette émulsion. Le triton X100 permet d'éviter la turbidité et d'obtenir une solution claire. Ce dernier est un surfactant qui permet la dispersion des acides gras issus de la dégradation des *p*-NPP (Gupta *et al.*, 2002).

Dans un mélange réactionnel 1,5 ml du surnageant et qui représente la préparation enzymatique, est mélangé à 0,5 ml de substrat (solution 1) et 1ml de la solution tampon (solution2). La réaction est menée pendant 5mn à 40°C. Les activités lipolytiques sont dosées dans un spectrophotomètre à 410nm (6405 UV : Vis Jenway). Afin de détecter toute hydrolyse du substrat d'origine non enzymatique, les mesures sont effectuées contre un témoin réalisé en remplaçant l'extrait enzymatique par l'eau distillée et incubé dans les mêmes conditions.

Une unité enzymatique est la quantité d'enzyme capable de libérer une μ mole de *p*-nitrophénol par minute.

L'activité A est mesurée selon la formule suivante :

$$A(\text{UI/L}) = \frac{\Delta DO/mn \times \text{volume de l'enzyme}(1,5\text{ml})}{12,75 \times \text{vol total de l'essai}(3\text{ml})} \times 1000$$

12.75 Correspond au coefficient d'extinction molaire du *p*- Nitrophénol à pH 8.

6-2-2 Test de Duncombe :

L'activité lipolytique est aussi déterminée par le test de Duncombe (1962). Dans ce test l'activité lipolytique est détectée en présence du substrat naturel des lipases, l'huile d'olive riche en trioléine (triglycéride).

Les acides gras produits par hydrolyse de la trioléine (huile d'olive) en émulsion sous l'action de la lipase, sont extraits par un solvant organique, l'isooctane. Leur présence est révélée par un réactif coloré acétate de cuivre-pyridine. Ce dernier est préparé en additionnant l'acétate de cuivre à la pyridine à raison de 5% (wt/v). Le complexe formé entre les acides gras et le réactif donne une coloration verte.

On mélange 10ml de l'extrait enzymatique à 10ml de l'émulsion de la trioléine préchauffée à 47°C, afin de déclencher la réaction pendant 15mn. Ensuite la réaction est arrêtée par l'ajout de l'acide chlorhydrique concentré. Dans un tube à essais la solution est additionnée de 5ml d'isooctane, et agitée délicatement pendant 2mn.

Après écoulement du temps d'agitation, le tube est mis dans de l'eau bouillante jusqu'à séparation des deux phases. La phase organique est prélevée et mélangée avec le réactif acétate de cuivre -pyridine pendant 2mn, suivie par une lecture au spectrophotomètre à 710nm.

6-3 Effet du pH, de la température et du NaCl sur l'activité lipolytique :

Tous les essais sont réalisés par l'utilisation du *p*-NPP comme substrat et l'activité est dosée par spectrophotomètre selon la méthode de Kordel *et al.*(1991) contre le témoin.

6 -3-1 Effet du pH sur l'activité lipolytique :

La solution de Tris HCl à 50mM ajusté à différentes valeurs de pH de 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10, a été utilisé pour déterminer l'optimum de pH pour lequel l'enzyme est active à 40°C.

6 -3-2 Effet de la température sur l'activité et la stabilité des enzymes lipolytiques :

Afin de déterminer la température optimale de l'activité lipolytique, la solution tampon est ajustée au pH optimal, et le dosage de l'hydrolyse du *p*-NPP est effectué après incubation des mélanges réactionnels pendant 5mn aux différentes températures suivantes : 30°,40°,50° ,60° , 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, 110°C, 120°C, 130°C et 140°C.

Concernant l'effet de la température sur la stabilité, les extraits enzymatiques sont pré-incubés pendant une heure à différentes températures : 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C et 80°C. Ensuite l'activité des surnageants pré-incubés est déterminée dans les conditions habituelles à la température optimale de l'activité lipolytique.

6-3-3 Effet du NaCl sur l'activité lipolytique :

Dans le but de déterminer la concentration en NaCl requise pour une activité optimale des enzymes lipolytiques, le surnageant récupéré des cultures décrites auparavant est dialysé contre 10mM du tampon Tris-HCl, pH 7 pendant une nuit à 4°C dans le but d'éliminer le sel. Le dosage de l'activité enzymatique se fait en ajoutant différentes concentrations en NaCl (1 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 et 5 M) au dialysat obtenu, et qui représente l'extrait enzymatique, ainsi qu'au témoin. La dégradation du *p*-NPP à 410 nm contre le témoin est mesurée au pH optimal et à la température optimale de la réaction.

6-4 Effet des effecteurs sur l'activité lipolytique :

6-4-1 Effet du PMSF, de l'ésérine, du SDS et de l'EDTA sur l'activité lipolytique :

L'effet de différents effecteurs PMSF (Sigma), ésérine (Sigma), le SDS et l'EDTA a été testé sur les activités lipolytiques. Les surnageants sont pré-incubés en présence d'un des effecteurs pendant 30mn, 60mn et 120mn à 40°C. Les effecteurs sont ajoutés à une concentration finale de 1mM, excepté l'EDTA qui est ajouté à une concentration de 0,5mM aux extraits enzymatiques.

Le PMSF et l'ésérine sont solubilisés dans l'isopropanol. Le SDS et l'EDTA sont solubilisés dans une solution Tris HCl à 50mM ajusté à pH 8.

Les résultats sont exprimés en p.100 de l'activité de l'extrait enzymatique non additionné d'effecteur et placé dans les mêmes conditions.

6-4-2 Effet des ions métalliques sur l'activité lipolytique :

L'effet des ions métalliques Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} a été testé sur l'activité lipolytique. L'extrait enzymatique est incubé en présence d'une concentration de 1 mM d'ions sous forme de chlorures en solution dans le tampon Tris HCl à 50mM, pH 8. ($MgCl_2$, $CuCl_2$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $HgCl_2$, $MnCl_2$). Le dosage de l'activité est effectué après incubation pendant 30mn, 60mn et 120mn à 40°C.

L'activité lipolytique résiduelle est déterminée et exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique dans un milieu réactionnel sans ion.

Résultats et discussion.

III- Résultats et discussion :

1-Isolement des souches d'actinobactéries thermo-halophiles :

Parmi les environnements extrêmes, les sebkhas algériennes représentent une source importante de la flore extremophile qui mérite d'être exploitée dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules bioactives. Ces sebkhas ont fait l'objet de quelques investigations tel que le lac d'El-Goléa, qui a été étudié notamment pour l'isolement de la flore halophile appartenant particulièrement au domaine des Archaea (Hacène *et al.*, 2004). En revanche les espèces d'actinobactéries n'ont fait l'objet que de peu de considérations.

Dans cette perspective nous avons ciblé l'étude de cinq sebkhas algériennes : la sebkha de Djelfa, d'Oran, de Msila, d'El-Goléa et chott Melghir, pour l'isolement de la flore d'actinobactéries thermo-halophiles. Sur les cinq sites de prélèvement, nous sommes parvenus à isoler un total de cinq souches seulement d'actinobactéries à partir d'un seul site, à savoir le chott Melghir. Toutefois, les autres sites contenaient des bactéries et des champignons, qui ont été écartés, car ils ne font pas partie de l'objet de notre travail.

Ces résultats sont similaires à ceux de Kademi *et al.* (1999). Les auteurs ont isolé à partir de 39 échantillons de sol 33 souches de bactéries thermophiles, avec une moyenne d'une souche par échantillon de sol. Sur les 39 échantillons, dix ne contenaient aucune souche thermophile. Dans une autre étude menée en Tunisie, sur neuf souches isolées à partir d'échantillons de sol, trois souches seulement étaient thermophiles (Allais, 1987).

Les cinq souches ont été toutes isolées du sol de chott Melghir, à une température de 55°C et en présence d'une concentration de 10% (1,71M) en NaCl. Aucune souche n'a été isolée des échantillons d'eau des différents sites. Des résultats similaires ont été observés, dans un lac salin de Quinghai en Chine où aucune souche d'actinobactéries n'a été isolée de l'échantillon d'eau (Cai, 2009). Cela peut s'expliquer par le fait que les actinobactéries soient connues pour être abondantes dans le sol qui est considéré comme leur habitat principal (Davies et Williams, 1970). Probablement en raison de l'abondance de la matière organique dans le sol, en effet les actinobactéries sont dans leur majorité chimio-organotrophes.

Il faut signaler que nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour l'isolement des souches d'actinobactéries thermohalophiles et plusieurs enrichissements ont été nécessaires en utilisant différents milieux de culture. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats des études abordées sur les extremophiles et qui ont démontré que l'accès limité à la majeure partie des espèces des environnements extrêmes est directement lié au fait qu'ils soient difficiles à isoler et à cultiver. Il est également admis que les microorganismes extrémophiles sont peu étudiés et exploités, en raison du fait que ceux-ci seraient moins abondants dans la nature (Lazzarani, 2000 ; Rainey et Oren, 2006).

Les difficultés que nous avons rencontrées pour l'isolement d'un nombre restreint des souches isolées peuvent être attribuées à divers facteurs. Tout d'abord, l'hyper-salinité caractéristique

des sebkhas a exercé un stress important, ce qui a limité le nombre d'espèces d'actinobactérie sebkhas a exercé un stress important, ce qui a limité le nombre d'espèces d'actinobactérie isolées. Cela est en corrélation avec le fait que dans les environnements extrêmes, le développement des microorganismes diminue quand le stress environnemental augmente (Rodriguez-Valera, 1985).

D'autre part la flore d'actinobactéries des sebkhas étudiées au cours de ce travail, a été sous soumise à un deuxième facteur de stress, à savoir la température élevée de 55°C, déterminée lors de l'étude expérimentale pour l'isolement des actinobactéries thermo-halophiles. Il est admis qu'en présence de plusieurs facteurs de stress, la susceptibilité des microorganismes vis-à-vis de ces facteurs s'accroît (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995). Le faible nombre d'espèces isolées peut s'expliquer par la difficulté d'adaptation des ces bactéries à la double contrainte du sel et de la température élevée.

Récemment encore, il était évident que les actinobactéries filamenteux, ne pouvaient coloniser des niches écologiques caractérisées par des conditions extrêmes, notamment de température et de salinité. Ils étaient considérés inaptes à tolérer l'impact des facteurs de stress (Zenova, 2009).

D'autre part, les conditions climatiques des sites de prélèvement est autre facteur influençant le développement des actinobactéries thermo-halophiles, notamment la température, qui est l'un des facteurs les plus important affectant la croissance et l'activité des microorganismes (Mansour, 2003 ; Manucharova, 2008).

A El-Oued où se situe le chott Melghir, les températures sont les plus élevées par rapport aux autres sites, caractérisés par un climat tempéré, ce qui a probablement favorisé le développement des souches d'actinobactéries thermo-halophiles. Xu *et al.*, (1996) ont démontré que les actinobactérie thermophiles sont plus abondants dans des zones où les températures sont élevées et vice versa. En revanche, à El-Goléa, où le climat est similaire à celui de chott Melghir, aucune souche n'a pu être isolée de ce site.

De tous ces facteurs cités, l'effet combiné des deux facteurs de stress, l'hyper-salinité de l'écosystème et la température élevée imposée lors de l'étude expérimentale constitue les principaux facteurs limitant la proportion des souches isolées. Nous pouvons donc nous interroger si l'apparente absence des actinobactéries dans les sites de prélèvement, est du au fait des conditions extrêmes. Ce groupe de bactéries serait inapte à se développer dans de telles conditions, ou à des biais dans les méthodes de culture que nous avons suivies et qui ont abouti à l'isolement d'un nombre limité de souches d'actinobactéries. La faible fréquence d'isolement des actinobactéries se développant dans des conditions extrêmes de température et de salinité, ne signifie pas qu'elles n'existent pas, mais qu'il est nécessaire de développer d'autres techniques plus performantes et plus adaptées à leur isolement. Comme par exemple techniques de culture qui tendent à simuler au mieux les conditions de l'environnement, notamment en terme de disponibilité des nutriments. Ces méthodes peuvent impliquer une composition des milieux plus proche des conditions *in situ*.

2- Identification des souches des souches d'actinobactéries isolées :

2-1 Etude des caractères cultureux et morphologiques :

Les colonies isolées présentent les caractères généraux des actinobactéries filamenteux, à savoir la formation de colonies distinctes, qui présentent un aspect filamenteux par la formation d'un mycélium aérien à la surface du milieu solide observé au microscope optique.

Les souches isolées ont été désignées comme suit : SAMIII, SMIIA, SMB5, PC5, SMG.

Les souches SAMIII, SMIIA ont été isolées sur le milieu ISP2 additionné de 10% NaCl et incubées à 55°C après 48h d'incubation. L'observation morphologique des deux, révèle que les deux souches forment, un mycélium aérien abondant de couleur blanche (figure 8, figure10), et un mycélium de substrat de couleur brune.

Sur milieu ISP2 à 0% NaCl, les mycélium aérien et de substrat changent de couleur et deviennent jaune. La couleur du mycélium de substrat des deux souches vire au noir après une longue période d'incubation.

La souche SMIIA produit un pigment de couleur brune sur milieu ISP2, par contre la souche SAMIII ne produit aucun pigment.

L'étude micromorphologique des deux souches SAMIII et SMIIA déterminée par microscopie électronique, révèle qu'elles produisent des spores à surface lisse. Les spores de la souche SAMIII sont de forme sphérique, portées au nombre de quatre à cinq sur le mycélium aérien. Par contre, les spores de la souche SMIIA ont une forme ovale, et portées à l'extrémité du mycélium aérien de structure non fragmenté (figure 9, figure 11).

Le milieu ISP5 additionné de 10% NaCl a permis l'isolement de trois souches désignées SMB5, SMG, PC5 ont été isolées. La souche SMG, forme un mycélium aérien et de substrat de couleur blanche. La souche SMB5 forme de grandes colonies de 2-3cm de diamètre, qui se développent après 5-7 jours d'incubation, les mycélium aérien et de substrat sont de couleur jaune pale.

En ce qui concerne la souche PC5 les colonies formées sont de petite taille à contour régulier, et les mycélium aérien et de substrat sont de couleur blanche.

Sur les milieux ISP2 et ISP5 additionné de 15%, 20% et 25% NaCl aucune souche n'a été isolée.

L'importance de la croissance, la couleur des mycélium aérien et de substrat des souches isolées, sur les différents milieux ISP1, ISP2, ISP4, ISP5 et la gélose nutritive, additionnés de 10% en NaCl sont résumés dans le tableau IV.

Tableau V : Caractères cultureux des souches isolées sur différents milieux.

	SAMIII	SMIIA	SMB5	SMI	SMG
Milieu d'isolement	ISP2	ISP2	ISP5	ISP5	ISP5
Concentration en NaCl	10%	10%	10%	10%	10%
Température d'incubation	55°C	55°C	55°C	55°C	55°C
ISP1					
Croissance	Bonne	Bonne	Faible	Bonne	Bonne
Mycélium aérien	Blanc	Blanc	Jaune pale	Blanc	Blanc
Mycélium de substrat	Blanc	Blanc	Jaune pale	Blanc	Blanc
ISP2					
Croissance	Bonne	Bonne	Faible	Bonne	Bonne
Mycélium aérien	Blanc	Blanc	Jaune pale	Blanc	Blanc
Mycélium de substrat	Blanc	Blanc	Jaune pale	Blanc	Blanc
ISP4					
Croissance	Faible	Faible	-	-	-
Mycélium aérien	Blanc	Blanc	-	-	-
Mycélium de substrat	Blanc	Blanc	-	-	-
ISP5					
Croissance	Faible	Faible	Bonne	Bonne	Bonne
Mycélium aérien	Blanc	Blanc	Jaune pale	Blanc	Blanc
Mycélium de substrat	Blanc	Blanc	Jaune pale	Blanc	Blanc
Gélose nutritive					
Croissance	Bonne	Bonne	Faible	-	-
Mycélium aérien	Blanc	Blanc	Jaune	-	-
Mycélium de substrat	Blanc	Blanc	Jaune	-	-



Figure 9 : Aspect macromorphologique de la souche SAMIII sur milieu ISP2 additionné de 10% de NaCl après 48 heures d'incubation à 55°C.

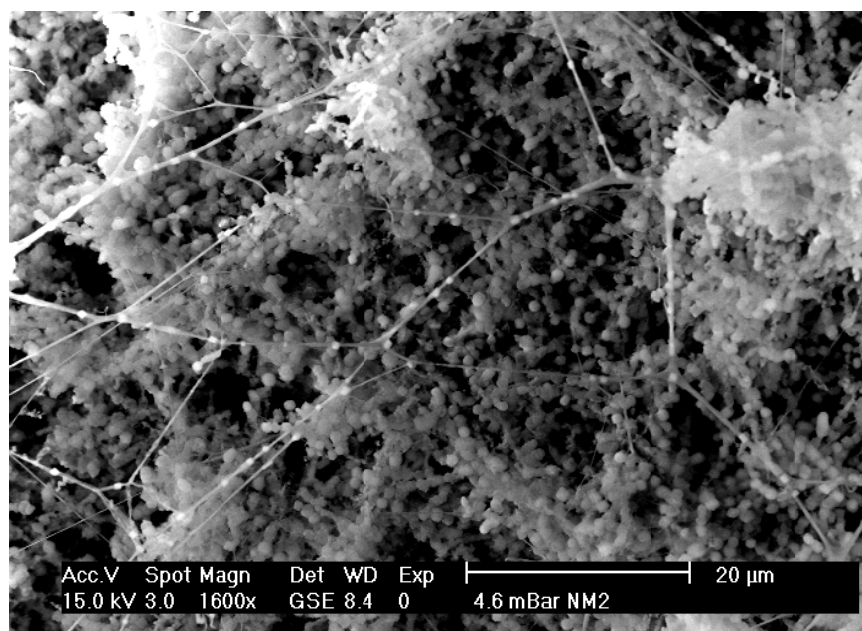


Figure 10 : Observation par microscopie électronique de la micromorphologie de la souche SAMIII se développant sur milieu ISP2 additionné de 10% de NaCl après 48 heures d'incubation à 55°C.



Figure11 : Aspect macromorphologique de souche SMIIA sur milieu ISP2 additionné de 10% de NaCl après 48 heures d'incubation à 55°C.

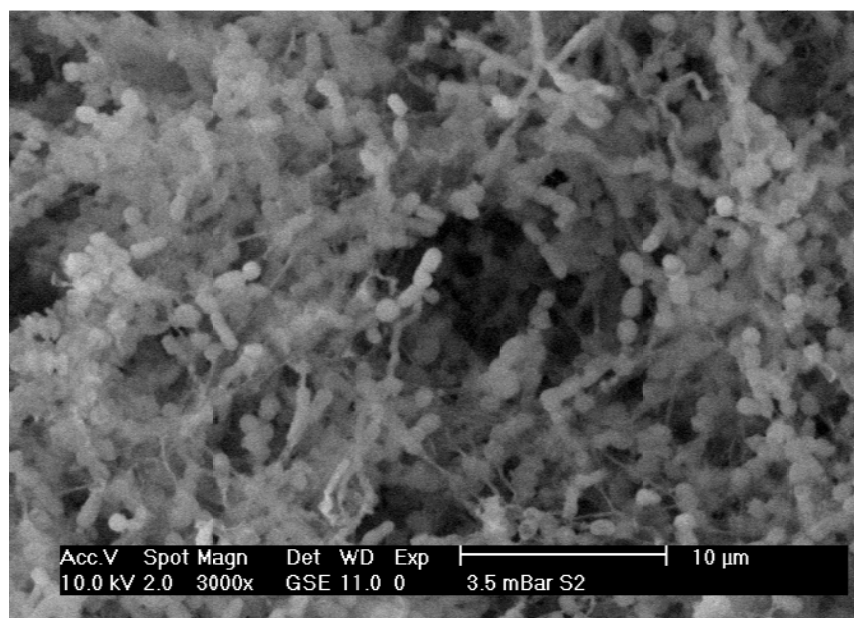


Figure 12 : Observation par microscopie électronique de la micromorphologie de la souche SMIIA se développant sur milieu ISP2 additionné de 10% de NaCl après 48 heures d'incubation à 55°C.

2-2-Identification moléculaire :

L'identification moléculaire par le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S, n'a porté que sur deux souches SAMIII et SMIIA. Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S représente une méthode précise et rapide pour la détermination de la position taxonomique d'un isolat (Lee *et al.*, 2002). Les méthodes d'identification moléculaire, particulièrement ceux qui sont utilisés pour la détermination des relations phylogénétiques sur la base des similitudes des séquences nucléotidiques, a eu un impact important sur la systématique des actinobactéries (Kim *et al.*, 1996, Cook *et Meyers*, 2003).

Les séquences complètes du gène codant pour l'ARN 16S ont été obtenues pour les souches SAMIII et SMIIA et ont montré l'appartenance des deux souches au genre *Saccharopolyspora* (Embley *et Goodfellow*, 1975). L'arbre phylogénétique a été établi selon la méthode neighbour-joining décrite par Saitou *et Nei* (1987) par alignement des séquences nucléotidiques de deux souches entre elles et avec celles des espèces les plus proches disponibles au GenBank.

