

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie
Filière : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie et santé



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude des paramètres biochimiques de l'activité
lipasique des surnageants de culture d'isolats halophiles
extrêmes**

Présenté par :

M^{lle} Kelkal khadidja et M^{lle} Messaoudi Meriem

Soutenu le : **07 Juliet 2025**

Devant le jury composé de :

M^{me} LAIB Y.

Mr NOURI H.

M^{me} BOUDJOU S.

MAA

MCA

MCB

Examinatrice

Promoteur

Présidente

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

*Nous adressons nos plus sincères et profonds remerciements à notre promoteur, **M^r Nouri Hamid**, dont l'accompagnement attentif, la disponibilité généreuse et les conseils éclairés ont constitué un véritable appui tout au long de ce travail. Sa gentillesse, sa bienveillance, sa rigueur et sa confiance ont été pour nous une source précieuse de motivation et d'inspiration.*

Nous tenons à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, à l'éclairage de leur expertise.

*Nous exprimons notre sincère reconnaissance à **M^{me} Boudjou Souhila** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant la présidence du jury.*

*Nous exprimons également nos sincères remerciements à **M^{me} Laib Yasmina**
Pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents, **Hakim** et **Nadia**, pour leur patience, leur bienveillance et leur soutien constant, tant sur le plan moral, affectif qu'émotionnel, tout au long de ces années.*

*A mes très chères sœurs, **Soumaya** et **Isra**, et mon frère **Assem**.*

*A tous les membres de la famille, **KELKAL** et **ZAIDI**.*

*A ma très chère copine **Ikram** pour son soutien sincère tout au long de mon parcours.*

*A ma collaboratrice et meilleure amie **Meriem**, pour sa complicité, sa patience, et son soutien et tous ces instants de travail, de rire et d'amitié.*

Khadidja Kelkal

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents, **Atman** et **Nora**, leur patience, leur bienveillance et leur soutien constant, tant sur le plan moral, affectif qu'émotionnel, tout au long de ces années.*

*A mon très cher frère **Mohand** qui m'a toujours soutenu et encouragé.*

*A tous les membres de la famille, **MESSAOUDI** et **TABET**.*

*A mes très chères amies, **Yassmina**, **Asma**, et **Mokrane**.*

*A ma collaboratrice et meilleure amie **Khadidja**, pour sa complicité, sa patience, et son soutien et tous ces instants de travail, de rire et d'amitié.*

Messaoudi Meriem

Sommaire

Liste des figures

Introduction	1
I. Microorganismes Halophiles	2
I.1. Haloarchées	2
I.2. Systématique des haloarchées	3
I.3. Halophilie et classification des microorganismes halophiles.....	3
I.4. Mécanisme d'adaptation aux milieux hypersalins	4
I.5. Macromolécules et enzymes des haloarchées	5
II. Lipases	6
II.1. Propriétés générales	6
II.2. Architecture générale des lipases.....	6
II.3. Processus de la lipolyse	7
III. Lipases microbiennes	8
IV. Lipases haloarchées	9
V. Immobilisation et Application biotechnologiques des lipases halophiles	10
Matériel et méthodes	12
I. Matériel utilisés	12
I.1. Matériel Biologique.....	12
I.2. Milieux de culture	12
II. Méthodologie de travail	12
II.1. Production des surnageants de culture ILI et ILII	12
II.2. Dosage de l'activité lipasique dans les surnageant de culture ILI et ILII.....	12
II.3. Préparation de l'émulsion huile-gomme arabique	13
II.4. Dialyse des surnageants	14
II.5. Caractérisation biochimique de l'activité lipasique dans les surnageants ILI et ILII...	14

II.5.1. Effet de la température sur l'activité lipasique.....	14
II.5.2. Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	14
II.5.3. Effet des solvants sur l'activité lipasique	15
II.6. Immobilisation des surnageants lipasiques à l'aide de billes d'alginate.....	15
Résultats et discussion.....	16
I. Production de surnageant IL1 et IL2.....	16
II. Dosage de l'activité lipasique des surnageants de culture en présence de différents substrats	16
III. Effet du NaCl sur l'activité lipasique des deux isolats	17
IV. Effet de la température sur l'activité lipasique des surnageants.....	18
V. Effet du pH sur l'activité lipasiques des surnageants	20
VI. Effet des solvants sur l'activité lipasique des surnageants.....	21
VI.1. Effet de l'Ethanol	21
VII. Effet de l'immobilisation du surnageant.....	26
Conclusion.....	28
Références bibliographiques	29

Liste des tableaux

Tableau I. Synthèse des principales applications biotechnologiques des lipases halophiles dans les secteurs alimentaires, pharmaceutiques et industriels	11
---	----

Liste des figures

Figure 1 : Source d'eau salée sise à Mecisna àSeddouk wilaya de Bejaia.....	2
Figure 2 : Structure tridimensionnel d'une lipase illustrant la structure α/β	7
Figure 3 : Mécanisme général de l'hydrolyse des triglycérides catalysée par une lipase.	7
Figure 4 : Activité lipasique de ILI (A) et de ILII (B) en présence de différents substrats. ...	16
Figure 5 : Profil de l'activité lipasique des surnageants de culture des isolats ILI et ILII.....	17
Figure 6 : Activité lipasique des surnageants de culture des ILI et ILII dialysés.	18
Figure 7 : Activité lipasique de ILI (A) et ILII (B) en fonction des variations de température.	18
Figure 8 : Pourcentage relatif de l'activité lipasique des surnageants lipasiques I et II en fonction de la température.....	19
Figure 9 : Activité lipasique ($\mu/1min$) des surnageant I et II en fonction des variations de pH.	20
Figure 10 : Pourcentage relatif d'activité des surnageants lipasique de lipase I et II en fonction du pH.	21
Figure 11 : Activités lipasiques en % en présence de différentes concentrations d'éthanol pour les surnageants I et II.....	21
Figure 12 : Effet du DMSO sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.	23
Figure 13 : Effet de l'acétone sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.	23
Figure 14 : Effet de l'hexane sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.	24
Figure 15 : Effet du glycérol sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.	24

Figure 16 : Activité lipasique des surnageants de culture des isolats Ili et ILII, après immobilisation..... 26

Introduction

Introduction

Dans un contexte industriel en constante évolution, la demande en molécules actives augmente énormément, notamment dans les domaines pharmaceutique et cosmétologique, une demande qui s'oriente de plus en plus vers de nouvelles molécules biologiques dont les processus de production sont respectueux de l'environnement, les molécules bioactives doivent répondre, à certaines exigences, à l'instar d'une activité spécifique et l'absence de toxicité. Les enzymes répondent parfaitement à ces critères ce qui explique d'ailleurs leur utilisation dans plusieurs domaines qui touchent à la santé humaine (*Anonyme 1*).

Or, les enzymes actuellement exploitées dans ces secteurs montrent rapidement des limites, notamment, leur l'instabilité en présence de solvants et des pH peu favorables à leurs activités (Wang et al., 2019).

La sensibilité des enzymes vis-à-vis des environnements peu propices, peut être palliée par l'utilisation des enzymes issues des microorganismes extrêmophiles, et en particulier les haloarchées. Ces microorganismes qui se développent dans des environnements hyper salins, produisant des enzymes qui montrent une grande tolérance aux conditions extrêmes ; tel que la salinité, la température, le pH élevés et la présence solvants organiques (Ozgen et al., 2016;Hagaggi, 2020).

Dans l'optique de développer des solutions cosmétologiques intégrant des enzymes halophiles extrêmes, notre choix s'est porté sur l'exploration du potentiel des lipases produites par les haloarchées, isolées dans la région de Bejaia. Ce choix est motivé, par une documentation assez récente, ainsi qu'une originalité dans l'utilisation de ces enzymes (Yavari-Bafghi & Amoozegar,2025).

L'utilisation de ces enzymes en cosmétologie nécessite une étape fondamentale ; la caractérisation biochimique, notre travail s'est, donc, focalisé sur l'évaluation de l'activité lipasique des surnageants de deux cultures produites par deux isolats de microorganismes halophiles extrêmes locaux, ce travail se veut comme une étape préliminaire essentielle pour intégration future de ces enzymes dans des formulations à usage cosmétique.

Synthèse bibliographique

I. Microorganismes Halophiles

I.1. Haloarchées

Les haloarchées regroupent les microorganismes appartenant au domaine Archea (Woese & Fox, 1977). Ce sont des microorganismes adaptés à des environnements hypersalins (Moopantakath et al., 2023). Les archées halophiles, vivent dans des concentrations élevées en NaCl (3–4 M) et de haute température, elles produisent diverses biomolécules (Singh & Singh, 2017). Elles possèdent des propriétés biotechnologiques intéressantes, et sont stables à des conditions de concentration en sel et en températures élevées, voir même en situations de déshydratation, on les retrouve dans divers écosystèmes salins tels que les lacs salés, salines solaires, et les saumures où ces conditions extrêmes sont réunies (Moopantakath et al., 2023). La figure 1, illustre un exemple d'un tel environnement ; une source d'eau salée naturelle située à Mecisna (commune de Seddouk, Bejaia), site d'isolement des souches étudiées.



Figure 1 : Source d'eau salée sise à Mecisna à Seddouk wilaya de Bejaia.

Ces propriétés font des haloarchées des microorganismes d'intérêt pour diverses applications biotechnologique et industrielles, les usages de leurs métabolites peuvent être regroupé en plusieurs catégories notamment dans la production des enzymes halophiles (Moopantakath et al., 2023; Singh & Singh, 2017) tel que les protéases, les lipases, les estérases,

et les amylases (Ma et al., 2010). Ces enzymes se distinguent par leur activité et leur stabilité à des fortes de NaCl environ 4M et peuvent aussi perdre irréversiblement leurs activités lorsque cette concentration est réduite (Akolkar & Desai, 2010).

I.2. Systématique des haloarchées

Pour comprendre la diversité des haloarchées il faut passer par leur positionnement dans la classification du vivant. Ces microorganismes extrêmophiles appartiennent au domaine Archaea, l'un des trois grands domaines du vivant proposé par Woese et Fox en 1977, aux côtés des Bactéries et des Eucaryotes (Woese & Fox, 1977).

Les haloarchées composent un groupe monophylétique d'archées strictement halophiles, rattachées à la classe Halobacteria au sein du phylum Euryarchaeota, qui appartient au domaine Archaea (Amoozegar et al., 2017).

Selon la classification actuelle la classe Halobacteria comprend trois ordres principaux ; *Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales*, ces ordres regroupent six familles valides ; (*Halobacteriaceae*, *Halococcaceae*, *Haloaecylaceae*, *Haloferacaceae*, *Halorubraceae* et *Natrialbaceae*).

