



**HAL**  
open science

# Criblage, identification et caractérisation biochimique, moléculaire et structurale de lipases, phospholipases et protéases d'origine microbienne et d'intérêt industriel

Ahlem Dab

► **To cite this version:**

Ahlem Dab. Criblage, identification et caractérisation biochimique, moléculaire et structurale de lipases, phospholipases et protéases d'origine microbienne et d'intérêt industriel. Biotechnologie. Université Claude Bernard - Lyon I; Université de Sfax (Tunisie), 2023. Français. NNT : 2023LYO10180 . tel-04703661

**HAL Id: tel-04703661**

**<https://theses.hal.science/tel-04703661v1>**

Submitted on 20 Sep 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE de DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
en cotutelle avec L'UNIVERSITE DE SFAX, TUNISIE**

**Ecole Doctorale N° 205  
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé  
&  
Ecole Doctorale Sciences Fondamentales (EDSF)**

**Discipline : Microbiologie, Biochimie et Biotechnologie**

Soutenue publiquement le 29/09/2023, par :  
**Ahlem DAB**

---

**Criblage, identification et  
caractérisation biochimique,  
moléculaire et structurale des lipases,  
phospholipases et protéases d'origine  
microbienne d'intérêt industriel**

---

Devant le jury composé de :

MIELE, Adriana	Professeure, Université Lyon 1	Présidente
BERTI, Liliane	Professeure, Université de Corse	Rapporteure
FIRDAOUS, Loubna	Maître de Conférences, Université de Lille	Rapporteure
BEZZINE, Sofiane	Professeur, ISEP, Université de Tunis	Rapporteure
MEJEAN, Annick	Professeure, Université Paris Denis-Diderot	Examinatrice
JAOUADI, Bassem	Professeur, Université de Sfax	Directeur de thèse
ABOUSALHAM, Abdelkarim	Professeur, Université Lyon 1	Directeur de thèse
NOIRIEL, Alexandre	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Co-encadrant de thèse
BERTI, Liliane	Professeure, Université de Corse	Rapporteure

## **CADRE OFFICIEL DE LA THESE**

### **Convention pour la mise en œuvre d'une cotutelle internationale de thèse :**

- Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, FRANCE (UCBL1)
- Université de Sfax, Sfax, TUNISIE (US)

### **Organisation du travail scientifique :**

- Univ Lyon, Université Lyon 1, Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS), UMR 5246 - CNRS, Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS), Bât Raulin, 43 Bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex - FRANCE
- Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE), Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Université de Sfax, BP 1177, Route Sidi Mansour Km 6 - 3018 Sfax - TUNISIE

### **Inscription en thèse :**

- Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS) à l'UCBL1
- Ecole Doctorale Sciences Fondamentales (EDSF) de la Faculté des Sciences de Sfax (FSS) à l'US

### **Directeurs de thèse :**

- Prof. ABOUSALHAM Abdelkarim (ICBMS UMR 5246 - CNRS /UCBL)
- Prof. JAOUADI Bassem (LBMEB-CBS/US)

Co-encadrant :

- Dr. NOIRIEL Alexandre (ICBMS UMR 5246 - CNRS /UCBL)

### **Cadre financier :**

- **Type de financement :** Bourse Campus France
- **Origine :** Projet de Recherche multilatéral PHC-Maghreb Transversal 2020
- **Intitulé du projet PHC :** « *Biodiversité des microorganismes d'intérêts biotechnologiques, isolés de biotopes extrêmes : procédés enzymatiques et leur impact sur l'environnement* »
- **Acronyme du projet :** « *FranMaghZYM 2020-2023* »
- **Codes du projet :** code Campus France : 43791TM & code PHC : 01MAG202

## Production scientifique réalisée durant mon travail de thèse

### A - Liste des publications dans des revues internationales à comité de lecture :

1. **Ahlem Dab**, Ismail Hasnaoui, Sondes Mechri, Fawzi Allala, Khelifa Bouacem, Alexandre Noiriél, Amel Bouanane-Darenfed, Ennouamane Saalaoui, Abdeslam Asehraou, Fanghua Wang, Abdelkarim Abousalham, Bassem Jaouadi. Biochemical Characterization of an Alkaline and Detergent-Stable Lipase from *Fusarium annulatum* Bugnicourt Strain CBS Associated with Olive Tree Dieback. *Plos one*, **2023**, vol. 18, no 5, p. e0286091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286091>. (IF **2023** = **3,752**)
2. Ismail Hasnaoui, **Ahlem Dab**, Sondes Mechri, Houssam Abouloifa, Ennouamane Saalaoui, Bassem Jaouadi, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehraou & Abdelkarim Abousalham. Purification, biochemical and kinetic characterization of a novel alkaline *sn*-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Penicillium crustosum* Thom strain P22 isolated from Moroccan olive mill wastewater. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(19) (2022) 11920. <https://doi.org/10.3390/ijms231911920> (IF **2021** = **6,208**)
3. Fatima Nehal, Mouna Sahnoun, **Ahlem Dab**, Sebahia Mohammed, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. Production optimization, characterization, and covalent immobilization of a thermophilic *Serratia rubidaea* lipase isolated from an Algerian oil waste. *Molecular Biology Reports* **46** (2019) 3167-3181. <https://doi.org/10.1021/bm2017228>. (IF **2018** = **2,316**)
4. Sondes Mechri, Khelifa Bouacem, Fadoua Jabeur, Sara Mohamed, Nariman Ammara Addou, **Ahlem Dab**, Aicha Bouraoui, Amel Bouanane-Darenfed, Samir Bejar, Hocine Hacène, Laura Baciou, Florence Lederer & Bassem Jaouadi. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable and halotolerant subtilisin SAPN, a serine protease from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2AT for chitin extraction from crab and shrimp shell by-products. *Extremophiles* **23** (2019) 529-547. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01105-8>. (IF **2020** = **2,395**)
5. Sondes Mechri, Khelifa Bouacem, Meriam Amziane, **Ahlem Dab**, Farida Nateche & Bassem Jaouadi. Identification of a new serine alkaline peptidase from the moderately halophilic *Virgibacillus natechei* sp. nov., strain FarDT and its application as bioadditive for peptide synthesis and laundry detergent formulations. *BioMed Research International* **2019** (2019) ID 6470897. <https://doi.org/10.1155/2019/6470897> (IF **2020** = **3,411**)
6. Sondes Mechri, Khelifa Bouacem, Meriam Amziane, **Ahlem Dab**, Farida Nateche & Bassem Jaouadi. Purification, biochemical characterization, and molecular elucidation of a new biotechnologically compatible serine peptidase from *Virgibacillus natechei* strain FarDT. 05/05/2020, *MOL2NET* 2020, International Conference on Multidisciplinary Sciences, 6th edition. Session NANOBIOMATJND-02: JSU-NDSU Nanotech. & BioMaterials Workshop, Jackson & Fargo, USA, 2020. MODEC-05: Nat. Prod. & Agro-Indust. Proc. in Amazon, UEA, Puyo, Ecuador, **2020**. Sciforum- 032635. Mol2Net-06, 2020, BIOCHEMPHYS-01 (pages 1-4), short paper, 10.3390/mol2net-06-06856. <https://doi.org/10.3390/mol2net-06-06856> (registering DOI)

### B - Articles en préparation

7. **Ahlem Dab**, Ismail Hasnaoui, Abdeslam Asehraou, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline (phospho)lipase from a newly isolated *Fusarium annulatum* Bugnicourt CBS suitable as bioadditive in detergent formulations, pour publication dans *Process Biochemistry*.
8. **Ahlem Dab**, Bart Kraak, Ismail Hasnaoui, Abdeslam Asehraou, Alexandre Noiriél, Abdelkarim Abousalham & Bassem Jaouadi. Draft Genome Sequence of the newly isolated *Fusarium annulatum* Bugnicourt strain CBS, pour publication dans *Journal of Biotechnology/Genome Announcement*.

### C - Liste des communications lors de séminaires et congrès nationaux et internationaux :

#### Communications orales :

1. **Ahlem Dab**, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Criblage, identification et caractérisation biochimique de lipases et phospholipases d'origine microbiennes d'intérêts industriels The 21<sup>st</sup> Scientific Day of IMBL, lipids- pathological markers and therapy targets, **8/07 2021, Lyon, France**
2. **Ahlem Dab**, Ismail Hasnaoui, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Expression hétérologue dans *Pichia pastoris* et caractérisation biochimique d'une (phospho)lipase de *Fusarium annulatum*. Séminaire Franco-Maghrébin (SFM 2022) sur la thématique « Enzymes microbiennes d'intérêt industriel, environnemental et thérapeutique ». **Le 28/06/22, ICBMS-UCBL1, Lyon, France**
3. **Ahlem Dab**, Ismail Hasnaoui, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Caractérisation biochimique de la lipase/phospholipase FAL de *Fusarium annulatum*, Bugnicourt CBS isolée

du sol contaminé par des déversements d'huile d'olive. La 2<sup>ème</sup> Rencontre Franco-Maghrebine (2<sup>ème</sup> RFM) sur le thème : « les enzymes microbiennes d'intérêts industriels et environnementaux ». Le **13/05/2022**, FSO-UMP, **Oujda, Maroc**

4. **Ahlem Dab**, Ismail Hasnaoui, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Production, purification, and biochemical characterization of a high alkaline lipase de *Fusarium annulatum*, *Bugnicourt* CBS isolée du sol contaminé par des déversements d'huile d'olive. The 31<sup>st</sup> International Congress of Biological Sciences and Biotechnology of the ATSB. **21-24/03/2022. Hammamet. Tunisie**

✚ **Communications affichées :**

1. **Ismail Hasnaoui**, Ahlem Dab, Houssam Abouloifa, Sondes Mechri, Yahya Rokni, Bassem Jaouadi, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Identification of a novel lipase purified from the ascomycete fungus *Penicillium crustosum* Thom P22 with biotechnological.
2. **Ahlem Dab**, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Criblage, identification et caractérisation biochimique de lipases et phospholipases d'origine microbiennes d'intérêts industriels. The 19<sup>th</sup> International Days of Biotechnology (IDB2021) of the ATBiotech, **19-22/12/2021. Sousse, Tunisie. En ligne**
3. **Ahlem Dab**, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Screening and biochemical characterization of fungal lipases and phospholipases suitable for application in detergent formulations. The 18<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress, **19-21/10/2021. Leipzig, Allemagne. En ligne**
4. **Ahlem Dab**, Alexandre Noiriél, Bassem Jaouadi & Abdelkarim Abousalham. Heterologous expression in *Pichia pastoris*, kinetic characterization and molecular modeling of a (phospho)lipase from *Fusarium annulatum*. The 22<sup>nd</sup> Scientific Day of IMBL, lipids- pathological markers and therapy targets, **04/07/2022, Lyon, France**
5. **Ahlem Dab**, Zied Zaraï, Ines Belhaj-Ben Romdhan, Sara Mohamed, Khelifa Bouacem, Nariman Ammara Addou, Adel Sayari, Ali Gargouri, Samir Bejar, Hacène Hocine & Bassem Jaouadi. Screening and identification of microorganisms isolated from salt lake and hot spring producing lipases for industrial and environmental interests. The 19<sup>th</sup> International Days of Biotechnology (IDB2019) of the ATBiotech, **18-21/12/2021. Sousse, Tunisie**
- 6.

## REMERCIEMENTS

Ce document est le résultat d'un effort de doctorat qui a nécessité la participation de nombreuses personnes. Je ne saurais les remercier assez pour leur précieuse contribution.

Mes premières expressions de reconnaissance vont à mes estimés professeurs **Abdelkarim ABOUSALHAM** et **Bassem JAOUADI**. Je leur suis profondément reconnaissant pour leur accueil dans le laboratoire et pour m'avoir permis d'entrer dans le monde de la recherche. Leur disponibilité, leurs commentaires précieux et leur soutien tout au long de ma thèse ont été cruciaux pour me former en tant que chercheur rigoureux. Grâce à leur bienveillance et leur patience, j'ai pu réaliser mon travail dans les meilleures conditions.

Un merci spécial au **Dr. Alexandre NOIRIEL**, mon co-encadrant. Sa patience, sa disponibilité et sa tolérance m'ont permis de gagner en compétence et de développer une passion pour la biologie moléculaire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à la **Pr. Adriana Erica MIELE** qui m'a accueilli au sein Institut des Sciences Analytiques (ISA), Université de Lyon. Son aide m'a été très précieuse et je lui suis reconnaissant pour la confiance qu'il m'a accordée, ses encouragements et ses conseils éclairés. Je souhaite aussi d'exprimer ma plus profonde gratitude au **Pr. Sébastien VIOLET**. Sa précieuse contribution à la partie structurale de ce travail a été essentielle. Son approche bienveillante, son écoute attentive et sa disponibilité constante ont créé un environnement de travail favorisant la réalisation de ce projet.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude au **Pr. Jacques DEVERCHERE**, Coordinateur du PHC Maghreb. Son aide, ses conseils précieux et son soutien ont été d'une grande importance. Il a facilité toutes mes démarches de mobilité, surtout pendant la période difficile de la pandémie de COVID. En outre, il m'a généreusement accordé un financement supplémentaire, permettant ainsi de réaliser ma soutenance dans les meilleures conditions possibles.

Hors des murs du laboratoire, je désire exprimer toute ma reconnaissance envers mes amis et ma famille dont le soutien inébranlable a été essentiel tout au long de cette aventure.

De plus, j'adresse mes remerciements à l'ensemble des enseignants, collaborateurs et à toute personne dont les mots, écrits, orientations et retours critiques ont éclairé mon cheminement intellectuel et enrichi mon savoir.