La position des deux souches SAMIII et SMIIA sur l'arbre phylogénétique (figure 13) construit révèle qu'elles appartiennent à deux espèces différentes. Les séquences des deux souches SAMIII et SMIIA partagent 96% de similitude. La souche SMIIA montre un taux de similitude de 98% avec l'espèce *Saccharopolyspora* sp. ASL9. La souche SAMIII montre un taux de similitude 98% avec la souche *Saccharopolyspora* sp. smarlab. Les espèces les plus proches sont non décrites à ce jour.

L'ensemble des résultats de l'analyse phylogénétique montrent que les souches SAMIII et SMIIA appartiennent probablement à deux nouvelles espèces du genre *Saccharopolyspora*. Le genre *Saccharopolyspora* renferme 21 espèces décrites à ce jour fait partie de la famille des Pseudonocardiaceae (Embley *et al.*, 1988).

Selon le Bergey's manual of systematic bacteriology(2001), la classification des deux espèces est la suivante :

Domaine : Bacteria
PhylumBXIV: Actinobacteria.
Classe : Actinobacteria
Sous classe: Actinobacteridae.
Ordre: Actinomycetale.
Sous ordre: Pseudonocardineae
Famille :Pseudonocardiaceae
Genre : *Saccharopolyspora*

Au vue de ces résultats et de l'intérêt que présentent les nouvelles espèces quant à la production de nouvelles molécules. Les souches SAMIII et SMIIA ont particulièrement retenues notre attention. Nous les avons sélectionnées pour tester leur potentiel à produire des substances antibactériennes et des enzymes hydrolytiques d'intérêt biotechnologiques. Elles ont fait l'objet de caractérisation biochimique et physiologique.

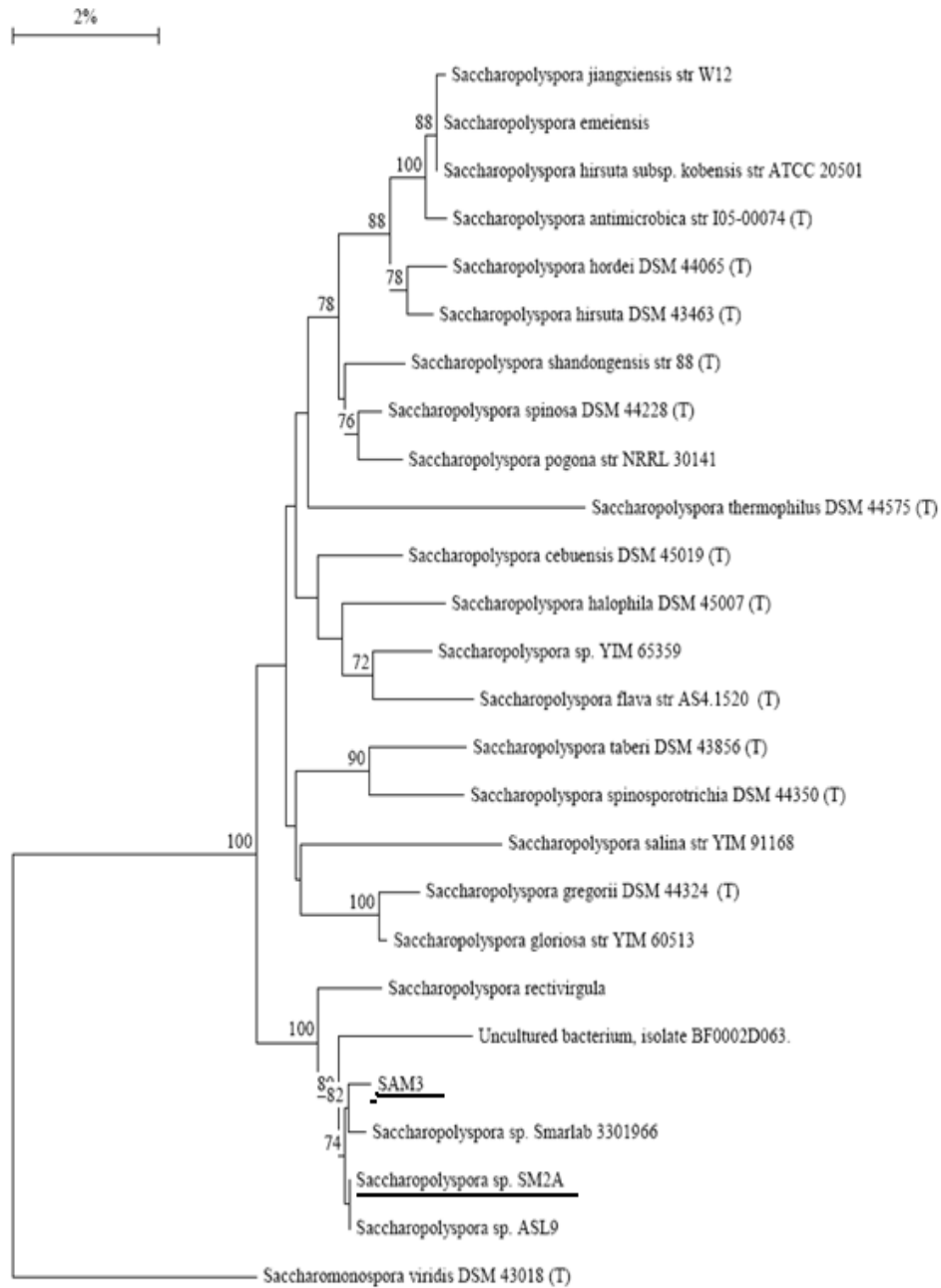


Figure13 :Arbre phylogénétique basée sur les séquences de l’ARN 16S selon la méthode neighbour-joining, montrant les relations phylogénétiques entre les deux souches SAMIII et SMIIA (SAM3 et SM2A), et entre les deux souches SAMIII et SMIIA et les espèces du genre *Saccharopolyspora*.

2-3-Etude des caractères physiologiques et biochimiques des souches SAMIII et SMIIA :

2-3-1 Etude des caractères physiologiques :

2-3-1-1 Etude de la tolérance à la température :

Les deux souches SAMIII et SMIIA se développent dans une gamme de température qui se situe entre 40°C et 55°C. Les auteurs définissent les organismes inaptes à se développer à des températures inférieures à 30°C comme thermophiles stricts (Xu *et al.*, 1996). Les deux souches SAMIII et SMIIA font donc partie de cette classe d'organismes thermophiles.

Par cette caractéristique les deux souches se différencient des autres espèces du genre *Saccharopolyspora* qui sont mésophiles, à l'exception de quatre espèces. *S. hirsuta* a une gamme de température pour la croissance qui se situe entre 25°C-50°C (Lacey et Goodfellow, 1975), *S. hordei* se développe entre 20°C et 60°C (Goodfellow *et al.*, 1989), l'espèce *S. rectivirgula* a une croissance à des températures qui se situe entre 37°C et 63°C. Ces quatre espèces sont donc thermo-tolérantes, contrairement aux deux souches SAMIII et SMIIA qui sont thermophiles strictes. Cette caractéristique les rapproche de l'espèce *S. thermophila* (45°C et 55°C) (Lu *et al.*, 2001). Celle-ci se différencie des deux souches SAMIII et SMIIA par de nombreux caractères phénotypiques et physiologiques notamment par la gamme de salinité tolérée (tableau VI)

2-3-1-2 Etude de la tolérance à la salinité :

Les souches SAMIII et SMIIA se développent à des concentrations en sel comprises entre 0% et 17%. Les deux souches se développent en absence de sel, et tolèrent des concentrations élevées. Cela permet de les classer selon Kushner (1978) parmi les organismes halotolérants, à l'opposé des halophiles strictes qui exigent le sel pour leur croissance. La concentration maximale en sel tolérée étant supérieure à 15% NaCl (2,5M), les souches SAMIII et SMIIA sont considérées comme extrêmement halotolérantes (Margesin et Schiner, 2001). Les espèces du genre *Saccharopolyspora* sont halotolérantes mais le maximum de la concentration en sel tolérée est de 15%. L'espèce de *Saccharopolyspora halophila* est la seule espèce halophile stricte (3% et 20% de NaCl) (Tang *et al.*, 2009). Ces résultats nous permettent de distinguer les souches SAMIII et SMIIA des autres espèces du genre *Saccharopolyspora* décrites. Par leur aspect halotolérant les souches SAMIII et SMIIA se rapprochent des espèces d'actinobactéries halophiles isolées des environnements salins.

Les espèces du genre *Nocardiopsis* tolèrent des concentrations élevées en NaCl, tel que *N. halophila* qui tolère jusqu'à 20% NaCl (Al-Tai et Ruan., 1994). *N. rosea*, *N. chromatogenes*, *N. baichengensis* se développent dans une gamme de NaCl entre 0%- et 18% (Li *et al.*, 2006).

Selon les auteurs, il est suggéré que les communautés bactériennes des environnements hypersalins sont capables de s'adapter au stress osmotique, provoqué par les changements brutaux de salinité, par une grande versatilité métabolique allant de l'halotolérance aux halophiles extrêmes (Ollivier *et al.*, 1994 ; Caton *et al.*, 2004).

L'examen de ces résultats montre que les souches SAMIII et SMIIA sont thermo-halophiles et représentent des espèces cohérentes avec les membres de la famille des *Pseudonocardiaceae* qui renferme des genres caractérisés par une grande diversité physiologiques (halophile, thermophiles, autotrophes, etc.) (Platas *et al.*, 1998).

Les deux souches SAMIII et SMIIA sont distinctes des autres espèces de *Saccharopolyspora* décrites par le fait qu'aucune de ces espèces n'est à la fois thermophile stricte et tolèrent des concentrations élevées en sel (Tableau VI).

Les souches SAMIII et SMIIA s'adaptent à deux facteurs de stress, elles font partie de ce qu'on appelle les organismes « polyextrémophiles » tels qu'ils ont été nommés par Rothshild et Mancilini (2001). Cette propriété est très peu commune chez les espèces du genre *Saccharopolyspora*.

Les espèces halophiles sont mésophiles comme *Saccharopolyspora halophila* qui a une bonne croissance en présence de 10% -15% en NaCl et à une température de 28°C-37°C (Tang *et al.*, 2009). L'autre espèce halophile *S. cebuensis* qui requièrent entre 3% et 20% NaCl, se développe à des températures comprise entre 15°-37°.

L'espèce thermophile de *S. thermophila* (45°C-55°C), et qui se développe dans une gamme de température similaire à celle des deux espèces SAMIII et SMIIA, tolère des concentrations en NaCl inférieure à 7% (Li *et al.*, 2001).

Les autres espèces du genre *Saccharopolyspora*, *S. hirsuta* (Lacey et Goodfellow, 1975), *S. hordei* (Goodfellow *et al.*, 1989), et *S. rectivirgula* (Korn-Wendisch, 1989) sont thermo-tolérantes et leurs exigences en NaCl ne dépassent les 12%.

Les deux souches SAMIII et SMIIA sont donc les deux seules espèces du genre *Saccharopolyspora* à être thermophiles strictes et tolèrent des concentrations élevées en NaCl allant jusqu'à 18%.

Bien que divers groupes physiologiques au sein des thermophiles, ex. acidophiles, neutrophiles, anaérobies, ont été étudiés et rapportés dans la littérature, peu d'informations sont disponibles pour les thermo-halophiles. La plupart des bactéries halophiles thermophiles étudiées ne tolèrent qu'une faible concentration de NaCl (Ollivier 1994).

Cela est aussi vrai pour les actinobactéries. La plupart des actinobactéries halophiles sont mésophiles. Parmi les espèces halophiles de *Nocardiopsis* isolées de sol salins en présence de 20% NaCl, *Nocardiopsis xinjiangensis* et *N. salina* et *N. kunsanensis* se développent ont dans une gamme température entre 20°C et 40°C (Li *et al.*, 2004 ; Chun *et al.* 2000). *Actinopolyspora halophila* ayant un optimum de croissance à une concentration de sel et de température de 20% et 37°C respectivement (Johnson *et al.*, 1986). L'optimum de croissance de *Streptomonospora alba* est de 10%-15% à 28°C (Li *et al.*, 2003a).

Il en est de même pour les espèces d'actinobactérie thermophiles connues, dont la pluparts sont non halophiles ou tolèrent qu'une faible concentration en NaCl. *Amycolatopsis thermoflava* se développe entre 28° et 55°C ne tolère que 5% de NaCl (Chun *et al.*, 1999). *Streptomyces thermocoprophilus* qui se développe entre 25°-55° est non halophile (Xu *et al.*, 1998).

Les organismes « polyextrêmophiles » appartiennent pour la plupart au domaine des Archaea (Rainey et Oren, 2006). La première bactérie thermo-halophile anaérobie *Halothermothrix orenii*, a été isolée de lac salin en Tunisie (chott el Gettar), celle-ci se développe de façon optimale à 60°C, et en présence de 5% à 10% NaCl, avec une concentration maximale de 20% (Cayol *et al.*, 1994). *Thermohalobacter berrensis* halophile modérée (2%-15% NaCl) et thermophile (65°C) a été également isolée de marais salant en France (Cayol *et al.*, 2000).

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau VI : Caractères différentiels entre les souches SMIIA et SAMIII et les autres espèce du genre *Saccharopolyspora* .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	SAMIII	SMIIA
Surface des spores	Lisse	épineuse	lisse	lisse	chevelu	lisse	lisse ou Irrégulièrement rugeuse	épineuse	épineuse	NA	Lisse	Epineuse	rugueuse	lisse	lisse	Lisse	lisse
Couleur mycélium aérien	B	Rs BR G B	B	B-J	B	B-J	J-O	G O BR J	BR R	In -J	In BF	In BF	B-BF-B	B	J-O-J	B	B
Couleur du mycélium de substrat	J B	O J R BR	J	I BF	I BF	I BF	J-O	G O J BR	BR R	I J	I BF	I BF	B BF Rs	B	O J	J	J clair
Couleur des pigments solubles	Rs	Y P O BR	aucun	aucun	R O J	aucun	aucun	I BR	BR	O R	aucun	BR	BF Rs BR	BR	aucun	B	aucun
Adénine	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	ND	ND
Caséine	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Chitine	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	ND
Hypoxantine	+	+	+	+	+	-	+	-	ND	+	-	+	+	-	+	ND	ND
amidon	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	ND	-	-	-
tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
xantine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND
Urée	-	+	-	-	+	-	+	+	ND	+	+	+	+	ND	+	+	+
NaCl tolérance % w/v	≤ 15	<5	<7	13	<7	< 13	<10	<11	2-3	7	<7	< 7	<7	2,5-12,5	3 -20	0-17	0-17
Gamme de température °c	20-45	20-42	28-37	10-35	25-50	20-60	37-63	15-37	28-37	20-45	45-55	15-38	20-45	15-37	10-45	40-55	40-55

Souches : **1**, *S. endophytica* YIM61095T(Qin *et al.*, 2008); **2**, *S. erythraea* NRRL 2338T(Labeda , 1987); **3**, *S. flava* AS 4.1520T(Lu *et al.*, 2001); **4**, *S. gregorii* NCIMB 12823T; **5**, *S. hirsuta subsp. hirsuta* DSM43463T(Lacey et Goodfellow, 1975); **6**, *S. hordei* NCIMB 12824T (Goodfellow *et al.*, 1989); **7** *S. rectivirgula* ATCC33515T(Korn-Wendisch *et al.*,1989); **8** *S. spinosa* DSM 44228T(Mertz et al., 1990); **9**, *S. spinosporotrichia* AS 4.198T(Zhou *et al.*, 1989) ; **10**, *S. taberi* DSM 43856T(Korn-Wendisch,1989). **11**, *S. thermophila* AS 4.1511T (Lu *et al.*, 2001); **12** *S. shandongensis* JCM 14614T(Zhang *et al.*,2008); **13** *S. antimicrobica* KCTC 19303T(Yuan *et al.*, 2008); **14**, *S. cebuensis* DSM45019T(Pimentel-Elardo *et al.*, 2008); **15**, *S. halophila* DSM 45007T strain YIM61095T(Tang *et al.*, 2009) . BF : buff; BR: brun ,In :incolore G :gris O :orange Rs :rose R :rouge B :blanc J :jaune

2-3-2 Détermination des caractères biochimiques :

Les deux souches ont des caractères en communs. Elles dégradent le glucose, l'adonitole, le sorbitol, le mellobiose, la tyrosine, et la gélatine. Produisent l'uréase, l'arginine dihydrolase, la lysine décarboxylase, et l'ornithine décarboxylase. Les deux souches diffèrent dans la dégradation du xylose, la production de l'ONPG, la citrate décarboxylase. La souche SMIIA dégrade le xylose, produit une β -galactosidase, et une citrate décarboxylase, contrairement à la souche SAMIII (Tableau VII).

La comparaison de l'ensemble des caractères phénotypiques, physiologiques, et biochimiques étudiés des souches SAMIII et SMIIA, les différencient entre elles et des autres espèces du genre *Saccharopolyspora*. Les caractères différentiels entre les deux souches SAMIII et SMIIA, et des autres espèces du genre *Saccharopolyspora* figurent sur le tableau VI, VII. .

Les deux souches forment des spores à surface lisse, ce qui les différencie de sept espèces de *Saccharopolyspora*. *S. erythrae*, *S. Spinosa*, *S. spinosporochita*, *S. shadongensis*, forment des spores à surface épineuse. *S. hirsuta* forme des spores à surface chevelu. Les spores de *S. rektivirgula*, *S. antimicrobica* sont à surface rugueuse.

La couleur du mycélium aérien est un autre caractère distinctif important. Les deux souches SAMIII et SMIIA forment un mycélium aérien de couleur blanche, les autres espèces ont des mycéliums de couleur rouge, rose, grise, jaune. A l'exception de quatre espèces sur les 23 décrites *S. endophytica*, *S. flava*, *S. hirsuta*, *S. cebuensis* dont le mycélium aérien est de couleur blanche. Ces dernières sont différentes des souches SAMIII et SMIIA par les concentrations en sel tolérées et qui sont inférieures à 15%, alors que les souches SAMIII tolèrent jusqu'à 17% de NaCl. Les quatre espèces sont mésophiles à l'exception de *S. hirsuta* qui est thermotolérante. *S. endophytica*, *S. flava*, *S. cebuensis* ne dégradent pas la caséine, contrairement aux souches SAMIII et SMIIA.

Les deux souches se différencient de l'espèce thermophile *S. thermophila* par de nombreux caractères : la forme des spores, la couleur des mycéliums aérien et de substrat, la dégradation de la caséine, la tolérance au NaCl. En effet *S. thermophila* ne tolère qu'une concentration inférieure à 7% NaCl.

Les souches SAMIII et SMIIA sont aussi différentes de l'espèce halophile *S. halophila*. Celle-ci est halophile stricte (3% et 20%) et mésophile (10°C-45°C), alors que SAMIII et SMIIA sont halotolérantes et thermophiles strictes.

En plus des données moléculaires, les caractères phénotypiques et physiologiques des deux souches SAMIII et SMIIA, montrent que ces deux souches appartiennent à deux nouvelles espèces du genre *Saccharopolyspora*.

Tableau VII : Caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques différentiels des souches SAMIII et SMIIA.

	SAMIII	SMIIA
Forme des spores	Sphérique	Ovoïde
Couleur du mycélium aérien	Blanc	Blanc
Couleur du mycélium du substrat	Blanc	Brun
Dégradation de :		
Glucose	+	+
Adonitole	+	+
xylose	—	+
Sorbitol	+	+
Mellobiose	+	+
Tyrosine	+	+
Gélatine	+	+
Production de :		
Citrate décarboxylase	—	+
ADH	+	—
LDC	+	+
ODC	+	+
ONPG	—	+
Urée	+	+
Gamme de température tolérée.	40°C-55°C	40°C-55°C
Gamme de NaCl tolérée.	0%-17%	0%-17%

3- Détermination de l'activité antibactérienne :

Les souches SAMIII et SMIIA ont été testées pour leur potentiel à produire des substances antibactériennes sur milieux solides et en milieu liquide.

3-1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu solide :

Après plusieurs essais, aucune activité antibactérienne n'a été observée par la méthode des disques d'agar, pour les deux souches SAMIII et SMIIA.

Par la méthode de la double couche d'agar nous sommes parvenus à la mise évidence d'une activité antibactérienne chez la souche SAMIII. Celle-ci a inhibé la croissance bactéries Gram positif : *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et Gram négatif : *Escherichia coli*. La zone d'inhibition est de 20mm de diamètre. La souche SAMIII est inactive contre *Pseudomonas aeruginosa*. Aucune activité antibactérienne n'a été observée chez la souche SMIIA.