La classification de ces microorganismes dépend de plusieurs critères complémentaires ; des caractères phénotypiques (morphologie cellulaire, pigmentation des colonies), la composition lipidique membranaire ainsi que des analyses phylogénétiques basées sur le gène 16S rRNA (Amoozegar et al., 2017).

I.3. Halophilie et classification des microorganismes halophiles

L'halophilie définit la capacité d'un microorganisme à se développer dans des milieux salins, on distingue 3 catégories principales basées sur leurs tolérances aux concentrations de sels ;

Les halophiles modérés : croissance optimale a des concentrations de 0.5 à 2.0M de NaCl, le cas de *Halobacillus Halophilus* rapporté par Saum et Muller en 2008 (Saum & Müller, 2008).

Les halophiles extrêmes (comme les haloarchées) : croissance optimale a des concentrations supérieures à 2M de NaCl (Moopantakath et al., 2023).

En plus de ces derniers certains microorganismes sont qualifiés de halotolérants, ils peuvent survivre à des conditions de forte salinité mais ne nécessitent pas forcément de forte concentration en NaCl pour leur croissance optimale, ils peuvent évidemment croître dans des environnements salins modérés, ce groupe inclut certaines bactéries et archées non halophiles (Ma et al., 2010).

I.4. Mécanisme d'adaptation aux milieux hypersalins

Les microorganismes halophiles possèdent une propriété fondamentale c'est que leur cytoplasme doit être au moins iso-osmotique, par rapport à leurs environnements, le transport actif de l'eau vers l'intérieur de la cellule pour compenser les pertes dues à l'osmose, n'est pas une solution énergétiquement viable, car les membranes biologiques des haloarchées sont perméables à l'eau (Oren, 2008).

Ces microorganismes ont dû mettre en place des stratégies face à la haute pression osmotique imposée par leurs milieux, pour maintenir leur intégrité cellulaire. Selon Oren, ces mécanismes d'équilibrage osmotique reposent sur deux approches principales distinctes (Oren, 2008) :

- Stratégie "Salt-in"

Parmi les mécanismes d'adaptation osmotiques développés par les haloarchées, la stratégie "Salt-in", qui est l'un des moyens efficaces pour le maintien de l'équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu extérieur, elle est typique des *Halobacteriaceae*, et repose sur l'accumulation de concentrations molaires élevées d'ion potassium (K⁺) et chlorure (Cl⁻) dans la cellule, ainsi les concentrations intracellulaires de KCl peuvent dépasser 4M, ce qui permet aux cellules de compenser l'énorme pression osmotique externe (Oren, 2008).

Cette stratégie présente un avantage énergétique, puisqu'elle évite la synthèse coûteuse de soluté compatible, contrairement à la stratégie "Salt-out" adoptée par d'autres halophiles.

Toutefois elle implique des contraintes majeures ; toutes les macromolécules intracellulaires en particulier les enzymes, doivent être fonctionnelles dans des conditions de concentrations élevées de KCl, ce qui nécessite des adaptations structurales profondes, comme une forte proportion d'acides aminés (aspartate et glutamate) à la surface des protéines,

une faible hydrophobicité, et une dépendance au sel pour leur repliement et stabilité conformationnelle (Oren, 2008).

- Stratégie “Salt-out” (soluté compatible)

Certains autres microorganismes adoptent une approche alternative à la stratégie “Salt-in”, appelée “Salt-out”, qui repose sur l’accumulation de soluté compatible dans le cytoplasme (Oren, 2008). Ces composés organiques neutres tels que l’écytoïne, la glycine-bétaïne ou encore le tréhalose, permettent de maintenir l’équilibre osmotique sans modifier la composition ionique interne de la cellule, ils protègent les protéines et les membranes sans perturber les fonctions métaboliques (Ma et al., 2010).

Par contre cette stratégie est plus coûteuse énergétiquement parce que la biosynthèse de ces molécules exige des ressources importantes de carbone et d’azote (Ma et al., 2010 ;Oren, 2008).

I.5. Macromolécules et enzymes des haloarchées

Les protéines des haloarchées sont riches en acides aminés acide tel que le glutamate et l’aspartate, ce qui leur confère une importante charge négative notamment sur leur surface (DasSarma & DasSarma, 2015).

Ces propriétés permettent une meilleure solubilité dans les milieux salins, en favorisant les interactions avec les cations (Na^+ et K^+), tout en réduisant l’agrégation des protéines, en parallèle ces protéines par leurs faibles hydrophobicités, c’est à dire elles ont un nombre réduit de résidus hydrophobe à la surface, ceci limite les interactions indésirables dans un environnement ionique très chargé (DasSarma & DasSarma, 2015) .

Des études structurales ont également montré que les enzymes halophiles possèdent une densité élevée de ponts salins et d’interactions électrostatiques, ce qui renforce la cohésion de leur structure tridimensionnelle même en présence de concentration très élevées de sel (DasSarma & DasSarma, 2015).

II. Lipases

II.1. Propriétés générales

Les lipases sont largement réparties chez les êtres vivants et se regroupent en deux grandes branches phylogénétiques ; l'une constituées des bactéries, et l'autre regroupe les eucaryotes y compris les animaux, les plantes, les champignons et les archées (Jaeger et al., 1994).

Les lipases (EC 3.1.1.3) sont des enzymes carboxylestérases qui ont la capacité d'hydrolyser, et parfois de produire, des acylglycérols à longue chaîne ($\geq C_{10}$) (Jaeger et al., 1999). Historiquement, deux caractéristiques ont été employées pour leur identification :

- L'activation interfaciale ; c'est-à-dire une amplification significative de l'activité en présence d'une interface huile/eau
- La présence d'un « couvercle » protéique qui se lève pour révéler le site actif (Jaeger et al., 1999).

Cependant, ces critères ne s'appliquent pas de manière universelle, on considère généralement que les lipases sont des hydrolases qui agissent spécifiquement sur le triglycéride (Chandra et al., 2020).

II.2. Architecture générale des lipases

Les lipases disposent d'une structure tridimensionnelle préservée connue sous le nom de pli α/β -hydrolase, qui comprend un noyau constitué de huit brins β parallèles, entourés par des hélices α formant une structure similaire à un « hot-dog » (David et al., 1992 ; Lee et al., 2006), Cette structure sert de fondement au site actif.

Le centre catalytique se compose d'un trio d'acides aminés : une sérine, située dans le motif conservé Gly-X-Ser-X-Gly, ainsi qu'une histidine et un acide aspartique ou glutamique. Ces trois résidus agissent en synergie pour faciliter l'hydrolyse des liaisons esters dans les triglycérides (Schreck & Grunden, 2014).

Un aspect spécifique des lipases est l'existence d'un couvercle, une boucle mobile qui cache le site actif lorsqu'aucun substrat n'est présent. Ce couvercle se lève en présence d'une

interface huile/eau, ce qui déclenche l'activation de l'enzyme en rendant son site catalytique disponible (Schreck & Grunden, 2014).

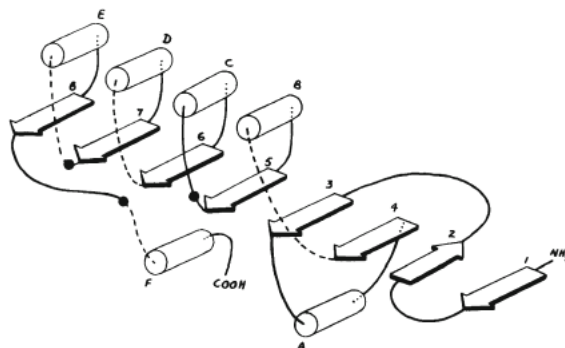


Figure 2 : Structure tridimensionnel d'une lipase illustrant la structure α/β (David et al., 1992).

II.3. Processus de la lipolyse

Les lipases ont pour substrat naturel les ester de glycérol elles catalysent l'hydrolyse non seulement des triacylglycérols mais aussi des diacylglycérol et monoacylglycérol, concernant les phospholipides cet activité s'étend aussi aux phospholipases (Sharma & Kanwar, 2014).

La lipolyse catalysée par les lipases se déroule exclusivement à l'interface lipide-eau, ce qui explique que la vitesse de la réaction de lipolyse est influencée directement par la concentration de molécule de substrat exprimé en (mol/m^3) (Jaeger et al., 1994).

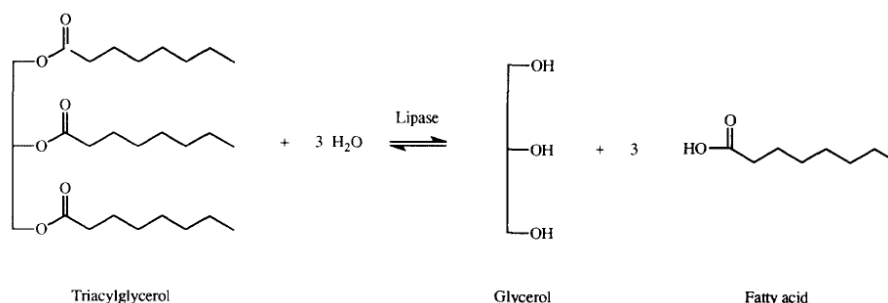


Figure 3 : Mécanisme général de l'hydrolyse des triglycérides catalysée par une lipase (Jaeger et al., 1994).

III. Lipases microbiennes

Les lipases microbiennes sont les plus valorisées, en raison de leur diversité d'activités catalytiques, de leur grande stabilité, de leur facilité de manipulation génétique ainsi que de leur capacité de production élevée sur des milieux de culture économiques (Reetz, 2013; Mendes et al., 2012).

Parmi les micro-organismes couramment utilisés pour la production de lipases, les bactéries, sont plus intéressantes par rapport aux levures car elles produisent des enzymes douées d'activités enzymatiques supérieures (Hasan et al., 2006). Elles présentent souvent des pH optimaux neutres ou alcalins, et sont généralement thermostables ; on peut-on citer *Bacillus spp.*, *Achromobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*

1. Propriétés des lipases microbiennes

Les lipases provenant de sources microbiennes présentent une large variété tant structurale que fonctionnelle. Ces molécules ont généralement un poids moléculaire qui varie de 19 à 60 kDa, elles sont majoritairement monomériques. L'activité enzymatique qu'elles présentent est grandement dépendante du pH, l'efficacité maximale étant notée autour de pH 7, même si elles ont la capacité de rester actives dans une fourchette plus étendue, allant de pH 4 à 8, des souches spécifiques, telles que *Pseudomonas nitroaeruginosa*, sont capables de produire des lipases actives dans des conditions de pH extrêmement alcalins (jusqu'à 11) (Karadzic et al., 2006).