## *Je dédie ce travail*

*À mes chers parents, qui m'ont façonné en la personne que je suis,*

*À mes frères, sœurs et leurs familles, pour leur soutien inébranlable,*

*Et à toute ma famille, reflet de l'amour et du soutien que j'ai reçu.*

## Liste des abréviations

<b>aa</b>	: Acide aminé
<b>AG</b>	: Acide gras
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	: ADN complémentaire
<b>ADNp</b>	: ADN plasmidique
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>ARNr</b>	: ARN ribosomique
<b>AS</b>	: Activité spécifique
<b>BAEE</b>	: <i>N</i> -benzol-L-arginine ethyl ester
<b>BAPNA</b>	: $\alpha$ -benzoyl-L-tyrosine <i>p</i> -nitroanilide
<b>BET</b>	: Bromure d'éthidium
<b>BHT</b>	: ButylHydroxyToluène
<b>BLAST</b>	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BSA</b>	: Albumine de sérum bovin
<b><math>\beta</math>-CD</b>	: $\beta$ -cyclodextrine
<b><math>\beta</math>-ME</b>	: $\beta$ -mercaptoéthanol
<b>CALA</b>	: Lipase de <i>Candida antarctica</i> de type A
<b>CALB</b>	: Lipase de <i>Candida antarctica</i> de type B
<b>CCM</b>	: Chromatographie sur couche mince
<b>CD</b>	: Dichroïsme circulaire
<b>CMC</b>	: Concentration micellaire critique
<b>DFP</b>	: Diiodopropyl fluorophosphate
<b>diC10</b>	: didécanyolglycérol ou dicaprine
<b>diC12PE</b>	: : 1,2-dilauryl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
<b>diC12-PC</b>	: 1,2- dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
<b>DMF</b>	: Diméthylformamide
<b>DMSO</b>	: Diméthylsulfoxyde
<b>dNTP</b>	: Désoxyribonucléoside triphosphate
<b>DTNB</b>	: Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)
<b>DL-DTT</b>	: DL-Dithiothréitol
<b>EC</b>	: Enzyme commission
<b>EDTA</b>	: Acide éthylène-diamine tétraacétique
<b>EGTA</b>	: Acide éthylèneglycol bis-(amino-2-éthyléther) N,N,N'N'-tétraacétique
<b>EOO</b>	: 1- $\alpha$ -éléostéaroyl-2, 3-octadécyl- <i>sn</i> -glycérol
<b>FAL</b>	Lipase de <i>Fusarium annulatum</i> Bugnicourt
<b>FF</b>	: <i>Fast Flow</i>
<b>FPLC</b>	: <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<b>FSL</b>	: lipase de <i>Fusarium solani</i>
<b>GA</b>	: Gomme arabique
<b>GNL</b>	: Gélose nutritive au lait
<b>GRAS</b>	: <i>Generally Recognized as Safe</i>
<b>GZEL</b>	Lipase de <i>Gibberella zeae</i>
<b>HEPES</b>	: Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazineéthane sulfonique
<b>HPLC</b>	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>HPL</b>	: lipase pancréatique humaine

<b>IPTG</b>	: Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>IUBMB</b>	: Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire
<b>Kb</b>	: Kilobase
<b>kDa</b>	: <i>kiloDalton</i>
<b>LB</b>	: Luria Bertani
<b>Lip A</b>	: Lipase de <i>Serratia marcescens</i>
<b>mdeg</b>	: millidegrees
<b>MES</b>	: Acide 2-(N-morphino) éthane sulfonique
<b>MG</b>	: Monoacylglycérol
<b>mNEM</b>	: N-éthylmaléimide
<b>NaTDC</b>	: Acide taurodésoxycholique sodique
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>OOE</b>	: 1,2-octadécyl-3- $\alpha$ -éléostéaroyl- <i>sn</i> -glycérol
<b>PAO</b>	: Oxyde de phénylarsine
<b>pb</b>	: Paire de base
<b>PC</b>	: Phosphatidylcholine
<b>PCR</b>	: Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PDA</b>	: <i>Potato dextrose agar</i>
<b>PEG</b>	: Polyéthylène glycol
<b>POPG</b>	: 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoglycérol
<b>PMSF</b>	: Fluorure de phénylméthylsulfonyl
<b>PVDF</b>	: Difluorure de polyvinylidène
<b>rFAL</b>	: Lipase recombinante de <i>Fusarium annulatum</i> Bugnicourt
<b>Ri</b>	: Indice de régioselectivité
<b>rpm</b>	: Rotation par minute
<b>SDS</b>	: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b><i>sn</i></b>	: <i>Stereospecific numbering</i>
<b>STPP</b>	: Tripolyphosphate de sodium
<b>TAE</b>	: Tris-acétate-EDTA
<b>TAED</b>	: Tétracétyléthylènediamine
<b>Taq</b>	: <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TC2</b>	: Triacétate de glycérol
<b>TC4</b>	: Tributyrat de glycérol
<b>TC6</b>	: Trihexanoate de glycérol
<b>TC8</b>	: Trioctanoate de glycéryle
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-tétraméthyl-1-,2-diaminométhane
<b>TG</b>	: Triglycéride
<b>THL</b>	: Tétrahydrolipstatine
<b>TLCK</b>	: N $\alpha$ - <i>p</i> -Tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone
<b>TLL</b>	: Lipolase <sup>®</sup> ou lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
<b>Tm</b>	: Température de fusion ( <i>Melting temperature</i> )
<b>TPCK</b>	: N- <i>p</i> -Tosyl-L-phénylalanine chlorométhyl cétone
<b>UFC</b>	: Unité formant colonie
<b>UI</b>	: Unité internationale
<b>UNESCO</b>	: <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
<b>UV</b>	: Ultraviolet

**v/v** : Volume par volume  
**WHO** : *World Health Organization*  
**X-gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside  
**3D** : Tridimensionnelle

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Caractéristiques biochimiques de certaines lipases végétales .....	27
<b>Tableau 2</b> : Analyse comparative des déterminants structuraux des lipases fongiques ont structuré tridimensionnelles élucidées.....	30
<b>Tableau 3</b> : Exemple simplifié de formules de poudre de lavage du linge [140]. .....	43
<b>Tableau 4</b> : Historique de l'innovation technologique dans le domaine des lessives [140].....	44
<b>Tableau 5</b> : Les lipases commerciales utilisées dans l'industrie des détergents [153] .....	47
<b>Tableau 6</b> : Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.....	55
<b>Tableau 7</b> : Composition des milieux de culture pour les différentes souches utilisées. ....	57
<b>Tableau 8</b> : Bilan de purification de FAL.....	84
<b>Tableau 9</b> : Effets de divers ions métalliques sélectionnés, d'inhibiteurs et de réactifs chimiques sur l'activité lipolytique de FAL purifiée à partir de la souche de <i>Fusarium annulatum</i> bugnicourt CBS.....	87
<b>Tableau 10</b> : Effets de divers additifs détergents de laboratoire sur la stabilité de FAL comparativement à GZEL et Lipolase®. ....	94
<b>Tableau 11</b> : Bilan de purification de rFAL.....	108

## Liste de Figures

<b>Figure 1 :</b> Exemples de structures des acides gras saturés et insaturés.....	6
<b>Figure 2:</b> Exemples de structure de glycérolipides : TG (1-dodécanoyl-2-héxadécanoyl-3-octadécanoyl-sn-glycérol), glycérophospholipide (1-hexanoyl-2-(9Z-octadécénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine) et glycéroglycolipide (1,2-di-(9Z,12Z,15Z-octadécatriénoyl)-3-O-β-D-galactosyl-sn-glycérol).....	7
<b>Figure 3 :</b> Les structures moléculaires des phospholipides [8]. .....	8
<b>Figure 4 :</b> Aspects des liposomes et des micelles [1].....	9
<b>Figure 5 :</b> Modèle de cinétique interfaciale d'après Verger and de Haas [14].....	13
<b>Figure 6 :</b> Réaction catalysée par la lipase dans les systèmes aqueux et organiques [39]. .....	15
<b>Figure 7:</b> Représentation de la structure secondaire du repliement α/β des hydrolases et positionnement relatif des acides aminés de la triade catalytique dans les lipases[39]. .....	17
<b>Figure 8 :</b> Vue d'ensemble des sites de clivage de la phospholipase dans les phospholipides.....	20
<b>Figure 9 :</b> Mécanisme de digestion des lipides alimentaires chez l'homme par la lipase.....	25
<b>Figure 10 :</b> Représentation schématique de l'activation de la lipase pancréatique en solution par la colipase et une micelle mixte duodénale [135]. .....	26
<b>Figure 11 :</b> La classification des lipases fongiques et de levures (107, 118). .....	29
<b>Figure 12 :</b> Structures 3d de (a) la lipase de <i>Candida rugosa</i> et (b) lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> . (a) en bleu sa conformation ouverte, pdb 1crl, et en gris sa conformation fermée, pdb 1trh ; (b) lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> , en magenta sa conformation ouverte avec du phosphonate de diéthyle, pdb 4tgl, et en gris sa conformation fermée, pdb 3tgl [163]......	31
<b>Figure 13:</b> Structure tridimensionnelle de la lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL, PDB ID : 1DTE) avec une triade catalytique (Ser146, Asp201 et His258 ; en vert) et un domaine de volet en rouge.....	32
<b>Figure 14 :</b> Représentation structurale de la lipase de <i>Fusarium graminearum</i> .(a)....perspective latérale de la structure de gzel, illustrée sous forme de ruban. les hélices-α et les brins-β sont identifiés respectivement par les étiquettes a1-a9 et b1-b10. (b) rotation de 90° de la structure de gzel par rapport à la surface dépeinte en (a). (c) surface potentielle d'interaction entre le noyau de l'enzyme et α9. le noyau est représenté comme une surface potentielle, et α9 est représenté comme un bâton doré. 33	33
<b>Figure 15 :</b> Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.....	37
<b>Figure 16 :</b> Les diverses classes des champignons [127].....	39
<b>Figure 17 :</b> Carte de restriction du vecteur pPICZαA avec sites de clonage multiples[181]. .....	54
<b>Figure 18 :</b> Représentation schématique condensée de la technique du pH-stat. Le milieu réactionnel contenant le substrat et l'enzyme est placé dans une cuve de 30 ml et mélangé avec un agitateur pour assurer une interaction constante. Une électrode pH mesure les variations du pH, indiquant l'activité lipolytique par la libération d'acides gras. Lors d'une baisse de pH, une pompe doseuse ajoute de la soude pour maintenir le pH constant. Le volume de soude ajouté est enregistré et utilisé pour quantifier l'activité lipolytique.....	59
<b>Figure 19 :</b> Dosages spectrophotométriques des activités lipases. à l'aide de 1-éléostéaroyl-2, 3-octadécyl-sn-glycérol (E00) et 1,2-octadécyl-3-éléostéaroyl-sn-glycérol (O0E).....	61

<b>Figure 20 :</b> Halos fluorescents de champignons producteurs de lipase. Sur un milieu d'agar à l'huile d'olive à 1% (v/v) avec rhodamine B, observés sous lumière UV à 365 nm. Dix champignons producteurs de lipase (TN10, M45, AS15, AI16, R22, CBS, F6, P63, C58, et V35) ont été obtenus, montrant des activités lipasiques variables. Après une incubation de 5 jours à 25°C, les boîtes de Pétri ont été soumises à UV.....	77
<b>Figure 21 :</b> Colonie de la souche CBS isolée des champignons du sol de l'olivier, <i>Olea europaea</i> cv. Chemlali.	78
<b>Figure 22 :</b> Arbre phylogénétique de la souche CBS. ....	80
<b>Figure 23:</b> Cinétiques de production des activités lipolytique de la souche <i>Fusarium annulatum</i> Bugnicourt CBS. La biomasse (poids sec des mycéliums) ( $\Delta$ ) et l'activité enzymatique lipolytique en utilisant le TC8 ( $\bullet$ ) ou Egg PC (o) comme substrat sur un milieu de culture optimisé sont présentées. Chaque point représente la moyenne ( $n = 3$ ) $\pm$ écart type.....	81
<b>Figure 24 :</b> Profil d'élution de la purification de FAL sur une colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF. Piste 1, marqueurs de masse moléculaire ; piste 2, fraction de précipité au sulfate d'ammonium (80%) après dialyse ; piste 3, fraction obtenue après chromatographie de filtration sur gel sur colonne Sephacryl S-200 ; pistes 4 et 5, fractions purifiées à partir de la colonne Q-Sepharose FF.....	82
<b>Figure 25:</b> Profil chromatographique de la purification de FAL sur colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF. Les protéines adsorbées ont été éluées avec un gradient linéaire de NaCl de 0 à 5 M dans le tampon A.....	83
<b>Figure 26 :</b> Effets du pH sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la FAL. La caractérisation de la FAL purifiée a été faite en utilisant le TC8 ou Egg PC à 40 °C dans des conditions standard. Le profil de pH a été déterminé dans différents tampons en variant les valeurs de pH de 4 à 12. La stabilité au pH de la FAL a été déterminée en incubant l'enzyme à différentes valeurs de pH, allant de 4 à 12, pendant 1 h à 40 °C et l'activité résiduelle a été mesurée à pH 9 sur le TC8 ou à pH 11 sur Egg PC, également à 40 °C. L'activité maximale sur TC8, obtenue à pH 9, ou sur Egg PC, à pH 11, a été considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. ....	85
<b>Figure 27 :</b> Effets de la température sur l'activité et la stabilité de FAL. A: L'activité enzymatique à différentes températures a été déterminée en utilisant TC8 ou le PC d'œuf à pH 9. B: La stabilité de FAL a été évaluée en mesurant l'activité résiduelle sur "TC8" à pH 9 après une incubation à diverses températures pendant des durées indiquées. C: L'activité résiduelle de FAL sur le PC d'œuf à pH 11 a été mesurée après incubation à différentes températures. Toutes les expériences ont été réalisées dans des conditions standard. ....	86
<b>Figure 28:</b> Effet du calcium sur l'activité de la FAL. Impact de la concentration en $Ca^{2+}$ sur l'activité de la FAL. L'activité enzymatique a été mesurée à des concentrations croissantes de $Ca^{2+}$ . Les émulsions de TC8 utilisées comme substrat pour l'activité lipasique en présence de 2 mM de NaTDC, et l'Egg PC utilisé comme substrat pour l'activité PLA1 en présence de 4 mM de NaTDC.....	88
<b>Figure 29:</b> Effet de l'augmentation des concentrations de sel biliaire (NaTDC) sur l'activité lipasique. En présence de 2 mM de $CaCl_2$ et l'activité phospholipase en présence de 4 mM de $CaCl_2$ , en utilisant respectivement l'émulsion TC8 et la phosphatidylcholine comme substrats. L'étoile indique l'activité de la FAL mesurée en l'absence de $CaCl_2$ et en présence de 10 mM d'EDTA. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. ....	89

<b>Figure 30 :</b> Effet de l'Orlistat sur les activités de la FAL. Du DMSO (lignes bleues) ou de l'Orlistat dans du DMSO (40 $\mu$ M, concentration finale, courbes rouges) a été injecté dans le milieu de réaction à 8 min (A) et 8 min (B) après le début de la lipolyse avec la FAL sur TC8 et sur PC d'œuf, respectivement. Les activités lipase et PLA1 ont été mesurées, à pH 9 et 40 °C et à pH 11 et 45 °C, en utilisant TC8 et Egg PC comme substrats, respectivement. Les courbes sont représentatives de trois expériences indépendantes. ....	89
<b>Figure 31:</b> Spécificité du substrat de FAL. (A) Sélectivité en fonction de la longueur de la chaîne de FAL. L'activité spécifique a été mesurée dans des conditions standard en utilisant TC2, TC4, TC8, l'huile d'olive (OO) ou Egg PC en tant que substrat, comme décrit dans les Matériaux et Méthodes. (B) Enregistrements cinétiques de la lipolyse de lipides enrobés de sn-sn-EOPC ou sn-OEPC par FAL. Les variations de l'absorbance à 272 nm ont été enregistrées pendant 10 minutes pour la stabilisation, puis pendant 40 minutes après l'injection de FAL (0,65 $\mu$ g par puits).....	90
<b>Figure 32 :</b> Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité de FAL, GZEL, et Lipolase®. L'effet des solvants organiques a été déterminé en incubant chaque enzyme avec le solvant [concentration finale de 25% (v/v)] pendant 24 h. Les activités lipasiques résiduelles ont été déterminées dans les mêmes conditions, en utilisant le TC8 comme substrat à 40 °C et à pH 9, comme décrit dans la section Matériaux et Méthodes, puis exprimées en pourcentage du niveau d'activité en l'absence de solvants organiques. L'activité de l'enzyme sans aucun solvant organique a été considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n = 3). <sup>a-d</sup> Les moyennes des enzymes indicateurs avec des lettres minuscules différentes diffèrent de manière significative (P < 0.05). ....	92
<b>Figure 33 :</b> Stabilité et compatibilité des lipases testées (FAL, GZEL et Lipolase®) en présence de détergents à lessive commerciaux. Pendant 60 min à 40°C l'activité enzymatique de l'échantillon témoin, sans additif et incubé dans des conditions similaires, a été considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n = 3). <sup>a-b</sup> Les moyennes des enzymes indicateurs avec différentes lettres minuscules diffèrent significativement (P < 0.05). ....	95
<b>Figure 34 :</b> Évaluation de l'efficacité des lipases utilisées sur l'élimination de l'huile d'olive des tissus de coton avec des détergents. Effet de FAL, GZEL et Lipolase® sur l'élimination de l'huile d'olive des tissus de coton avec divers détergents à lessive liquides et solides. <sup>a-b</sup> Les moyennes pour toutes les colonnes de chaque paramètre avec des lettres minuscules différentes diffèrent significativement (P < 0.05). Les valeurs représentent les moyennes de 3 réplicats indépendants et l'erreur standard est indiquée. ....	96
<b>Figure 35:</b> Test de performance de lavage sur l'élimination de l'huile avec un détergent commercial en présence de FAL, GZEL ou Lipolase®. Le test d'analyse de la performance de lavage de la lipase a été réalisé avec le détergent commercial Class (7 mg/mL) en utilisant un tissu de coton taché de sauce tomate, de ketchup ou de jaune d'oeuf. Le tissu taché d'huile a été rincé à l'eau du robinet, lavé avec Class (7 mg/mL), lavé avec Class complété avec GZEL (500 U/mL), lavé avec Ariel complété avec Lipolase® (500 U/mL), ou lavé avec Ariel complété avec FAL (500 U/mL) .....	97
<b>Figure 36 :</b> Carte de plasmide PPICZ-LipFAL.....	106