L'activité antibactérienne de la souche SAMIII a été obtenue sur les milieux M1, M2, M4. Sur le milieu M3 la souche SAMIII est inactive. Il est admis et prouvé que le choix du milieu de culture est important pour la mise en évidence des activités antibactériennes (Iwai et Omura, 1982). En l'occurrence, la composition des différents milieux de culture utilisé n'a montré aucun effet significatif sur l'activité antibactérienne de la souche SAMIII, puisque le diamètre des zones d'inhibition est identique sur les trois milieux. Ces résultats sont en parfait désaccord avec ceux d'autres études sur les activités antagonistes des actinobactéries, notamment ceux de Ismet *et al.* (2004). Les auteurs ont noté des variations dans les diamètres des zones d'inhibition en fonction des même milieux utilisés dans notre étude (milieux M1, M2, M3, M4). De nombreux autres travaux ont montré que la composition du milieu influe sur l'activité antibactérienne. L'espèce *Actinopolyspora* sp. AH1 a une meilleure activité contre *Staphylococcus aureus* sur le milieu tyrosine agar, comparé à deux autres milieux testés. Cette même souche ne montrée aucune activité sur le milieu glycérol-asparagine agar (Kokare, 2004). Il en est de même pour l'espèce d'*Actinomadura* sp., qui est active sur cinq milieux différents, mais une meilleure production de la substance antibactérienne est obtenue sur deux milieux GYEA et ISP1 (Badji, 2004).

Sur les milieux M1, M2, et M4 additionnés de concentrations variables en sel (0%, 5% et 10%), on a observé que NaCl n'a exercé aucune influence sur l'action antagoniste. Cela ne concorde pas avec les résultats d'autres études relatives à l'effet du sel sur la production des antibiotiques. Le NaCl a été longtemps reconnu pour son effet favorable pour la production des antibiotiques, mais dans des mesures limitées. Généralement des quantités de l'ordre de 0,5% sont ajoutées aux milieux de production. Okami *et al.*, (1976) ont constaté une meilleure production de l'antibiotique aplasmomycin par *Streptomyces* en présence de 1% à 3% de NaCl. Nakata *et al.*, (1999) ont rapporté que la production de deux antibiotiques pyoluteorin et diacetylphloroglucinole par *Pseudomonas*, est nettement améliorée lorsque une concentration de 1% à 2,5% de NaCl est ajoutée au milieu.

La production de l'actinorhodin par *Streptomyces coelicolor* est optimale en présence de 2,5% de NaCl dans le milieu. Mais à des concentrations plus élevées (5%), la croissance ainsi que la production de l'antibiotique sont inhibées (Sevcikova et Kormanec, 2004).

Le fait que le sel n'ait aucun effet sur l'activité antibactérienne de la souche SAMIII serait en relation avec le caractère halotolérant de la souche, qui adapte son métabolisme aux variations de salinité. Certains auteurs ont évoqué l'existence d'une relation étroite entre l'activité antimicrobienne des actinobactéries et leur écosystème naturel (Facteurs physico-chimiques et biologiques) (Boughachiche *et al.*, 2005).

3-2 Mise en évidence de l'activité antibactérienne milieu liquide (méthode des disques en papier :

Afin d'approfondir l'étude sur la substance active de la souche SAMIII, et d'établir une cinétique de production, il convenait de produire la substance en milieu liquide. L'extraction par le n-butanol à partir des cultures liquides n'a permis d'obtenir aucune activité antibactérienne. Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques en papier imbibés de l'extrait butanolique. Ce résultat pourrait être attribué au fait que la souche ne produit pas de substance antibactérienne en milieu liquide. Il a déjà été rapporté dans la littérature que des souches d'actinobactéries produisent des substances actives seulement en milieu solide, et n'en produisent pas en milieu liquide. L'antibiotique fumaramidmycin est un exemple illustrant ce cas. Cet antibiotique produit par *Streptomyces kurssanovii*, est produit sur milieu solide, mais il ne l'est pas en culture liquide. Les auteurs ont suggéré que l'antibiotique est rapidement inactivé en milieu liquide (Maruyama *et al.*, 1975).

Lors d'une autre étude menée sur la production d'un antibiotique par *Streptomyces halstedii*, il a été observé que la souche était active de façon optimale sur milieu solide. Par contre le passage au milieu liquide n'a permis d'obtenir aucune activité.

Cependant, l'antibiotique purifié à partir du milieu solide et ajouté au milieu liquide, n'a pas été désactivé. Les auteurs ont conclu que ce cas est différent du précédent. Contrairement à la fumaramidmycin, l'absence de l'activité est plutôt due à l'absence de la production, et non pas à l'inactivation de l'antibiotique (Shomura *et al.*, 1979). Il a été noté qu'une relation existait entre la morphologie de la souche et la production de l'antibiotique. Le mycélium était branché sur milieu solide, où la production a eu lieu, par contre en milieu liquide il était fragmenté. La souche mutante qui ne forme pas de mycélium fragmenté en milieu liquide produisait l'antibiotique dans ce milieu (Shomura *et al.*, 1979). Il est aussi suggéré qu'en milieu liquide les nutriments varient avec le temps de la culture, alors que leur distribution autour des colonies sur milieux solides ne varient pas ou varient très peu (Badji *et al.*, 2005). Les raisons pour les quelles la souche SAMIII ne produit de substance active pas en milieu liquide reste à déterminer.

L'absence de la production de la substance antibactérienne par la souche SAMIII en milieu liquide a entravé l'étude plus approfondie. Nous avons focalisé notre travail sur les activités enzymatiques.

4- Criblage des activités enzymatiques :

La production des antibiotiques est considérée comme le rôle majeur des actinobactéries. En outre, leur capacité à produire une multitude d'enzymes, constitue un autre phénomène attractif chez ces procaryotes (Subramani et Rajesh, 2009).

Les deux souches SAMIII et SMIIA ont été testées pour leur aptitude à produire quatre enzymes hydrolytiques : la cellulase, l'amylase, la protéase et la lipase. Les deux souches produisent une protéase et une lipase, par contre elles sont dépourvues d'enzymes amylolytique et cellulolytique.

Sur le milieu à base d'amidon, aucune zone claire n'a été observée autour des colonies des deux souches SAMIII et SMIIA après l'ajout de lugol. Cela indique l'absence de l'enzyme amylase.

Les deux souches ne produisent pas la cellulase, puisqu'aucune zone claire n'a été détectée autour des colonies sur le milieu à base de cellulose.

Sur le milieu à base de caséine, une zone d'éclaircissement importante est observée autour des colonies des deux souches SAMIII et SMIIA, qui s'élargit avec le temps jusqu'à ce qu'elle atteigne la surface de la boîte. Cela est la preuve d'une activité protéolytique importante.

Les deux souches se sont développées sur le milieu minéral additionné d'huile d'olive comme seule source de carbone, aucune croissance n'a été observée sur milieu minéral témoin. Cela est témoin de la présence d'enzymes lipolytiques (lipases/estérases).

Les enzymes protéolytiques chez les actinobactéries ont fait l'objet de nombreuses études (Mohamedin, 1999), contrairement aux lipases produites par ce même groupe de microorganismes. Les enzymes lipolytiques sont d'importants biocatalyseurs pour les applications biotechnologiques, particulièrement celles produites par les extrémophiles (Arpigny *et al.*, 1998).

Les lipases bactériennes ont été longtemps étudiées, purifiées et caractérisées, notamment les lipases de *Staphylococcus* et *Bacillus* (Sommer *et al.*, 1997). Les lipases des actinobactéries quant à elles, n'ont pas bénéficié du même intérêt. Quelques espèces seulement du genre *Streptomyces*, ont fait l'objet d'études approfondies pour la production de lipases. Celles-ci incluent les lipases de *Streptomyces rimosus* (Abramic *et al.*, 1999), *Streptomyces lividans* (Peacock *et al.*, 2003) et *S. fradiae* (Zhang *et al.*, 2007).

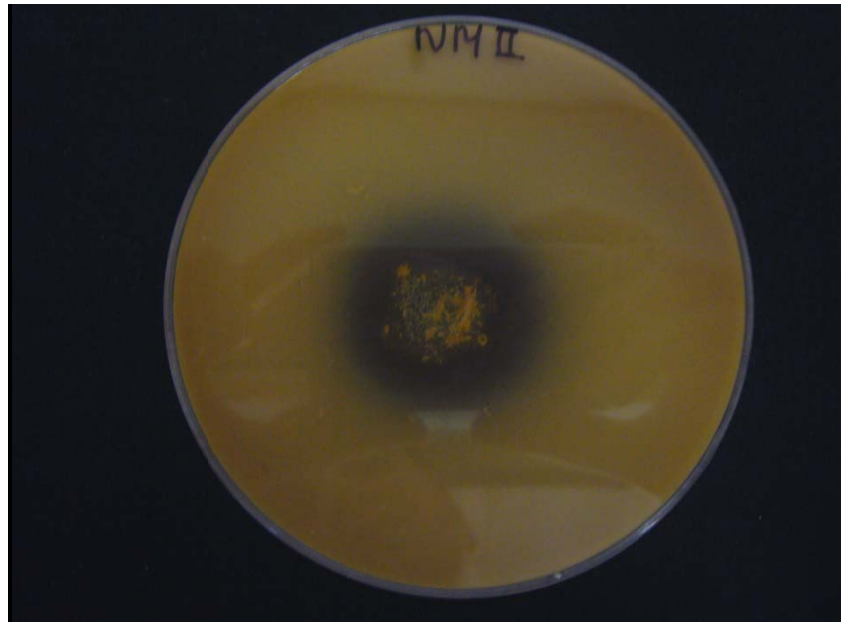


Figure 14 : Dégradation de la caséine par la souche SMIIA (ancien code NMII) sur milieu caséine –agar.

Le genre *Saccharopolyspora* quant à lui est largement exploité pour la production d'antibiotiques, néanmoins aucune étude sur la production d'enzymes particulièrement les lipases par ce genre n'a été menée à présent. Très peu d'études ayant été consacrées aux systèmes lipolytiques chez le genre *Saccharopolyspora*, une étude générale a été entreprise visant à caractériser ce type d'activités chez les deux souches SAMIII et SMIIA. Il nous a paru intéressant d'approfondir l'étude sur cette enzyme chez les deux souches. L'intérêt de ce choix se situe non seulement au niveau de l'importance de cette enzyme dans les réactions catalytiques, mais aussi par le fait qu'elle soit produite par des souches thermo-halophiles.

Lors de nombreuses études, il a été démontré que le screening ciblé d'un groupe de microorganismes à l'égard d'une propriété déterminée, avait un impact important sur l'isolement de nouveaux métabolites (Mitra *et al.*, 2008). Des études entreprises sur les bactéries halotolérantes en vue de tester leur potentiel à la production d'enzymes sous des conditions de température élevée, de large gamme de pH et de salinité, ont abouti à la découverte de nouvelles enzymes. Une nouvelle protéase a été isolée partir d'un nouveau membre des γ -proteobactria (Sana *et al.*, 2006), une nouvelle estérase (Sana *et al.*, 2007) et une ribonucléase ont été isolées chez les espèces du genre *Bizionia* (Sana *et al.*, 2008). A partir d'une archaea halophile *Natronococcus*, une nouvelle lipase halophile a été isolée pour la première fois (Boutaiba, 2006).

Nous rapportons ici, pour la première fois une caractérisation biochimique préliminaire d'enzymes lipolytiques chez le genre *Saccharopolyspora*.

5- Caractérisation biochimique préliminaire des enzymes lipolytiques :

5- 1 Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches SAMIII et SMIIA vis-à-vis du substrat synthétique *p*-NPP :

L'activité lipolytique a été mesurée par le dosage du *p*-nitro phénol apparue lors de l'hydrolyse *p*-NPC16 sous l'action de la lipase. Les souches SAMIII et SMIIA produisent des enzymes lipolytiques extracellulaires. Un taux d'hydrolyse de 28,5 UI et 6,68 UI a été détecté dans les surnageants des cultures de la souche SAMIII et SMIIA respectivement. Cela indique la présence d'une forte activité lipolytique, chez la souche SAMIII.

Les souches SAMIII et SMIIA montrent des activités lipolytiques en milieu contenant l'huile d'olive et le tween 80. Aucune activité lipolytique n'a été détectée dans les surnageants des cultures en milieu ISP2 exempt de source lipidique. Ce résultat montre que les deux enzymes lipolytiques sont inductibles. Les lipases sont généralement des enzymes inductibles, et sont produites en présence de source lipidique tels que l'huile d'olive, les tweens, les triglycérides etc. (Gupta *et al.*, 2004, 2007). Le choix de l'utilisation du tween 80 comme inducteur a été aguilé par plusieurs études qui ont montré que le tween 80 stimulait la production de d'enzymes lipolytiques chez de nombreuses espèces. Parmi lesquels, les lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus delemar*, *Geobacillus* sp. et *Bacillus* sp. (Gilbert *et al.*, 1991 ; Espinosa *et al.*, 1990; Abdel-Fattah, 2002, Sidhu *et al.* 1998).

La production de la lipase par *Burkholderia glumae*, est fortement induite par le Tween 80 et 85 (Boekema *et al.*, 2007). Les mécanismes impliqués sont pour la plupart inconnus. Il est suggéré que les tweens augmentent la perméabilité des membranes cellulaires, favorisant ainsi la libération des enzymes lipolytiques(Boekema *et al.*, 2007).

5-2 Détermination de l'activité lipolytique des souches SAMIII et SMIIA vis-à-vis du substrat naturel : la trioléine (Test de Duncombe) :

Le test de Duncombe (1966), réalisé afin de confirmer la présence d'une véritable lipase, par l'hydrolyse du substrat naturel, à savoir l'huile d'olive riche en trioléine, s'est révélé positif. Le dosage des acides gras libres à 710nm au spectrophotomètre a montré une forte activité chez la souche SAMIII, qui a fortement dégradé l'huile d'olive. Par contre cette activité était faible chez la souche SMIIA. Le résultat du test de Duncombe indique clairement la présence d'une véritable lipase chez la souche SAMIII, qui a dégradé l'huile d'olive, riche en triglycérides à longues chaînes. Une caractéristique typique des lipases (Abramic *et al.*, 1999). Contrairement aux estérases qui sont faiblement actives sur les triglycérides à longues chaîne carbonée. Ce qui nous amener à conclure que l'enzyme produite par la souche SMIIA est une estérase.

Afin de confirmer l'activité estérase de l'enzyme produite par la souche SMIIA, l'activité a été testée sur le *p*-NPC4, qui est un ester d'acide gras à courte chaîne (C4). L'enzyme a présenté une forte activité sur *p*-NPC4, en comparaison avec l'activité sur *p*-NPC16 (ester d'acide gras à longues chaîne), avec un taux d'hydrolyse de 75% et 25% sur *p*-NPC4 et le *p*-NPC16 respectivement. Tendant à montrer une plus forte affinité de l'enzyme de la souche SMIIA pour les esters d'acides gras à courtes chaînes, ce qui est caractéristique des estérases.

Ce résultat est intéressant, puisque que la production des enzymes lipolytiques est un caractère très peu fréquent chez les actinobactéries, ce qui a été démontré dans plusieurs études. Une étude récente menée sur 20 souches d'actinobactéries halotolérantes, en vue de tester leur potentiel à produire des lipases, a montré que seulement 3 souches en produisaient (Ginalakshmi *et al.*, 2008). Sur 526 souches d'actinobactéries criblées pour la production de lipases, trois étaient performantes et appartiennent toutes au genre *Streptomyces* (Cardenas *et al.*, 2001a). Dans une autre étude, il a été rapporté que sur 840 souches d'actinobactéries, 6% seulement produisaient des enzymes lipolytiques, parmi lesquels trois espèces avaient une forte activité à savoir *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces halstedii*, et *Streptomyces* sp. (Cardenas *et al.*, 2001b). Un résultat similaire a été observé dans une autre étude, qui a révélé que seulement 5 et 22 souches sur 532 et 230 souches d'actinobactéries testées pour l'activité lipolytique étaient actives (Hou, 1993 ; Hou et Johnston, 1992).

5-3 Caractérisation biochimique préliminaire de l'estérase de la souche SMIIA :

5-3-1 Effet du pH sur l'activité estérase de la souche SMIIA :

L'effet du pH sur l'activité estérase a été déterminé pour des valeurs de pH comprises entre 6 et 11. Comme le montre la figure 15, l'activité estérase est relativement faible à pH 6, puis elle augmente en fonction du pH. A pH relativement alcalin l'activité est élevée, elle est de 50% de l'activité optimale à pH 8 et atteint un maximum à pH 9. L'activité décroît rapidement quand le pH augmente au delà de 9 et l'enzyme perd plus de 80% de son activité optimale à pH10, cette activité s'annule complètement à pH 11.

L'estérase de la souche SMIIA entre donc dans la catégorie des estérases alcalophiles par son optimum d'activité à pH 9. Ce résultat n'est pas corroboré par les résultats des travaux menés par Fojan *et al.*, (2000). Les auteurs ont démontré par des études cristallographiques sur de nombreuses estérases, que celles-ci sont généralement actives à des pH neutres (aux environs de pH 6). Ce qui les différencie des lipases actives à des pH alcalins (Fojan *et al.*, 2000 ; Peterssen, 2000).

De nombreuses estérases confirment cette hypothèse. Les estérases de *Bacillus* sp., *B. stearothermophilus* ont des optima d'activité à des pH neutre (Ateslier et Metin, 2006; Henke et Bornscheuer, 2002). Il en est de même pour l'estérase de l'Archaea *Sulfolobus solfataricus*, active de façon optimale entre pH 6 et 7 (Kim et Lee, 2004).

L'optimum d'activité de l'estérase de la souche SMIIA est observé chez les estérases des espèces de *Streptomyces*. Parmi lesquelles l'estérase de *Streptomyces diastatochromogenes* dont l'optimum d'activité est situé entre pH 8 et 9 (Tesch *et al.*, 1996). *Streptomyces scabies* produit une estérase avec une activité optimale à pH 8 (McQueen et Schottel , 1987).

5-3-2 Effet de la température sur l'activité estérase de la souche SMIIA :

L'influence de la température sur l'activité estérase a été estimée dans une gamme de température qui s'étend entre 30°C et 70°C et à pH 9. Les résultats sont montrés sur la figure 16. L'enzyme présente un optimum d'activité à 40°C. Au-delà de cette température l'activité décroît, mais reste considérablement importante. L'enzyme conserve 80% de son activité optimale à 60°C et à 70°C l'activité est égale à 60% de l'activité maximale. Ce résultat suggère une haute thermostabilité de l'enzyme. L'enzyme est active dans une large gamme de température entre 30°C et 70°C. Toutefois, bien que l'enzyme soit active à des températures élevées, la température d'activité optimale est considérée faible dans le contexte où cette enzyme est produite par une souche thermophile.

Par cette température optimale d'activité, l'estérase de la souche SMIIA est comparable aux estérases produites par des microorganismes mésophiles tels que *Bacillus subtilis* (Kaiser *et al.*, 2006), et *Lactococcus lactis* (Tsakalidou et Kalantzopoulos, 1992).

Tandis que les estérases produites par les espèces thermophiles ont des optima d'activité à des températures élevées. Ainsi, l'espèce thermophile *Bacillus circulans* (50°C-55°C) produit des estérases dont l'optimum d'activité est de 50°C (Kademi *et al.*, 1999). *Bacillus brevis*, *B. licheniformis* et *Bacillus acidocaldarius* ont des activités lipolytiques maximales à 57-67°C (Fakhreddine *et al.*, 1998), et à 60°C respectivement (Manco *et al.*, 1992). L'espèce thermophile et halotolérante *Bacillus licheniformis* S-86, produit une estérase dont l'optimum d'activité se situe à 55°C (Torres *et al.*, 2009). Des enzymes lipolytiques actives de façon optimale à des températures élevées, ont également été isolées à partir de microorganismes mésophiles, telle que la lipase de *Bacillus megaterium* (37°C) et *Pseudomonas aeruginosa* (37°C), ayant un optimum d'activité à 55°C (Lima *et al.*, 2004 ; Pesaresi *et al.*, 2005)

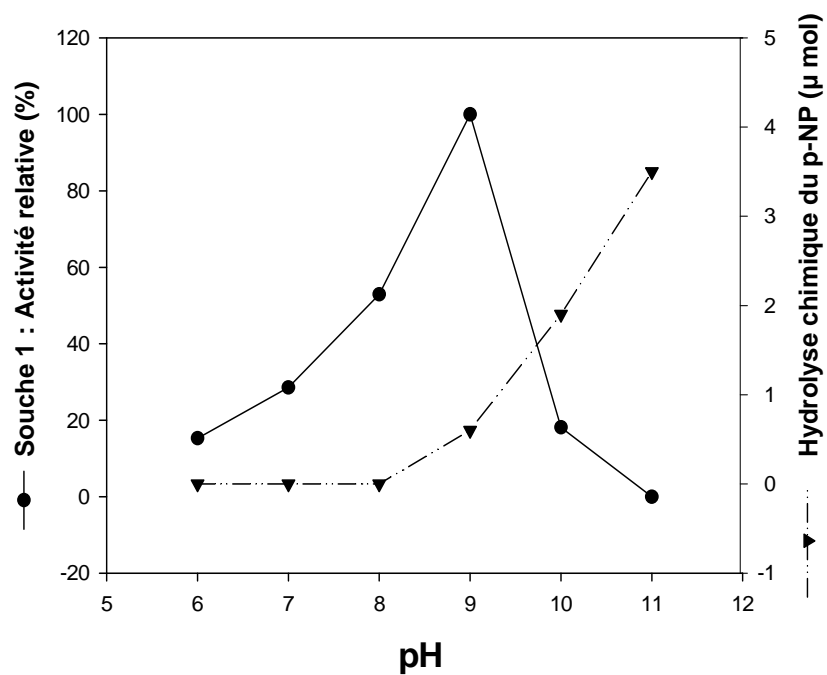


Figure 15 : Effet du pH sur l'activité estérase de la souche SMIIA.