Sur le plan thermique plusieurs lipases microbiennes montrent une stabilité remarquable ; par exemple, une lipase thermo-alcaline issue de *B.stearothermophilus* présente une activité optimale à 55°C conserve plus de 70% d'activité après 0.5h à 70°C (Ben Bacha et al., 2015).

Du point de vue de la catalyse, les lipases microbiennes peuvent agir soit sans spécificité de région, soit avec une spécificité régionale pour les positions 1 et 3 des acylglycérols (Chandra et al., 2020). Certaines montrent même une stéréospécificité partielle. Ces enzymes, en particulier, sont idéales pour les réactions dans des environnements organiques où elles peuvent catalyser l'estérification, la transestérification ou l'aminolyse. Le comportement catalytique de ces derniers est influencé par le type de solvant employé, en raison de leur structure adaptable qui peut s'ajuster à divers environnements (Chandra et al., 2020).

IV. Lipases haloarchées

Les lipases provenant des halo archées se caractérisent par leur performance dans des conditions extrêmes de salinité, de température et de pH et en présence de solvants organiques (Ozgen et al., 2016;Hagaggi, 2020).

Les lipases issues des haloarchées présentent des propriétés physico chimiques remarquables. Par exemple la lipase extracellulaire produite par *halolamina sp* montre une activité maximale à 3.6M NaCl, elle conserve plus de 70% de son activité sur une large plage de pH allant de 3 à 10, et reste active en présence de solvants organiques tels que le méthanol, l'acétone ou le DMSO, bien qu'elle soit inhibée par le n-butanol(Okay et al., 2022).

Une souche haloarchéenne, désignée *Haloarcula sp* G41, a été isolée à partir du sol salé du Lac de Yuncheng en Chine. L'identification génétique, fondée sur l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S, a montré une similarité de 97,4 % avec *Haloarcula salaria*. Cette souche est une archée halophile extrême, nécessitant impérativement la présence de sel pour croître car aucune croissance n'est observée en l'absence de NaCl (Ventosa et al., 1998), elle présente une croissance optimale entre 37 °C et 40 °C, et à un pH compris entre 6 et 8. Après purification, la masse moléculaire de la lipase produite par cette souche est estimée à environ 45 kDa. L'enzyme présente une activité optimale à 70 °C et reste stable sur une large plage de températures allant de 20 °C à 80 °C, conservant jusqu'à 60 % de son activité après 24 heures à 90 °C, cette thermostabilité dépasse celle de nombreuses lipases d'archées halophiles, dont les activités maximales sont généralement rapportées entre 45 °C et 65 °C (Camacho et al., 2009;Boutaiba et al., 2006;Ozcan et al., 2009).

Le pH optimal d'activité de cette lipase est de 8,0, et elle demeure stable dans une plage allant de pH 7 à 11, ce qui indique une nature alcalin stable (Li & Yu, 2014) Des résultats similaires ont été observés par Bhatnagar et collaborateurs qui ont montré que la lipase de *Natronococcus TC6* avait une activité maximale à pH 7,0 avec le substrat p-NPP (Boutaiba et al., 2006). Par ailleurs, Ozcan et collaborateurs sont rapporté que cinq souches d'archées halophiles présentaient une activité optimale à pH 8,0 (Ozcan et al., 2009).

En ce qui concerne la salinité, l'activité maximale de la lipase est observée à 15 % de NaCl, elle chute drastiquement en absence de sel, mais retrouve 82,5 % de son activité après réintroduction du NaCl, ce qui confirme sa nature halostable (Mevarech et al., 2000). En effet,

les enzymes halophiles nécessitent généralement des concentrations en NaCl ou KCl comprises entre 1 et 4M pour maintenir leur activité et stabilité optimales (Mevarech et al., 2000) aussi, cette lipase se révèle hautement stable en présence de solvants organiques hydrophobes, (comme l'hexane ou l'isooctane), et montre même une activité accrue avec le glycérol. En revanche, son activité est inhibée en présence de solvants polaires tels que l'acétone et le méthanol.

Enfin, ces résultats divers démontrent que les lipases haloarchéennes présentes des caractéristiques et des propriétés physico-chimiques distinctes, une variation existe entre les souches, et entre les lipases elles même.

V. Immobilisation et Application biotechnologiques des lipases halophiles

L'immobilisation enzymatique est une technique qui a pour but, le maintien des enzymes dans une géométrie adéquate pour améliorer leurs puretés et leurs stabilité (Joseph et al., 2008). Ce procédé permet également d'optimiser la stabilité opérationnelle et thermique d'une enzyme, tout en induisant parfois un changement conformationnel qui facilite l'accès du substrat au site actif (Khan et al., 2019). Les lipases issues de *Haloarcula* libre et immobilisé ont eu un succès pour leur utilisation dans la production de biodiesel, ils ont atteint respectivement un rendement de 80.5 et 89.2%, cette méthode est en cours d'optimisation dans le but d'obtenir des rendement plus élevée (Li & Yu, 2014).

Afin d'illustrer concrètement les domaines d'application des lipases, le tableau 1 en présente une synthèse basée sur les données bibliographiques ;

Tableau I. Synthèse des principales applications biotechnologiques des lipases halophiles dans les secteurs alimentaires, pharmaceutiques et industriels

Domaine	Exemple d'applications	Références
Alimentaire	Margarine, fromage, beurre	(Jaeger et al., 1994).
Biocatalyse	Biodiesel, molécules chirales pour médicaments	(Jaeger et al., 1994).
Pharmaceutique	Intermédiaire de drogue, molécule active	(Yavari-Bafghi & Amoozegar, 2025).
Industriel	Détergents, traitement de déchets	(Schreck & Grunden, 2014).

Malgré leur fort potentiel, les enzymes halophiles présentent encore plusieurs limites techniques ; leurs structure atypique complique les approches d'ingénierie génétique rendant difficile la prédiction des effets des mutation, elles sont aussi instable en dehors des milieux hypersalins ce qui peut entrainer leur agrégation et une perte d'activité , enfin leur expression en hôtes classiques comme *E.coli* reste problématique, en raison du mauvais repliement des protéines menant souvent à la formation d'un corps d'inclusion inactif ce qui freine leurs exploitation industrielle (Yavari-Bafghi & Amoozegar, 2025).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel utilisés

I.1. Matériel Biologique

Dans la présente étude, deux isolats de microorganismes halophiles extrêmes sont utilisés pour la production des lipases, nous les avons appelés : Isolat Lipase I (ILI) et Isolat Lipase II (ILII). Ils proviennent de la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université de Bejaia. Ils sont isolés à partir des salines de Seddouk à Bejaia en 2019, ces isolats sont stockés à -80° C.

Pour la revivification des isolats, un morceau de glace des cryotubes de -80°C est mis en culture sur le milieu Brown pendant 7 jours à 37°C sous agitation.

I.2. Milieux de culture

Deux milieux de culture sont utilisés dans cette étude, le milieu Brown et le milieu Brown modifié spécifiquement formulé pour induire et optimiser la production des lipases. Le milieu Brown est utilisé pour la revivification des isolats stockés à -80°C ; tandis que le milieu Brown modifié est utilisé pour la production des lipases.

II. Méthodologie de travail

II.1. Production des surnageants de culture ILI et ILII

A l'issue de la phase de revivification, les cultures obtenues dans le milieu Brown ont été transférées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 100 ml de milieu Brown modifié. Les cultures sont incubées pendant 23 jours à 37°C sous agitation constante, cette étape a permis d'induire la production enzymatique par les deux isolats ILI et ILII.

II.2. Dosage de l'activité lipasique dans les surnageant de culture ILI et ILII

Le dosage de l'activité enzymatique à partir du surnageant est réalisé par la méthode de titration acide-base, introduite pour la première fois en 1966 par N. W. Tietz et collaborateurs (Tietz & Fiereck, 1966), cette méthode consiste à neutraliser les acides gras issus de la dégradation du substrat.

Une solution de gomme arabique (voir plus bas) est utilisée comme agent émulsifiant dans la préparation du substrat destiné au dosage de l'activité lipasique. En effet, l'huile d'olive,

étant hydrophobe ne se mélange pas avec l'eau. La gomme arabique permet de stabiliser l'émulsion formée, en dispersant l'huile en fines gouttelettes homogène dans le milieu aqueux. Cette émulsion stable assure un meilleur contact entre l'huile la lipase présentes dans le surnageant, ce qui permet une hydrolyse plus efficace et reproductible du substrat. Cette approche est couramment utilisée pour le dosage de l'activité lipasique,

Un volume de Deux ml de chaque culture, ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 10 minutes, 0,5ml de surnageant sont mélangés avec 5ml de solution tampon phosphate 0.2M à pH 7 et 5ml d'émulsion de gomme arabique. En parallèle, un témoin négatif a été préparé en remplaçant le surnageant par de l'eau distillée. Cette analyse est réalisée en triplicat.

Le mélange réactionnel est incubé à 37°C incubé sous agitation pendant 30 minutes. La réaction enzymatique a été stoppée par l'ajout de 1 ml d'un mélange éthanol/acétone (v/v).

Après arrêt de la réaction, 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine ont été ajoutées à chaque tube. A l'aide de la solution NaOH 0,1N une titration a été réalisé jusqu'à l'obtention d'une couleur rose clair stable pendant 10 secondes au moins.

La même démarche est entreprise avec deux substrats différent ; il s'agit de l'huile de colza et l'huile de tournesol.

Le calcul de l'activité lipasique se fait comme suit :

$$\mu 0 = \text{Activité } (\mu\text{mol/l. min}) = (Vs - VB).N.1000/ VR. T$$

Ce protocole est adapté à la méthode de dosage par Ozgen et collaborateurs (Ozgen et al., 2016).

II.3. Préparation de l'émulsion huile-gomme arabique

Dans un bécher contenant 100 ml d'eau distillée portée à ébullition, 2 g de gomme arabique ont été ajouté progressivement en pluie fine. Une fois la gomme entièrement dispersée, le mélange a été transféré dans un cristallisateur contenant de la glace et agité jusqu'à obtention d'une solution claire, 90 ml de cette solution (2%) est additionné de 10ml de l'huile d'olive, le mélange est agité 4 fois pendant 1min en faisant des pauses de 30 secondes entre deux agitations successives, pour obtenir une émulsion qui sers de solution substrat. L'huile d'olive est remplacée par l'huile de tournesol /huile de colza pour les expériences de dosage de l'activité lipasique avec ces deux huiles comme substrat (Cardenas et al., 2001).