<b>Figure 37 :</b> Cinétique de croissance microbienne (o) et production de lipase extracellulaire de X33-rFAL. L'activité a été mesurée sur le substrat trioctanoïne (TC8) en utilisant la technique du pH-stat. Les cultures ont été réalisées dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL de milieu liquide BMMY et incubées à 30 °C sous agitation de 250 tr/min. Le méthanol [1 % (v/v)] a été ajouté toutes les 24 heures pour induire le fort promoteur AOX1. Des aliquotes ont été prélevées toutes les 24 heures pour suivre la croissance et l'activité lipasique. Chaque point représente la moyenne (n = 3) ± l'écart-type. ....	107
<b>Figure 38:</b> Analyse par SDS-PAGE de l'expression de rFAL à partir du milieu surnageant. Pour chaque jour, 100 µl de surnageant du milieu ont été chargés. MM désigne le marqueur de masse moléculaire. ....	107
<b>Figure 39 :</b> Analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE de la rFAL (12% de polyacrylamide) des protéines éluées. MM désigne le marqueur de masse moléculaire ; piste 1, rFAL purifiée ; Piste 2, coloration de l'activité lipolytique du zymogramme du rFAL purifié. Après l'électrophorèse, le gel a été incubé dans 10 µM de butyrate de méthylumbelliféryle pendant 15 min, à 37°C. Les bandes ont été analysées sous UV pour révéler l'activité. MM, marqueur de masse moléculaire. ....	108
<b>Figure 40 :</b> Analyse SDS-PAGE de la rFAL après déglycosylation avec l'endoglycosidase (Endo H). piste 1, rFAL glycosylée ; piste 2, rFAL digérée avec Endo H. MM, marqueur de masse moléculaire. ....	109
<b>Figure 41 :</b> Effets de la température sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la rFAL purifiée en utilisant TC8 ou Egg PC. L'activité enzymatique à différentes températures (de 25 °C à 55 °C) a été déterminée en utilisant TC8 à pH 9 ou PC d'œuf à pH 11. La stabilité de FAL a été mesurée sur TC8 (B) ou PC d'œuf (C) à pH 9. Les activités résiduelles sont exprimées en pourcentage de l'activité initiale (point au temps 0, mesuré immédiatement après l'ajout de l'enzyme), qui a été fixée à 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. ....	110
<b>Figure 42 :</b> Effets du pH sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la rFAL purifiée. En utilisant TC8 ou Egg PC dans des conditions standard. Les activités résiduelles ont été estimées après 20, 40, 60 et 90 minutes d'incubation à différentes valeurs de pH allant de 4 à 12 à 45°C. Les activités résiduelles sont exprimées en pourcentage de l'activité initiale qui était l'activité maximale sur TC8 obtenue à 50°C ou sur PC d'œuf à 55 et était considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. ....	111
<b>Figure 43 :</b> Le profil de spécificité de substrat de la rFAL purifiée. La sélectivité de la longueur de chaîne de FAL sur divers triacylglycérols, l'activité spécifique a été mesurée dans des conditions standards en utilisant le tributyrine (TC4), la trioctanoïne (TC8), et la trioléine (TC18) ou l'émulsion d'huile d'olive (OO) ainsi que le PC d'œuf comme substrat, comme décrit dans le Matériel et les Méthodes. ....	112
<b>Figure 44 :</b> Régiosélectivité de rFAL et GZEL envers les TG synthétiques. (A) Cinétique de l'hydrolyse de sn-EOO ou sn-OOE par rFAL et GZEL enrobés sur des puits de plaque de microtitration. La variation d'absorbance à 272 nm a été enregistrée pendant 10 min, pour stabilisation, puis pendant 30 min après l'injection des enzymes (0,1 µg par puits). Les enregistrements cinétiques présentés ici sont typiques de ceux obtenus dans trois expériences indépendantes. ....	112
<b>Figure 45 :</b> RI% de rFAL en utilisant sn-EOO ou sn-OOE. Comparé à ceux de SML, FSC, TLL, Lecitase, CALA et CALB rapportés dans nos études précédentes. ....	113

<b>Figure 46 :</b> Suivi cinétique de la lipolyse de l'EOPC enduit et de l'OEPC par rFAL. Les variations de l'absorbance à 272 nm ont été suivies pendant 10 min pour la stabilisation, puis pendant 40 minutes après l'injection de rFAL.....	114
<b>Figure 47 :</b> Analyse par TLC de l'hydrolyse de l'EOPC enduit révélée par lumière UV à 254 nm (panneau de gauche) et par coloration à l'iode pendant 15 minutes (panneau de droite). Les standards (Std) utilisés étaient l'EOPC et l'acide $\alpha$ -eleostearique. L'EOPC enduit a été hydrolysé par rFAL ou GPL-RP2, et l'enzyme avec une activité PLA1 connue (El Alaoui et al. 2016).....	115
<b>Figure 48 :</b> Influence des concentrations croissantes d'ions calcium ( $CaCl_2$ ) et de taurodésoxycholate de sodium (NaTDC) sur les activités de rFAL.....	115
<b>Figure 49 :</b> Profil de dénaturation thermique de rFAL de 20° C à 60° C surveillé par spectroscopie de dichroïsme circulaire à pH 8 et en présence de différentes concentrations (de 10% à 50% v/v) d'éthanol, d'isopropanol et de méthanol. Chaque échantillon a été scanné 5 fois et chaque spectre est la moyenne de 5 scans.....	116
<b>Figure 50 :</b> Profil de dénaturation thermique de rFAL de 20°C à 60°C. surveillé par spectroscopie de dichroïsme circulaire à pH 8 et en présence de différentes concentrations (de 10% à 50% v/v) d'éthanol, d'isopropanol et de méthanol. Chaque échantillon a été scanné 5 fois et chaque spectre est la moyenne de 5 scans.....	117
<b>Figure 51 :</b> Vue d'ensemble de la structure 3D de rFAL. Prédite par les outils Alphafold (A). Les hélices $\alpha$ sont étiquetées de $\alpha 1$ à $\alpha 8$ . Les résidus catalytiques S144, D198 et H257 sont représentés sous forme de bâtonnets CPK tandis que le couvercle (hélice $\alpha 3$ / 82-95) dans sa conformation fermée est coloré .....	118
<b>Figure 52 :</b> Docking moléculaire in silico de la phosphatidylcholine (A) ou du triacylglycérol (B) dans la poche de substrat de rFAL, positionnant dans les deux cas le carbone réactif sn-1 vers la ser144 catalytique (représentée en rouge). B et D : vues du site actif de FAL avec PC (B) ou TG (D) dans leurs formes réactives sn-1. L'azote du squelette de s82 et l145 constitue le trou oxyanion de FAL.....	119

## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Etude bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>I. Lipides</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Définition et classification des lipides</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Les acides gras</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Les glycérolipides</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Les glycérophospholipides</b> .....	<b>7</b>
<b>5. Autres lipides</b> .....	<b>9</b>
<b>II. Enzymes lipolytiques</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Généralité</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Modèles de cinétiques interfaciale et le Volet amphiphile</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Modèles de cinétiques</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Les lipases</b> .....	<b>14</b>
4.1. Spécificité des lipases .....	15
4.2. Structure de lipases .....	15
4.2.1. Le repliement $\alpha/\beta$ .....	17
4.2.2. La triade catalytique His-Ser-Asp .....	18
4.2.3. Le volet amphiphile : .....	18
<b>5. Phospholipases</b> .....	<b>19</b>
5.1. Superfamille PLA1 .....	20
5.2. Phospholipases A1 microbiennes : .....	21
5.3. Les phospholipases A1 cytosoliques .....	22
5.4. La Famille de (phospho)lipase .....	22
<b>6. Origine des lipases</b> .....	<b>23</b>
6.1. Les lipase mammifères .....	23
6.2. Les lipases végétales .....	26
<b>7. Les lipases microbiennes</b> .....	<b>27</b>
7.1. Les lipases bactériennes .....	27
7.2. Les lipases fongiques .....	28
7.2.1. Exemples de lipases fongiques .....	31
<b>8. Les champignons</b> .....	<b>36</b>
8.1. Définition .....	36
8.2. Mode de vie .....	36
8.3. Mode de reproduction .....	37
8.4. Phylogénie des champignons .....	38
<b>9. Les Fusariums</b> .....	<b>39</b>
9.1. Classification : .....	39
9.2. Le système lipolytique de <i>Fusarium</i> .....	40

9.2.1. Exemple de lipases de <i>Fusarium</i> .....	40
9.3. Les lipases de <i>Fusarium</i> et pathologies.....	41
<b>10. Applications biotechnologiques des enzymes lipolytiques .....</b>	<b>42</b>
10.1. Détergence.....	42
10.1.1. Définition .....	42
10.1.2. Composition d'un détergent.....	42
10.1.3. Les enzymes détergentes .....	44
10.1.4. Critère de choix .....	45
10.1.5. Exemples de lipases dans la détergence.....	46
10.2. Production de biodiésel.....	48
10.3. Les industries du cuir .....	49
10.4. Les industries textiles.....	50
10.5. La bioremédiation des eaux usées.....	50
10.6. Médecine .....	51
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>52</b>
<b>I. Réactifs.....</b>	<b>52</b>
• <b>Lipides :</b> .....	<b>52</b>
<b>II. Matériel.....</b>	<b>53</b>
<b>1. Souches .....</b>	<b>53</b>
1.1. Souches productrices d'enzymes lipolytiques.....	53
1.2. Souche d' <i>Escherichia coli</i> .....	53
1.3. Souche de <i>Pichia pastoris</i> .....	53
<b>2. Vecteurs de clonage et plasmides.....</b>	<b>53</b>
2.1. Vecteurs de clonage et d'expression.....	53
<b>3. Techniques de biologie moléculaires.....</b>	<b>55</b>
3.1. Digestion d'ADN .....	55
3.1.1. Enzymes de restriction : .....	55
3.1.2. Amplification d'ADN par PCR : .....	55
3.2. Oligonucléotides .....	55
3.3. Identification Moléculaire et Analyse Phylogénétique de l'Isolat CBS .....	55
<b>4. Milieux.....</b>	<b>56</b>
4.1. Les milieux d'isolement et de culture.....	56
<b>5. Logiciels .....</b>	<b>57</b>
<b>III. Méthodes .....</b>	<b>58</b>
<b>1. Culture et conservation des souches .....</b>	<b>58</b>
1.1. Cultures.....	58
1.1.1. Culture de <i>Fusarium annulatum</i> .....	58
1.1.2. Culture de <i>E. coli</i> .....	58
1.1.3. Culture de <i>P. pastoris</i> .....	58
1.2. Conservation des souches .....	58
<b>2. Dosage des activités enzymatiques en milieu liquide.....</b>	<b>59</b>
2.1. Activité lipolytique : .....	59
2.2. Etude de la stéréopréférence de la lipase.....	60
2.3. Dosage de l'activité galactolipase.....	61

<b>3. Purification</b>	<b>62</b>
3.1. Lipase FAL	62
3.1.1. Extraits lipolytiques à partir de la <i>Fusarium annulatum Bugnicourt</i>	62
3.1.2. Précipitation sélective au sulfate d'ammonium	62
3.1.3. Chromatographie	62
3.1.4. Dosage de protéines, électrophorèse et zymographie	63
3.1.5. Zymographie	63
3.1.6. Analyse de la séquence terminale NH <sub>2</sub>	63
3.2. La lipase recombinante rFAL	64
3.3. Purification de lipides	64
3.3.1. Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)	64
<b>4. Caractérisation biochimique</b>	<b>66</b>
4.1. Les lipases Native et recombinantes	66
4.1.1. Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique	66
• L'effet de l'orlistat :	66
• L'effet d'autres inhibiteurs :	66
4.1.2. Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique	66
4.1.3. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la lipase FAL	67
4.1.4. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la lipase FAL	67
4.1.5. Effet du CaCl <sub>2</sub> sur l'activité lipolytique	67
4.1.6. Effet de certains détergents synthétiques sur la stabilité de lipase	67
4.1.7. Effet des détergents liquides et solides commerciaux sur la stabilité enzymatique de lipase	68
4.1.8. Analyse de la Performance de lavage de la FAL	68
4.1.9. Analyse Statistique	68
4.1.10. L'analyse de dichroïsme circulaire (CD)	69
4.1.11. Essai de déglycosylation	69
<b>5. Techniques d'extraction et de manipulation de l'ADN</b>	<b>70</b>
5.1. Extraction de l'ADN plasmidique	70
5.2. Extraction de l'ADN génomique à partir de Pichia	70
5.3. Quantification de l'ADN	71
5.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	71
<b>6. Préparation des cellules compétentes et transformation</b>	<b>71</b>
6.1. Souche d'E. coli	71
6.2. Souche de Pichia pastoris	72
<b>7. MÉTHODES ANALYTIQUES</b>	<b>72</b>
7.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	72
7.2. Séparation des protéines sur gel d'acrylamide	73
7.3. Coloration au bleu de Coomassie	73
<b>8. Modélisation et docking moléculaire</b>	<b>73</b>
<b>Résultats et discussion</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre I : Purification et caractérisation biochimique de la lipase de <i>Fusarium annulatum Bugnicourt</i></b>	<b>75</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>76</b>
<b>2. Ciblage des souches fongiques productrices de lipases extracellulaires</b>	<b>77</b>
<b>3. L'identification de la souche CBS par taxonomie classique et moléculaire</b>	<b>78</b>
3.1. Caractéristiques morphologiques	78
3.2. Identification moléculaire et analyse phylogénique	79
<b>4. Optimisation de la production de la lipase extracellulaire par <i>Fusarium annulatum</i></b>	<b>80</b>

<b>5. Purification et caractérisation biochimique de la lipase .....</b>	<b>82</b>
<b>6. Caractérisation biochimique de la lipase .....</b>	<b>84</b>
6.1. Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la FAL.....	84
6.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la FAL.....	85
6.3. Effect of Metal Ions on FAL Activity .....	86
6.4. Effet des sels biliaires, des inhibiteurs et des réactifs chimiques sur l'activité de la FAL.....	88
6.5. Spécificité de substrat de la FAL.....	90
<b>7. Performance enzymatique de la FAL.....</b>	<b>91</b>
7.1. Effet des solvants organiques sur la stabilité de la FAL .....	91
7.2. Effects of Detergent Additives on the Stability of FAL and GZEL.....	92
7.3. Stabilité et compatibilité des lipases avec divers détergents à lessive commerciaux .....	94
7.4. Performance enzymatique de la FAL dans la lavage et le détachement des huiles .....	95
<b>8. Discussion .....</b>	<b>98</b>
<b>9. Conclusions.....</b>	<b>102</b>
<b><i>Chapitre 2 : Expression hétérologue et caractérisation moléculaire de la lipase de Fusarium annulatum. ....</i></b>	<b><i>103</i></b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>104</b>
<b>2. Clonage de gène et analyse de séquence .....</b>	<b>106</b>
<b>3. Étude des propriétés physico-chimiques de rFAL .....</b>	<b>109</b>
3.1. Spécificité du substrat de rFAL .....	111
3.2. Analyse par chromatographie sur couche mince (TLC) des produits de lipolyse.....	114
3.3. Effet des sels biliaires et des ions calcium.....	115
3.4. Analyse par dichroïsme circulaire (CD) .....	116
<b>4. Modélisation et docking de rFAL .....</b>	<b>117</b>
<b>5. Discussion .....</b>	<b>119</b>
<b>6. Conclusions.....</b>	<b>126</b>
<b><i>Synthèse, Conclusions et Perspectives .....</i></b>	<b><i>128</i></b>
<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b><i>132</i></b>

# Introduction générale

Dans le contexte actuel de progrès scientifique et technologique accéléré, la biochimie est une discipline qui se distingue par ses avancées révolutionnaires, touchant divers secteurs tels que la biotechnologie, l'économie et la communication. Ce développement exponentiel offre un éventail de possibilités inédites, visant à répondre aux exigences croissantes du marché mondial. Un élément central dans cette progression biotechnologique réside dans les biocatalyseurs ou enzymes.