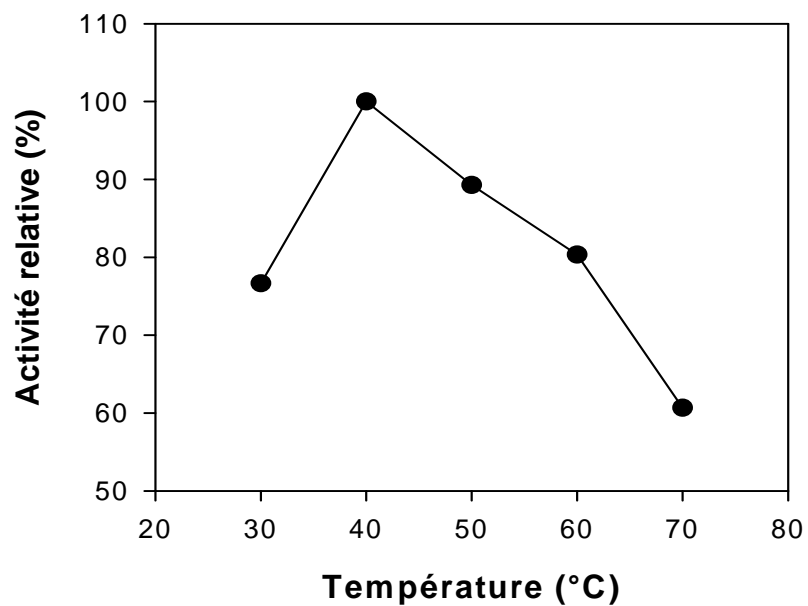


Figure 16 : Effet de la température sur l'activité estérase de la souche SMIIA.

5-3-3 Effet du NaCl sur l'activité estérase de la souche SMIIA :

L'effet du NaCl sur l'activité estérase a été testé sur les extraits enzymatiques dialysés dans une gamme allant de 0 M à 4 M, à pH 9 et à 40°C (figure 17). L'influence du NaCl sur l'activité est représentée sur la figure 17. L'enzyme est active en absence de sel. L'activité s'accroît en fonction la concentration du NaCl, et l'optimum d'activité se situe à 2M. Ensuite l'activité diminue, mais reste élevée à de fortes concentrations. L'estérase déploie des activités dans une large gamme de salinité, mais son activité est d'autant meilleure et optimale en présence qu'en absence de sel. En effet elle est de 50% de l'activité maximale à des concentrations de NaCl comprises entre 3 et 4M, alors qu'elle n'est que de 20% de l'activité optimale à 0M.

L'estérase produite par la souche SMIIA, déploie des activités dans une gamme de concentrations du NaCl, où se situent les exigences de la souche productrice halotolérante. La plupart des enzymes halophiles sont inactives à de faibles concentrations en sel (Mevarech, 2000), en revanche l'estérase de la souche SMIIA, demeure active en absence de sel. D'autres enzymes halophiles ont aussi cette capacité, tel que l' α -amylase de *Haloarcula hispanica*, active à de faibles concentrations en sel et son optimum d'activité se trouve à 4M NaCl. (Hutcheon *et al.*, 2005).

L'estérase produite par la souche SMIIA est sel-tolérante, appartenant à une famille d'enzymes typiquement susceptibles au sel. La plupart des estérases bactériennes tolèrent que de faibles concentrations de NaCl. L'estérase d'*Arthrobacter nicotianae* qui tolère une concentration maximale de sel de l'ordre de 0,8M NaCl (Smacchi *et al.*, 2000). L'estérase d'une souche de *Bacillus* sp. halotolérante, a un optimum d'activité en présence d'une concentration inférieure à 1M NaCl (Sana *et al.*, 2007; Karpushova *et al.*, 2005). *Bacillus licheniformis* S-86 produit une estérase qui ne conserve que 50% de son activité optimale en présence de 1M NaCl (Torres *et al.*, 2009b)

Les estérases fonctionnelles à de fortes concentrations en sel sont isolées à partir d'archaea halophiles extrêmes. Une estérase halophile stricte, isolée à partir de l'Archaea halophile *Haloarcula marismortui* est la première estérase à avoir fait l'objet d'une caractérisation biochimique, décrivant sa dépendance au sel. Celle-ci requière 3M KCl pour une activité optimale (Muller-Santos *et al.*, 2009). D'autres estérases halophiles ont été caractérisées, sont actives de façon optimale entre 3-4,5 M NaCl ont été isolées à partir d'Archaea halophiles extrêmes (Ozcan, 2009). Des estérases fonctionnelles à des concentrations élevées ont été rapportées dans une étude du métagénome d'un bassin hyper-salé. Des concentrations entre 2-4M de NaCl stimulaient les activités estérasiques (Ferrer *et al.*, 2005).

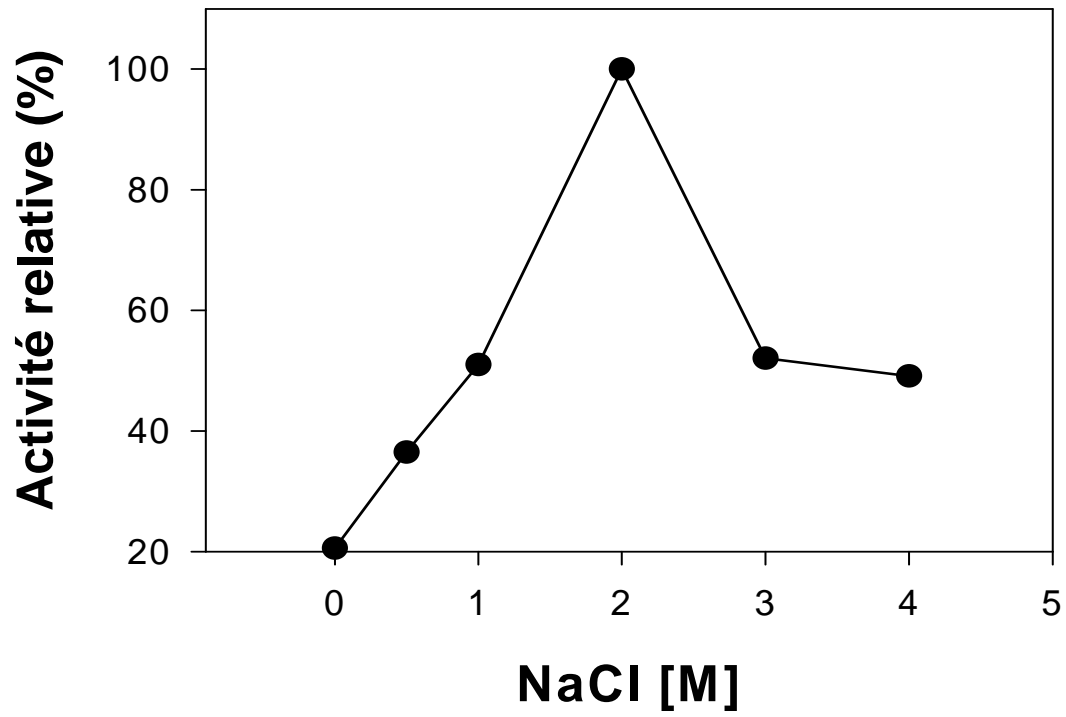


Figure 17 : Effet du NaCl sur l'activité estérase de la souche SMIIA.

5-3-4 Effet du PMSF et de l'ésérine sur l'activité estérase de la souche SMIIA :

Les inhibiteurs des hydrolases à sérine, le PMSF et l'ésérine ont fortement inhibé l'estérase de la souche SMIIA, cela indique que l'enzyme contient un résidu sérine ans le site catalytique. Elle fait donc partie de la famille des sérines hydrolases, à la quelle appartiennent les lipases, les estérases et les protéases. La plupart des estérases sont inhibées par le PMSF comme celles d'*Acinetobacter lwoffii* (Kim et Park, 2002), et de *Pseudomonas aeruginosa* (Pesaresi *et al.*, 2005). Néanmoins quelques estérases ne sont pas affectées par le PMSF, c'est le cas de l'estérase de *Bacillus licheniformis* S-86 (Torres *et al.*, 2009b).

Bien que de nombreuses estérases bactériennes et fongiques ont été isolées et caractérisées, telles que les estérases de *Bacillus* sp. (Kim *et al.*, 2004), *Pseudomonas* sp. (Kim *et al.*, 2002), *Micrococcus* sp. (Fernandez *et al.*, 2004), *Aspergillus* sp. (Giuliani *et al.*, 2001), *Humicola* sp. (Htzakis *et al.*, 2003). A présent peu d'informations sont disponibles sur les estérases des actinobactéries. Les études de ces enzymes n'ont porté que sur celles produites par le genre *Streptomyces*.

Parmi celles ci, deux cholestérol estérases de *Streptomyces lavendulae* et *Streptomyces* sp. X9, et quatre autres de *S. avermitilis* et *S. griseus* sont les plus connus des estérases des actinobactéries (Xiang *et al.*, 2007).

A notre connaissance aucune étude n'a porté sur des estérases chez le genre *Saccharopolyspora*. L'estérase isolée de la souche SMIIA est alcalophile et halotolérante à de concentrations élevées en NaCl (2M). Son utilisation en milieux organiques comme en milieu aqueux est potentielle.

5-4 Caractérisation préliminaire de l'activité lipase de la souche SAMIII :

5-4-1 Cinétique de la croissance et de la production enzymatique :

La production de la lipase a été menée en milieu liquide contenant l'huile d'olive, le tween 80 et additionné de 10% NaCl, sous agitation 160 rpm à 55°C. L'apparition et l'évolution de l'activité lipase en fonction du temps de la culture de la souche a été suivie pendant une période de 12 jours (figure 18). La production apparait liée à la croissance cellulaire. L'activité lipase est décelable dès le début de la croissance et une production maximale de l'enzyme est obtenue au 3^{ème} jour. Puis on observe que la production diminue légèrement et reste stable jusqu'au 5^{ème} jour, alors que la croissance est encore en phase exponentielle. Cette chute d'activité peut être attribuée à la production de protéases par la souche qui ont été à l'origine de la dégradation de l'enzyme lipase. Après les 5^e jour on remarque une chute du poids sec du mycélium accompagnée d'une diminution de l'activité lipolytique.

5-4-2 Effet du pH sur l'activité lipase de la souche SAMIII :

Les variations de l'activité lipase en fonction du pH ont été étudiées à des valeurs comprises entre 5 et 10. Les résultats sont rapportés sur la figure 19. L'enzyme présente une activité importante qui se situe dans un intervalle entre pH 8 et pH 9, avec un optimum d'activité à pH 8. Entre pH 4 et pH 7 l'activité est constante et faible, elle est de 32% de l'activité optimale. Aux valeurs supérieures à pH 9 l'activité chute brusquement, à pH 10 elle ne représente plus que 32% de l'activité optimale. Par son pH optimal d'activité, la lipase se rapproche des lipases d'origine bactérienne qui sont actives à des pH neutres ou légèrement alcalins (8-8,5), tel qu'il a été démontré par les travaux de Fojan (2000), Petersen (2001) et Bornscheuer (2002). C'est le cas des lipases produites par l'espèce thermophile *Bacillus* sp. (Sidhu *et al.* 1997), *Corynebacterium paurometabolum* (Joshi *et al.*, 2006), *Bacillus alcalophilus* et *Acinetobacter radioresistens*, dont les activités sont optimales à pH 10 (Chen, 1998, Ghanem *et al.*, 2000).

En revanche, la lipase produite par la souche SAMIII se distingue par son activité dans une zone étroite de pH, contrairement aux lipases bactériennes qui sont actives dans une gamme étendue de pH. La lipase de *Staphylococcus aureus* est active entre pH 6 et 10,5 (Horchani *et al.*, 2009). La lipase de *Pseudomonas cepacia* conserve son activité dans une gamme de pH variant de 3 à 11 (Sugihara *et al.*, 1992). La lipase de la souche SAMIII est comparable à celle produite par *Alcaligenes* sp. , active de façon similaire dans une gamme de pH étroite (8,5-9,5) (Mori *et al.*, 2009).

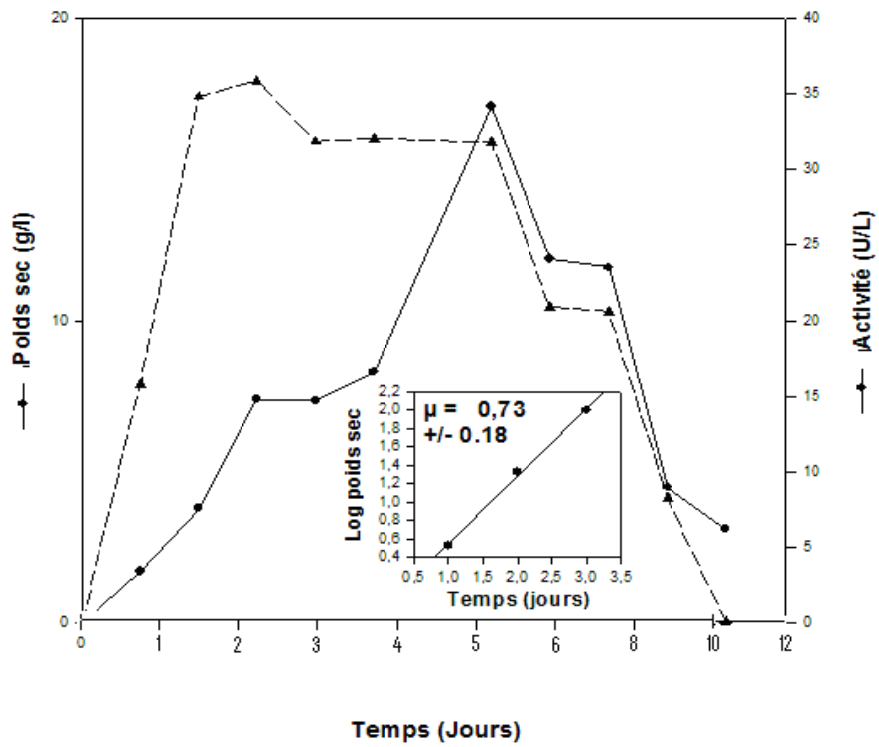


Figure 18 : Cinétique de croissance et de production de la lipase de la souche SAMIII

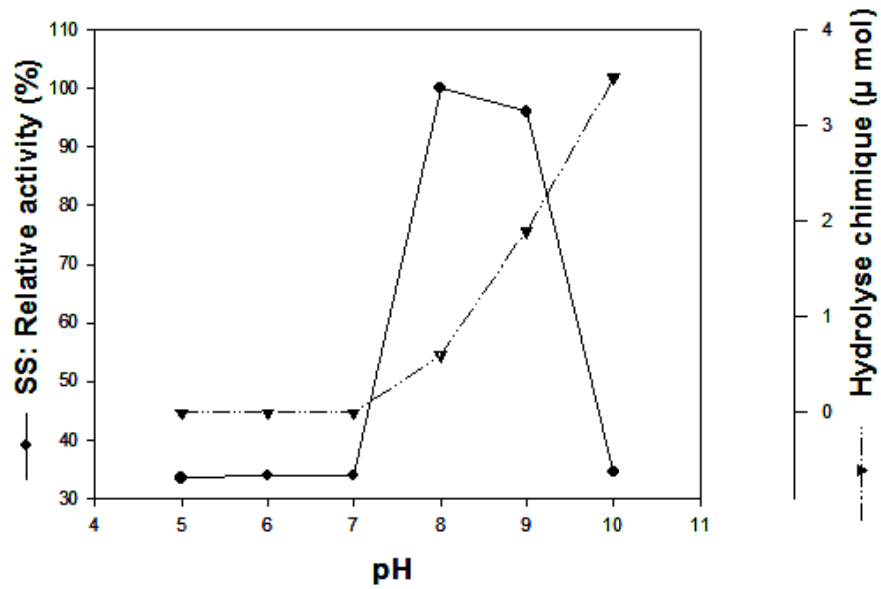


Figure 19 : Effet du pH sur l'activité lipase de la souche SAMIII.

5-4-3 Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la lipase produite par la souche SAMIII :

La recherche de la température optimale d'activité lipase a été testée dans une gamme comprise entre 30°C et 120°C et à pH8. Sur la figure 20, on observe une augmentation progressive de l'activité lipase en fonction de la température et l'optimum d'activité est atteint à 120°C. Ensuite on assiste à une diminution l'activité, mais celle-ci reste importante, à 130°C elle est de 90% de l'activité optimale. À 140°C l'activité est appréciable et elle est de 60% de l'activité maximale. La lipase est donc active dans une large gamme de température puisque l'activité à 40°C et à 140°C est de 50% et 60% de l'activité optimal respectivement.

L'enzyme a un optimum d'activité à 120°C alors que la souche productrice SAMIII ne se développe pas à des températures supérieures à 55°C. Il a souvent été démontré que les organismes thermophiles produisent des enzymes avec des optima d'activité à des températures supérieures aux températures maximales de la croissance du microorganisme producteur (Haki et Rakshit, 2003).

La figure 21 représente les résultats de la détermination de la stabilité de la lipase après incubation des extraits enzymatiques aux différentes températures entre 30°C et 80°C pendant une heure, puis mesure de l'activité résiduelle dans les conditions usuelles de dosage à 120°C. La lipase semble être thermostable. L'activité enzymatique reste stable pendant une heure à 40°C. Une légère diminution de la stabilité thermique se manifeste lors de l'incubation de l'enzyme à des T supérieures à 40°C, mais 70% de l'activité optimale subsiste après 1 heure d'incubation à 60° et 70°C. L'enzyme est totalement inactivée à 80°C pdt une heure.

La lipase de la souche SAMIII est exceptionnellement extrêmement thermoactive, ce fait est tout à fait rare, car les lipases sont communément actives à des températures entre 30°C et 60°C (Gupta *et al.*, 2004). Ainsi, la lipase recombinante de *Streptomyces fradiae* fonctionnelle à des températures élevées mais l'optimum de température ne dépasse pas 55°C (Zhang *et al.*, 2008), les lipases thermophiles de certaines espèces de *Bacillus* ont des optima d'activité à des températures aux environs de 55°C (Sinchakum *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999).

En outre, des enzymes lipolytiques actives à des températures extrêmes ont été décrites. Telles que la lipase de *Thermus thermophilus*, et l'estérase de l'Archaea *Archaeoglobus fulgidus* actives de façon optimale à 80°C (Fusinos, 2005 ; Manco *et al.*, 2000). L'estérase de l'archaea thermoacidophile *Sulfolobus tokodaii* ainsi que la lipase de *Bacillus* sp. THL027, ont des optima d'activité de 70°C (Suzuki *et al.*, 2004; Dharmstithi et Luchai, 1999). L'estérase de *Pyrobaculum calidifontis* active à 90°C (Hotta *et al.*, 2002).

La lipase produite par la souche SAMIII, s'est révélée être la plus thermoactive de toutes les lipases décrites jusqu'à présent. La température la plus élevée pour un optimum d'activité des enzymes lipolytiques rapportée jusqu'à présent, est de 96°C observée chez les des deux lipases Lip A et Lip B, produites par la bactérie anaérobie thermophile *Thermosyntropha lipolytica* (Salameh et Wiegel, 2007). L'autre enzyme lipolytique dont la température optimale d'activité est approximativement aussi élevée que celle de la lipase isolée dans cette étude, est l'estérase de l'Archaea *Pyrococcus furiosus* active à 100°C (Ikeda et Clark, 1998).

Il convient également de dire, que ces enzymes lipolytiques hyperthermophiles sont produites par des microorganismes hyperthermophiles, dont les optima de température pour la croissance est entre 52°C et 70°C pour *Thermosyntropha lipolytica* (Svetlitschny *et al.*, 1996), et 100°C pour *Pyrococcus furiosus* (Fiala et Stetter, 1986), contrairement à la souche SAMIII qui est thermophile modérée. Néanmoins, il a été déjà rapporté que des lipases thermophiles étaient produites par des espèces mésophiles telle que *Burkholderia cepacia* (Rathi, 2001). *Pseudomonas* sp. (37°C) produit une lipase dont l'optimum est à 90°C (Rathi, 2000).

La lipase de la souche SAMIII se distingue de toutes les lipases isolées par son optimum d'activité à 120°C, qui est à notre connaissance la température la plus élevée des températures optimales d'activité chez les lipases.

Elle peut être de ce point de vue comparée à d'autres enzymes hydrolytiques. Telles que la β -xylanase isolée d'ADN environnemental, active à un optimum de 100°C (Sunna et Bergquist, 2003), l' α -amylase de *Methanococcus jannaschii* $T_{opt}=120^\circ C$ et de *Thermococcus aggregans* $T_{opt}=100^\circ C$ (Canganella *et al.*, 1994), la xylanase de *Pyrodictium abyssi* $T_{opt}=105^\circ C$ (Andrade *et al.*, 2001) et de α -Glucosidase *Sulfolobus solfataricus* $T_{opt}=100^\circ C$ (Giuliano *et al.*, 2004).