II.4. Dialyse des surnageants

Des membranes de dialyse d'un seuil de coupure de 5kDa *Cellu Sep T1* sont utilisées pour réaliser des boudins de dialyse. Les membranes de dialyse ont été rincées à l'eau distillée pour éliminer toutes impuretés. Les surnageant issus des cultures en milieu Brown modifié ont été récupérés par centrifugation à 4500 rpm pendant 15 minutes et introduit dans les boudins de dialyse a raison de 10 ml par boudin. Les extrémités des membranes ont été soigneusement fermées et chaque boudin a été immergé dans 1 L d'eau distillée, sous agitation douce pendant 2 heures.

L'eau a ensuite été remplacée, et la dialyse a été poursuivie pour 24h sous agitation pour favoriser l'élimination des sels.

À la fin de la dialyse, le contenu des boudins a été récupéré et l'activité enzymatique a été mesuré et calculer en suivant le même protocole de titration décrit précédemment.

II.5. Caractérisation biochimique de l'activité lipasique dans les surnageants ILI et ILII

II.5.1. Effet de la température sur l'activité lipasique

Pour évaluer l'effet de la température sur l'activité lipasique des surnageants, celle-ci a été mesuré à pH 7 en incubant pendant 30 minutes à différentes températures (20°C, 30°C, 37°C, 50°C, 60°C et 70°C). Après incubation, les échantillons ont été refroidis à température ambiante. L'activité lipasique a été mesurée comme précédemment décrit.

II.5.2. Effet du pH sur l'activité enzymatique

Afin d'évaluer l'effet du pH sur l'activité lipasique des surnageants, les surnageants sont incubés à différents pH 4-4.5-5-5.5-6-6.5-7-7.5-8. Pour chaque pH un tampon adapté à 0.2M a été préparés ; un tampon citrate pour pH (4 /4.5/5 et 5.5), un tampon Tris-HCL pour le pH basique (8), un tampon phosphate pour les pH (6/6.5 et 7) le tampon phosphate à pH 7 est utilisé pour le témoin positif. La mesure de l'activité lipasique a été réalisée par le même protocole cité ci-dessus.

II.5.3. Effet des solvants sur l'activité lipasique

L'effet de différents solvants organiques sur l'activité lipasique des surnageants a été étudié. A cet effet, les solvants utilisés dans cette étude sont : l'éthanol, le glycérol, l'acétone, l'hexane et le DMSO. Ils ont été testés à trois concentrations différentes : 10%, 20% et 30% avec deux temps d'incubation 1h et 2h.

Pour évaluer l'activité en présence de 10% de solvant ; 450µl de surnageants est mélangé avec 50µl de ce dernier, le même raisonnement a été suivi pour 20% et 30%.

Le mélange homogénéisé, est incubé à 4C° pendant 1h, à l'issus de cet incubation l'activité lipasique des surnageants ILI et ILII a été mesuré après 1h et 2h d'incubation, avec la méthode de titration décrite précédemment.

II.6. Immobilisation des surnageants lipasiques à l'aide de billes d'alginate

Un essai d'immobilisation des sur les surnageants ILI et ILII a été réalisée par encapsulation dans une matrice d'alginate, à 2 % (m/v). A cet effet, 0,2 g d'Alginate ont été dissous dans 10 ml d'eau distillée préalablement chauffée à 50 °C, afin d'assurer une dissolution complète. Une fois la solution homogène obtenue, la source de chaleur a été arrêtée et 2 ml de surnageant enzymatique ont été ajoutés à la préparation.

Le mélange a été agité doucement jusqu'à refroidissement complet, afin de garantir une bonne homogénéisation sans dénaturer l'enzyme. Une fois refroidie, la solution a été prélevée à l'aide d'une seringue, puis introduite goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 25 % (m/v). Le contact entre l'alginate et le calcium a permis la formation instantanée de billes gélifiées, emprisonnant les enzymes à l'intérieur. Les billes obtenues ont ensuite été lavé 3 fois à l'eau distillée puis séchées pendant 4 heures et 30 minutes dans une étuve ventilée à 37°C selon le protocole décrit par Benhouria (Benhouria et al., 2015). L'activité lipasique des enzymes immobilisées a été mesurée le jour même de l'immobilisation, puis à nouveau une semaine après, afin d'évaluer la stabilité de l'enzyme au cours du temps.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I. Production de surnageant ILI et ILII

Afin de réaliser l'ensemble des tests de caractérisation biochimiques, la préparation des surnageant de culture est réalisée en culture batch de 100ml incubé à 37°C sous agitation pendant 23 jours, le milieu de culture est supplémenté de l'huile d'olive (2,5%) pour induire la production de la lipase. Plusieurs auteurs ont rapporté que l'huile d'olive est l'une des meilleures sources pour l'induction de la production de lipase chez les microorganismes notamment les haloarchées même à des concentration inférieures à 2,5% (Sugihara et al., 1991 ;Hagaggi, 2020).

II. Dosage de l'activité lipasique des surnageants de culture en présence de différents substrats

L'activité lipasique des surnageants de culture a été mesurée en présence de trois substrats ; l'huile de colza, l'huile d'olive et l'huile de tournesol par titration en triplicat (Figure 4).

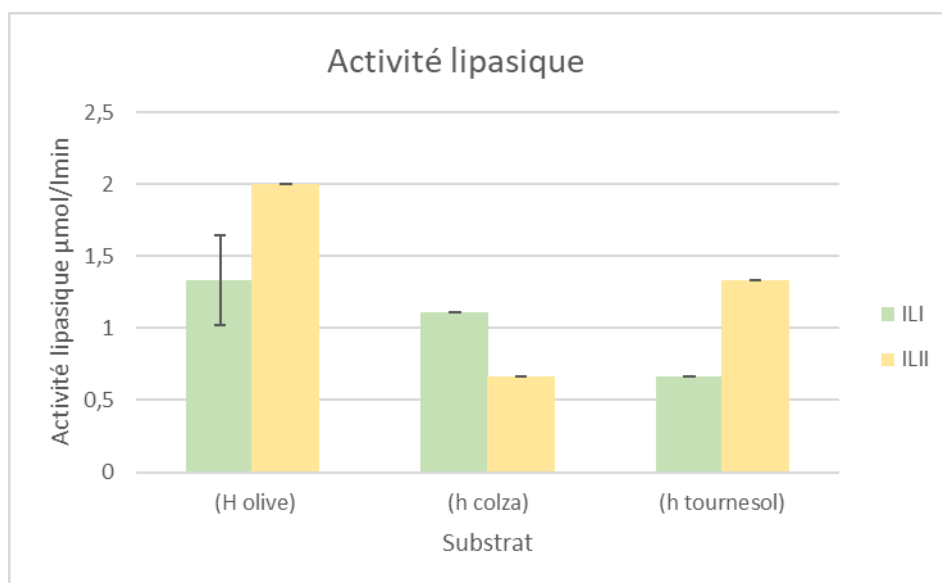


Figure 4 : Activité lipasique de ILI et de ILII en présence de différents substrats.

Les résultats montrent que l'activité est maximale avec l'huile d'olive comme substrat ; pour les deux surnageants, elle est suivie par celle du colza et du tournesol respectivement pour le surnageant (ILI). Pour le deuxième surnageant (ILII) si, l'huile d'olive reste le substrat qui montre la plus forte activité lipasique, le tournesol vient en deuxième position, et suivi par l'huile de colza (ILII). Les lipases des halophiles peuvent être actives sur plusieurs substrats, Ozgen et collaborateurs ont montré que la

lipase de *Haloarcula hispanica* est capable d'hydrolyser une large gamme de substrats ; composée de 7 huiles (Ozgen et al., 2016).

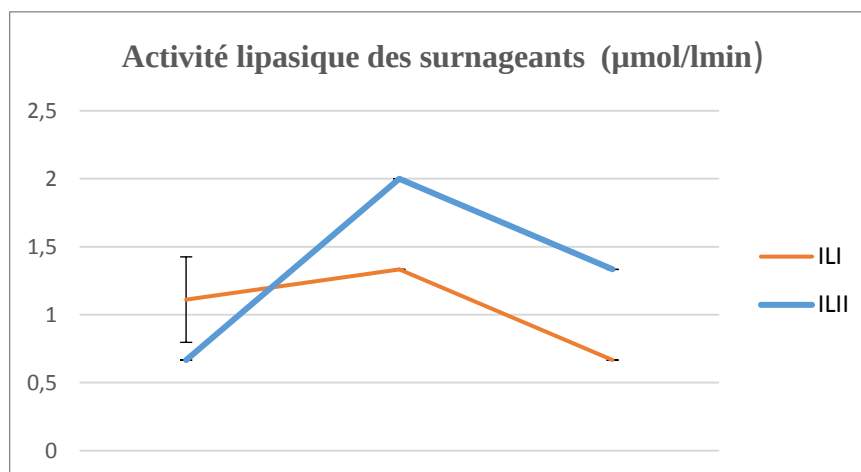


Figure 5 : Profil de l'activité lipasique des surnageants de culture des isolats ILI et ILII.

La comparaison entre les profils de l'activité des deux surnageants (Figure 5) montre une activité plus importante pour ILII sur deux substrats, l'huile d'olive et l'huile de tournesol, cependant ILI montre une activité plus importante que celle de ILII sur l'huile de colza, ce résultat suggère que les deux isolats produisent des lipases probablement différentes.

III. Effet du NaCl sur l'activité lipasique des deux isolats

Les enzymes extracellulaires halophiles évoluent dans un environnement fortement saturé en NaCl leur activité est optimale dans ces conditions ; nous avons voulu tester l'impact de l'absence total de sel sur cette activité. L'activité des surnageant est testée avant et après dialyse ; les résultats sont rapportés dans la figure 6.

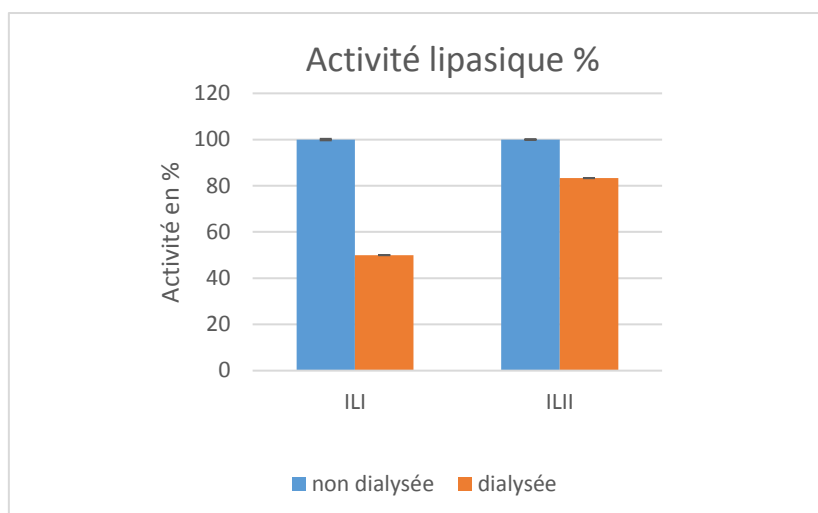


Figure 6 : Activité lipasique des surnageants de culture des ILI et ILII dialysés.