Par rapport aux procédés chimiques conventionnels, les enzymes présentent une compétitivité supérieure en termes d'efficacité énergétique, de rapidité, de sensibilité, et de spécificité des réactions qu'elles catalysent. En raison de ces avantages, l'utilisation des enzymes a connu un essor remarquable au cours des dernières décennies et continue de révéler des perspectives prometteuses. Selon le dernier rapport de *Research and Markets*, le marché des enzymes industrielles devrait croître de \$2,190.59 millions au cours de la période 2022-2027, avec un taux de croissance annuel composé (ou CAGR, *compounded annual growth rate*) de 6,26%.

Ces biocatalyseurs sont de plus en plus sollicités dans divers secteurs, notamment l'industrie agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, le secteur textile, le tannage du cuir, le domaine de l'environnement, et l'industrie de la détergence. Cela souligne l'importance primordiale des enzymes, non seulement pour leur rôle catalytique essentiel, mais aussi pour leur potentiel dans la réalisation de processus industriels plus durables et éco-efficaces. Dans ce contexte, la recherche et le développement d'enzymes nouvelles et améliorées, capables d'optimiser les procédés biotechnologiques existants et de favoriser l'émergence de nouvelles applications industrielles, est un enjeu scientifique majeur.

Les lipases, classées comme des hydrolases à sérine, jouent un rôle de catalyseur dans l'hydrolyse et la synthèse de divers esters. Leur application croissante dans divers domaines industriels témoigne de leur importance considérable. En particulier, elles sont de plus en plus incorporées dans les détergents à lessive pour une élimination plus efficace des taches grasses et une préservation de l'intégrité des couleurs des textiles. En effet, les enzymes présentes dans les détergents améliorent considérablement l'efficacité du nettoyage, tout en économisant du temps et de l'énergie.

Les enzymes, de par leur pH neutre, réduisent les risques de brûlures chimiques et de corrosion des équipements industriels. Leur efficacité nettoyante supérieure à celle de

nombreux produits chimiques, combinée à leur biocompatibilité et leur biodégradabilité, en font une solution de nettoyage respectueuse de l'environnement. Parmi les 3000 types d'enzymes existants, seules une poignée est incorporée dans les produits de lessive, notamment les protéases, les lipases, les amylases et les cellulases.

Les lipases sont particulièrement pertinentes en raison de leur grande efficacité dans la décomposition des taches d'huile et de graisse. Elles peuvent être dérivées de sources microbiennes (bactéries et champignons), animales ou végétales, mais les lipases microbiennes ont trouvé une utilisation plus large en raison de leurs propriétés bénéfiques. Cette diversité d'applications a stimulé la recherche de nouvelles souches lipolytiques pour l'identification de nouvelles lipases aux propriétés attractives. Cependant, pour répondre à la demande industrielle, l'expression hétérologue et/ou homologue est souvent nécessaire pour augmenter les niveaux de production d'enzymes lipolytiques.

Dans cette perspective, ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet de Recherche du Partenariat Hubert Curien (PHC)-Maghreb (FranMaghZYM 2020-2023), code Campus France : 43791TM et code PHC : 01MAG20. Ce projet, intitulé "Biodiversité des microorganismes d'intérêt biotechnologique, isolés de biotopes extrêmes : procédés enzymatiques et leur impact sur l'environnement", est une collaboration entre des équipes de recherche en Tunisie, France, Maroc, et Algérie. Les objectifs principaux de ce travail de thèse sont :

- ✚ La collecte d'une collection de souches fongiques à partir de différents biotopes extrêmes en Tunisie.
- ✚ Le criblage et l'isolement de ces différentes souches pour tester leur potentiel lipolytique.
- ✚ La purification d'une nouvelle enzyme lipolytique à partir de la souche la plus performante.
- ✚ L'expression hétérologue du gène codant pour l'enzyme la plus performante, dans le système de la levure *Pichia pastoris*.
- ✚ La purification et la caractérisation de l'enzyme recombinante par rapport à l'enzyme native.
- ✚ L'étude des relations structure-fonctions des enzymes mentionnées.
- ✚ L'application des hydrolases retenues (natives ou recombinantes) dans la formulation des produits de détergents de lavage (cocktail d'hydrolases) et dans le traitement des cuirs, notamment lors des opérations de dégraissage enzymatique (lipases et phospholipases).

Dans ce contexte, une souche lipolytique a été isolée et identifiée à partir de biotopes tunisiens, précisément le champignon filamenteux *Fusarium annulatum*. Les conditions de culture ont été optimisées pour maximiser la production d'activité lipasique. Une nouvelle lipase extracellulaire, nommée *Fusarium annulatum* Lipase (FAL), a été purifiée et caractérisée biochimiquement. La FAL a démontré sa capacité à hydrolyser différents lipides, tels que les triglycérides (TG), les phospholipides et les galactolipides.

En parallèle, la stabilité de l'enzyme en présence de détergents a été évaluée, ainsi que son efficacité contre diverses taches lipidiques. En outre, le clonage et l'expression hétérologue de la FAL chez la levure *Pichia pastoris* ont été réalisés. La modélisation moléculaire de la FAL, basée sur l'homologie de séquence, a permis d'expliquer la spécificité de l'enzyme sur différents substrats lipidiques.

# Etude bibliographique

## **I. Lipides**

### **1. Définition et classification des lipides**

Le mot "lipide" fait référence à un groupe hétérogène de substances biologiques ayant en commun l'insolubilité dans l'eau et la solubilité dans les solvants organiques tels que le chloroforme, les hydrocarbures ou les alcools [1]. Cette propriété les distingue des autres composants de la matière vivante tels que les sucres, les protéines et les acides nucléiques. Les lipides sont essentiels pour la structure et la fonction des membranes cellulaires, l'isolation thermique et la régulation des processus métaboliques [2].

L'organisation des lipides en catégories est un sujet délicat en raison de leur grande variété et de la difficulté d'établir une définition universelle. Diverses classifications ont été proposées. Initialement Small [3] a élaboré un système de classification qui sépare les lipides en deux grandes familles (lipides polaires et lipides apolaires) selon leurs caractéristiques physico-chimiques en présence d'eau.

Une autre façon de classer les lipides est basée sur leur structure, en les regroupant en lipides simples, complexes et protéolipides. Les lipides simples comprennent des acides gras et les alcools (tels que les acylglycérols, les éthers de glycérols, les stérols, les esters de stérols et les esters de cire). Les lipides complexes se décomposent en trois produits ou plus lors de leur hydrolyse (tels que les phospholipides, les glycolipides et les sphingolipides). Des informations complémentaires sont disponibles sur la base de données CYBERLIPID (<http://www.cyberlipid.org>).

Une classification plus récente des lipides, fondée sur leur composition chimique, a été suggérée par le groupe d'Edward Dennis [4, 5]. Cette méthode divise les lipides en huit catégories : les acides gras (FA), les glycérolipides (GL), les glycérophospholipides (GP), les sphingolipides (SP), les stéroïdes (ST), les prénoïdes (PR), les saccharolipides (SL) et les polycétides (PK). L'objectif de cette classification est de simplifier la gestion des bases de données et de favoriser la communication entre les scientifiques. De nombreux lipides et leurs métabolites sont répertoriés dans la base de données LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>).

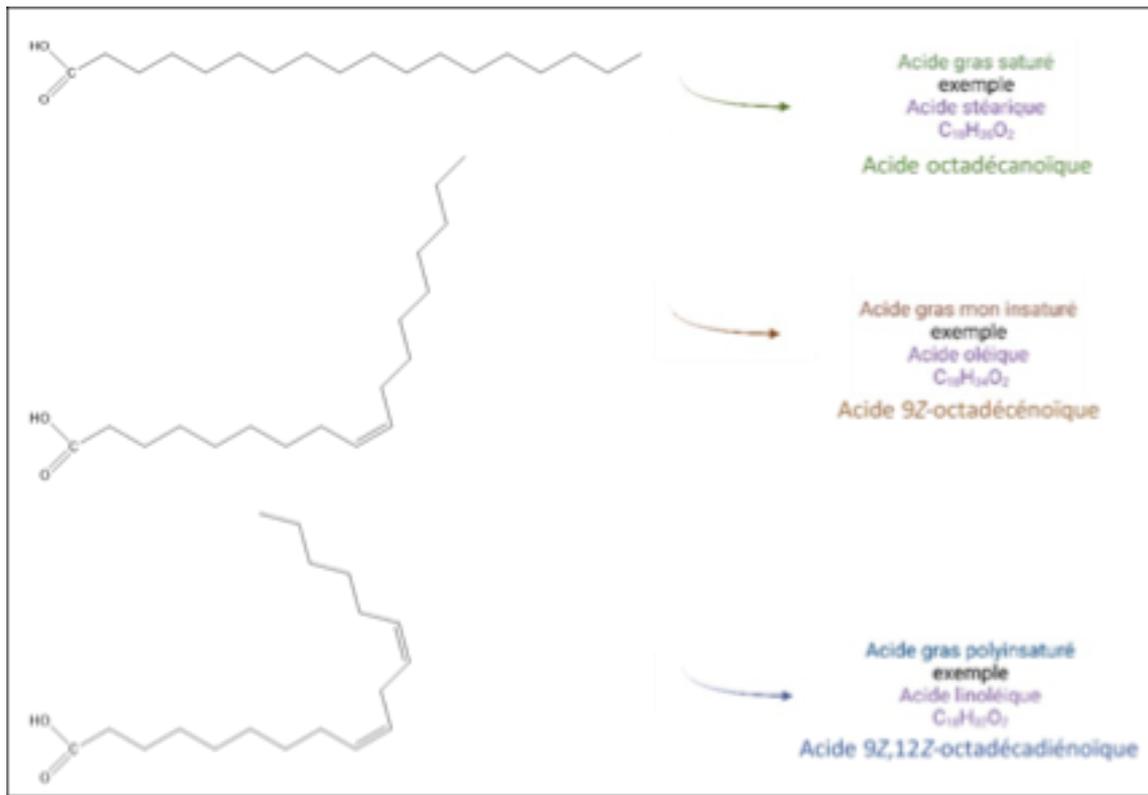
Dans ce contexte, les principaux lipides alimentaires liés aux recherches présentées dans cette thèse seront décrits.

## **2. Les acides gras**

Les acides gras sont des composants essentiels des huiles et des graisses. Ils appartiennent à une famille de molécules dont la structure chimique de base est similaire, composée d'une chaîne hydrocarbonée saturée ou insaturée, terminée par un groupement carboxyle. Les acides gras se distinguent les uns des autres non seulement par la longueur de la chaîne carbonée, mais également par la position, le nombre et la configuration spatiale (*Z*, *E*) des liaisons doubles. Les acides gras ayant un nombre total d'atomes de carbone de 1 à 6 sont généralement classés comme des acides gras à chaîne courte, tandis que ceux de 7 à 14 atomes de carbone sont définis comme des acides gras à chaîne moyenne. Les acides gras à chaîne longue ont 16 atomes de carbone ou plus[6].

Les acides gras sont présents dans de nombreux produits d'origine animale et végétale. L'acide laurique (C12:0) est l'un des trois acides gras saturés les plus fréquemment rencontrés dans la nature avec l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0) (Figure 1). Parmi les acides gras monoinsaturés, l'acide palmitoléique ou acide 9Z-hexadécénoïque (C16:1  $\Delta^9$ ) est largement répandu comme un constituant dans presque toutes les catégories de plantes et d'animaux. De plus, l'acide oléique ou acide 9Z-octadécénoïque (18:1  $\Delta^9$ ) est présent en quantités bien moins importantes que le C16:1  $\Delta^9$  (Figure 1).

Les acides gras polyinsaturés ayant moins de 18 atomes de carbone se trouvent en très faibles quantités dans les graisses animales et végétales. Cependant, les acides gras en C14 et C16 ont été signalés dans les huiles issues d'animaux marins. Les acides gras polyinsaturés les plus courants sont le C18:2  $\Delta^{9,12}$  (acide linoléique ou acide 9Z,12Z-octadécadiénoïque) (Figure 1) et le C18:3  $\Delta^{9,12,15}$  (acide  $\alpha$ -linoléique ou acide 9Z,12Z,15Z-octadécatriénoïque), appartenant respectivement aux familles  $\omega$ -6 et  $\omega$ -3. L'acide linoléique est considéré comme un acide gras essentiel présent dans les huiles végétales, avec une teneur moyenne variant entre 40 et 60%. De même, l'acide  $\alpha$ -linoléique est largement répandu dans la nature en tant que composant principal des huiles végétales hautement insaturées.