La thermostabilité et la thermoactivité de cette lipase est une caractéristique importante, du fait que le fonctionnement des enzymes à haute température est avantageux pour les applications industrielles. La rentabilité des processus industriels à l'aide d'enzymes qui, en supportant la température élevées, doublent le taux de réactions, par conséquent la quantité d'enzyme utilisée diminue (Zamost *et al.*, 1991). L'utilisation d'enzymes thermostables et thermoactives issus d'organismes thermophiles, offre une alternative intéressante, qui permet d'économiser sur le temps et le coût des processus industriels, en éliminant les étapes d'immobilisation des enzymes utilisées afin d'améliorer leur thermo-stabilité (Zamost *et al.*, 1991). Aussi, les lipases thermophiles représentent un excellent modèle pour la compréhension des stratégies adoptées pour la thermostabilité et thermoactivité des protéines aux températures élevées, et un potentiel biotechnologique important (Salameh et wiegel, 2006).

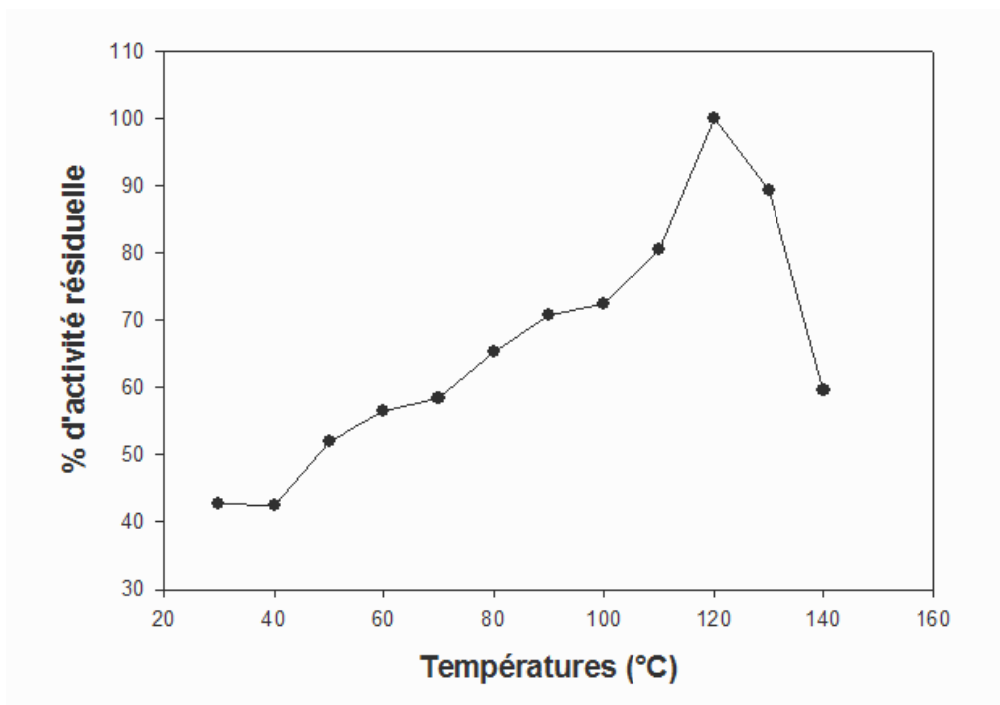


Figure 20: Effet de la température sur la lipase produite par la souche SAMIII.

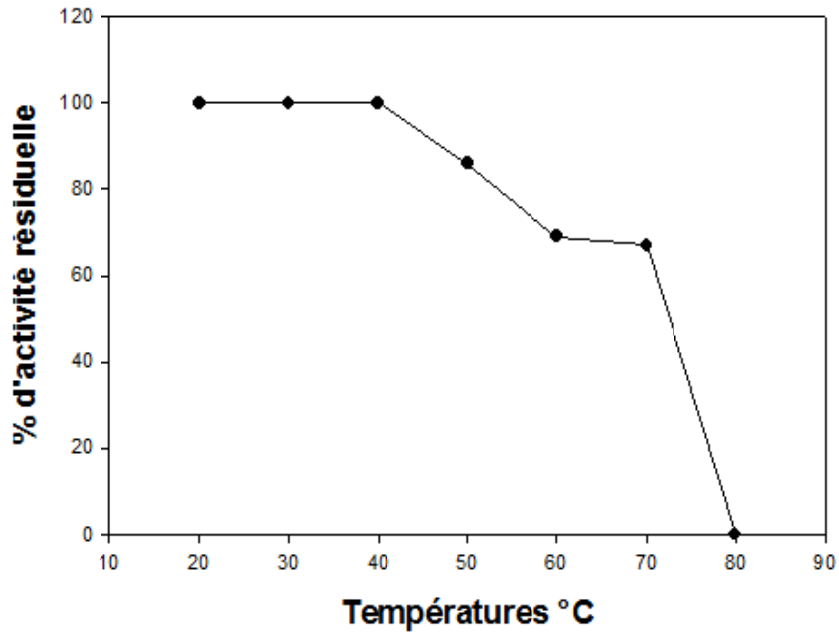


Figure 21 : Thermostabilité de la lipase produite par la souche SAMIII.

5-4-4 Effet du NaCl sur l'activité lipase de la souche SAMIII :

L'effet du NaCl sur l'activité lipase a été déterminé en utilisant les extraits enzymatiques dialysés. Différentes concentrations de NaCl entre 0M et 4,5M ont été testées sur l'hydrolyse du *p*-NPP, à pH 8, et à 120°C (figure 22). Aucune activité n'est observée entre 0M et 1M de NaCl. L'activité s'accroît en ajoutant des concentrations supérieures à 1M, jusqu'à ce qu'elle atteigne un optimum à une concentration de 3M. Une plus forte concentration en sel provoque une légère diminution de l'activité, mais elle reste importante. L'extrait enzymatique présente 80% de l'activité optimale lorsqu'il est soumis à une concentration de 4M, à 4,5 M l'activité obtenue représente encore 72% de l'activité maximale.

La lipase produite par la souche SAMIII est dépendante du sel, qui doit probablement être requis pour sa stabilité. Ceci est caractéristique des enzymes halophiles, qui requièrent des concentrations élevées pour leurs activité et stabilité, et sont dénaturées à des concentrations inférieures à 1M (Mevarech, 2000).

L'inactivité de l'enzyme en absence de sel, pourrait être due à une dénaturation de celle-ci. Car les enzymes halophiles sont généralement dénaturées à concentrations en sel en dessous de 1M (Madern *et al.*, 2001). Cette dénaturation peut être réversible ou non réversible. En l'occurrence, l'activité lipase a été restaurée en ajoutant des concentrations élevées en NaCl, aux surnageants dialysés. L'enzyme a donc été réactivée après avoir été soumise à de faibles concentrations en sel lors de la dialyse.

Le phénomène d'inactivation de l'enzyme à de faibles concentrations en sel, et son activation en présence de fortes concentrations présenté ici pour la lipase produite par la souche SAMIII, est peu fréquent chez les lipases, et n'a été mis en évidence que récemment. Il a été rapporté chez une lipase halophile isolée pour la première fois d'une *Archaea* halophile *Natronococcus*. Celle-ci requière 4M de NaCl pour une activité optimale, et aucune activité n'est observée en absence de sel (Boutaiba *et al.*, 2006).

Récemment, des *Archaea* ont été criblés pour la production d'enzymes lipolytiques, qui ont étudiés en présence de différentes concentrations en sel. Des résultats similaires à ceux obtenus par Boutaiba *et al.*, (2006) ont été observés. Les lipases étaient complètement inactive en absence de sel. L'activité augmentait en fonction de la concentration en NaCl jusqu'à 4M puis diminuait (Ozcan *et al.*, 2009). Ce phénomène a été aussi rapporté pour la première fois chez une estérase de *Haloarcula marismortui*, totalement inactive en absence de sel et a présente optimum d'activité à 3M (Muller-Santos *et al.*, 2009).

En outre, ce phénomène est observé chez d'autres enzymes halophiles. C'est le cas de la malate déshydrogénase de *Haloarcula marismortui* (Mevarech, 2000), la glucose déshydrogénase de *H. mediterranei* (Bonete *et al.*, 1996) et la glutamate déshydrogénase de *Halobacterium salinarum* (Hayden *et al.*, 2002).

La lipase de la souche SAMIII est sel-dépendante, elle présente ainsi le comportement des enzymes halophiles produites par les microorganismes halophiles extrêmes, alors que la souche SAMIII est halotolérante. La lipase montre une caractéristique spécifique à l'habitat, à savoir un habitat hypersalin, contrairement à l'estérase de la souche SMIIA, dont les caractéristiques sont spécifiques aux exigences de la souche productrice. Ceci démontre, avec d'autres résultats que les exigences en sel des enzymes halophiles ne sont pas forcément en corrélation avec les exigences des organismes producteurs. Ceci a été illustré chez plusieurs halozymes. Par exemple l'archaea halophile extrême *Haloarcula hispanica*, produit une α -amylase qui fonctionne à de faible concentration en sel (Hutcheon *et al.*, 2005). Plusieurs bactéries halotolérantes produisent des enzymes résistante au sel, tel que l' α -amylase produite par *Bacillus* sp, celle-ci est stable à 5M NaCl (Khire *et al.*, 1992).

La lipase produite par la souche SAMIII est différente des autres lipases connues par le fait qu'aucune des lipases halophiles décrites n'est active à une température aussi élevée que 120°C. les lipases halophiles isolées sont mésophiles (Boutaiba *et al.*, 2006), d'autres sont fonctionnelles à des températures élevées, avec un maximum de 65°C (Ozcan *et al.*, 2009). Une lipase thermohalophile a été isolée récemment à partir de l'espèce *Salinivibrio* sp., par contre celle-ci est active en absence de sel (Amoozegar *et al.*, 2009). Une enzyme dépendante de fortes concentrations en sel, et active à de hautes températures au environs de 130°C est représenté par la formyltransférase produite par l'archaea *Methanopyrus kandleri* (Ermler *et al.*, 1997; Shima *et al.*, 2003).

L'adaptation de la lipase produite par la souche SAMIII de forte concentration en sel, a due probablement contribuer à sa stabilité et activité à de haute température. Le sel est reconnu pour son effet protecteur sur macromolécules biologiques, notamment les protéines, contre la dénaturation provoquée par des températures élevées. Il a été prouvé par des études sur des enzymes et d'autres biomolécules halophiles que les fortes concentrations en sel stabilisaient ces molécules et amélioraient leur thermostabilité (Tehei *et al.*, 2002).

Ceci a été observé chez de nombreuses enzymes halophiles, telle que la lipase produite par *Natronococcus* sp. (Boutaiba *et al.*, 2006), et la glucose déshydrogénase de *H. mediterranei* (Bonete *et al.*, 1996). La thermostabilité de ces enzymes augmente en présence de fortes concentrations en sel. Suite à la détermination de la structure cristallographique de la malate déshydrogénase de *Haloarcula marismortui*, Dym *et al.* (1995) ont conclu, que plusieurs caractéristiques structurales conférant la stabilité de l'enzyme halophile, sont aussi impliquées dans sa thermostabilité.

Ces enzymes halophiles adaptées à fonctionner à de fortes concentrations en sel sont des biocatalyseurs appropriés pour des applications en milieux organiques, dès lors que ces milieux sont caractérisés par une faible activité d'eau, de façon similaire aux milieux hypersalés, et qui autorisant un rendement élevée (Ruiz et Castro, 2007).

Bien que des espèces halophiles modérées produisant des enzymes lipolytiques ont été décrites dans la littérature (Sanchez-Porro *et al.*, 2002 ; Martin, 2007 ; Rohban, 2009), très peu d'études se rapportent à l'effet du NaCl sur l'activité lipase, et un nombre limité d'enzymes halophiles a été isolé. La lipase décrite dans cette étude ouvre une nouvelle voie afin d'isoler et de caractériser les halozymes, particulièrement les lipases à partir des microorganismes halotolérants.

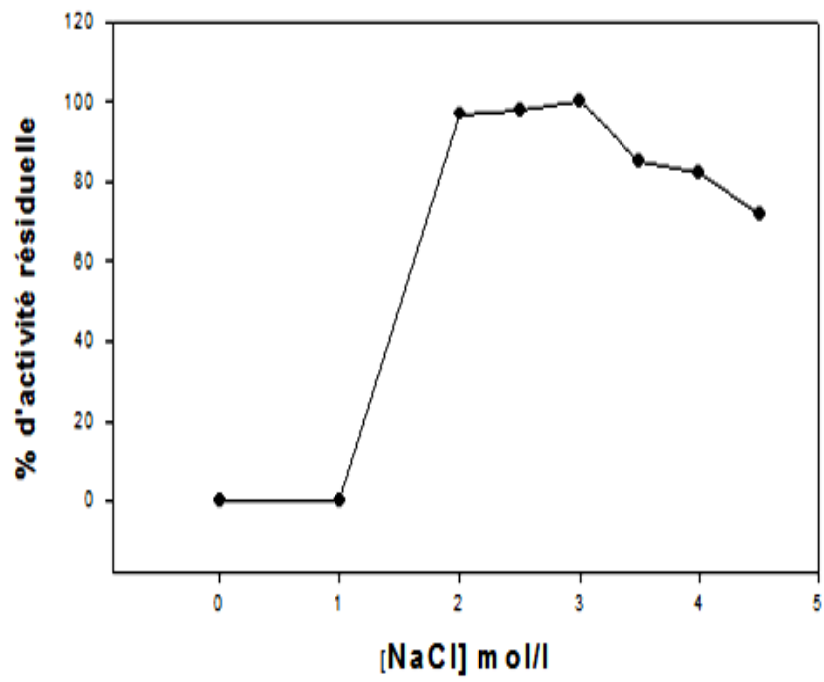


Figure 22: effet du NaCl sur l'activité lipase produite par la souche SAMIII.

5-4-5 Effet des effecteurs sur l'activité lipase de la souche SAMIII :

5-4-5-1 Effet du PMSF, de l'ésérine, du SDS et de l'EDTA sur l'activité lipase :

Les effecteurs sont des composés chimiques qui modifient les réactions enzymatiques et nous permettent d'acquérir d'importantes informations sur la structure et le mode d'action des enzymes. Dans ce contexte l'effet de divers effecteurs : le PMSF, l'ésérine, l'EDTA, et le SDS, a été testé sur l'activité lipase de la souche SAMIII. Les surnageants a été incubé en présence des effecteurs pendant 30mn, 60mn et 120mn, à 40°C. Les mesures de l'hydrolyse du *p*-NPP ont été effectuées dans les conditions optimales de la réaction (120°C, pH 8). Les résultats de cette étude sont rapportés sur le tableau VIII.

L'addition du PMSF à une concentration finale de 1mM à la préparation enzymatique a diminué l'activité de 18%, 20 % et 24% après 30mn, 60mn et 120mn respectivement. Le PMSF est un inhibiteur spécifique qui interagit directement avec le site actif des sérine hydrolases de manière irréversible (Gupta *et al.*, 2004). Ce résultat montre que l'enzyme possède un résidu sérine dans le site catalytique et est nécessaire à son activité, ce qui est caractéristique des lipases appartenant à la classe des sérines hydrolases. Certaines lipases sont revanche résistantes à l'inactivation par le PMSF. Aucune influence de 1mM de PMSF n'a été observée sur la lipase de *Bacillus thermocatenuatus* (Schmidt-Dannert *et al.*, 1996). Il en est de même pour la lipase produite par la souche *Pseudomonas* sp. ATCC 21808 (Kordel *et al.*, 1991).

Ce résultat est confirmé par l'effet de l'ésérine ou physostigmine qui réagit aussi avec la sérine du site actif. Ainsi l'ésérine a réduit l'activité lipase de 52% après 120mn.

Le SDS est un détergent ionique qui détruit les liaisons hydrogènes, hydrophobes et ioniques. Son action dénature les protéines et entraîne généralement la perte de l'activité enzymatique. Le SDS a eu un effet inhibiteur sur l'activité lipase, l'activité chute de 36% après 120mn.

La lipase a été sensible à une concentration de 0,5mM de l'EDTA qui est un chélateur de métaux. Celui-ci a réduit l'activité de 50%, suggérant que cette lipase est une métalloenzyme ou métallo-lipase (Kanwar *et al.*, 2006). Généralement l'EDTA n'influe pas sur l'activité des lipases (Gupta *et al.*, 2004). Toutefois des lipases bactériennes sensibles à l'EDTA ont été décrites, telles que les lipases produites par *Bacillus coagulans* (Kanwar *et al.*, 2006), *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 (Chakraborty et Raj, 2008), *Acinetobacter* sp. (Snellman *et al.*, 2002).

5-4-5-2 Effet des ions métalliques sur l'activité lipase :

L'effet de différents ions métalliques Mg^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} a été testé, sous forme de sels de chlorure. Les surnageants sont incubés en présence d'une concentration de 1mM des différents ions, à 40°C pendant 30mn, 60mn, et 120mn. La mesure de l'hydrolyse du *p*-NPP, s'effectue à 120°C et pH 8. Le tableau IX regroupe les résultats obtenus avec les différents cations testés.

Les ions Mg^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} augmentent légèrement l'activité, par contre le Ca^{2+} inhibe l'activité d'approximativement 50%. Le Co^{2+} , Cu^{2+} n'ont aucun effet significatif (tableau VII).

Le Ca^{2+} a exercé un effet inhibiteur sur la lipase de la souche SAMIII. Un résultat similaire a été observé chez la lipase de *Streptomyces fradiae* varK11 (Zhang *et al.*, 2008). En revanche, les ions divalents Ca^{2+} stimulent souvent l'activité lipasiques (Gupta, 2004). Ce cas a été observé chez la lipase d'*Acinetobacter* sp. RAG1. Cette lipase est fortement activée et stabilisée par le Ca^{2+} et perd 70% de son activité en absence du cation (Snellman *et al.*, 2002). D'autres lipases sont aussi stimulées par le Ca^{2+} , telle que la lipase de *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Pseudomonas* sp. KB 700A (Rashid *et al.*, 2001), et *Pseudomonas fluorescens* 2D (Makhzoum *et al.*, 1996). Dans le cas présent,

Contrairement à la majorité des lipases qui sont fortement inhibées par les métaux lourds (Patkar et Bjorkling, 1994), telle que la lipase de *Pseudomonas* sp. KB 700A (Rashid *et al.*, 2001), *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 (Chakraborty et Raj, 2008), la lipase de la souche SAMIII n'est pas affectée par les métaux lourds. Le Co^{2+} , le Cu^{2+} , et le Hg^{2+} ont amélioré l'activité. Celle-ci est de 20% supérieure à l'activité initiale en présence de l'ion Hg^{2+} . L'activité lipase de *Bacillus coagulans* MTCC-6375 est aussi améliorée par le Hg^{2+} , par contre cette dernière est inhibée par le Co^{2+} (Kanwar *et al.*, 2006). Ces résultats montrent que les ions métalliques ont des effets divers sur différentes lipases.

Tableau VIII : Effet des effecteurs sur l'activité lipase de la souche SAMIII.

	Concentration	Activité résiduelle (%)		
		30mn	60mn	120mn
Aucun		100		
PMSF	1mM	81,77	82,71	75,93
SDS	1mM	97,42	76,86	64,83
Esérine	1mM	67,75	49,29	48,71
EDTA	0,5mM	62,26	62,03	55,02

Tableau IX : Effet des ions métalliques sur l'activité lipase de la souche SAMIII.

	Concentration	Activité résiduelle (%)		
		30mn	60mn	120mn
Aucun		100	100	100
MgCl ₂	1mM	94,17	112,14	73,01
HgCl ₂	1mM	139,47	92,28	110,39
MnCl ₂	1mM	109,81	92,87	100,81
CoCl ₂	1mM	98,13	111,68	91,35
CuCl ₂	1mM	97,42	107,24	79,32
CaCl ₂	1mM	50,81	44,62	73,24

Différentes enzymes lipolytiques fonctionnant dans des conditions extrêmes ont été décrites et des lipases et estérases thermophiles ont été isolées (Demirjian *et al.*, 2001). L'estérase et la lipase de *Bacillus* sp. A30-1 sont alcalophiles et thermophiles (70°C-pH 9) (Wang et Saha, 1993; Wang *et al.*, 1995), il en est de même pour les lipases de *Pseudomonas* sp. (90°C, pH 11) (Rathi *et al.* 2000) et de *Bacillus thermocatenuatus* (Schmidt-Dannert *et al.*, 1996). D'autres enzymes halophiles ont des activités optimales à de hautes températures tel que l'amylase de *Halothermotrix orenii* (T_{opt} 65°C), et les protéases de *Pseudoaltromonas* sp (T_{opt} 55°C). Peu de lipases produites par les bactéries halophiles, et thermohalophiles ont été décrites.

L'estérase la lipase des deux souches SAMIII et SMIIA respectivement, se sont révélés particulièrement attractives. En effet l'estérase de la souche SMIIA est halo-alcalophile. La lipase de la souche SAMIII est originale. Elle est remarquable par le fait qu'elle cumule des adaptations à divers facteurs de stress, qu'on pourrait qualifier de conditions 'polyextrêmophiles'. La lipase est extrêmement thermoactive, halophile et alcalophile. Par l'ensemble de ces propriétés elle se distingue très nettement de toutes les lipases décrites. Un autre argument en faveur de l'originalité de cette enzyme est du fait qu'elle soit isolée pour la première fois à partir d'une espèce du genre *Saccharopolyspora*.