L'ILI perd 50 % de son activité après dialyse tant dis que l'ILII ne perd que presque 20 % de son activité. Les enzymes halophiles montrent une certaine dépendance vis-à-vis du sel qui n'est pas toujours la même, si certaines enzymes sont capables de supporter une désaliénation quasiment totale (Ozgen et al., 2016) d'autres perdent plus de 50 % de leur activité en absence de sel (Hagaggi, 2020). Ces observations renforcent l'hypothèse quant à la différence entre les deux lipases.

IV. Effet de la température sur l'activité lipasique des surnageants

L'activité lipasique des surnageants est étudiée sur une plage de température allant de 20 à 70°C. Le résultat de cette étude est représenté dans les figures 7 et 8.

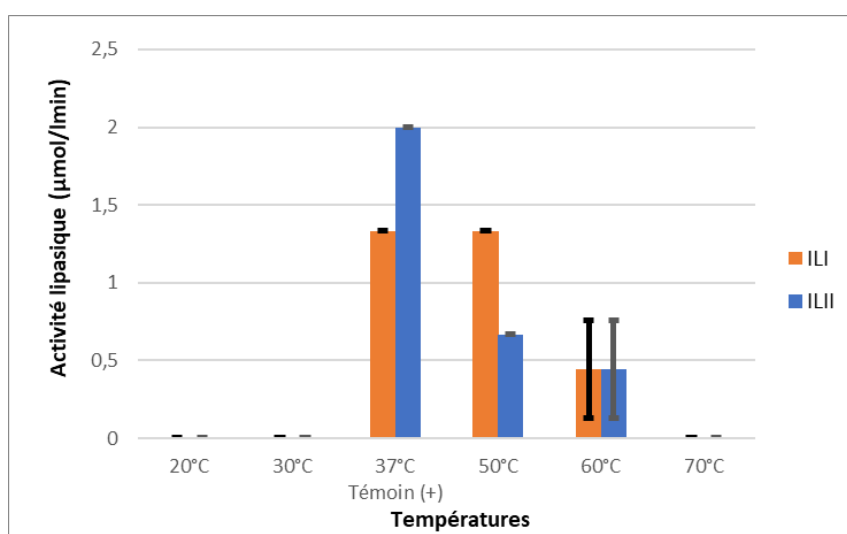


Figure 7 : Activité lipasique de ILI et ILII en fonction des variations de température.

ILI présente une activité maximale à partir de 37°C et se maintient jusqu'à 50°C, au-delà, cette activité chute drastiquement et perd plus de 70% à 60°C, pour devenir quasiment nulle à 70°C. Pour ILII elle est maximale des 37°C mais décline progressivement dès 50°C jusqu'à la perte complète de l'activité à 70°C.

Les deux surnageants présentent un comportement différent vis à vis les températures testées, la température optimale observée pour ILI se situe dans l'intervalle [50-37°C], rapporté pour les lipases d'origine haloarchéenne, dont l'activité est maximale entre 45°C et 65°C (Boutaiba et al., 2006; Camacho et al., 2009; Ozcan et al., 2009). De même l'activité modérée de ILII avec un pic unique à 37°C s'apparente aux résultats de (Hagaggi, 2020) où l'activité maximale était atteinte à 40°C, avec une perte progressive au-delà. Enfin, Ozgen et al en 2016 ont rapporté une lipase partiellement purifiée montrant une activité maximale à 45°C et capable de préserver jusqu'à 55% de son activité même à 70°C ce qui contraste avec nos surnageants, dont l'activité est quasi totalement inhibée à cette température (Ozgen et al., 2016).

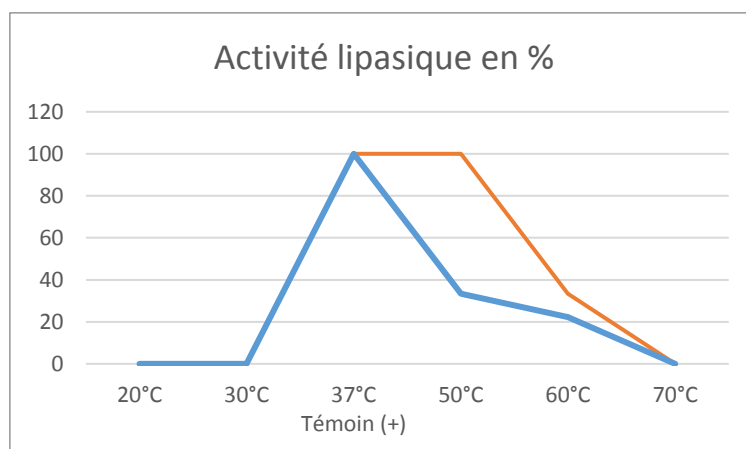


Figure 8 : Pourcentage relatif de l'activité lipasique des surnageants lipasiques I et II en fonction de la température.

La figure 8 représentant une comparaison des profils des activités enzymatiques (en pourcentage d'activité) des deux surnageants en fonction de la température, elle met en évidence la différence de spectre thermique des deux enzymes.

Ces profils opposés soutiennent l'hypothèse que les deux surnageants lipasiques correspondent à deux enzymes différentes, présentant probablement des spécificités structurales et fonctionnelles bien distinctes.

V. Effet du pH sur l'activité lipasiques des surnageants

L'activité lipasique des deux surnageants de culture ILI et ILII ont été étudiées à des pH différents, ces résultats sont représentés dans la figure 9.

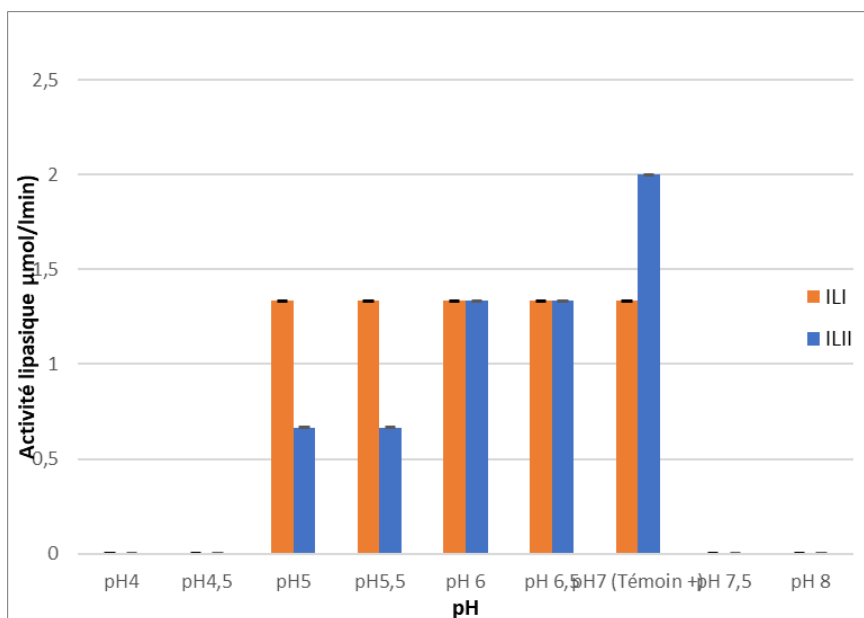


Figure 9 : Activité lipasique ($\mu\text{mol}/1\text{min}$) des surnageant I et II en fonction des variations de pH.

Le surnageant ILI est actif dans une large plage acide, allant de pH 5 à pH 7, avec une activité optimale à pH 7, à partir de pH 7.5, l'activité chute drastiquement pour être totalement nulle à pH 8, traduisant une sensibilité marquée aux conditions alcalines.

D'autre part, ILII montre une progression nette de l'activité à partir de pH 5 atteignant un pic à pH 7, puis subissant elle aussi une inactivation à partir de pH 7.5. Ces résultats concordent avec la littérature. En effet, Boutaïba et al. En 2006 ont observé une activité maximale à pH 7 pour la lipase de *Natronococcus sp* TC6, ce qui se rapproche du comportement de ILII. Ozcan et collaborateurs ont rapporté que plusieurs lipases de haloarchées présentaient un pH optimal à 8 (Ozcan et al., 2009), ce qui se situe au-delà de l'intervalle actif de nos surnageants de culture, enfin Li et Yu ont décrit une lipase de *Haloarcula sp.* G41 ayant une activité optimale à pH 8 et stable jusqu'à 11 ce qui souligne la moindre alcalino-tolérance des enzymes testées dans cet étude (Li & Yu, 2014).

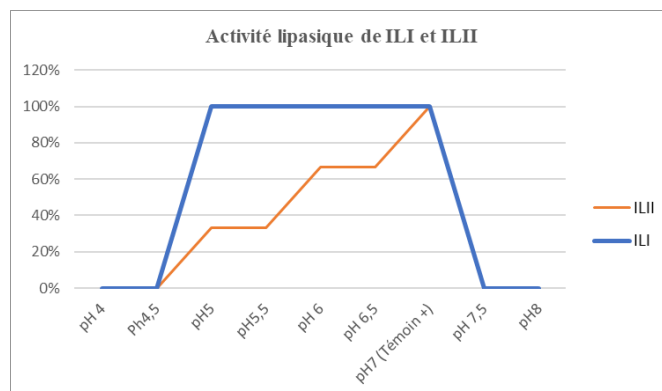


Figure 10 : Pourcentage relatif d'activité des surnageants lipasique de lipase I et II en fonction du pH.

La figure 10 représentant une comparaison des profils des activités enzymatiques (en pourcentage d'activité) des deux surnageants en fonction du pH, elle met en évidence la différence du comportement des deux surnageants dans les plages de pH étudiés.

VI. Effet des solvants sur l'activité lipasique des surnageants

Dans le but d'évaluer l'activité lipasique de nos surnageants ILI et ILII en présence de solvant organiques nous avons testé l'activité vis à vis de 4 solvant polaires ; l'éthanol, l'acétone, le glycérol et le DMSO, et un solvant apolaire ; l'hexane à (30%, 20% et 10%), après une incubation de 1h et 2h. L'ensemble de ces résultats est présenté dans les figures 11 à 15.