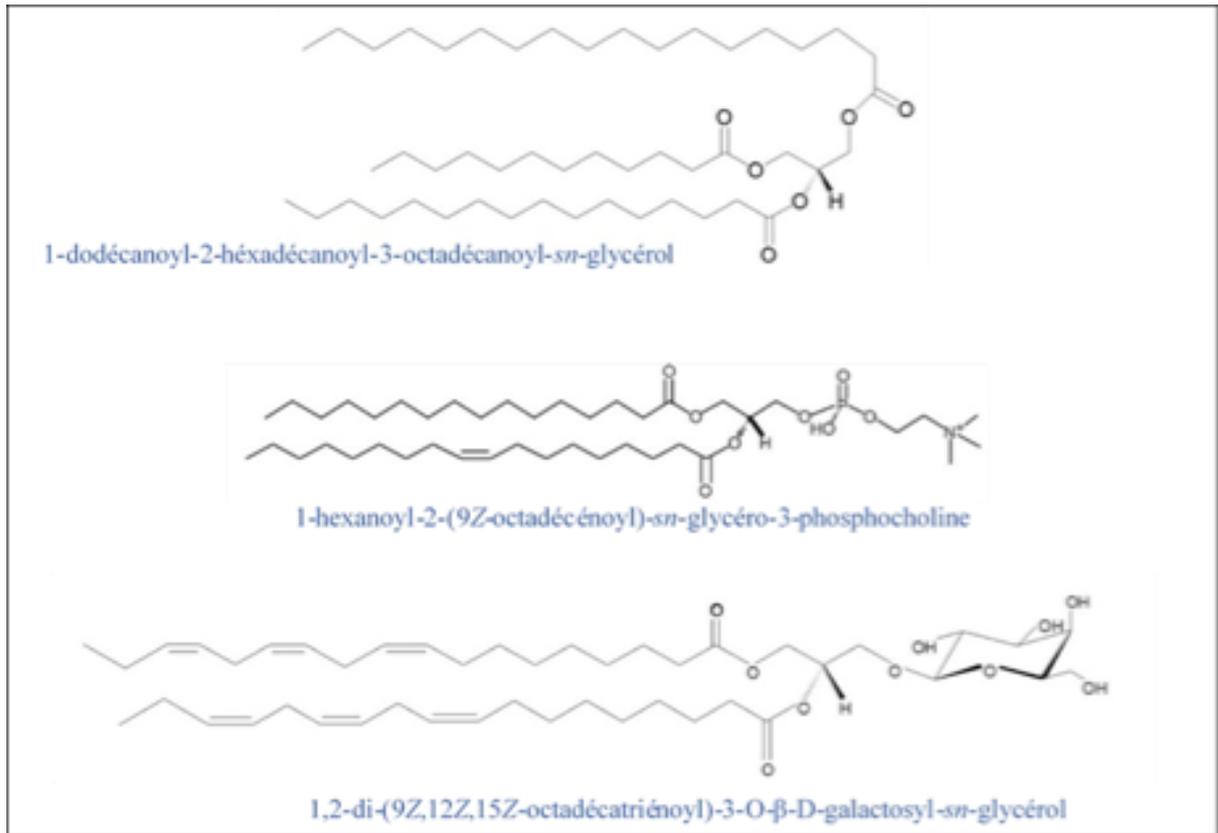


**Figure 1** : Exemples de structures des acides gras saturés et insaturés.

### 3. Les glycérolipides

Les glycérolipides regroupent tous les lipides contenant du glycérol. On distingue notamment les acylglycérols, les glycérophospholipides et les glycéroglycolipides (Figure 2). Les acylglycérols sont des molécules de glycérol mono-, di- ou tri-substituées par l'estérification d'un acide gras (Figure 2). Les triglycérides ou TG, qui représentent environ 90% des lipides alimentaires, jouent un rôle dans le stockage intracellulaire et le transport des acides gras (Figure 2). Les polarités des groupes hydroxyles du glycérol et carboxyles des acides gras sont neutralisées par les liaisons esters, rendant les triglycérides neutres et très hydrophobes. Les glycérophospholipides sont des phospholipides à base de glycérol et sont le composant principal des membranes biologiques. La structure la plus basique est un phosphatidate. Ce dernier peut être estérifié par une tête polaire tels que la choline (Figure 2).

Les glycéroglycolipides, également connus sous les noms de glycolipides ou galactolipides, sont formés d'un *sn*-1,2-diacylglycérol (DG) lié, par l'intermédiaire d'une liaison osidique, en position *sn*-3 à un galactose (monogalactosyl-DG ou MGDG) (Figure 2) ou deux galactoses (digalactosyl-DG ou DGDG). Les glycolipides sont abondants chez les algues et constituent la moitié des lipides des thylakoïdes. [7].



**Figure 2:** Exemples de structure de glycérolipides : TG (1-dodécanoyl-2-héxadécanoyl-3-octadécanoyl-*sn*-glycérol), glycérophospholipide (1-hexanoyl-2-(9Z-octadécénoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) et glycéroglycolipide (1,2-di-(9Z,12Z,15Z-octadécatriénoyl)-3-O-β-D-galactosyl-*sn*-glycérol).

#### 4. Les glycérophospholipides

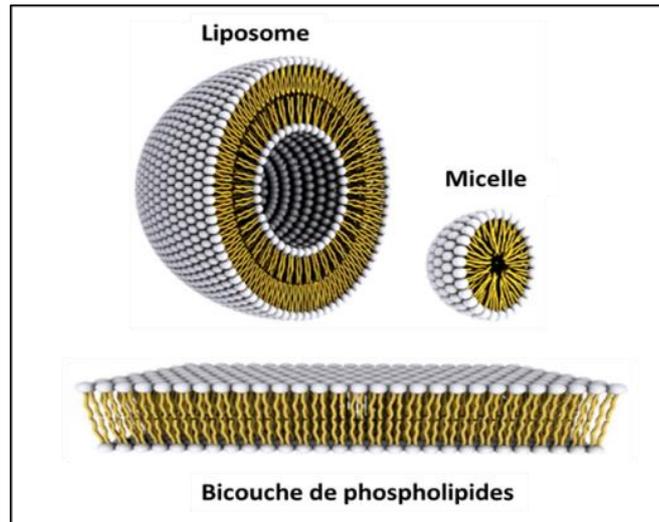
Les glycérophospholipides sont une catégorie spécifique de glycérolipides, reconnus pour leur importance et leur abondance dans les membranes biologiques, la signalisation moléculaire et le métabolisme. Ces molécules amphiphiles comportent une partie hydrophobe (queue) et une partie hydrophile (tête). La structure des diverses classes de glycérophospholipides est illustrée dans la Figure 3. Un glycérol forme le "squelette" de la molécule, avec des acides gras estérifiés aux positions *sn*-1 et *sn*-2 et une fonction phosphate à la position *sn*-3. Cette dernière est liée à l'hydroxyle d'un alcool, comme un amino-alcool (choline, éthanolamine, sérine) ou un polyol (glycérol, inositol), par une liaison phosphodiester. La variation dans l'alcool lié au groupement phosphate conduit à différents glycérophospholipides, tels que la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylglycérol (PG) et la cardiolipine (CL)[4]. Le PA, où la fonction phosphate n'est liée à aucun groupement, représente la forme la plus simple des glycérophospholipides. Bien qu'il soit présent en faible quantité dans les cellules, il constitue un intermédiaire clé dans la biosynthèse des phospholipides. La

PC est le phospholipide majoritaire dans les membranes eucaryotes, représentant plus de 50 % de leur composition. La CL est un type de diphosphatidylglycérol qui constitue environ 18 % des molécules présentes dans la membrane interne mitochondriale. Cette molécule est composée d'un glycérol lié à deux groupes de PA via les fonctions alcools primaires du glycérol.

Structure de base du phospholipide	Substituant (X)	Phospholipide/caractéristiques
		hydrogène PA anionique
		ethanolamine PE zwitterionique
		choline PC zwitterionique
		sérine PS anionique
		glycerol PG anionique
		phosphatidylglycerol CL anionique
		inositol PI anionique

Figure 3 : Les structures moléculaires des phospholipides [8].

En présence d'eau, les phospholipides peuvent former de nombreux types de structures telles que des micelles ou des liposomes (Figure 4). De petites micelles sphériques sont formées en dispersion aqueuse par des amphiphiles avec une fraction lipophile relativement faible. Dans le cas des phospholipides, cela peut être causé par la présence d'une seule chaîne alkyle (lyso-phospholipides) ou de deux chaînes alkyle courtes. Le diamètre hydrodynamique de telles micelles est typiquement dans la gamme de 5 à 10 nm. Les micelles ne se forment qu'au-dessus d'une concentration définie de l'amphiphile. Cette concentration est appelée concentration micellaire critique (CMC). En dessous de cette concentration, les amphiphiles sont présents sous forme de monomères. Au-dessus de la CMC, il y a un échange constant entre les molécules amphiphiles libres et les amphiphiles liés dans les micelles.



**Figure 4 :** Aspects des liposomes et des micelles [1].

La CMC est une propriété importante des phospholipides et des tensioactifs en général. En dessous de la CMC, la tension superficielle change avec la concentration de l'amphiphile. Au-dessus de la CMC, la tension superficielle reste relativement constante ou change avec une pente plus faible. La valeur de la CMC pour un amphiphile donné dépend de la température du milieu et de la présence et concentration d'autres substances tensioactives et électrolytes.

Les bicouches phospholipidiques (Figure 4) se trouvent en abondance dans les membranes cellulaires, et font partie intégrante des systèmes de délivrance de médicaments bien établis comme les liposomes. Exposés à un milieu aqueux, les phospholipides amphiphiles s'assemblent en un feuillet à deux couches avec les queues hydrophobes pointant vers la partie interne et les têtes polaires vers la partie externe, ce qui donne une bicouche phospholipidique. Pour minimiser davantage la région hydrophobe exposée à l'eau, des vésicules phospholipidiques fermées peuvent être formées. Ces vésicules sont également appelées liposomes (Figure 4). Ce qui rend les liposomes si intéressants pour les applications pharmaceutiques, c'est le fait que des médicaments hydrophiles peuvent être encapsulés dans le noyau aqueux des vésicules. De plus, les principes actifs lipophiles peuvent également être transportés dans la couche phospholipidique.

## 5. Autres lipides

Nous pouvons distinguer d'autres lipides comme les sphingolipides, les stérols et les vitamines liposolubles. Les sphingolipides sont des amides de sphingosine essentiels au maintien et au développement des organismes vivants, formant des microdomaines lipidiques dans les membranes. Les stérols, en particulier le cholestérol, sont des esters d'acides gras présents dans divers types de cellules. Les vitamines liposolubles, qui comprennent les

vitamines A, D, E et K, ont un métabolisme similaire à celui des lipides et jouent un rôle essentiel dans une multitude de processus physiologiques importants tels que la vision, la croissance, la différenciation des épithéliales, le métabolisme phosphocalcique, la protection contre le stress oxydatif et la coagulation

Composition physico-chimique.

## **II. Enzymes lipolytiques**

### **1. Généralité**

Les enzymes lipolytiques, telles que les estérases, les lipases, galactolipases et les phospholipases, sont reconnues pour leur rôle en tant que biocatalyseurs dans l'hydrolyse des liaisons ester carboxyliques ou phosphoriques présentes dans les triglycérides (TG), les diglycérides (DG), les monoglycérides (MG) ou les phospholipides.

D'après la classification proposée par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (consultable sur <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>), les enzymes sont réparties en 13 catégories distinctes. Les enzymes lipolytiques font partie de la catégorie des estérases, identifiées par le code EC 3.1. Cette famille d'enzymes est essentielle pour la régulation du métabolisme des lipides et joue un rôle crucial dans divers processus biologiques et industriels. Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les points communs de cette famille, puis leurs actions spécifiques seront abordées dans la section suivante.

### **2. Phénomène d'activation interfaciale**

De par leur nature hydrophobe, les lipides s'organisent en structures distinctes au contact d'un milieu aqueux, formant ainsi une interface entre les deux milieux. Cette interface présente des caractéristiques biochimiques spécifiques essentielles à l'activation et au fonctionnement des lipases et phospholipases. L'activation interfaciale, un phénomène propre aux carboxylester hydrolases lipolytiques (lipases et phospholipases), fut initialement identifiée par K. Holwerda en 1936 [8] puis en 1945 par Schonheyder et Volqvartz [9]. Alors que l'enzyme est faiblement actif sur un substrat monomérique en solution, il multiplie son activité de 5 à 10 ordres de grandeur lorsque le substrat s'agrège au-delà de sa limite de solubilité. Cela revient au fait que l'activité des lipases est renforcée sur des substrats insolubles (tels que les émulsions) par rapport aux mêmes substrats dans des solutions monomériques [10]. Il est donc ressorti de ces études que les lipases pourraient constituer une catégorie particulière d'estérases très efficaces pour hydrolyser les molécules à groupement ester carboxylique agrégées dans l'eau. Cette propriété a longtemps été utilisée pour distinguer les « lipases » des « estérases ». Les estérases n'ont généralement pas besoin d'une interface pour s'activer, étant principalement liées à leur affinité pour les substrats hydrosolubles. Ainsi, leurs mécanismes d'activation et leur spécificité de substrats diffèrent de ceux des enzymes lipolytiques agissant à l'interface lipidique.

Les premières investigations sur la cinétique interfaciale de ces enzymes lipolytiques remontent aux années 1960, grâce aux travaux de Gutfreund et Racker (1961) sur la lipase pancréatique. Depuis lors, de nombreux chercheurs ont exploré la relation structure-fonction et

la cinétique des lipases aux interfaces lipide-eau par la détermination de la structure tridimensionnelle (3D) de la lipase pancréatique humaine [11] ont et la lipase de *Rhizomucor miehei* [12]. Ces structures 3D révèlent la présence d'une boucle amphiphile (volet) recouvrant le site catalytique en solution. Il a été postulé que cette boucle devait subir un changement conformationnel en présence d'une interface lipide-eau et cela pourrait expliquer le phénomène d'activation interfaciale. Cependant, des recherches récentes sur les lipases ont néanmoins montré qu'il n'existe pas de lien direct entre les structures observées et les propriétés cinétiques. Des structures déterminées en présence d'inhibiteurs ou de micelles mixtes ont validé le rôle du volet dans la catalyse. Toutefois, certaines lipases microbiennes, comme la cutinase ou la lipase de *Bacillus subtilis*, n'ont pas de volet et ne présentent pas d'activation interfaciale. À l'inverse, les lipases de *Pseudomonas glumae* [13] et de *Candida antarctica* B (CALB) [14], ont des volets amphiphiles recouvrant leurs sites actifs mais ne présentent pas d'activation interfaciale.

Des recherches plus récentes ont révélé que les lipases exhibent une cinétique interfaciale complexe, dépendant à la fois de la concentration des substrats et de la nature de l'interface. Les travaux de Reis et al [15] ont notamment souligné l'impact de la tension superficielle et de la présence d'agents tensioactifs sur la cinétique interfaciale des lipases. Par ailleurs, des études comme celles Derewenda et al [16] et de Winkler et al. [11] ont mis en lumière l'importance des certains résidus d'acides aminés à la surface des lipases pour la reconnaissance des substrats et la stabilisation de l'enzyme à l'interface.

En ce qui concerne les phospholipases, le mécanisme d'activation semble différent. La nature polaire des phospholipides qu'elles hydrolysent entraîne une présentation du substrat distincte, les exemptant d'un mécanisme similaire à celui des lipases. Ces enzymes adoptent une structure appelée i-face qui permet leur adsorption à la surface [17]

En résumé, les recherches ont révélé une variété de mécanismes d'action pour les lipases et phospholipases. Les critères d'activation interfaciale et de présence d'un segment amphiphile, le "lid", ne sont pas essentiels pour différencier cette catégorie d'enzymes lipolytiques. Le critère principal d'une enzyme lipolytique reste sa capacité à hydrolyser les TG à longue chaîne.

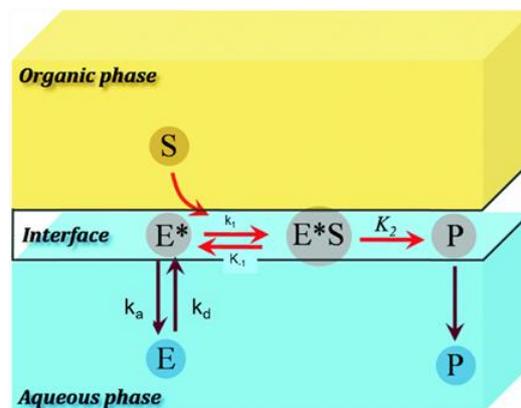
### **3. Modèles de cinétiques**

Les lipases, bien qu'elles soient complètement solubles dans l'eau, exercent leur activité catalytique à l'interface entre les lipides et l'eau, illustrant ainsi la catalyse en milieu hétérogène. En conséquence, le modèle de Michaelis-Menten traditionnellement utilisé pour l'enzymologie homogène ne convient pas pour étudier ces enzymes. Verger et de Haas ont développé en 1973

une adaptation du modèle Michaelien pour tenir compte des caractéristiques spécifiques des enzymes lipolytiques [18]. Le processus enzymatique se déroule en deux phases distinctes :

Phase d'adsorption : L'enzyme soluble (E) se fixe à l'interface lipide-eau, ce qui lui confère un état énergétique plus favorable. Cette étape est contrôlée par deux constantes de vitesse,  $k_p$  et  $k_d$ , représentant respectivement la pénétration de l'enzyme dans l'interface et sa désorption de celle-ci (Figure7).