Ces résultats corroborent l'idée générale qui stipule que les enzymes des halophiles sont susceptibles de déployer des activités optimales dans des conditions extrême de température de pH et de salinité. Ainsi l'exploitation d'une variété de microorganismes halophiles produisant des enzymes hydrolytiques serait d'une importance primordiale pour la biotechnologie.

Grâce à ces caractéristiques remarquables la lipase et l'estérase décrites dans cette étude offrent la possibilité d'étendre le répertoire des lipases destinées aux multiples applications biotechnologiques. L'alcali-tolérance et la thermostabilité des lipases sont des caractéristiques appréciables pour leur exploitation industrielle (Kulkarni et Gadre, 1997). La plupart des processus industriels dans lesquelles les lipases sont utilisées, se déroulent à des températures supérieures à 70°C (Sharma, 2004). Certaines molécules découvertes chez les alcalophiles sont déjà utilisées dans la fabrication de détergents.

Conclusion.

Conclusion :

L'une des stratégies prometteuses pour la découverte de nouvelles molécules consiste en l'exploration d'environnements peu ou pas étudiés, tels que les environnements extrêmes. Cette voie a été choisie dans notre travail, dont l'objectif principal était l'isolement de souches d'actinobactéries thermo-halophiles susceptibles de produire des métabolites bioactifs originaux en vue de leurs applications en biotechnologie. Les conditions extrêmes de salinité des sebkhas en font un écosystème passionnant pour l'isolement de la flore extrêmophile potentiellement intéressante. Ainsi notre choix s'est porté sur ces environnements hypersalins. Cinq sebkhas algériennes ont été sélectionnées, la sebkha d'Oran, la sebkha de Djelfa, la sebkha de Msila, la sebkha d'El-Goléa et le chott Melghir. Celui-ci a été le seul site à partir duquel nous sommes parvenus à isoler les souches d'actinobactéries thermo-halophiles. Un total de cinq souches seulement a été isolé, à une température de 55°C et à 10% NaCl. Nous avons rencontré des difficultés pour l'isolement de ces souches thermo-halophiles, et plusieurs enrichissements ont été nécessaires. Cette difficulté est attribuée, à la double contrainte de l'hyper-salinité et la température élevée, à laquelle était soumise la flore d'actinobactéries ciblée. Les extrêmophiles ont fasciné les scientifiques depuis des décennies, néanmoins leur culture soulève des difficultés, ce qui a limité l'accès à la majeure partie des espèces colonisant les environnements extrêmes. La mise au point de milieux de culture originaux et le développement de stratégies de culture plus spécifiques et plus appropriées à ce genre de microorganismes reste primordial. Reste à savoir si l'absence des actinobactéries dans les sebkhas est liée au fait qu'ils soient moins abondants dans ces écosystèmes, ou bien qu'ils soient plus difficiles à cultiver.

Deux souches sur les cinq isolées, désignées SAMIII et SMIIA ont fait l'objet d'identification moléculaire par le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S. Cette identification a permis de les rattacher au genre *Saccharopolyspora*. Les résultats préliminaires de l'étude phylogénétique a montré que les deux souches appartiennent probablement à deux nouvelles espèces. Ce résultat est étayé par l'étude morphologique et physiologique. En effet un ensemble de caractères phénotypiques, physiologiques particulièrement la gamme de température et de salinité requises pour la croissance, distinguent nos souches des autres espèces décrites. Une étude moléculaire plus approfondie par l'hybridation ADN/ADN, serait utile afin de confirmer ce résultat.

Ce résultat est suffisant pour justifier la prise en considération de ce caractère comme critère de sélection de ces deux souches, en vue de tester leur potentiel à produire les métabolites bioactives. Car il est communément admis que de nouvelles espèces produisent probablement de nouveaux métabolites. Les deux souches ont fait l'objet de caractérisation biochimique et physiologique.

Les deux souches se développent dans une gamme de température de salinité comprise entre 40°C et 55°C, 0M-2,9M respectivement. Elles sont donc thermophiles strictes et extrêmement halotolérantes.

Les souches SAMIII et SMIIA ont été testées pour leur aptitude à produire des substances antibactériennes et des enzymes hydrolytiques extracellulaires.

Les résultats des tests d'antagonismes ont révélé, après plusieurs essais, que la souche SAMIII est active contre trois souches cibles sur les quatre utilisées. Par contre aucune activité n'a été détectée chez la souche SMIIA. Les essais de production de la substance active produite par la souche SAMIII en milieu liquide, ont été sans succès. Ceci est peut être dû au fait que souche ne produit pas la substance active en milieu liquide. Suite à ces résultats, aucune étude approfondie n'a pu être abordée. La suite de l'étude a porté sur le criblage des activités enzymatiques.

Quatre activités enzymatiques ont été recherchées : l'activité protéolytique, l'activité amylolytique, l'activité cellulolytique, et l'activité lipolytique. La production d'enzymes protéolytiques et d'enzymes lipolytiques a été mise en évidence chez les deux souches. A notre connaissance aucune étude n'a été consacrée aux enzymes lipolytiques chez le genre *Saccharopolyspora*. Ainsi, il nous a paru digne d'intérêt d'approfondir l'étude de cette enzyme chez les souches SAMIII et SMIIA. Nous avons rapporté dans cette étude, pour la première fois la caractérisation biochimique d'enzymes lipolytiques chez des espèces du genre *Saccharopolyspora*.

Il était extrêmement intéressant d'étudier ces enzymes chez nos souches, d'autant plus que ces dernières sont thermo-halophiles. Car la recherche de nouvelles hydrolases qui fonctionnent dans des conditions extrêmes est un domaine captivant. Vu les nombreuses applications potentielles de ces enzymes, grâce à leur compatibilité avec les conditions dans lesquelles s'effectuent les procédés biotechnologiques.

La caractérisation biochimique a révélé que les deux enzymes produites par les souches SAMIII et SMIIA particulièrement attractives. En effet, la souche SMIIA produit une estérase alcalophile et halotolérante. L'activité est maximale à pH 9, 40°C et 2M NaCl. La souche SAMIII quant à elle, produit une lipase très particulière. Celle-ci est alcalophile, extrêmement thermoactive et thermostable, et halophile dépendante du sel. La lipase est active d'une façon optimale à pH 8-9, à une température de 120°C et à 3M de NaCl. Des enzymes hydrolytiques thermoactives ont déjà été décrites, néanmoins, c'est la première fois à notre connaissance, qu'une lipase fonctionnant à des températures aussi élevée et dépendante du sel soit décrite. Le petit nombre de lipases hautement thermostables et halophiles décrites à ce jour, et les propriétés très intéressantes de ces deux enzymes lipolytiques, font que ce travail présente un intérêt certain pour des applications biotechnologiques. En effet ces enzymes présentent des propriétés répondant aux besoins de nombreux domaines.

L'isolement de telles enzymes possédant ces propriétés particulières issus des microorganismes colonisant les environnements extrêmes, représente une alternative prometteuse, aux techniques d'ingénierie de protéines utilisées afin d'améliorer leur propriétés particulièrement la thermostabilité.

Il est considéré que l'aspect extrêmophile des microorganismes soit associé à une diversité physiologique, biochimique, et métabolique. Les résultats du présent travail corroborent ces considérations. Selon la caractérisation physiologique et biochimique, il est indiqué que ces deux souches s'adaptent à de larges gammes de salinité, permettant de maintenir leurs activités dans des conditions variées de salinité. D'autre part, les souches SAMIII et SMIIA ont un potentiel important à produire divers métabolites bioactifs, parmi les plus demandés pour des applications primordiales d'actualité, à savoir des substances antibactériennes et des enzymes hydrolytiques : les lipases et les protéases.

Ce travail illustre l'intérêt de l'étude des microorganismes extrêmophiles. Cette étude nous a permis d'isoler deux souches qui offrent des perspectives en termes d'application biotechnologiques et d'études fondamentales. Nous avons pu décrire deux enzymes lipolytiques remarquables. Une lipase et une estérase possédant des caractéristiques distinctes des autres biocatalyseurs décrits. Ces enzymes permettent d'étendre le répertoire des biocatalyseurs existants destinés aux multiples applications biotechnologiques, et peuvent servir d'excellent modèle pour l'élucidation des mécanismes qui régissent l'adaptation des protéines aux différentes formes d'extremophilie, notamment l'halophilie, la thermophilie et l'alcalophilie. L'aspect de ces enzymes est d'autant plus original, qu'elles soient isolées à partir de nouvelles espèces. Une opportunité rendue possible grâce à l'exploration d'environnements extrêmes. .

Au terme de ce travail, nous sommes convaincu que les environnements extrêmes continuent d'être une source inépuisable de microorganismes présentant un intérêt grandissant tant sur le plan des applications biotechnologiques que sur le plan fondamental.

Perspectives :

- Etudier les autres souches isolées pour leur potentiel à produire des métabolites bioactifs.
- L'exploration d'autres environnements extrêmes dans le but d'isoler d'autres souches potentiellement intéressantes.
- Purification et caractérisation moléculaire des enzymes lipolytiques isolées.
- Essais des enzymes lipolytiques dans la catalyse en milieux organiques.
- Détermination de la structure du site catalytique des deux enzymes lipolytiques, et étude de la relation structure/fonction.
- Détermination des mécanismes impliqués dans la stabilité des enzymes lipolytiques dans les conditions extrêmes étudiés.
- Hybridation ADN/ADN pour les deux souches SAMIII et SMIIA.

Références bibliographiques.

Références bibliographiques :

1. Abdel-Fattah, R.Y. (2002) Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. Using Box-Behnken experimental design. *Biotechnology Letters* **24**: 1217–1222.
2. Abdulla, H., May, E., Bahgat M, Dewedar A (2008) Characterization of Actinomycetes Isolated From Ancient Stone and Their Potential Of Deterioration. *Polish Journal Of Microbiology*, **57**: 213-220.
3. Abramić, M., Lešćić, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., Pigac, J. (1999) Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**:522-529.
4. Adrio, J.L., Demain, A.L., (2008) Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Molecular Biotechnology*, **38**:41–55.
5. Aharonowitz, Y., Demain, A.L. (1978) Carbon Catabolite Regulation of Cephalosporin Production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **14**: 159-164.
6. Allais, J.J., Hoyos-Lopez, G., Kammoun. S., Baratti. J.C. (1987) Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Applied And Environmental Microbiology*, **53**: 942-945.
7. Allgaier, M., Grossart, H.P. (2006) Diversity and Seasonal Dynamics of *Actinobacteria* Population in Four Lakes in Northeastern Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 3489–3497.
8. Al-Zarban, S., Abbas, I., Al-Musallam, A.A., Steiner, U., Stackebrandt, E., Kroppenstedt RM (2002) *Nocardioopsis halotolerans* sp. nov., isolated from salt marsh soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 525–529.
9. Anderson, A.S., Wellington, E.M.H. (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51** :797-814.
10. Andrade, C. M., Aguiar, W. B., Antranikian, G. (2001) Physiological aspects involved in production of xylanolytic enzymes by deep-sea hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **91–93**: 655–669.
11. Arpigny, J.L, Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes : classification and properties. *Biochemical Journal* **343**, 177-183.
12. Arpigny J.L., Jendrossek, D., Jaeger K.E. (1998) A novel heat-stable lipolytic enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 displaying similarity to polyhydroxyalkanoate depolymerases. *FEMS Microbiology Letters* **167**:69-73.

13. Ateşlier, Z.B.B., Metin, K. (2006) Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology* **38** : 628-635.
14. Azerad, R. (2001) Chemical biotechnology Better enzymes for green chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:533–534.
15. Kim, B., Sahin N., Minnikin D.E., Zakrzewska -Czerwinska J., Mordarski M, Goodfellow M (1999). Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**: 7-17.
16. Okami, Y., Okazaki, T., Kitahara,T., Umezawa, H. (1976) a new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. *The journal of antibiotics*, 10: 1019-1025.
17. Ozcan, B., G Ozyilmaz, C Cokmus, M Caliskan (2009) Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **36** : 105-110.
18. Sana, B., Ghosh, D., Saha, M., Mukherjee, J. (2007) Purification and characterization of an extremely dimethylsulfoxide tolerant esterase from a salt-tolerant *Bacillus* species isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Process Biochemistry*, **42**:1571-1578.
19. Sana, B., Ghosh, D., Saha, M., Mukherjee, J. (2006) Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Process Biochemistry*, 41 :208-215.
20. Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N. (2004) Antifungal activity of a saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *Journal de Mycologie Médicale*, **15** :211–219.
21. Baltz, H.R. (2008) Renaissance in antibacterial discovery from Actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, **8**:1-7.
22. Baltz, R.H. (2007) Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future, *Microbe* **2**: 125-130.
23. Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E, Lechevalier, H.A. (1964) Rapid Differentiation Between *Nocardia* and *Streptomyces* by Paper Chromatography of Whole-Cell Hydrolysates. *Applied and Environmental Microbiology* **12**: 421-423.
24. Becker, B., Lechevalier, M.P., Lechavalier, H.A. (1965) Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes, *Applied Microbiology*, Vol 13, n°2.
25. Beloqui, A., Dominguez de Maria, P., Golyshin, P. N., Ferrer, M. (2008) Recent trends in industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, **11**:240–248.

26. Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, **58**: 1–26.
27. Bergogne, E.(1999) Antibiothérapie en pratique clinique. pp 47-95.
28. Bibb, M.J. (2005) Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, **8**:208–215.
29. Bonete, M.J., Pire, C., Lorca F.L., Camacho, M.L. (1996) Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeo *Haloferax mediterranei*: Enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Letters* **383**:227-229.
30. Bora. L., Kalita, M.C. (2007) Thermozyms: An area of potential research. *Current Science*, **93**:593-594.
31. Bornscheuer, T.U. (2002) Microbial carboxyl esterases classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **26**:73-81.
32. Bornscheuer, U.T. (1995) Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 578-586.
33. Boughachiche, F., Reghioia, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A. (2005) Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebkhha de ain Mlila. *Sciences & Technologie* **23** : 5-10.
34. Bouke, K.H.L., Beselin, A., Breur, M., Hauer, B., Koster, M. , Rosenau, F., Tommassen, J. (2007) Hexadecane and Tween 80 Stimulate Lipase Production in *Burkholderia glumae* by Different Mechanisms, *Applied and Environmental Microbiology*, **73**:3838-3844.
35. Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D.A., Baratti, J.C. (2006) Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **41**:21-26.
36. Brock, T. D. (1986) Thermophiles. In *General, Molecular, and Applied Microbiology*. Edited by Brock T D. New York: Wiley Interscience.
37. Brock, T.D., Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, **98**: 289-297.
38. Bruins, M. E., Janssen, A.E.M., Remko, B.M. (2001) Thermozyms and their applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **90**: 155-186.
39. Buchholz, K., Kasche, V., Bomscheuer, T.U. (2005) Biocatalysts and Enzyme Technology. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.* pp 1-44.

40. Bull, A. T., Bunch, A. W., Robinson, G. K. (1999) Biocatalysts for clean industrial products and processes. *Current Opinion in Microbiology* **2**:246-251.
41. Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M. (2000) Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**: 573-606.
42. Cai, Y. (2009) Classification and Salt-tolerance of Actinomycetes in the Qinghai Lake Water and Lake side Saline Soil. *Journal of sustainable Development*, **2**:111-212.
43. Cardenas, F., Alvarez, E., De Castro-Alvarez M.S., Sánchez-Montero, J.M., Elson, S., Sinisterra, J. V.(2001) Three new lipases from actinomycetes and their use in organic reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, **19**:315-329.
44. Cardenas F, de Castro MS, Sanchez-Montero JM, Sinisterra JV, M. Valmaseda, Elsona SW, Alvarez E (2001) Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* **28**:145–154.
45. Cayol ,J.L. , Ollivier, B., Patel, B. K. C., Prensier, G., Guezennec. J., Garcia, J. L. (1994) Isolation and Characterization of *Halothemothrix orenii* gen. nov., sp. nov., a Halophilic, Thermophilic, Fermentative, Strictly Anaerobic Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **40**:534-540.
46. Cayol, J.L., Ducerf, S., Patel, B.K.C, Garcia, J.L., Thomas, P., Ollivier, B. (2000) *Thermohalobacter berrensii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly halophilic bacterium from a solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,**50**: 559–564.
47. Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J.P., Comeau, L.C., Sarda, L. (2002) Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG . *Lipids*, **37**: 653-662.
48. Chakraborty. K., Raj, R.P. (2008) An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry* **109** : 727–736.
49. Chakravarty. S., Varadarajan, R. (2000) Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis, *FEBS Letters* **470**: 65-69.
50. Chen, S.J., Cheng, C.Y., Chen, T.L. (1998) Production of an Alkaline Lipase by *Achetobacter radioresistens*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **86**:308-312.
51. Chen. L., Daniel R. M., Coolbear, T. (2003) Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, **13**: 255-275.
52. Chun, J., Bae, K.S., Moon, E.Y., Jung SO, Lee HK, Kim SJ (2000) *Nocardioopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 1909–1913.

53. Chun, J., Goodfellow, M., (1995) A Phylogenetic Analysis of the Genus *Nocardia* with 16S rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**:240-245.
54. Chun, J., Kim, S.B., Oh, Y.K., Seong, C.N., Lee, D.H., Bae, K.S., Lee, K.J., Kang, S.O., Hah, Y.C.M. Goodfellow, M. (1999) *Amycolatopsis thermoflava* sp. nov., a novel soil actinomycete from Hainan Island, China. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49** :1369-1373.
55. Collins, M.D., Pirouz. T., Goodfellow, M. (1977) Distribution of Menaquinones in Actinomycetes and Corynebacteria. *Journal of General Microbiology*, **110**:221-230.
56. Collins, M.D., Rirouz, T., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (1977) Distribution of Menaquinones in Actinomycetes and Corynebacteria, *Journal of General Microbiology*, **100**: 221-230.
57. Cook, A. E., Meyers, P.R. (2003) Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 1907-1915.
58. Cook, A. E., Meyers, P.R. (2003) Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**:1907–1915.
59. Cui, X.L., Mao, P.H., Zeng, M., Li, W.L., Zhang, L.P., Xu, L.H., Jiang, C.L. (2001) *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**: 357–363.
60. Damodaran, S. (1998) Water activity at interfaces and its role in regulation of interfacial enzymes: a hypothesis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **11**: 231-237.
61. Danson, J.M., Hough, W.D. (1997) The Structural Basis of Protein Halophilicity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **117**: 307–312.
62. Danson, M. J., Hough, D.W. (1998) Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. *Trends in Microbiology* **6**:307-314.
63. Davies, F.L., Williams, S.T. (1970) Studies on the ecology of actinomycetes in soil, The Occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil, *Soil Biology and Biochemistry*,**2**: 227-238.
64. Demain, A.L. (1998) Induction of secondary metabolism. *International Microbiology*, **1** :259-264.
65. Demain, A.L. (2000) Microbial biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **18**:26-31.
66. Demain, A.L. (2000) Small bugs, big business: The economic power of the microbes. *Biotechnology advances*, **18**: 499–514.

67. Demain, A.L. (2006) From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**: 486–495.
68. Demain, A.L., Adrio, J.L. (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology* **38**: 41-55.
69. Demain, A.L., Fang, A. (1995) Emerging Concepts of Secondary Metabolism in Actinomycetes. *Actinomycetologica*, **9**: 98-117.
70. Demain, A.L., Lancini, G. (2006) Bacterial Pharmaceutical Products. *Prokaryotes* **1**:812–833.
71. Demain, A.L., Sanchez, S. (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, **62**: 5–16.
72. Demain, A.L., Zhang, L. (2005) Natural Products and Drug Discovery. *Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, pp 3-29.
73. Demirjian, D. C., Moris-Varas, F., Cassidy, C.S. (2001) Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**: 144-151.
74. Dharmsthiti, S., Luchai, S. (1999) Production, purification and characterization of thermophilic lipase from Bacillus sp. THL027. *FEMS Microbiology Letters* **179**: 241-246.
75. Dominy, B.N., Perl, D., Schmid, F.X., Brooks, C. (2002) *Journal of Molecular Biology* **319**: 541-554.
76. Donadio, S., Carrano, L., Brandi, L., Serina, S., Soffientini, A., Raimondi, E., Montanini, N., Sosio, M., Gualerzi, C.O. (2002) Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. *Journal of Biotechnology*, **99**: 175-185.
77. Dordick, J. S., Khmelnsky, Y.L., Sergeeva, M.V. (1998) The evolution of biotransformation technologies. *Current Opinion in Microbiology*, **1**:311-318.
78. Duncombe, W.G. (1962) The Colorimetric Micro-Determination of Long-Chain Fatty Acids. *Biochemical Journal*, **88**:7-10.
79. Dym, O., Mevarech, M., Sussman, J.L. (1995) Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium. *Science*, **267**:1344-1346.
80. Edwards, C. (1993) Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **42** :161-179.
81. El-Nakeeb, M.A., Lechevalier, H.A. (1963) Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **11**: 75-77.