VI.1. Effet de l'Ethanol

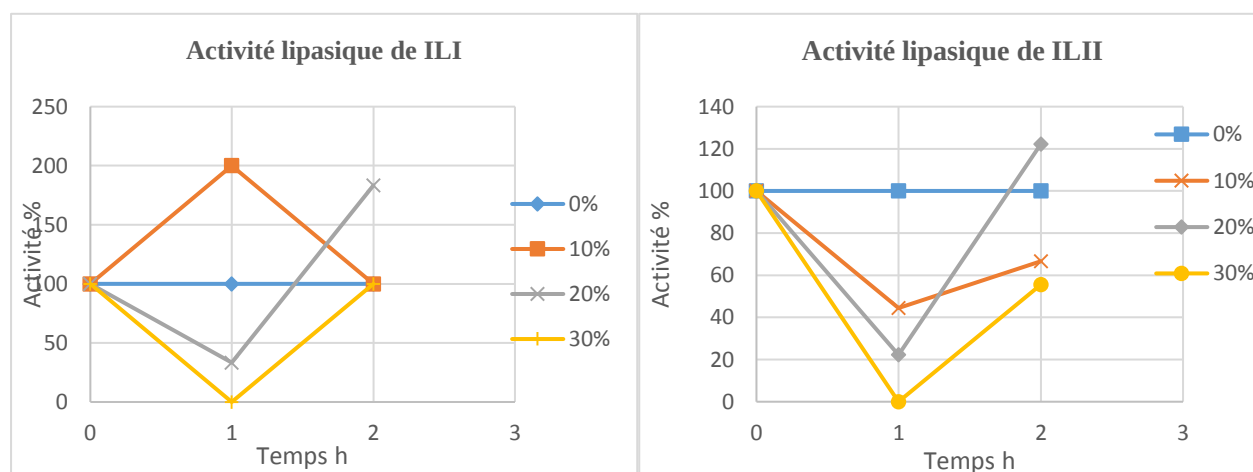


Figure 11 : Activités lipasiques en % en présence de différentes concentrations d'éthanol pour les surnageants I et II.

La figure 11 représente l'effet de l'éthanol sur l'activité lipasique des surnageants ILI et ILII, l'effet de l'éthanol a été évalué à différentes concentrations (10%, 20%,30%) et à deux temps d'incubation (1h et 2h). Les résultats sont représentés dans la figure x, qui permet de visualiser les réponses enzymatiques dans chaque condition expérimentale. Les profils obtenus révèlent une différence marquée entre les deux surnageants en termes de tolérances à l'éthanol.

Pour ILI une stimulation remarquable est observée à 10% d'éthanol après 1h avec une activité enzymatique doublée (200%) par rapport au témoin non traité. Cet effet diminue après 2h d'incubation, où l'activité revient à son niveau initial (100%). A 20% l'enzyme est inhibé à court terme (environ 30% à 1h), mais l'activité remonte de manière significative à 183% après 2h. A 30% l'activité est complètement supprimée après 1h, mais une récupération complète (100%) est observée a 2h, ce qui traduit une résilience enzymatique intéressante.

Chez ILII le comportement est plus fragile ; à 10% d'éthanol, l'activité diminue à 44% après 1h, avec une récupération partielle à 66% après 2h. A 20% une chute nette à 22% est observée après 1h, suivie d'une remontée à 122%.

A 30% de concentration d'éthanol l'activité est complètement annulée après 1h, mais remonte à 55% après 2h. Ce profil montre un enzyme plus sensible à l'environnement alcoolisé.

Ces résultats traduisent une tolérance plus élevée de l'enzyme ILI à l'éthanol en comparaison avec ILII, ce comportement est partiellement cohérent avec les observations de Akmoussi toumi et collaborateurs en 2018, qui ont rapporté un effet stimulateur de l'éthanol sur la lipase de *Haloferax Mediterranei* (HML) avec une activité résiduelle de 129% à 160% après 24h d'exposition à des solvants organiques hydrophiles (Akmoussi-Toumi et al., 2018). A l'inverse hagaggi dans son étude a 2020 a décrit une inhibition sévère de l'activité lipasique par l'éthanol chez *Oceanobacillus iheyensis* QCS, souche halotolérante (Hagaggi, 2020), ce qui se rapproche du profil observé pour ILII.

Les différences de comportements observées entre les deux surnageants suggèrent que les deux enzymes possèdent des propriétés intrinsèques différentes vis-à-vis de ce solvant. Chez ILI l'augmentation de l'activité à faible et moyenne concentration pourrait probablement se traduire par une capacité de nos enzymes à se stabilisé temporairement dans ces conditions, avant une possible inhibition à plus forte concentration (30%), c'est une relation dose-dépendante, la récupération de l'activité après 2h même à 30% traduit une certaine résilience de la structure de l'enzyme face à l'éthanol. Cependant chez ILII l'inhibition précoce observée

dés 10% et la récupération partielle à 20% ou 30% pourraient traduire probablement une structure plus sensible ou moins sensible ou moins adaptable a la présence de l'éthanol.

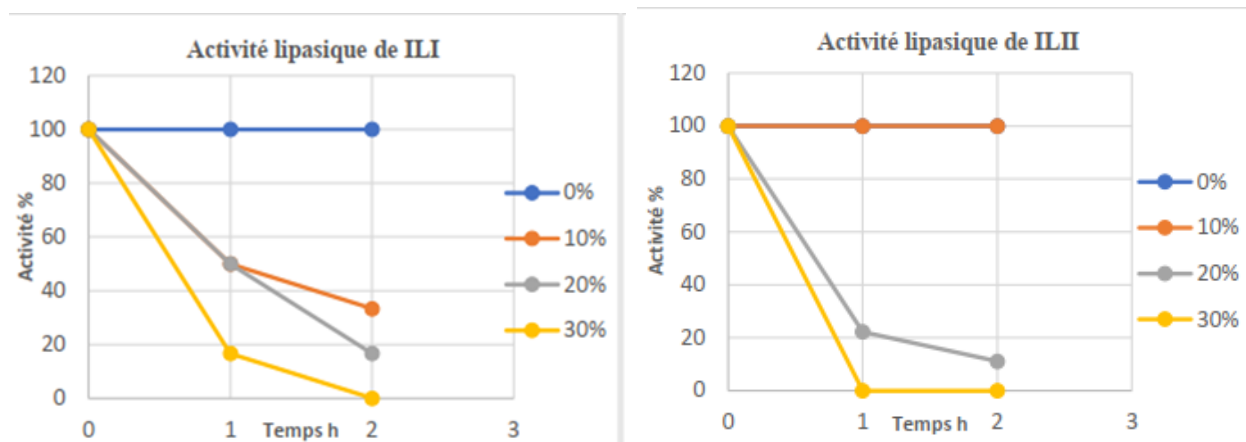


Figure 12 : Effet du DMSO sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.

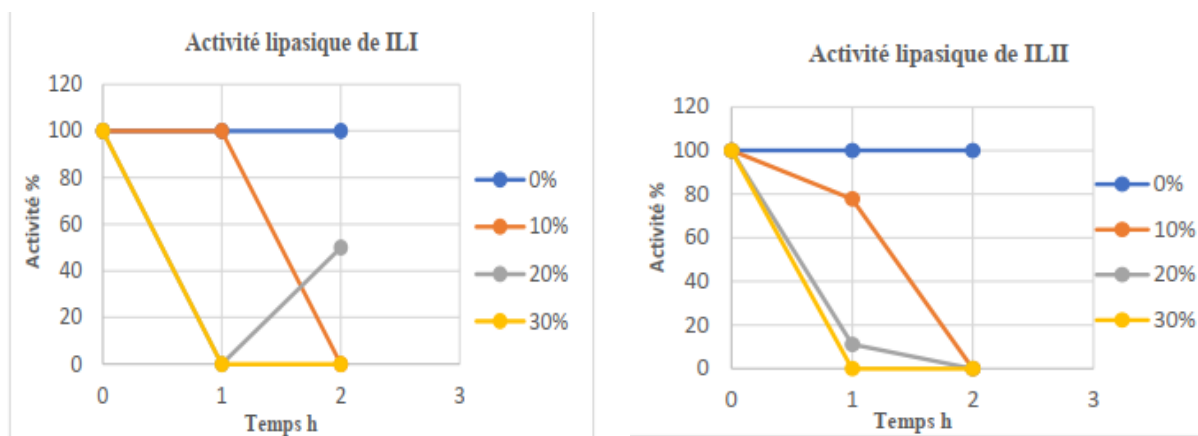


Figure 13 : Effet de l'acétone sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.

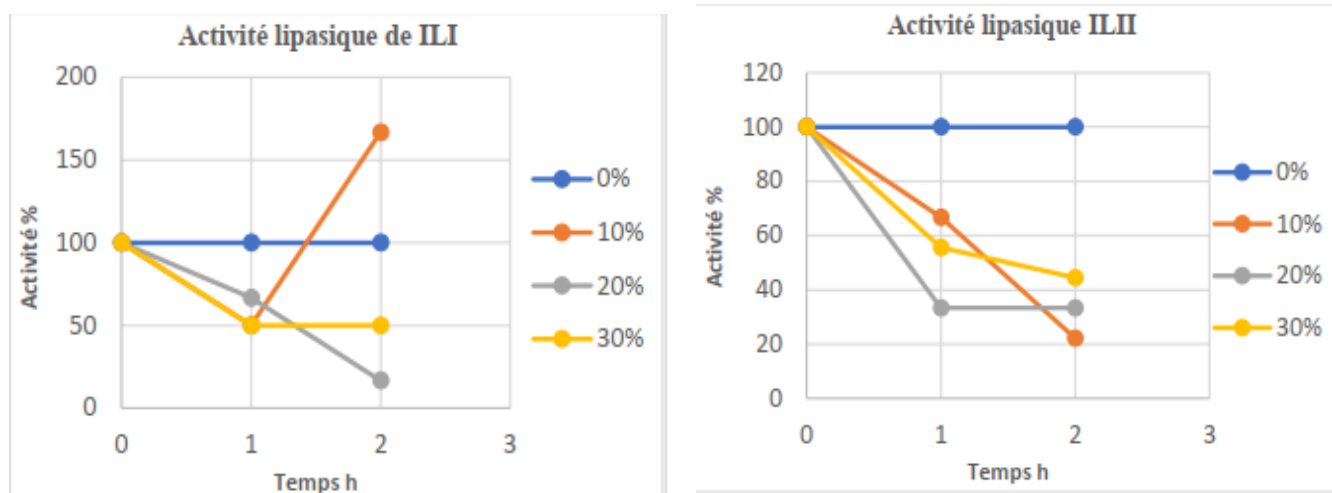


Figure 14 : Effet de l'hexane sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.