Phase de catalyse : Une étape catalytique de type Michaelis-Menten se déroule ensuite à l'interface. L'enzyme adsorbée ( $E^*$ ) se lie au substrat (S) pour former le complexe enzyme-substrat ( $E^*S$ ) et libérer le produit de réaction (P). Contrairement aux mécanismes "classiques" qui se déroulent dans un espace tridimensionnel (dans un volume réactionnel), ce mécanisme a lieu dans un système bidimensionnel. E, S,  $E^*S$  et P sont exprimés en unités de surface ( $m^2$ ) plutôt qu'en unités de volume ( $m^3$ ). Toutefois, ce modèle n'est valide que lorsque le produit de réaction est immédiatement éliminé de l'interface et solubilisé dans le tampon de réaction (en supposant un temps de diffusion négligeable). Ce modèle est donc applicable uniquement pour la libération des produits de lipolyse à chaîne courte ou moyenne, qui génèrent des produits solubles dans la phase aqueuse.



**Figure 5** : Modèle de cinétique interfaciale d'après Verger and de Haas [19].

Il existe plusieurs modèles pour décrire l'action enzymatique des lipases et des phospholipases, chacun offrant des perspectives différentes sur les mécanismes impliqués. Un autre modèle par exemple, le modèle de dilution de surface, a été développé pour décrire l'action enzymatique des phospholipases  $A_2$  ( $PLA_2$ ) dans des micelles mixtes détergent-lipide [20, 21]. Dans une première étape, l'enzyme (E) s'adsorbe de manière non spécifique sur la surface de la micelle mixte (A), formant le complexe EA. Cette étape se déroule en milieu homogène. Le complexe EA interagit ensuite avec les lipides (B) de la micelle pour former le complexe EAB,

où B représente la densité en phospholipides. L'enzyme hydrolyse le substrat, libère le produit P, et régénère le complexe EA.

Deux modèles complémentaires ont été développés pour les cinétiques d'hydrolyse des liposomes par les PLA<sub>2</sub> : le "scooting mode" et le "hopping mode" [22]. Dans le "scooting" mode, l'enzyme se fixe de manière irréversible à la surface des liposomes et ne se désorbe pas après l'action catalytique. L'enzyme effectue de nombreux cycles d'hydrolyse et possède une efficacité catalytique élevée. Ce modèle est bien adapté pour étudier les cinétiques des PLA<sub>2</sub>. À l'inverse, le "hopping" mode décrit un modèle où l'enzyme se désorbe après chaque cycle et doit se réadsorber pour effectuer une nouvelle action catalytique, ce qui entraîne une faible efficacité catalytique. Ce dernier modèle explique le phénomène d'échange de la lipase pancréatique entre des gouttelettes d'huile, où l'enzyme se désorbe de son substrat pour se fixer sur un autre [23].

#### **4. Les lipases**

Les lipases, également connues sous le nom de TG hydrolases (E.C.3.1.1.3), font partie de la sous-catégorie des hydrolases spécifiques aux esters carboxyliques (E.C 3.1.1). Ces enzymes catalysent naturellement l'hydrolyse des liaisons ester carboxylique des TG, qu'ils aient des chaînes courtes solubles dans l'eau ou des chaînes longues insolubles en milieu aqueux [24].

Outre l'hydrolyse, les lipases sont également capables de catalyser des réactions de synthèse (Figure 8). Ces réactions peuvent se produire de deux manières : soit à l'interface d'un système biphasique composé d'une phase organique non miscible contenant le substrat hydrophobe et de l'eau [25], soit dans un système présentant des conditions thermodynamiquement avantageuses, comme une faible activité de l'eau. Les réactions de synthèse principales sont l'estérification et la transestérification [15, 25].

Au cours de l'estérification, la lipase associe un acide gras à un alcool par une liaison covalente, produisant un ester et libérant une molécule d'eau. Les réactions similaires sont la thio-estérification et l'amidation, où l'alcool est substitué par un thiol ou un amide, respectivement.

Les lipases peuvent également catalyser des réactions de transestérification, comme l'alcoolyse, l'acidolyse, l'aminolyse et l'interestérification. Récemment, de nouvelles applications prometteuses ont été rapportées pour différentes lipases, notamment des réactions d'addition de Michael organo-catalysées par ces enzymes. Les principaux types de liaisons formées par cette réaction sont C-C, C-N, C-O ou C-S [26].

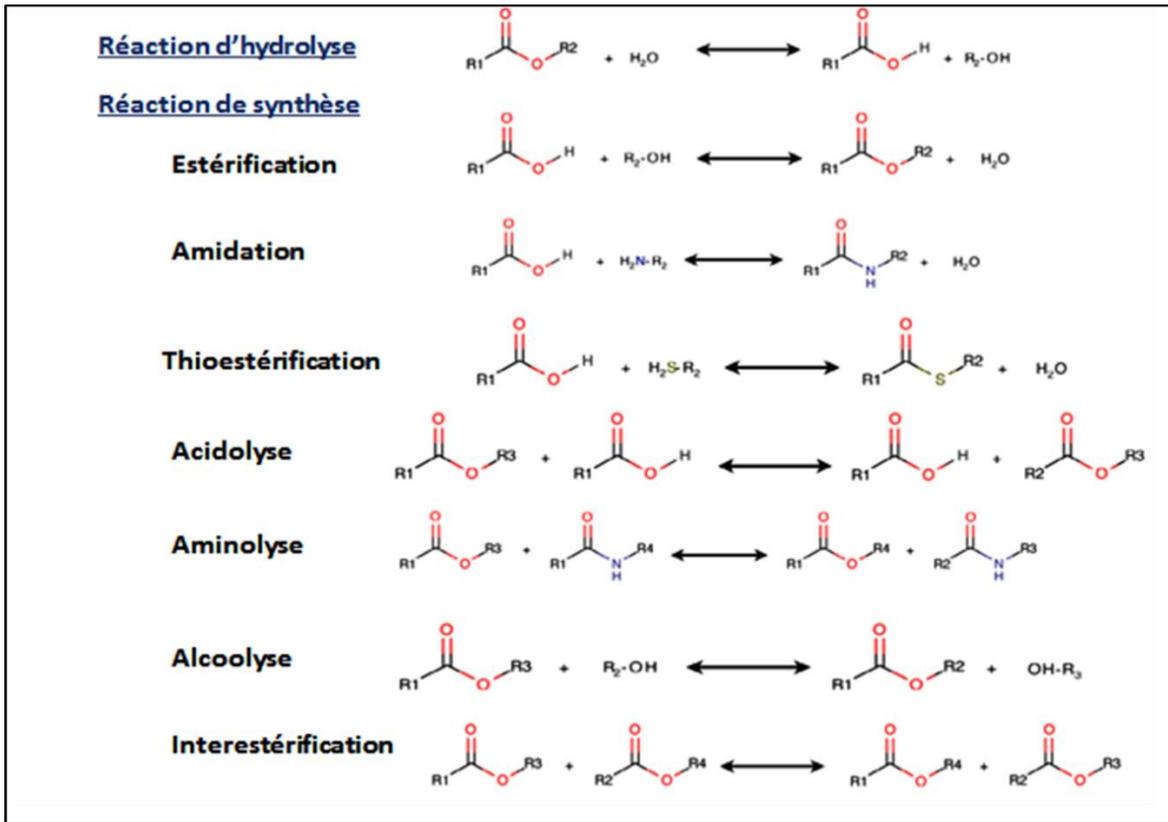


Figure 6 : Réaction catalysée par la lipase dans les systèmes aqueux et organiques [39].

#### 4.1. Spécificité des lipases

Les lipases, bien qu'elles puissent hydrolyser une large gamme de substrats, sont particulièrement intéressantes pour leur sélectivité. Elles sont classées en fonction de leurs spécificités par rapport aux TG, ce qui permet de déterminer leurs applications potentielles dans l'industrie [27]. Trois types de sélectivités sont particulièrement notables :

##### Typosélectivité :

Cela concerne la préférence d'une lipase pour un substrat spécifique, par exemple les tri-, di- ou monoglycérides. [27] ont rapporté la sélectivité de *Malassezia globosa* Lip 1 pour les mono et diglycérides. La typosélectivité inclut également la préférence pour la longueur de la chaîne carbonée, la présence et la position de substitutions ou d'insaturations, comme dans le cas de la lipase de *Geotrichum candidum* [27]. La forme du site de liaison de l'enzyme et la nature des acides aminés formant ce site sont les principaux facteurs contrôlant cette préférence [28].

##### Régiosélectivité :

Cette spécificité concerne l'hydrolyse préférentielle des fonctions esters carboxyliques en positions externes *sn*-1 et *sn*-3 (esters d'alcools primaires) vis-à-vis de la position interne *sn*-2 (esters d'alcool secondaire). Les lipases peuvent être non régiosélectives, comme celles de *Candida rugosa* [29, 30], *Chromobacterium viscosum* [31] et *Burkholderia cepacia* [32].

D'autres lipases sont régiosélectives pour les positions *sn*-1 et *sn*-3, comme celles de *Rhizomucor endophyticus* [33], *Malbranchea cinnamomea* [34] et *Thermomyces lanuginosus* [35]. Seules quelques lipases ont montré une préférence pour la position *sn*-2, comme les lipases de *Staphylococcus* [35] et *Geotrichum sp. FO401B* [36]. L'architecture et la taille du site actif accueillant le substrat sont les facteurs déterminants dans la régiosélectivité de l'enzyme.

#### L'énantiosélectivité :

L'énantiosélectivité est une autre forme de sélectivité des lipases, qui concerne leur capacité à préférer un énantiomère par rapport à l'autre dans un mélange racémique (1,2 contre 2,3-*sn*-glycérols). Les énantiomères peuvent avoir des propriétés physico-chimiques similaires, mais leurs propriétés biologiques sont souvent différentes [25]. La résolution des mélanges racémiques est donc d'un grand intérêt, notamment dans le domaine pharmaceutique.

On parle également de stéréospécificité lorsque les lipases sont capables de discriminer entre deux groupements stéréohétérotopiques dans le cas des acylglycérols prochiraux (position *sn*-1 contre *sn*-3). Les facteurs influençant l'énantiosélectivité ont été identifiés grâce à des avancées telles que la cristallographie des protéines [37], les simulations et la dynamique moléculaire ou l'étude de l'architecture du site actif et des trajectoires du substrat [37]. Ces facteurs dépendent de la complémentarité entre le substrat et la structure topologique d'un site actif de lipase [38], des liaisons hydrogène entre les intermédiaires tétraédriques et les résidus du site catalytique [39], de la flexibilité de la région structurelle [40] et des interactions électrostatiques des résidus de surface de l'enzyme [41].

L'énantiosélectivité des lipases est largement utilisée dans les industries pharmaceutiques et agrochimiques pour la production d'énantiomères uniques, plutôt que de mélanges [42]. Elle a également été employée pour les procédés de production de produits pharmaceutiques par transestérification d'alcools secondaires [43].

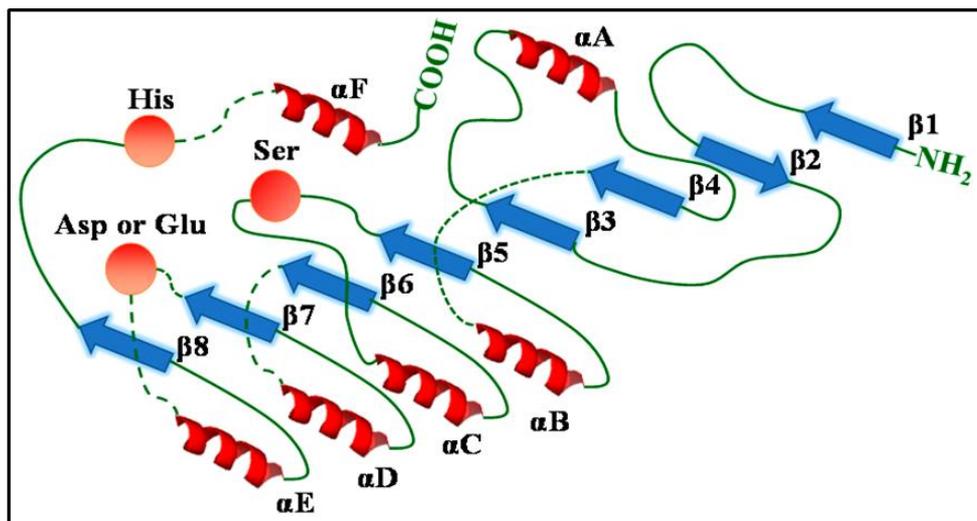
La structure des lipases est un facteur important pour comprendre leur fonction et leur activité biochimique. La détermination de la structure de différentes lipases a révélé plusieurs caractéristiques communes.

## 4.2. Structure de lipases

### 4.2.1. Le repliement $\alpha/\beta$

Le repliement  $\alpha/\beta$  des hydrolases, également appelé «  $\alpha/\beta$ -fold», est un critère principal concernant la structure des lipases, présent dans toute cette famille d'enzymes. Le repliement  $\alpha/\beta$  est une architecture 3D composée d'un feuillet  $\beta$  central, dont les brins  $\beta$  sont connectés par des hélices  $\alpha$  (Figure 7). Ce motif structural a été identifié en 1992 en comparant les structures de différentes hydrolases (Ollis et al. 1992). Le motif  $\alpha/\beta$  est largement conservé parmi les lipases, mais on le retrouve également dans d'autres enzymes non lipolytiques, telles que l'acétylcholinestérase, la diènelactone hydrolase et la thioestérase (Holmquist 2000). La conservation de cette structure à travers ces enzymes suggère que ce motif est stable et propice à l'activité catalytique.

Deux théories évolutives sont proposées pour expliquer la conservation du repliement  $\alpha/\beta$ . La première, l'évolution convergente, suggère que la probabilité de trouver ce motif dans des enzymes phylogénétiquement éloignées est très faible, et que c'est la fonctionnalité particulière de ce repliement qui aurait conduit plusieurs enzymes différentes à converger vers ce motif. La seconde théorie, dite divergente (gènes homologues), postule que cette conformation provient d'un ancêtre commun dont le code génétique aurait évolué (divergé) pour donner des protéines différentes tout en conservant leur structure 3D. Cette dernière théorie est généralement acceptée (Janeček et Baláž 1993). Cependant, le critère structural du repliement  $\alpha/\beta$  est nécessaire mais pas suffisant pour définir les lipases.



**Figure 7:** Représentation de la structure secondaire du repliement  $\alpha/\beta$  des hydrolases et positionnement relatif des acides aminés de la triade catalytique dans les lipases[44].

Ser: résidu sérine; Asp ou Glu: résidu d'acide aspartique ou glutamique; His: résidu d'histidine; les hélices indiquent les hélices  $\alpha$  ; les flèches indiquent les feuilles/brin beta  $\beta$ .

#### 4.2.2. La triade catalytique His-Ser-Asp

Le site actif des lipases est hautement conservé et se compose d'une triade catalytique comprenant un nucléophile (sérine), un résidu acide (acide aspartique ou acide glutamique) et une histidine, similaire à celle des protéases à sérine. L'ordre de ces trois acides aminés dans la séquence est Ser-Asp/Glu-His. La sérine catalytique, avec un groupement hydroxyle dans sa chaîne latérale, agit en tant que nucléophile. Elle est toujours localisée au niveau d'un coude nucléophile (appelé  $\gamma$  turn) reliant le feuillet  $\beta 5$  et l'hélice  $\alpha$  qui le suit. La séquence consensus du coude nucléophile présente un motif Gly-X-Ser-X-Gly.

L'acide aspartique, parfois remplacé par l'acide glutamique chez certaines lipases comme la lipase de *Geotrichum candidum* (Schrag et al., 1991) et la lipase de *Candida rugosa* (Grochulski et al., 1993), est souvent situé à l'extrémité C-terminale du brin  $\beta 7$ . L'acide catalytique stabilise le noyau imidazol de l'histidine activée par la sérine. L'histidine, quant à elle, est située à l'extrémité C-terminale du dernier feuillet de la séquence. Avec son groupement imidazol, l'histidine active la sérine catalytique en captant un proton.