82. Embley, M.T., Smida, J., Stackebrandt, E. (1988) The phylogeny of mycolate-less wall chemotype IV Actinomycetes and description of Pseudonocardiaaceae fam. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **11**: 44-52.
83. Ermler, U., Merckel, M.C., Thauer, R.K., Shima, S. (1997) Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri*—new insights into salt-dependence and thermostability. *Current Biology*, **5**:635–646.
84. Everly, C. de Macario, Macario, Alberto J.L. (2000) Stressors, stress and survival; Overview, *Frontiers in Bioscience* **5**:780-786.
85. Facchiano, A.M., Colonna, G., Ragonz, R. (1998) Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study. *Protein Engineering Design and Selection*, **11**: 753-760.
86. Fakhereddine, L. Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Baratti, J.C. (1998) Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. *Biotechnology Letters*, **20**:879-883.
87. Fernández, J., Mohedano, A.F., Fernández-García, A., Medina M, Manuel N (2004) Purification and characterization of an extracellular tributyrin esterase produced by a cheese isolate, *Micrococcus* sp. INIA 528. *International Dairy Journal*.**14**: 135-142.
88. Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Martins dos Santos, V.A.P., Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. (2005) Microbial Enzymes Mined from the Urania Deep-Sea Hypersaline Anoxic Basin. *Chemistry & Biology*, **12**: 895–904.
89. Fickers, P., Destain, J., Thonart, P. (2008) Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. **12** : 119-130.
90. Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* **82** : 1033-1041.
91. Forar, L.R., Sifour, M., Sakr, M., Hacene, H. (2008) A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *World Journal Microbiology Biotechnology* **24**: 2235–2241.
92. Forar, L.R., Elshafei, A., Saker, M., Bengraa, C., Hacene, H. (2007) Screening, Isolation and Characterization of a Novel Antimicrobial Producing Actinomycete, *Strain RAF10*, *Biotechnology* **6**: 489-496.
93. Galinski, E.A. (1990) Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **49**: 487-496.
94. Galinski, E.A., Herzog, R.M. (1990) The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Archives of Microbiology* **153**:607 – 613.

95. Gazenko, S.V., Reponen, T.A., Grinshpun, S.A., Willeke, K. (1998) Analysis of Airborne Actinomycete Spores with Fluorogenic Substrates, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **64**:4410-4415.
96. Ghanem, A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**:1721–1754.
97. Ghanem, E.H., Al-Sayed, H.A., Saleh, M.K. (2000) An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **16**: 459-464.
98. Ghanem, N.B., Sabry, S.A., El-Sherif, Z.M., Abu El-Ela, G.A., (2000) Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **46**: 105–111.
99. Giuliano, M., Schiraldi, C., Marotta, M .R., Hugenholtz, J., De Rosa, M.(2004) Expression of *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**: 829–832.
100. Glöckner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R. (2000) Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of Actinobacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, **66**: 5053–5065.
101. Gochnauer, M.B., Leppard, G.G., Komararat, P., Kates, M., Novitsky, T., Kushner, D.J. (1975) Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Canadian Journal of Microbiology*, **21** :1500–1511.
102. Godfroy, A., Postec, A., Raven, N. (2006) Growth of Hyperthermophilic Microorganisms for Physiological and Nutritional Studies. *Methods in Microbiology*, **35**:92-108.
103. Gomes, J., Steiner, W. (2004) The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food technology Biotechnology* **42**: 223-235.
104. Gupta, N., Sahai, V., Gupta, R. (2007) Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry* **42**:518–526.
105. Gupta, N., Rathi, P., Gupta, R. (2002), Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry*, **311**: 98-99.
106. Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*. **64**: 763-781.
107. Haavik, H.I. (1979) On the physiological Meaning of Secondary Metabolism. *Folia Microbiologica*, **24**: 365-367.

108. Hacene, H., Rifa, F., Chebhouni, N., Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Baratti, J. C., Ollivier, B. (2004) Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments* **58**:273–284.
109. Hacène, H., Daoudi-Hammad, F., Bhatnagar, T., Baratti, J.C., Lefebvre, G. (2000) Hà, a new aminoglycoside anti Pseudomonas antibiotic produced by a new strain of Spirillispora. *Microbios*, **102**: 69-77.
110. Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* **89**:17–34.
111. Hasan, F. (2006) Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 235-251.
112. Hashimoto, M., Takeshi, K., Ikuko, K., Hiroshi, K., Hiroshi, A., Natsume, M. (2003) Relationship between Response to and Production of the Aerial Mycelium-including Substances Pamamycin-607 and A-fatcor. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **67**(4): 803-808.
113. Hayden, B.M., Bonete, M.J., Brown, P.E., Moir A.J.G., Engel, P.C. (2002) Glutamate dehydrogenase of *Halobacterium salinarum*: evidence that the gene sequence currently assigned to the NADP⁺-dependent enzyme is in fact that of the NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase. *FEMS microbiology letters*, **211**: 37 – 41.
114. Held M, Schmid A, van Beilen J B, Witholt B (2000) Biocatalysis Biological systems for the production of chemicals. *Pure and Applied Chemistry*, **72**:1337–1343.
115. Henke, E., Bornscheuer, U. (2002) Esterases from *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. *Applied microbiology and biotechnology*, **60**: 320-326.
116. Hide, W.A., Chan, L., Li, W.H. (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily, *Journal of Lipid Research*, **33**: 167-178.
117. Hodgson, D.A. (1992) Differentiation in Actinomycetes . *Prokaryotic Structure and Function: A New Perspective*, pp 407-424.
118. Holland, R., Liu, S.Q., Crow, V.L., Delabre, M.L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. (2005) Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavor: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal* **15**: 711-718
119. Horchani, H., Mosbah. H., Ben Salem N., Gargouri, Y., Sayari, A. (2009) Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **56**: 237–245.
120. Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. (2002) Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 3925–3931.

121. Hou, C.T. (1993) Screening of microbial esterases for asymmetric 2-ethylhexyl butyrate hydrolysis of 2-ethylhexyl butyrate. *Journal of Industrial Microbiology*, **11**: 73-81.
122. Hou, C.T., Johnston, T.M. (1992) Screening of Lipase Activities with Cultures from the Agricultural Research Service Culture Collection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **69**:1088-1097.
123. Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. (2004), Lipases and their Industrial Applications, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **118**: 155-170.
124. Hough, D.W., Danson, M.J. (1999) Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**:39-46.
125. Huang, Y., Wang, L., Lu, Z., Hong, L., Liu, Z., Tan, G.Y.A., Goodfellow, M. (2002) Proposal to combine the genera Actinobispora and Pseudonocardia in an emended genus Pseudonocardia, and description of Pseudonocardia zijingensis sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52** : 977-982.
126. Hugenholtz, P., Pace, N. (1996) Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology*, **14**: 190-197.
127. Husson, E. (2005) Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique. pp 22-26.
128. Hutcheon, G.W., Vasisht, N., Bolhuis, A. (2005) Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon Haloarcula hispanica. *Extremophiles* **9**:487-495
129. Ikeda, M., Clarcks, D.S. (1998) Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archeon Pyrococcus furiosus in Echerichia coli. *Biotechnology Bioenerg*, **57**:624-629.
130. Illanes, A. (1999) Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*, **2**: 1-9.
131. Imhoff, J.F., Rodriguez-Valera, F. (1984) Betaine Is the Main Compatible Solute of Halophilic Eubacteria. *Journal of Bacteriology*, **160**:478-479.
132. Imhoff, J.F., Rodriguez-Valera, F. (1984) Betaine is the Main Compatible Solute of Halophilic Eubacteria, *Journal of Bacteriology* **160**:478-479.
133. Ismet, A., Vikineswary, S., Paramaswari, S., Wong, W., Ward, A., Seki, T., Fiedler, H., Goodfellow, M. (2004) Production and Chemical Characterization of Antifungal Metabolites From Micromonospora sp. M39 Isolated From Mangrove Rhizosphere Soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **20**: 523-528.
134. Jaeger, K.E. (2004) Protein technologies and commercial enzymes White is the hype – biocatalysts on the move. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**:269-271.

135. Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. (1999), Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, *Annual Reviews Microbiology* **53**: 315-51.
136. Jaeger, K.E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Schimossek, K., Zonta, A., Reetz, M.T. (1997) Bacterial lipases for biotechnological applications, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **3**: 3-12.
137. Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry*, **202**:715 – 728.
138. Jaenicke, R. (2000) Stability and stabilization of globular proteins in solution. *Journal of Biotechnology*, **79**:193–203.
139. Jiang, C.L., Xu, L.H. (1996) Diversity of Aquatic Actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**:249–253.
140. Johannes, T. W., Zhao, H. (2006) Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, **9**:261–267.
141. Johnson, K.G., Lanthier, P.H., Gochnauer, M.B. (1986) Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Archives of Microbiology*, **143**: 370-378.
142. Johnson, K.J. ,Lanthier, P. H. , Gochnauer, M.B. (1986) Cell walls from *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Arch Microbiol* , **143**: 365- 369.
143. Joshi, G.K., Kumar, S., Tripathi, B.N., Sharma, V. (2006) Production of Alkaline Lipase by *Corynebacterium paurometabolum*, MTCC 6841 Isolated from Lake Naukuchial, Uttaranchal State, India. *Current Microbiology*, **52**: 354–358.
144. Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. N., Baratti, J. C. (1999) A thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strain. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**: 332-338.
145. Kademi A, Fakhreddine L, Ait-Abdelkader N, Baratti JC (1999) Effect of culture conditions on growth and esterase production by the moderate thermophile *Bacillus circulans* MAS2. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **23**: 188–193.
146. Kaiser, P., Raina, C., Parshad, R., Johri, S., Verma, V., Anrabi, K.I., Qazi, G.N. (2006) A novel esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): Purification and characterization of the enzyme. *Protein Expression and Purification*, **45** :262-268.
147. Kang, S.G., Lee, K.J. (1997) Kinetic analysis of morphological differentiation and protease production in *Streptomyces albidoflavus* SMF30. *Microbiology*, **143**: 2709-2714.

148. 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 metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein Expression and Purification* **46**: 421–428.
149. Karpushova, K., Brümmer, F., Barth, S., Lange, S., Schmid, R.D. (2005) Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **67**: 59-69.
150. Kerkar, S. (2004) Ecology of Hypersaline Microorganisms. Marine Microbiology: Facets & Opportunities; Ramaiah, N (Ed.), pp 7-47
151. Kim, H.E., Park, K.R. (2001) Purification and Characterization of an Esterase from *Acinetobacter lwoffii* I6C-1. *Current Microbiology* **44** : 401-405.
152. Kim, J. W., Flowers, L. O., Whiteley, M., Peeples, T. L. (2001) Biochemical confirmation and characterization of the family- 57-like α -amylase of *Methanococcus jannaschii*, *Folia Microbiology*, **46**: 467–73.
153. Kim, S., Goodfellow, M. (1999) Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* Lechevalier *et al.* 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**:507-512.
154. Kim, S., Lee, S.B. (2004) Thermostable esterase from a thermoacidophilic Archeon : Purification and characterization for enzymatic resolution of a chiral compound. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **68**: 2289-2298.
155. Kim, S.B., Goodfellow, M. (2002) *Streptomyces thermospinisporus* sp. nov., a moderately thermophilic carboxydrotrophic streptomycete isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 1225-1228.
156. Kirk, O., Borchert, V. T., Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:345–351.
157. Koch, R., Spreinat, A., Lemke, K., Antranikian, G. (1991) Purification and properties of a hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. *Archives of Microbiology*, **155**: 572-578.
158. Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S., Chopade, B.A. (2004) Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Current Science*, **86**: 593-597.
159. Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., Schmid, R.D (1991) Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data. *Journal Of Bacteriology*, **173**: 4836-4841.

160. Korn-wendisch F, Kempf A., Grund E, Kroppenstedt RM, Kutzner HJ (1989) Transfer of *Faenia rectivirgula* Kurup and Agre 1983 to the Genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, Elevation of *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *taberi* Labeda 1987 to Species Level, and Emended Description of the Genus *Saccharopolyspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**:430-441.
161. Kristjansson, J.K., Hreggvidsson, G.O. (1995) Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **11**: 17-25.
162. Kulkarni, N., Gadre, R.V. (1999) A novel alkaline, thermostable, protease- free lipase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters* **21**: 897-899.
163. Kushner, D.J. (1978) Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In *Microbial life in extreme environments*. Ed: Kushner DJ. Academic press, Ltd, London. , pp 317-368
164. Kushner, H. (1998) Life at high salt and solute concentration In Ventosa A, Nieto JJ *Biotechnological applications as potentialities of halophilic microorganisms*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**: 85-94.
165. Labeda, D. P. (1987) Transfer of the Type Strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the Genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and Designation of a Neotype Strain for *Streptomyces erythraeus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, **37** : 19-22
166. Labuschagne, R.B., Van Tonder, A., Litthauer, D. (1997) Flavobacterium odoratum lipase: Isolation and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**: 52-58.
167. Lacey, J. (1997) Actinomycetes in composts. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **4**: 113-12
168. Lacey, J., Goodfellow, M. (1975) A Novel Actinomycete from Sugar-cane Bagasse *Saccharopolyspora hirsuta* gen et sp. nov. *Journal of General Microbiology*, **88**: 75-85
169. Lancini, G., Lorenzetti, R. (1993) *Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites*. Plenum Press, pp1-19.
170. Lancini, G., Parenti, F., Gallo, G.G. (1995) *Antibiotics: a multidisciplinary approach*. Plenum Press pp1-27.
171. Lanyi, J.K. (1974) Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria. *Bacteriological Reviews*, **38**:272-290.
172. Larsen, H. (1986) Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Letters*, **39**: 3 – 7.

173. Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 399–405.
174. Lechevalier, H., Prauser, H., Labeda, P., Ruan, J. (1986) Two New Genera of Nocardioform Actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**:29-37.
175. Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S., Suhartono, M.T., Pyun, Y.B. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters* **179**:393-400.
176. Lee, S.D., Kim, E.S., Kang, S.O., Hah, Y.C. (2002) *Pseudonocardia spinosispora* sp. nov., isolated from Korean soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 1603–1608.
177. Li, W.J., Xu, P., Tang, S.K., Xu, L.H., Kroppenstedt, M.R., Stackebrandt, E., Jiang, C.L. (2003) *Prauserella halophila* sp. nov. and *Prauserella alba* sp. nov., moderately halophilic actinomycetes from saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 1545–1549.
178. Li WJ, Xu P, Zhang LP, Tang SK, Cui XL, Mao PH, Xu LH, Schumann P, Stackebrandt E, Jiang CL (2003) *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui et al. 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 1421–1425.
179. Li, W.J., Kroppenstedt, R.M., Wang, D., Tang, S.K., Lee, J.C., Park, D.J., Kim, C.J., Xu, H.L., Jiang, C.L. (2006) Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**: 1089–1096.
180. Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Baratti, J.C., de Filippis, I., Fontana, J.D. (2004) Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **31**: 53-61.
181. Lippert, K., Galinski, E.A. (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **37**:61-65.
182. Litchfield, C.D. (1998) Survival strategies for microorganisms from hypersaline environment and their relevance to life in early Mars. *Meteoritics and Planetary Science*, **33**: 813-819.
183. Lu, Z., Liu, Z., Wang, L., Zhang, Y., Qi, W., Goodfellow, M. (2001) *Saccharopolyspora flava* sp. nov. and *Saccharopolyspora thermophila* sp. nov., novel actinomycetes from soil *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**: 319–325.

184. Lu, Z., Liu, Z., Wang, L., Zhang, Y., Qi, W., Goodfellow, M. (2001) *Saccharopolyspora flava* sp. nov. and *Saccharopolyspora thermophila* sp. nov., novel actinomycetes *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**: 319-325.
185. Madern, D., Ebel, C. (2007) Influence of an anion-binding site in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*, *Biochimie* **89**: 981-987.
186. Madern, D., Ebel, C., Zaccari, G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophile* **4**:91-98.
187. Madigan, M.T., Oren, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*, **2**:265-269.
188. Manco, G., Giosue, E., D'Auria, S., Herman, P. (2000) Cloning, Overexpression, and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to Hormone-Sensitive Lipase Subfamily from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **373**: 182–192.
189. Reetz, M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**: 145-150.
190. Mansour, S.R. (2003) The occurrence and Distribution of Soil Actinomycetes in Saint Catherine Area, South Sinai, Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **6**:721-728.
191. Marhuenda-Egea FC, Bonete M J (2002) Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:385–389.
192. Martin, J.F., Casqueiro, J., Liras, P. (2005) Secretion systems for secondary metabolites: how producers cell sends out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, **8**: 282-293.
193. Martin, J.F., Demain, A.L. (1980) Control of Antibiotic Biosynthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **44**: 230-251.
194. McQueen, D.A.R., Schottel, J.L. (1987) Purification and Characterization of a Novel Extracellular Esterase from Pathogenic *Streptomyces scabies* That Is Inducible by Zinc. *Journal of Bacteriology*, **169**: 1967-1971.
195. Mertz, F. P., Yao, R. C. (1990) *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from Soil Collected in Sugar Mill Rum Still. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **40**: 34-39.
196. Mitra, A., Santra, S.C., Mukherjee, J. (2008) Distribution of actinomycetes, their antagonistic behaviour and the physico-chemical characteristics of the world's largest tidal mangrove forest. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**: 685-695.
197. Mori, M., Ali, E., Du, D., Park, E.Y. (2009) Characterization and Optimization of Extracellular Alkaline Lipase Production by *Alcaligenes* sp. Using Stearic Acid as Carbon Source. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **14**: 193-201.

198. Müller-Santos, M., de Souza, E. M., de Pedrosa, F., Mitchell, D. A., Longhi, S., Carrière, F., Cnaan S, Krieger N (2009) First evidence for the salt-dependent folding and activity of an esterase from the halophilic archaea *Haloarcula marismortui*. *Biochimica et Biophysica Acta*. xxx :xxx–xxx.
199. Muramatsu, H.(2008) Development of a simple-identification method for actinomycetes based on partial 16S rDNA sequences as exemplified by a comparative study of Malaysian and Japanese actinomycetes, *Actinomycetologica* **22**: 30-33.
200. Nakata, K., Yoshimoto, A., Yamada, Y. (1999) Promotion of Antibiotic production by high NaCl concentration or Heat Shock in *Pseudomonas fluorescens* S272. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **63** : 293-297.
201. Nardini, M., Dijkstra, B.W. (1999) α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* **9**:732–737.
202. Natsume, M., Yasui K., Marumo, S. (1989) Calcium ion regulates aerial mycelium formation in actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, **42**:440-447.
203. Nawani, N.N., Kapadnis, B.P., Das, A.D., Rao, A.S., Mahajan, S.K. (2002) Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *Journal of applied microbiology*, **39**: 965 – 975.
204. Nidetzky, B., Schwab, H. (2007) Special issue: Enzyme technology and biocatalysis. *Journal of Biotechnology* **129**:1-2.
205. Niehaus, F., Bertoldo, C., Kaehler, M., Antranikian, G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 711-729.
206. Nini, L., Sarda, L., Comeau, L.C, Boitard E, Dubès JP, Chahinian S (2001) Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta* , **1534**:34-44.
207. Ochi, K. (1995) Phylogenetic Analysis of Mycolic Acid-Containing Wall-Chemotype IV Actinomycetes and Allied Taxa by Partial Sequencing of Ribosomal Protein AT-L30. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**:653-660.
208. Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.L., Mah, R. A. (1994) Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **58**: 27-38.
209. Oren, A. (1994) The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**: 415-440.
210. Oren, A. (2002) Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **39**: 1-7.

211. Overbeeke, P.L.A., Govardhan, C., Khalaf, N., Jongejan, J.A., Heijnen, J.J. (2000) Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**: 385-393.
212. Panda, T., Gowrishankar, B. S. (2005) Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**: 160–169.
213. Panke, S., Held, M., Wubbolts, M. (2004) Trends and innovation in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology* **15**:272-279.
214. Patel, J.J, Brown, M.E (1969) Interactions of Azotobacter with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant and Soil*. **31**:273-281.
215. Patel, R.N. (2002) Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**: 804-826.
216. Peacock, L., Ward, J., Ratledge, C., Dickinson, F.M, Ison, A. (2003)How Streptomyces lividans uses oils and sugars as mixed substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, **32** :157-166.
217. Pelaez, F. (2005) The historical delivery of antibiotics from microbial natural products- Can the history repeat?. *Biochemical Pharmacology*, **71**: 981-990.
218. Pencreac'h , G., Baratti, J. C. (2001), Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations, *Enzyme and Microbial Technology* **28**: 473-479.
219. Perez-Pomares, F., Bautista, V., Ferrer, J., Pire, C., Marhuenda-Egea, F. C., Bonete, M. J. (2003) α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* **7**:299-306.
220. Pesaresi, A., Devescovi, G., Lamba, D., Venturi, V., Degrassi, G. (2005) Isolation, Characterization, and Heterologous Expression of a Carboxylesterase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Current Microbiology* **50** :102–109
221. Petersen M (1999) Chemical biotechnology Industrial applications and recent advances. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**:593–594.
222. Petersen, M. T. N., Fojan, P., Petersen, S. B. (2001) How do lipases and esterases work: the electrostatic Contribution. *Journal of Biotechnology* **85**: 115–147.
223. Pimenov, N.V., Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2006) In Situ Activity Studies in Thermal Environments. *Methods in Microbiology*, **35**: 29-349.