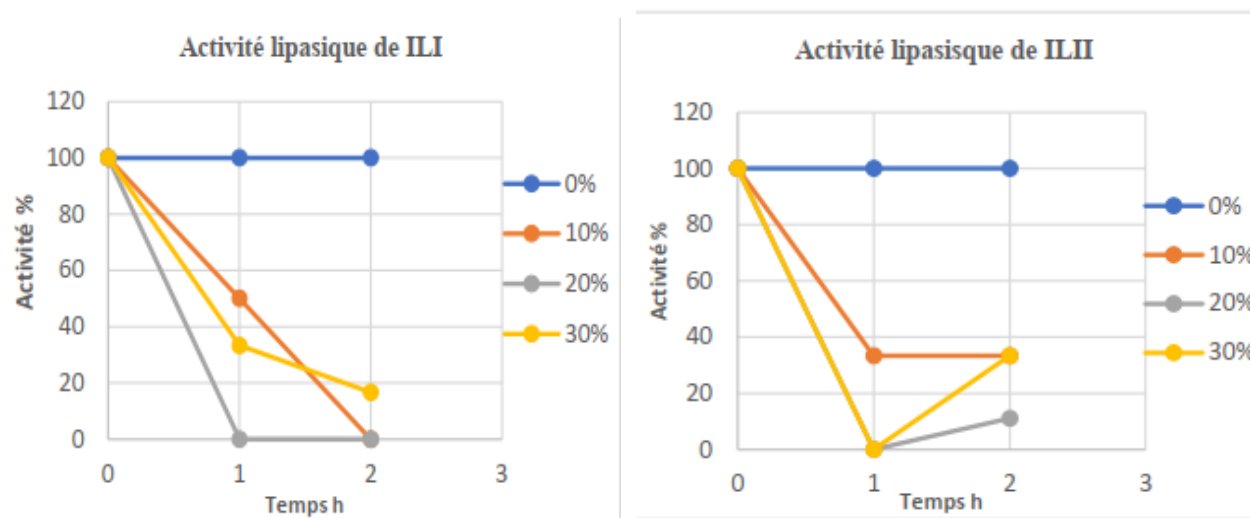


Figure 15 : Effet du glycérol sur l'activité lipasique des surnageants des deux isolats ILI et ILII.

L'évaluation de l'effet de l'acétone, du DMSO, du glycérol et de l'hexane sur l'activité lipasique des surnageants ILI et ILII a révélé des profils distincts selon la nature du solvant et l'isolat concerné. De manière générale, l'acétone a montré un effet inhibiteur clair, avec une perte d'activité dose-dépendante dès 10 % de concentration. Cette inhibition est indépendante

du temps d'incubation, puisque l'activité enzymatique reste annulée aussi bien après 1h qu'après 2 h d'exposition.

Le DMSO, solvant polaire aprotique, a également induit une inhibition croissante selon la concentration, mais contrairement à l'acétone, son effet est temps-dépendant, avec une accentuation de la perte d'activité après 2 h. À partir de 30 %, le DMSO stoppe totalement la réaction enzymatique, ce qui indique une perte complète de l'activité. Concernant l'hexane et le glycérol l'activité est maintenue jusqu'à 30%

Il est important de noter que l'acétone et le DMSO sont des solvants aprotiques, et leur effet sur l'activité enzymatique a été documenté dans plusieurs études. Dans une analyse comparative, il a été observé que la 6B lipase voyait son activité réduite de moitié en présence de 20 % d'acétone, et qu'une concentration de 60 % provoquait presque une perte totale d'activité. En revanche, la 6B lipase a montré un effet stimulant en présence de faibles concentrations de DMSO, avec une activité maximale atteinte à 15 % de ce solvant, avant de diminuer à des concentrations plus élevées (Kamal et al., 2013). Ces observations renforcent l'idée que l'effet des solvants aprotiques varie fortement selon la structure spécifique de l'enzyme.

Ces résultats s'opposent partiellement à certaines observations issues de la littérature. En effet, Akmoussi-Toumi et al ont rapporté un effet stimulant de solvants hydrophiles, tels que l'éthanol ou le DMSO, sur la lipase HML de *Haloferax mediterranei*, avec une activité résiduelle atteignant entre 129 et 160 % après 24 h (Akmoussi-Toumi et al., 2018).

De son côté, Xin Li et Hui-Ying Yu en 2014 ont montré que la lipase de *Haloarcula sp* G41 était activée par les solvants hydrophiles, mais instable en présence de solvants hydrophobes cette étude indique que plus de 80 % de l'activité de leur enzyme était conservée dans le DMSO et le glycérol, avec même une augmentation de l'activité à 112,1 % pour le glycérol et 116,9 % pour l'hexane (Li & Yu, 2014), ce qui contraste fortement avec les résultats obtenus

Enfin, Hagaggi a rapporté que la lipase étudiée perdait plus de la moitié de son activité en présence d'acétone, et que l'éthanol supprimait sévèrement l'activité, des observations qui rejoignent nos résultats pour certains solvants (Hagaggi, 2020).

VII. Effet de l'immobilisation du surnageant

Dans cette étude nous avons voulu évaluer l'effet de l'immobilisation des surnageants ILI et ILII dans des billes d'alginate sur leurs activité lipasique, afin d'analyser la stabilité et la rétention de l'activité lipasique dans le temps en comparant l'activité le jour de l'immobilisation à celle mesurée une semaine plus tard les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

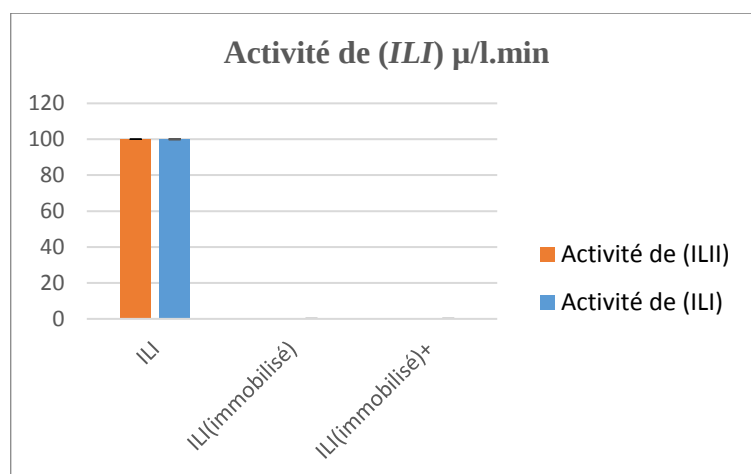


Figure 16 : Activité lipasique des surnageants de culture des isolats ILI et ILII, après immobilisation.

L'étude de l'effet de l'immobilisation sur l'activité lipasique des extraits enzymatiques issus des isolats ILI et ILII a montré une perte complète de l'activité après encapsulation dans l'alginate de sodium, alors que l'activité maximale était observée avec les enzymes libres. Ce résultat suggère que l'enzyme n'a pas pu conserver sa fonctionnalité après immobilisation. Deux hypothèses peuvent être avancées.

La première serait que les enzymes lipasiques de nos isolats ne sont pas compatibles avec une immobilisation dans l'alginate, bien que cela reste peu probable, au vu des études antérieures ayant démontré l'efficacité de cette méthode (Garba et al., 2022).

La seconde, plus plausible, est que la concentration du surnageant utilisé ou le rapport entre l'enzyme et la matrice d'alginate n'a pas été optimal, empêchant la détection d'une activité mesurable. En effet, des travaux antérieurs ont réussi à immobiliser efficacement des lipases extrêmophiles la lipase dans l'alginate de sodium, tout en conservant une activité significative. Ainsi, nos résultats indiquent qu'il est nécessaire de revoir et d'optimiser les conditions d'immobilisation, en agissant sur des paramètres tels que la concentration

enzymatique, la composition du mélange d'alginate, ou encore la durée et température de réticulation, afin de permettre une encapsulation efficace tout en préservant l'activité enzymatique.

Conclusion

Conclusion

Ce travail avait pour objectif l'étude des caractéristiques biochimiques des activités lipasique des surnageant de culture de deux isolats halophiles extrêmes. Les deux isolats nommés ILI et ILII montrent des activités lipasiques différentes notamment vis à vis des substrats utilisés. Nous avons aussi montré que les deux isolats se comportent différemment, lorsqu'ils sont privés de NaCl, une donnée importante qui permet d'envisager des études sur les dialysats des surnageants. D'ailleurs, il est particulièrement intéressant de noter que l'un des surnageant conserve son activité même en l'absence de sel, ce qui représente un avantage significatif pour une utilisation dans des environnements non salins, notamment dans des domaines comme la cosmétologie, une caractérisation plus approfondie du dialysat de cette enzyme serait donc justifiée.

Les deux surnageants des isolats (ILI) et (ILII) testées vis-à-vis de la température ont montrés deux profils différents ; ILI a montré une meilleure stabilité thermique, avec une activité conservée jusqu'à 50 °C, tandis que ILII présente une température optimale plus basse, limitée à 37 °C. Cette différence suggère des potentialités d'application différentes selon les conditions industrielles visées.

À l'avenir, il serait également pertinent d'évaluer la stabilité de l'activité enzymatique dans le temps si la température est maintenue constante, afin de mieux comprendre la durabilité catalytique des deux lipases.

Les surnageants des deux isolats ayant conservées leurs activités en présence de faible concentration de solvant pourraient dans le cadre d'un approfondissement des recherches, faire l'objet d'une étude de stabilité à plus long terme, notamment après plusieurs jours d'incubation afin d'évaluer la persistance de leurs activité lipasique.