Le site actif des lipases se trouve dans une poche au niveau du noyau de la protéine. Bien que les lipases partagent la même structure, leurs sites de fixation du substrat, appelés trous oxyanion, présentent différentes formes qui varient d'une lipase à l'autre. Pleiss et ses collaborateurs (Pleiss et al., 1998) ont proposé trois formes de sites actifs (Figure 8) : un site actif en forme de tunnel, comme pour la lipase de *Candida rugosa* (Grochulski et al., 1993), un site actif profond en forme d'entonnoir, comme pour la lipase de *Candida antarctica* (Uppenberg et al., 1994) et la cutinase de *Fusarium solani* (Longhi et Cambillau, 1999), et un site actif situé à la surface de la lipase, comme pour la lipase de *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990).

#### 4.2.3. Le volet amphiphile :

Dans de nombreux cas, le site actif des lipases n'est pas directement accessible au solvant. Il est protégé par une structure amphiphile, appelée volet ou « lid », qui bloque l'accès au solvant et au substrat. Ce volet a une partie hydrophile à la surface et une partie hydrophobe à l'intérieur, située près du site actif. Cette conformation est considérée comme fermée ou inactive, car le volet empêche toute interaction entre l'environnement externe et le site actif.

Le changement de conformation de la lipase (mouvement du volet) vers une forme ouverte permet de dégager l'entrée du site catalytique et de recevoir le substrat. Cette nouvelle conformation ouverte, également appelée active, est stabilisée par des forces faibles (van der Waals) avec deux autres boucles, appelées E5 et E9. Cette conformation ouverte permet aussi

un réarrangement structurel, conduisant à une meilleure disposition du site actif et augmentant la stabilité de l'état de transition de l'intermédiaire tétraédrique formé. Ces deux formes ont été identifiées pour plusieurs enzymes grâce aux structures 3D en présence d'inhibiteurs qui fixent la conformation ouverte (Miled et al. 2000, Belle et al. 2007).

Ce volet est présent chez de nombreuses lipases, mais certaines lipases présentent un volet réduit, comme les lipases pancréatiques de type 2 (Withers-Martinez et al. 1996), ou même pas de volet du tout, comme la cutinase (Longhi et al. 1997).

## **5. Phospholipases**

Dans l'ensemble du règne vivant, les phospholipides font partie intégrante de toutes les membranes biologiques, côtoyant les glycolipides et les stérols. Ces phospholipides subissent un métabolisme géré par les phospholipases, enzymes ayant des fonctions diversifiées et parfois contrastées. En effet, elles peuvent intervenir dans des processus tels que la digestion et la transduction du signal, mais aussi servir d'agent toxique puissant dans les venins de certaines espèces, tels que les serpents et les scorpions[45, 46].

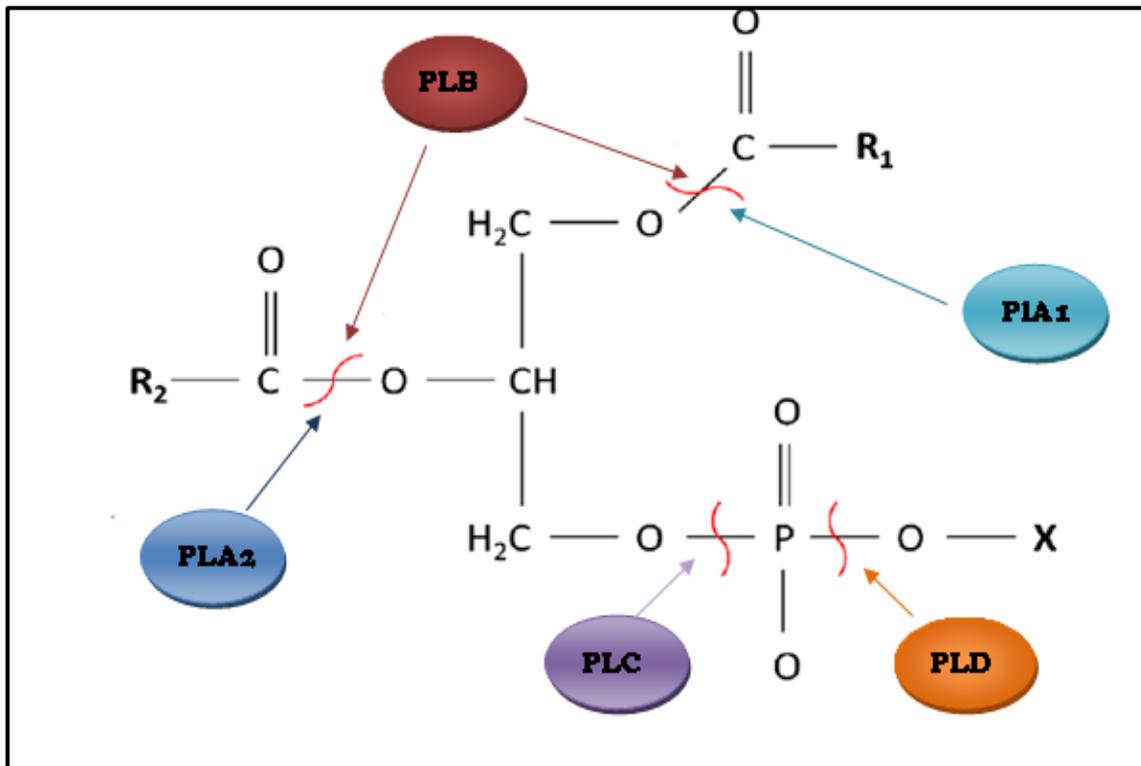
La classification des phospholipases repose sur leur point de clivage spécifique sur le phospholipide, et on en distingue cinq familles principales, comme illustré sur la Figure 8. Elles sont réparties en deux classes

### **-Les acylhydrolases :**

- **Les phospholipases A1 (PLA1; EC 3.1.1.32)** se caractérisent par leur capacité à hydrolyser les liaisons ester carboxyliques en position *sn*-1, ce qui donne lieu à un lyso-phospholipide et un acide gras libre.
- **Les phospholipases A2 (PLA2 ; EC 3.1.1.4)** fonctionnent de manière similaire aux PLA1, mais agissent spécifiquement sur les liaisons ester carboxyliques en position *sn*-2, libérant également un lyso-phospholipide et un acide gras libre.
- **Les phospholipases B (PLB ; EC 3.1.1.5)** combinent les actions de PLA1 et PLA2. Elles sont capables d'hydrolyser les lyso-phospholipides pour produire un phosphoglycérate [47].

### **- Les phosphodiesterases :**

- **Les phospholipases C (PLC ; EC 3.1.4.3)** se distinguent par leur rôle dans la catalyse de l'hydrolyse de la liaison ester phosphorique qui lie le glycérol et le groupement phosphate. Cette réaction conduit à la libération d'un diacylglycérol (DG) et d'un phosphoalcool.
- **Les phospholipases D (PLD ; EC 3.1.4.4)** ciblent la liaison phosphodiester distale. Le produit de cette hydrolyse est l'acide phosphatidique et un alcool, dont l'identité spécifique confère au phospholipide sa spécificité.



**Figure 8** : Vue d'ensemble des sites de clivage de la phospholipase dans les phospholipides

### 5.1. Superfamille PLA1

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la phospholipase A1 (PLA1) est une enzyme qui hydrolyse un lien ester à la position *sn*-1 des glycérophospholipides (GPLs), produisant généralement un acide gras saturé ou mono-insaturé et un 1-lyso-2-acyl-phospholipide (2-acyl-LPL). Les phospholipases A1 sont omniprésentes et impliquées dans de multiples processus physiologiques essentiels au sein des microorganismes, y compris la régulation du métabolisme lipidique, la signalisation intercellulaire et potentiellement la pathogenèse [48].

Contrairement à la phospholipase A2 (PLA2), qui a fait l'objet de nombreuses études la phospholipase A1 (PLA1) a été moins explorée. Chez les mammifères, six phospholipases A1 sécrétées (sPLA1) ont été identifiées. Les PLA1 membranaires, associées aux acides phosphatidiques, et les PS-PLA1 jouent des rôles physiologiques notables en produisant des lyso-PS et des lyso-PA. Ces produits interviennent ensuite en tant que médiateurs dans de nombreux processus biologiques. Parmi les autres enzymes, certaines sont impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines ou dans la digestion, telles que la lipase endothéliale et GPL-RP2 [49].

Il est à noter que ces enzymes sont souvent considérées comme des dérivées des lipases, compte tenu de leurs homologues de séquences avec les lipases pancréatiques, hépatiques et endothéliales. Cette similitude a conduit à leur classification en huit familles, basée sur des

critères phylogénétiques [50]. Cette homologie se retrouve également dans leurs fonctions, avec certaines PLA1 qui présentent une activité lipase majoritaire et une activité PLA1 minoritaire. Leur mécanisme d'action repose sur une triade catalytique, similaire à celui des lipases.

La structure des phospholipases comprend deux domaines distincts : le domaine N-terminal contient les résidus d'acides aminés impliqués dans la catalyse ainsi que des cystéines hautement conservées, qui assurent la structuration de la protéine [51].

Concernant le domaine C-terminal des PLA1, il joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité catalytique, principalement via son interaction avec la colipase dans certains cas [50]. Sa structure est comparativement similaire aux domaines C2, impliqués dans la transduction du signal. Cette similarité est particulièrement observée dans le cas des PLA2 cytosoliques, qui sont responsables de la production de messagers lipidiques [52]. Cette correspondance structurelle suggère des fonctions possiblement analogues, bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

## **5.2. Phospholipases A1 microbiennes :**

Chez les microorganismes, les PLA1 sont souvent associées à des fonctions pathogéniques. Le rôle de la PLA1 en tant que facteur de virulence a été démontré chez certaines bactéries et champignons, comme *Yersinia enterocolitica*, un pathogène humain [53]. L'activité de la PLA1, codée par le gène *yplA*, est liée à l'hémolyse dépendante de la lécithine et joue un rôle crucial dans la pathogénèse de *Y. enterocolitica* [54]. Elle facilite la colonisation de l'hôte et amplifie les altérations pathologiques déclenchées par la réponse inflammatoire de ce dernier. Par ailleurs, elles peuvent faciliter l'adhésion des agents pathogènes aux cellules hôtes, contribuer à la résistance contre les défenses immunitaires de l'hôte et promouvoir la propagation de l'infection [55]. En outre, il est à noter que des bactéries comme *Aeromonas sp* et *Staphylococcus aureus* exploitent la sécrétion de PLA1 pour moduler l'environnement hôte à leur avantage [56, 57]. Pour ces raisons, les PLA1 produites par les microorganismes, y compris les bactéries, sont considérées comme des cibles potentielles pour l'élaboration de nouvelles stratégies antimicrobiennes [57].

La PLA1 a aussi un intérêt industriel considérable, car elle génère des lysophospholipides 2-acyl, excellents émulsifiants très recherchés dans les industries alimentaires, cosmétique et pharmaceutique.

### 5.3. Les phospholipases A1 cytosoliques

Les phospholipases A1 cytosoliques sont impliquées dans de multiples processus métaboliques. Pour citer quelques exemples, KIAA0725 et p125, largement distribuées dans de nombreux organismes, ont été liées à la dynamique des vésicules Golgiennes, orchestrant le transport intracellulaire de lipides et de protéines [49]. Une autre phospholipase A1, provenant du tissu cérébral bovin, présente une prédominance de l'activité PLA1 couplée à une activité PLA2 moins marquée. Bien qu'aucune étude *in vivo* n'ait encore confirmé son activité séquentielle PLA1/Lyso PLA2, son implication dans le métabolisme de l'acide arachidonique est supposée [49].

Dans le monde végétal, certaines PLA1 ont des rôles essentiels. Par exemple, la phospholipase A1 DAD1 d'*Arabidopsis thaliana* est impliquée dans la libération d'acide linoléique qui est ensuite métabolisé en acide jasmonique, une hormone végétale régulant divers processus, dont la croissance et la réponse au stress [54]. Une autre PLA1 de cette espèce, AtLCAT3, bien qu'elle hydrolyse une variété de phospholipides, son rôle précis demeure non défini [58].

### 5.4. La Famille de (phospho)lipase

De nombreuses lipases, à la fois chez les micro-organismes et les mammifères, possèdent une activité dualiste, en agissant à la fois en tant que lipases et phospholipases. Ces enzymes ont une grande diversité fonctionnelle et structurale qui leur permet d'exercer une variété d'activités biologiques.

Dans les micro-organismes, on peut citer quelque l'exemple de la TG lipase provenant de *Staphylococcus* qui a été caractérisée par une activité phospholipase A (PLA) notable sur la phosphatidylcholine (PC) d'œuf [59]. Parallèlement, les lipase du champignons forestier *Peziza*, de *Fusarium solani* et de *Fusarium graminearum* sp. on dévoilé également une activité PLA importantes[60-62]..

Ces lipases / phospholipases sont souvent impliquées dans des processus vitaux tels que l'acquisition de nutriments, la signalisation cellulaire et la pathogenèse. Par exemple, la lipase / phospholipase de *Fusarium solani* joue un rôle important dans la pathogenèse en dégradant les lipides membranaires de l'hôte, ce qui facilite l'infection [63].

Chez les mammifères, les lipases / phospholipases sont impliquées dans le métabolisme des lipides, la signalisation cellulaire et l'immunité. Par exemple, la lipase HPLRP2 (Protéine 2 liée à la lipase pancréatique humaine) a montré une spécificité de substrat envers divers triglycérides, phospholipides et galactolipides, avec un niveau significatif d'activité

galactolipase lors de l'utilisation de films monomoléculaires de monogalactosyldiglycérade comme substrats. Caro et al [64] suggère que la principale fonction physiologique de l'HPLRP2 est l'hydrolyse des galactolipides, soulignant son rôle important dans la digestion de la matière végétale alimentaire. Par ailleurs, une proportion significative des lipases pancréatiques chez les mammifères présente cette vaste spécificité de substrat, prenant pour exemple de la lipase pancréatique de la dinde (TPL), du lapin (RPL), du cobaye (GPLRP2) et de l'autruche (OPL), qui sont capable d'hydrolyser efficacement les phospholipides[65]. Cette caractéristique est essentielle pour une hydrolyse efficace des aliments lipidiques au cours du processus de digestion[66, 67].

En somme, les lipases/phospholipases microbiennes qui exposent un large éventail d'activités enzymatiques, promettant un grand potentiel pour des applications biotechnologiques futures et la recherche sur la pathogénèse.

## **6. Origine des lipases**

Les lipases sont largement présentes dans le monde vivant et jouent un rôle physiologique essentiel dans le métabolisme des lipides. Elles sont produites par les plantes, les mammifères et les microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires.