224. Pimentel-Elardo, S.M., Tiro, P.L., Grozdanov, L., Hentschel, U. (2008) *Saccharopolyspora cebuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Philippine sponge (*Porifera*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**: 628-632
225. Platas, G., Moron, R., Gonzalez, C.J., Genilloud, O., Pelaez, F., Diez, M.T. (1998) Production of antibacterial activities by members of the family *Pseudonocardiaceae*: influence of nutrients. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **14** : 521-527.
226. Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D. (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* **93**: 67-80.
227. Podar, M., Reysenbach, A.L. (2006) New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 250-255.
228. Porcelli, M., Peluso, I., Marabotti, A., Facchiano, A., Cacciapuoti, G. (2009) Biochemical characterization and homology modeling of a purine-specific ribonucleoside hydrolase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Insights into mechanisms of protein stabilization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **483**:55–65.
229. Pridham, T.G., Gottlieb, D. (1948) The utilization of carbon compounds by some Actinomycétales as an aid for species determination. *Journal of bacteriology* **56** : 107-114.
230. Qin, S., Li, J., Zhao, G.Z., Chen, H.H., Xu, L.H., WJ, L. (2008) *Saccharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. *Systematic and Applied Microbiology* **31** : 352-357
231. Quax, W.J. (2006) Bacterial Enzyme. *Prokaryotes*, **1**:777-796.
232. Rahman, N.Z.R.A, Basri, M. (2006) Lipase: introduction In New lipases and proteases. *Nova Science publishers* pp1-22.
233. Rainey, F.A., Oren, A. (2006) Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them. *Methods in Microbiology*, **35**:1-25.
234. Ramos-Cormenzana, A. (1989) Ecological distribution and biotechnological potencial of halophilic microorganisms, In *Microbiology of Extreme Environments and Its Potential for Biotechnology*. Ed., M. S. Da Costa J C D and D. Williams R A, Elsevier Applied Science, London. pp.289–309.
235. Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. (2001) Low-Temperature Lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. Strain KB70. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:4064–4069.
236. Rathi, P., Bradoo ,S., Saxena, R.K., Gupta, R. (2000) A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters* **22**: 495–498.

237. Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. (2009) Lipases at interface: A review, *Advances in Colloid and Interface Science* **xxx**: xxx-xxx.
238. Reponen, T.A., Gazenko, S.V., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Cole, E.C. (1998) Characteristics of Airborne Actinomycete Spores, *Applied and Environmental Microbiology* 3807-3812.
239. Roberts, M.F. (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms, *Saline System* **1**:1-30.
240. Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1981) Characteristics of the Heterotrophic Bacterial Populations in Hypersaline Environments of Different Salt Concentrations. *Microbial Ecology*, **7**:235-243.
241. Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J.F. (1986) Variation of Environmental Features and Microbial Populations with Salt Concentrations in a Multi-Pond Saltern. *Microbial Ecology*, **11**:107-115.
242. Rohban, R., Amoozegar, M.A., Ventosa, A. (2009) Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**:333-40.
243. Rosenberg, E. (2006) Biotechnology and Applied Microbiology. *Prokaryotes*, **1** : 284-298.
244. Rozzell, D.J. (1999) Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities. *Bioorganic and medicinal chemistry* **7**: 2253-2261.
245. Ruan, J.S., Al-tai, A.M., Zhou, Z.H. , Qu, L.H. (1994) *Actinopolyspora iraqiensis* **sp. nov.**, a New Halophilic Actinomycete Isolated from Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**:759-763.
246. Ruiz, D.M., De Castro, R.E. (2006) Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **34**:111–115.
247. Russell, N.J., Evans, R.I., Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A., Abee, T. (1995) Membranes as a target for stress adaptation *International Journal of Food Microbiology* **28** : 255-261.
248. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406–425.
249. Salameh, M., Wiegel, J. (2007) Lipases from Extremophiles and Potential for Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, **61**: 253-277.

250. Salameh, M.A., Wiegel, J. (2007) Purification and Characterization of Two Highly Thermophilic Alkaline Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *Applied And Environmental Microbiology*, **73**: 7725–7731.
251. Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A. (2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, **94**: 295–300.
252. Sanglier, J.J., Wellington, E.M., Behal, V., Fiedler, H.P., Ellouz, G. R., Finance, C., Hacene, M., Kamoun, A., Kelly, C., Mercer, D.K.(1993) Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research in microbiology*, **144**:661-663.
253. Santos, H., Da Costa, M.S. (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments, *Environmental Microbiology*, **4**(9): 501-509.
254. Satyanarayana, T., Raghukumar, C., Shivaji, S. (2005) Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, **89** :78-90.
255. Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S., Gulati, R. (1999) Microbial lipases: Potential biocatalysts for the Future Industry. *Current Science*, **77** : 101-115
256. Schafert, T., Borchert, T.V. (2004) Bioprospecting for Industrial Enzymes: Importance of Integrated Technology Platforms for Successful biocatalyst development. *Microbial Diversity and Bioprospecting*, pp:375-390.
257. Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalyst today and tomorrow, *Nature*, **409**: 258-268.
258. Schmidt-Dannert, C. (1999) Recombinant Microbial Lipases for Biotechnological Applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**: 2123-2130.
259. Schmidt-Dannert, C., Rfia, M. L., Atomi, H., Schmid, R. D. (1996) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta* **1301** :105-114.
260. Schneider, D., Bruton, C.J., Chater, K.F. (1996) Characterization of *spaA*, a *Streptomyces coelicolor* gene homologous to a gene involved in sensing starvation in *Escherichia coli*. *Gene* **177**:243-251.
261. Schulze, B., Wubbolts, M.G. (1999) Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**:609–615.
262. Sellek, G.A., Chaudhuri, J.B. (1999) Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**:471-482.

263. Sevcikova, B., Kormanec, J. (2004) Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Archives of Microbiology*, **181**: 384–389.
264. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **19** : 627-662.
265. Shi, W., Tang, X.F., Huang, Y., Bing Tang, F.G., Shen, P. (2006) An extracellular halophilic protease SptA from a halophilic archaeon *Natrinema* sp. J7: gene cloning, expression and characterization. *Extremophiles* **10**:599–606.
266. Shima, S., Thauer, R.K., Ermler, U. (2003) Hyperthermophilic and salt-dependent formyltransferase from *Methanopyrus kandleri*. *Biochemical Society Transactions* **32**: 269-272.
267. Shomura T, Yoshida J, Amano S, Kojima M, Sand I, Niida T (1979) Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. *The journal of antibiotics*. **5**:425-435.
268. Sidhu, P., Sharma, R., Soni, S.K., Gupta, J.K. (1998) Effect of cultural conditions on extracellular alkaline lipase production by bacillus sp. Rs-12 and its characterization. *Indian Journal of Microbiology*, **38**: 9-14.
269. Singh, S.B., Barrett, J.F. (2006) Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochemical pharmacology* **71**:1006 – 1015.
270. Smacchi, E., Gobetti, M., Rossi, J. (2000) Purification and characterization of an extracellular esterase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *Le Lait*, **80**:255–265.
271. Smith, J.L., Alford, J.A. (1966), Inhibition of Microbial Lipases by Fatty Acids, *Applied Microbiology*, Vol 14, n°5.
272. Snellman EA, Sullivan E R, Colwell RR (2002) Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *European Journal of Biochemistry*, **269** : 5771–5779.
273. Sommer. P., Bormann, C., Gotz, F. (1997) Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3553-3560.
274. Stackbrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**:479-491
275. Stackebrandt, E. (1991) Aspects on the Evolution and Phylogeny of the *Actinomycetes*, *Actinomycetol* **5**: 56-63.

276. Stackebrandt, E., Ludwig, W., Seewaldt, E., Karl-heinz, S. (1983) Phylogeny of Sporeforming Members of the Order *Actinomycetales*. *International Journal of Systematic Microbiology*, **33**: 173-180.
277. Stackebrandt, E., Woese, C. R. (1981) Towards a Phylogeny of the Actinomycetes and Related Organisms. *Current Microbiology*, **5** : 197-202.
278. Stadler, P., Zandonella, G., Haalck, L., Spener, F., Hermetter, A., Paltauf, F. (1996) Inhibition of microbial lipases with stereoisomeric triradylglycerol analog phosphonates. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1304** : 229-244.
279. Staneck, J.L., Roberts, G.D. (1974) Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography, *Applied Microbiology*, **28**: p.226-231
280. Staneck, J.L., Roberts, G.D. (1974) Simplified Approach to identification of Aerobic Actinomycetes by thin layer chromatography. *Applied Microbiology*, **28**: 226-231.
281. Stone, M.J., Williams, D.H. (1992) On the evolution of functional secondary metabolites (natural product). *Molecular Microbiology*, **6**: 29-34.
282. Straathof JJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*,**13**:548–556.
283. Sugihara, A., (1992) Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem* **112**: 598-603.
284. Suihko, M.L., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. (2006) Occurrence and characterization of Actinobacteria and *Thermoactinomycetes* isolated from pulp and board samples containing recycled fibres. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**: 183-191.
285. Sunna, A., Bergquist, P. L. (2003) A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample, *Extremophiles*, **7**:63–70.
286. Suzuki, K., Nagai, K., Shimizu, Y., Suzuki, Y. (1994) Search for Actinomycetes in screening for New Bioactive Compounds. *Actinomycetologica*, **8**:122-127.
287. Suzuki, Y., Miyamoto, K., Ohta, H. (2004) novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *FEMS Microbiology Letters* **236**: 97–102.
288. Svetlitshny ,V., Rainey, F., Wiegel, J. (1996) *Themosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a Lipolytic, Anaerobic, Alkalitolerant, Thermophilic Bacterium Utilizing Short- and Long-Chain Fatty Acids in Syntrophic Coculture with a Methanogenic Archaeum. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**:1131-1137.

289. Szilagyi, A., Zavodszky, P. (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey, *Research article* **8**: 493-504.
290. Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y., Bibb, M. J. (2001) A complex role for the g-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **41** :1015–1028.
291. Tang, S.K., Wang, K., Cai, M., Zhi, X.Y., Lou, K., Xu, L.H., Jiang, C.L., Li, W.J. (2008) *Saccharopolyspora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a saline lake in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**: 555-558.
292. Tehei, M., Franzetti, B., Maurel, M.C., Vergne, J., Hountondji, C., Zaccai, G. (2002) The search for traces of life: the protective effect of salt on biological macromolecules. *Extremophiles* **6**:427–430.
293. Tesch, C., Nikoleit, K., Gnau, V., Gotz, F., Bormann, C. (1996) Biochemical and Molecular Characterization of the Extracellular Esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. *Journal of Bacteriology*, **178**:1858–1865.
294. Thangapandian, V., Ponmurugan, P., Ponmurugan, K. (2007) Actinomycetes Diversity in the Rhizosphere Soils of Different Medicinal Plants in Kolly Hills-Tamilnadu, India, for Secondary Metabolite Production. *Asian Journal of Plant Sciences*, **6**: 66-70.
295. Thumar, J., Singh, S.P. (2007) Two-step purification of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *Journal of Chromatography B*, **854**: 198-203.
296. Topakas, E., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. (2003) Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **36** :561-565.
297. Torres, S., Baigorí, M.D., Swathy, S.L., Pandey, A., Castro, G.R. (2009) Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. *Food Research International* , **42**: 454-460.
298. Torres, S., Martínez, M.A., Pandey, A., Castro, G. R. (2009) An organic-solvent-tolerant esterase from thermophilic *Bacillus licheniformis* S-86. *Bioresource Technology* **100** :896–902.
299. Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (1992) Purification and partial characterization of an esterase from *Lactococcus lactis* ssp *lactis* strain ACA-DC 127. *Lait*, **72**: 533-543.
300. Tsuzuki, W., Kitamura, Y., Suzuki, T., Mase, T. (1999) Effects of Glucose on Lipase Activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem* **63**(8): 1467-1470.
301. Van, B., Li, Z. (2002) Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**: 338-344.

302. Van Den Burg B (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, **6**:213–218.
303. Vasic-Racki, D. (2006) History of industrial biotransformations-dreams and realities. *Industrial biotransformations*, pp 1-39.
304. Ventosa, A., Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 85-94.
305. Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1982) Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *Journal of General Microbiology*, **128**:1959-1968. (2006).
306. Verger, R. (1997) Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, **15**:32-38.
307. Vieille C, Zeikus J G (1996) Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends in Biotechnology*, **14**: 183-189.
308. Vieille, C., Epting, K. L., Kelly, R. M., Zeikus, J.G. (2001a) Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase. *European Journal of Biochemistry* **268**: 6291–630.
309. Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis : a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **9**: 113-148.
310. Waller, W., Comeau, L. (1987) Caractéristiques et performances d'une lipase fongique acido-résistante. *Revue française des corps gras* , **34**: 205-212.
311. Wang, C.Y., Hsieh, Y.R., Ng, C.C., Chan H, Lin HT, Lin WST (2009) Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme and Microbial Technology*, **44**: 373-379.
312. Wang, Y., Saha, B.C. (1993) Purification and Characterization of Thermophilic and Alkaliphilic Tributyrin Esterase from *Bacillus* Strain A30-1 (ATCC 53841). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **70**: 1135-1138.
313. Wang, Y.X., Srivastava, K.C., Shen, G.J., Wang, H.Y. (1995) Thermostable Alkaline Lipase from a Newly Isolated Thermophilic *Bacillus*, Strain A30-1 (ATCC 53841). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **79**:433-438.
314. Warwick, S., Bowen, T., Mc Veigh, H., Embley, M. (1996) A Phylogenetic Analysis of the Family *Pseudonocardiaceae* and the Genera *Actinokineospora* and *Saccharothrix* with 16s rRNA Sequences and a Proposal To Combine the Genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an Emended Genus *Pseudonocardia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:293-299.

315. Ko, W.H., Wang, I.T., Ann P.J. (2005) A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 597-599.
316. Winkler, U.k., Stuckmann, M. (1979) Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharide Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia Marcescens*. *Journal Of Bacteriology*, **138**:663-670.
317. Wosten, H.A.B, Willey, J. M. (2000) Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow i.nto the air. *Microbiology*, **146** : 767–773.
318. Wright, G.D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug delivery Reviews*, **57**: 1451-1470.
319. Xiang, H., Masuo, S., Hoshino, T., Takaya, N. (2007) Novel family of cholesterol esterases produced by actinomycetes bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1774**:112–120.
320. Xu, L., Tiang, Y.Q., Zhang, Y., Zhao, L., Jiang, C.L. (1998) International journal of systematic bacteriology, *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48** : 1089-1093.
321. Yahya A RM, Anderson WA, Moo-Young M (1998) Ester Synthesis in lipase-ctalyzed reactions, *Enzyme and Microbial Technology* **23**: 438-450.
322. Yasufuku. Y., Ueji, S. I. (1997) High Temperature-Induced High Enantioselectivity of Lipase for Esterifications of 2-Phenoxypropionic Acids in Organic Solvent. *Bioorganic Chemistry* **25**, 88–99.
323. Yoon JH., Kim, I.G., Shint, Y.K., Yong-Ha P. (2005) Proposal of the genus *Thermoactinomyces* sensu strict and three new gerena, *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium* and *Seinonella*, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**: 395-400.
324. Yuan, L.J., Zhang, Y.Q., Guan, Y., Wei, Y.Z., Li, Q.P., Yu, L.Y., Li, W.J., Zhang, Y.Q. (2008) *Saccharopolyspora antimicrobica* sp. nov., an actinomycete from soil *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:1180-1185
325. Zaccai, G., Tehei, M. (2005) Adaptation to extreme environments: Macromolecular dynamics in complex systems, *Biochimica et Biophysica Acta* **1724**: 404-410.
326. Zaks, A. (2001) Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**:130-136
327. Zamost, B. L., Nielsen, H. K., Starnes, R. L. (1991) Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, **8** :71-82.

328. Zenova, G. M., Kurapova, A. I., Lysenko, A. M., Zvyagintsev, D. G. (2009) The Structural–Functional Organization of Thermotolerant Complexes of Actinomycetes in Desert and Volcanic Soils. *Eurasian Soil Science*, **42** :531–53.
329. Zhang, H., Lee, Y.K., Zhang, W., Lee, H.K. (2006) Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic Diversity by 16S rRNA gene-RFLP Analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**: 159-169.
330. Zhang, Y., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Shi, P., Wu, N., Fan, Y., Li, J., Yao, B. (2008) A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11. *Enzyme and Microbial Technology* **42**:346-352.
331. Zhou, Z.H., Liu, Z.H., Qian, Y.D., Kim, S.B., Goodfellow, M. (1998) *Saccharopolyspora spinosporotrichia* sp. nov., a novel actinomycete from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary* **48** : 53-58
332. Zuegg, J., Hönig, H., Schrag, J.D., Cygler, M. (1997) Selectivity of lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **3**:83-98.
333. Zvyagintsev, D.G., Zenova, G. M., Oborotov, G. V. (2008) Mycelial Bacteria of Saline Soils. *Eurasian Soil Science*, **41** : 1107–1114.

Summary:

The principal objective of this work is, the isolation of thermo-halophilic actinobacteria, likely to produce new bioactive metabolites for application in biotechnology. In order to achieve our objective, we adopted the exploration approach of extreme environments. We have chosen in this study an hypersalin environment: Algerian Sebkhas. Five sites were selected: Chott Melghir, Sebkha of El-Goléa, Sebkha of Oran, Sebkha of Djelfa and Sebkha of Msila. Five strains of thermo-halophilic actinobacteria were isolated from only one site which known Chott Melghir. The other sites contained bacteria and mushrooms which were drawn aside, because they do not make parties of the objective of work. Several enrichments were necessary for strains isolation starting from the sample of ground of Chott Melghir, at a temperature of 55°C and with concentration of 10% NaCl. The molecular identification was subjected to two strains, designated SAMIII and SMIIA, among the five isolates. Analysis of the 16S rRNA sequences of the two strains showed that, they are probably new species of the genus *Saccharopolyspora*. These results encouraged us to select these strains and to test their ability to produce bioactive metabolites. The obtained results of antagonism tests showed that, strain SAMIII was active against some tested bacteria. In contrast, strain SMIIA was completely inactive. The two strains were screened for enzymes activity; indeed, they produce proteolytic enzymes and lipolytic enzymes. The study on the lipolytic enzymes was thorough at two strains SAMIII and SMIIA. These lipolytic enzymes appeared particularly interesting. Strain SMIIA produces an esterase alcalophile and halotolerant. SAMIII have a lipase activity, this lipase is alcalophile, highly thermoactive, thermostable and dependent halophilic on salt. This work allows us to describe a lipase and an esterase enzyme for the first time, from two species of *Saccharopolyspora*. The whole of the given properties of these extremozymes, have an interesting potentialities for biotechnology applications. But also they can be used as model for the comprehension of strategies to adopt the stability of proteins, under extreme conditions.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو البحث عن أكتينوبكتيريا (Actinobacterias) تنمو في درجات قصوى من الحرارة و الملوحة و التي لها القدرة على إنتاج مواد حيوية ذات أهمية بيوتكنولوجية. لهذا الغرض اخترنا نهج إستكشاف بيئة متميزة بظروف صعبة للنمو، و المتمثلة في السبخة التي تنتمي إلى النظم الإيكولوجية المالحة. لقد تم إختيار خمسة مواقع هي : سبخة وهران، الجلفة، المسيلة، المنيعية و شط ملغير. تم عزل خمسة سلالات من الأكتينوبكتيريا من شط ملغير وهذا بعد عدة تحسينات في درجة حرارة 55° مئوية و 10% من كلوريد الصوديوم. أما المواقع الأخرى فقد احتوت بكتيريا وفطريات تم وضعها جانبا، لأنها لم تحقق الهدف من البحث. تم التعرف على نوع السلالات عن طريق تحديد تتابع 16S rRNA، وقد بينت النتائج إنتماء السلالتين SAMIII و SMIIA إلى أنواع جديد من جنس *Saccharopolyspora*. وهذه النتيجة دفعتنا إلى إختيار هاتين السلالتين لاختبار قدرتهما على إنتاج الأيضيات ذات التأثير ضد الأحيائي.

تم اختبار قدرة هاتين السلالتين على إنتاج المواد المضادة للبكتيريا والأنزيمات، و قد تبين أن السلالة SAMIII تنتج مواد مضادة للبكتيريا، بينما لم تظهر السلالة SMIIA أي فعالية. السلالتان SAMIII و SMIIA تنتجان الأنزيمات المفككة للبروتين و تلك المفككة للدهون. تم إجراء دراسة معمقة على الأنزيمات المفككة للدهون، و قد تبين أنها ذات أهمية. السلالة SMIIA تنتج Esterase فعالة في درجة حرارة عالية و رقم حموضة (pH) 8. أما السلالة SAMIII فتنتج Lipase متميزة، لأنها نشطة في درجة حرارة و ملوحة عالية و pH قاعدي. لقد تمكنا خلال هذا العمل من تعيين أنزيمين خاصين عزلا لأول مرة من نوع من البكتيريا التابعة لجنس *Saccharopolyspora*. تدل الخصائص العامة لهذين الأنزيمين أنهما جديان، و استعمالهما في المجال البيوتكنولوجي قد يكون ذا أهمية بالغة، كما أنهما يمثلان نموذجا من أجل دراسة الطرق المتبعة من طرف البروتينات النشطة في ظروف قصوى.