Enfin, bien que nous ayons tenté une immobilisation dans l'alginate, cette étape n'a pas abouti, Il serait donc nécessaire d'optimiser les conditions d'immobilisation pour envisager une application concrète en catalyse hétérogène, notamment dans des formulations cosmétiques innovantes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Akmoussi-Toumi, S., Khemili-Talbi, S., Ferioune, I., & Kebbouche-Gana, S. (2018). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from *Haloferax mediterranei* CNCMM 50101. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 817–830.
2. Akolkar, A. V., & Desai, A. J. (2010). Catalytic and thermodynamic characterization of protease from *Halobacterium* sp. SP1(1). *Research in Microbiology*, 161(5), 355–362.
3. Amoozegar, M. A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H., & Ventosa, A. (2017). Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. In *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 163, Issue 5, pp. 623–645). Microbiology Society.
4. Ben Bacha, A., S Moubayed, N. M., & Abid, I. (2015). Thermostable, alkaline and detergent-tolerant lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. In *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* (Vol. 52).
5. Benhouria, A., Islam, M. A., Zaghouane-Boudiaf, H., Boutahala, M., & Hameed, B. H. (2015). Calcium alginate-bentonite-activated carbon composite beads as highly effective adsorbent for methylene blue. *Chemical Engineering Journal*, 270, 621–630.
6. 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(1–2), 21–26.
7. Camacho, R. M., Mateos, J. C., González-Reynoso, O., Prado, L. A., & Córdova, J. (2009). Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 901–909.
8. Cardenas, F., Alvarez, E., De Castro-Alvarez, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., Elson, S. W., & Sinisterra, J. V. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 14(4–6), 111–123.
9. Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd.
10. DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 25, pp. 120–126). Elsevier Ltd.
11. David, L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Sybille, M., Harel, M., James Remington, S., Silman, I., Schrag, J., Joel, L., Koen, H. G. V., & Goldman, A.

- (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197–211.
12. Garba, A., Sallau, A. B., Ibrahim, Umar, I. A., Dantsoho, F. A., & Ahmed A S. (n.d.). PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA LIPASE IMMOBILIZED ON CALCIUM ALGINATE MICROSPHERES. In *Nigerian Journal of Scientific Research* (Vol. 21, Issue 2).
13. Hagaggi, N. S. A. (2020a). Studies on the extremo-lipase produced by the halotolerant *Oceanobacillus iheyensis* strain QCS. *Novel Research in Microbiology Journal*, 4(4), 907–920.
14. Hagaggi, N. S. A. (2020b). Studies on the extremo-lipase produced by the halotolerant *Oceanobacillus iheyensis* strain QCS. *Novel Research in Microbiology Journal*, 4(4), 907–920.
15. Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251.
16. Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). *BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases*. www.annualreviews.org
17. Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(1), 29–63.
18. Joseph, B., Ramteke, P. W., & Thomas, G. (2008). Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. In *Biotechnology Advances* (Vol. 26, Issue 5, pp. 457–470).
19. Kamal, Z., Yedavalli, P., Deshmukh, M. V., & Rao, N. M. (2013). Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. *Protein Science*, 22(7), 904–915.
20. Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L. I., & Fujiwara, N. (2006). Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(2), 82–89.
21. Khan, A. K., Mubarak, N. M., Abdullah, E. C., Khalid, M., Nizamuddin, S., Baloch, H. A., & Siddiqui, M. T. H. (2019). Immobilization of Lipase Enzyme Carbon Nanotubes via Adsorption. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 495(1).
22. Lee, L. C., Lee, Y. L., Leu, R. J., & Shaw, J. F. (2006). Functional role of catalytic triad and oxyanion hole-forming residues on enzyme activity of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/phospholipase L1. *Biochemical Journal*, 397(1), 69–76.
23. Li, X., & Yu, H. Y. (2014). Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production. *Folia Microbiologica*, 59(6), 455–463.

24. Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A., & Ventosa, A. (2010). Halophiles 2010: Life in saline environments. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 76, Issue 21, pp. 6971–6981).
25. Mendes, A. A., Oliveira, P. C., & De Castro, H. F. (2012). Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. In *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Vol. 78, pp. 119–134).
26. Mevarech, M., Frolov, F., & Gloss, L. M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. In *Biophysical Chemistry* (Vol. 86).
27. Moopantakath, J., Imchen, M., Anju, V. T., Busi, S., Dyavaiah, M., Martínez-Espinosa, R. M., & Kumavath, R. (2023). Bioactive molecules from haloarchaea: Scope and prospects for industrial and therapeutic applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A.
28. Okay, S., Adem, Ş., & Kurt-Kizildoğan, A. (2022). CHARACTERIZATION OF HIGHLY STABLE EXTRACELLULAR LIPASE FROM THE EXTREMELY HALOPHILIC ARCHAEON Halolamina sp. *Bioscience Journal*, 38.
29. Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
30. Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., & Caliskan, M. (2009). Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 105–110.
31. Ozgen, M., Attar, A., Elalmis, Y., Birbir, M., & Yucel, S. (2016). Enzymatic activity of a novel halotolerant lipase from Haloarcula hispanica 2TK2. *Polish Journal of Chemical Technology*, 18(2), 20–25.
32. Reetz, M. T. (2013). Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 135, Issue 34, pp. 12480–12496). American Chemical Society.
33. Saum, S. H., & Müller, V. (2008). Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile Halobacillus halophilus: Chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline Systems*, 4(1).
34. Schreck, S. D., & Grunden, A. M. (2014). Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 98, Issue 3, pp. 1011–1021). Springer Verlag.
35. Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2014).
36. Singh, A., & Singh, A. K. (2017). Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. In *Biotechnology Letters* (Vol. 39, Issue 12, pp. 1793–1800). Springer Netherlands.
37. Sugihara, A., Tani, T., & Tominaga, Y. (1991). Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from Bacillus sp. In *J. Biochem* (Vol. 109).
38. Tietz, N. W., & Fiereck, E. A. (n.d.). CLINICA CHIMICA ACTA A SPECIFIC METHOD FOR SERUM LIPASE* DETERMINATION.

39. Ventosa, A., Joaqui', J., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 62, Issue 2).
40. Wang, W., Wen, P., Xu, K., Zheng, R., & Zheng, Y. (2019). Catalysis of enzymes under industrial environment and their adaptive modifications: a review. In *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology* (Vol. 35, Issue 10, pp. 1857–1869). NLM (Medline).
41. Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms (archaebacteria/eubacteria/urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny)* (Vol. 74, Issue 11).
42. Yavari-Bafghi, M., & Amoozegar, M. A. (2025). Pharmaceutical applications of halophilic enzymes. In *Heliyon* (Vol. 11, Issue 4). Elsevier Ltd.
43. Anonyme 1(<https://www.researchandmarkets.com/reports/5144944/industrial-enzymes-a-global-market-overview>)

Annexes

Annexe 1. Composition du milieu de culture Brown (1L).

Composant	Quantité (g)
NaCl	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	20
KCl	2
Citrate de sodium	3
Extrait de levure	5
Peptone	5
Eau distillé	Ajusté à 1L
pH final	7.2
Stérilisation	Autoclavage a 120°C pendant 20min

Annexe 2. Composition du milieu Brown modifié (pour 200mL).

Composant	Quantités (g)
Extrait de levure	0.2
Citrate trisodique	0.2
MgSO ₄	4
KCL	0.4
NaCl	50
Huile d'olive	5mL
Eau distillé	200mL
pH final	7.2
Stérilisation	Autoclavage à 120°C pendant 20min

Annexe 3. Solutions tampons utilisées.

Tampon	Composants	Quantités (g)	Volume (mL)	pH final
Phosphate (pH 7)	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.9	100	7.0
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.3		
Phosphate (pH 6)	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.733	50	6.0
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.05		
Phosphate (pH 6.5)	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.65	50	6.5
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.14		
Tris-HCl (pH 7.5 et 8)	Tris base	1.211	50	7.5/8.5
	HCl	Ajustement avec gouttes		
Citrate (pH 4)	Acide citrique	1.63	50	4.0
	Citrate trisodique	0.39		
Citrate (pH 4.5)	Acide citrique	1.24	50	4.5
	Citrate trisodique	0.92		
Citrate (pH 5)	Acide citrique	0.70	50	5.0
	Citrate trisodique	1.63		
Citrate (pH 5.5)	Acide citrique	0.30	50	5.5
	Citrate trisodique	2.18		

Les pH ont été ajustés avec l'ajout de quelques gouttes d'une base forte (NaOH) ou d'un acide fort (HCl)

Résumé

Dans le but d'identifier de nouvelles enzymes robustes pour des applications industrielles et cosmétologiques, ce travail s'est intéressé à la caractérisation biochimique de lipases produites par deux isolats halophiles extrêmes (ILI et ILII). Les isolats ont été cultivés à partir d'une source saline, et la production enzymatique a été évaluée. Une étude approfondie a été menée pour analyser l'effet de différents paramètres (température, pH, substrats lipidiques, solvants organiques) sur l'activité lipasique. Les résultats ont mis en évidence des différences marquées entre les deux isolats, suggérant des profils enzymatiques distincts. Une tentative d'immobilisation dans l'alginate de sodium a également été réalisée, mais a nécessité une optimisation. Ces résultats montrent le potentiel biotechnologique de ces enzymes pour des usages dans des conditions extrêmes.

Mots clés : Lipases, halophiles, enzymes, caractérisation biochimique, isolats extrêmes, solvants, immobilisation, cosmétologie.

Abstract

In order to identify new robust enzymes for industrial and cosmetic applications, this study focused on the biochemical characterization of lipases produced by two extreme halophilic isolates (ILI and ILII). The isolates were cultured from a saline source, and lipase production was evaluated. A comprehensive analysis was carried out to assess the effect of different parameters (temperature, pH, lipid substrates, organic solvents) on lipase activity. The results revealed significant differences between the two isolates, suggesting distinct enzymatic profiles. An immobilization attempt using sodium alginate was also performed but requires further optimization. These findings highlight the biotechnological potential of these enzymes under extreme conditions.

Keywords : Lipases, halophiles, enzymes, biochemical characterization, extreme isolates, solvents, immobilization, cosmetology.

المخلص

يهدف التعرف على إنزيمات قوية جديدة للاستخدامات الصناعية والتجميلية، ركّز هذا العمل على الدراسة البيوكيميائية تم عزل السلالات من مصدر مالح، وتم تقييم (ILI , ILII) لإنزيمات الليباز المنتجة من طرف عزلتين هالوفيلية متطرفة قدرتها على إنتاج الليباز. كما تم تحليل تأثير عدة عوامل (درجة الحرارة، الأس الهيدروجيني، ركائز دهنية، ومذيبات أظهرت النتائج اختلافات واضحة بين العزلتين، مما يشير إلى وجود خصائص إنزيمية مختلفة. عضوية) على نشاط الإنزيم كما تم إجراء تجربة تثبي للإنزيم باستعمال الألبينات، لكنها تتطلب تحسيناً إضافياً. تؤكد هذه النتائج الإمكانيات البيوتكنولوجية لهذه الإنزيمات في الظروف القاسية.

لكلمات المفتاحية:

الليباز، الكائنات الهالوفيلية، الإنزيمات، التوصيف البيوكيميائي، العزلات المتطرفة، المذيبات، التثبيث، التجميل