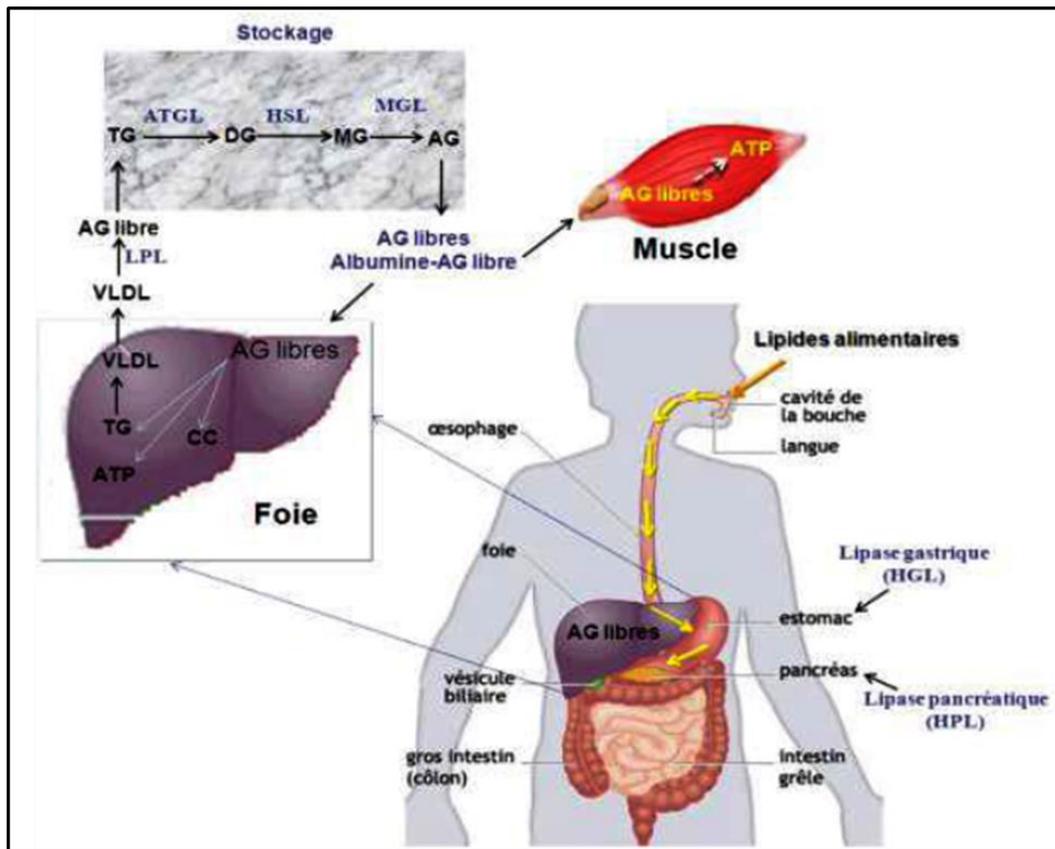
### **6.1. Les lipase mammifères**

Au sein des mammifères, diverses lipases sont générées à plusieurs étapes du tractus gastro-intestinal, incluant aussi des tissus spécifiques tels que le foie et le tissu adipeux (Référence Figure 9). Le processus d'assimilation des lipides s'amorce dans la cavité buccale et se prolonge dans l'estomac, où la lipase gastrique catalyse l'hydrolyse de 5 à 40% des triglycérides consommés. Subséquemment, dans le duodénum, une action conjointe entre la lipase gastrique et la lipase pancréatique facilite une dégradation plus avancée des lipides [68, 69].

À l'échelle intestinale, les lipides hydrolysés subissent une resynthèse, puis sont véhiculés à travers le système sanguin sous la forme de chylomicrons, une catégorie de lipoprotéines [70]. La lipase hépatique et la lipoprotéine lipase hydrolysent à leur tour ces lipoprotéines afin de procurer de l'énergie aux différents tissus de l'organisme. Chez l'homme, la source principale d'énergie est stockée sous forme de (TG) dans le tissu adipeux, constitué essentiellement d'adipocytes. Le tissu adipeux est capable de répondre à diverses hormones qui modulent la mobilisation (catécholamines) et l'accumulation (insuline) des TGs. L'hydrolyse complète des molécules des TGs du tissu adipeux nécessite l'intervention, d'une de façon séquentielle, de 3 enzymes. La lipase hormonosensible (LHS) hydrolyse les triglycérides en 1,2-diacylglycérol et 2-monoacylglycérol (Langin, Holm et al. 1996). En 2004, une nouvelle lipase dénommée

adipocyte triacylglycerol lipase (ATGL) a été identifiée Les lipoprotéines sont hydrolysées par l'action conjointe de la lipase hépatique et de la lipoprotéine lipase, fournissant ainsi de l'énergie aux différents tissus de l'organisme. Dans l'organisme humain, la réserve d'énergie majeure est constituée de triglycérides (TG) emmagasinés dans le tissu adipeux, composé principalement d'adipocytes. Ce tissu adipeux est réceptif à une variété d'hormones qui modulent soit la mobilisation (via les catécholamines) soit l'accumulation (via l'insuline) des TGs. L'hydrolyse complète des molécules de TG dans le tissu adipeux requiert la participation séquentielle de trois enzymes distinctes. La lipase hormonosensible (LHS) est la première à intervenir, catalysant l'hydrolyse des triglycérides en 1,2-diacylglycérol et 2-monoacylglycérol (Langin, Holm et al. 1996). Plus récemment, en 2004, une nouvelle lipase, nommée adipocyte triacylglycerol lipase (ATGL), a été identifiée, révélant une plus grande complexité dans la biochimie des lipases chez l'homme[71-73]. La lipase adipocyte triacylglycérol (ATGL) présente une affinité pour les triglycérides (TG) dix fois supérieure à celle pour les diglycérides (DG), ainsi qu'à celle de la lipase hormonosensible (LHS) pour les TG, témoignant de sa spécificité de substrat élevée[74]. La dégradation finale des monoglycérides en acides gras non estérifiés et glycérol fait intervenir la lipase des monoglycérides (LMG).

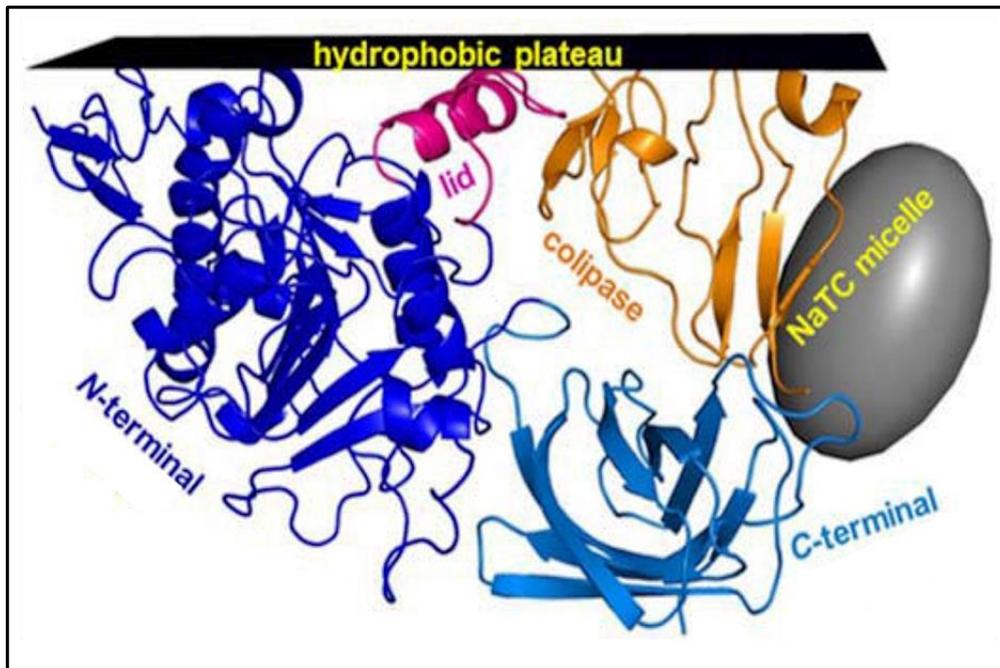
Les acides gras (AG) produits par la lipolyse des adipocytes sont ensuite libérés dans le plasma, où ils se lient à l'albumine pour être transportés, principalement vers le cœur et le muscle [74]. Ainsi, cette cascade enzymatique complexe assure une régulation fine du métabolisme des lipides et de la distribution d'énergie au sein de l'organisme.



**Figure 9** : Mécanisme de digestion des lipides alimentaires chez l'homme par la lipase.

La lipase pancréatique humaine (HPL) compte parmi les lipases de mammifères les plus largement étudiées, contribuant à l'hydrolyse d'environ 75% à 80% des triglycérides (TG) alimentaires[75]. Produite par les cellules acineuses du pancréas exocrine, la HPL est sécrétée dans le suc pancréatique sous une forme active. Cette glycoprotéine de 50,5 kDa est régiosélective pour les positions *sn*-1 et *sn*-3 des TAG et présente une faible activité vis-à-vis des phospholipides, esters de cholestérol et galactolipides[76]. La HPL démontre une dépendance marquée envers la concentration en sels biliaires. À des concentrations inférieures à leur concentration micellaire critique (CMC), les monomères de sels biliaires s'associent à certaines molécules de lipase, réduisant ainsi la quantité d'enzyme disponible pour l'adsorption à l'interface lipidique (Wickham et al., 2002). Au-delà de la CMC, l'accumulation de micelles de sels biliaires autour des globules limite soit l'interface disponible pour l'ancrage de la lipase, soit augmenté la pression interfaciale au-delà de la limite d'adsorption de la lipase (23-30 dynes/cm), ou génère une couche chargée négativement qui repousse l'enzyme [68]. Le cofacteur protéique amphiphile colipase (10 kDa) peut contrer ces effets inhibiteurs (Figure 11). Sa structure en "quatre doigts" permet à deux de ses "doigts" hydrophobes de se fixer à la molécule lipidique [77, 78], tandis que les deux autres, hydrophiles, interagissent avec le domaine C-terminal de la HPL [79]. La structure de la HPL a été élucidée pour la première fois

en 1990 [80]. L'enzyme comporte un domaine catalytique N-terminal composé de 335 acides aminés et un domaine C-terminal composé de 114 acides aminés. Sa triade catalytique, formée des résidus sérine 153, aspartate 177 et histidine 263, est camouflée par une boucle de 23 résidus appelée "couvercle", rendant le site catalytique inaccessible[81]. En présence du substrat, le "couvercle" et la boucle  $\beta 5$  changent de conformation, dévoilant le site catalytique et permettant la formation du trou oxyanion stabilisateur.



**Figure 10 :** Représentation schématique de l'activation de la lipase pancréatique en solution par la colipase et une micelle mixte duodénale [135].

## 6.2. Les lipases végétales

Les lipases végétales sont principalement localisées dans les graines où les triglycérides (TG) sont stockés dans des organites spécialisés appelés "oléosomes". Pendant la germination des graines, ces TG sont décomposées par les lipases, fournissant une source de carbone et d'énergie essentielle pour soutenir la croissance post-germinative de l'embryon. Un nombre croissant de lipases ont été isolées à partir de différentes plantes (Tableau 1). Par ailleurs, divers gènes codant des protéines possédant une activité de TG hydrolase ont été identifiés et clonés chez *A. thaliana* et d'autres espèces. Il s'agit notamment de AtLIP1 [82] et AtDAD1 [83] chez *Arabidopsis*, de LeLID1 chez la tomate, une lipase homologue à DAD1[84] ainsi que de OBL1 ("oil body lipase 1"), une protéine associée aux gouttelettes lipidiques (LD) chez le ricin [85]. Ces lipases clonées, appartenant à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases, ont démontré leur capacité à hydrolyser les triglycérides. De nombreux efforts de recherche sont en cours pour élucider leur rôle physiologique spécifique chez les plantes.

**Tableau 1 :** Caractéristiques biochimiques de certaines lipases végétales

Source	Caractéristiques biochimiques	Référence bibliographique
<i>Jatropha curcas</i>	pH 7.5, 37°C	[86]
<i>Ricinus communis</i>	pH 4.5, R: <i>sn</i> -1 et <i>sn</i> -2, CL: courte et moyenne, SD: insaturé	[85]
Coconut	pH 8.5, 30-40°C, R: <i>sn</i> -1,3	[87]
Riz	pH 11, 80 ° C, R: non spécifique sur TG, <i>sn</i> -2 sur PC	[88]
Blé	pH 5,5, 32-37 ° C	[89]
<i>Euphorbia characias</i>	pH 5, 60 °C, CL: courte et moyenne	[90]
Babaco ( <i>Carica pentagona</i> )	pH 8, 50 °C, R: <i>sn</i> -1,3, CL: court, SD: insaturé	[91]
Papayer ( <i>Carica papaya</i> )	pH 9, 50 °C, R: <i>sn</i> -3	[92]

Triglycérides TG ; PC; phosphatidylcholine, R; régiosélectivité, CL; préférence de longueur de chaîne, SD ; préférence de degré de saturation en acides gras).

## 7. Les lipases microbiennes

Les lipases microbiennes, provenant principalement de bactéries, levures et champignons, sont valorisées pour leur diversité catalytique, leur rendement élevé, leur faible coût de production, et leur stabilité dans des conditions extrêmes. Elles n'ont pas besoin de cofacteurs et présentent une large spécificité de substrat, ce qui les rend particulièrement utiles dans le commerce [93-95].

### 7.1. Les lipases bactériennes

L'intérêt porté aux lipases bactériennes s'est amplifié en raison de leur potentiel en tant que catalyseurs biologiques. De plus, elles jouent également un rôle important en tant que facteurs de virulence chez certaines espèces bactériennes pathogènes [96-98]. En général, les lipases d'origine bactérienne montrent une activité optimale à pH neutre ou alcalin [99, 100] et à des températures comprises entre 30°C et 60°C [101].

Il y a vingt ans, Arpigny et Jaeger ont commencé par classer 53 lipases et estérases procaryotes connues, en se basant sur la ressemblance de leurs séquences d'acides aminés et leurs caractéristiques physiologiques, en huit familles, la plus vaste d'entre elles a été divisée en six sous-groupes. Selon cette organisation, les véritables lipases appartiennent à la famille I qui englobe majoritairement les lipases de *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Staphylococcus*. Ces enzymes contiennent le pentapeptide catalytique classique Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (GXSXG). Les lipases de la famille II manifestent une séquence Gly-Asp-Ser-Leu au site actif, et les estérases de *Streptomyces*, *Aeromonas* et *Salmonella* sont classifiées dans cette famille. La famille III rassemble les lipases de *Streptomyces sp*, cependant, contrairement aux estérases de la famille II, elles sont extracellulaires. Les lipases ayant une ressemblance avec les lipases mammifères sensibles aux hormones sont regroupées sous la famille IV, appelée famille HSL, qui comprend les lipases de *Pseudomonas sp.*, *A. eutrophus*, *Moraxella sp.*, *A. acidocaldarius*, *E. coli* et *A. fulgidus*. Les lipases de bactéries mésophiles comme *P. oleovorans* et *Haemophilus*

influenza sont réunies dans la famille V. Les lipases de la famille VI sont les estérases les plus petites et les enzymes actives sont dimériques. Les lipases de la famille VII sont de grandes estérases et leur séquence d'acides aminés est homologue à celle des acétylcholines estérases eucaryotes. Les lipases de la famille VIII sont similaires aux  $\beta$ -lactamases.

En 2010, Hausmann et Jaeger ont signalé qu'environ 900 enzymes lipolytiques bactériennes ont été découvertes, un chiffre qui a continué à augmenter au cours de la dernière décennie, dépassant maintenant 5000 enzymes [102]. En particulier, moins de 10% d'entre eux ont été clonés, exprimés et caractérisés biochimiquement, alors que plus de 90% ont été identifiés uniquement par homologie de séquence. De plus, de nombreux enzymes n'ont pu être classés dans aucune des huit superfamilles définies par Arpigny et Jaeger. Face à ce grand nombre d'enzymes, une extension de la classification originale a été élaborée par Kovacic et al., couvrant 19 familles en fonction de critères phylogénétiques, de motifs de séquence conservés et de fonctions biologiques [103]. Cette classification devrait aider à prédire les fonctions et les propriétés biochimiques des enzymes nouvellement identifiées dans les bases de données par homologie de séquence.

## **7.2. Les lipases fongiques**

Les lipases fongiques se distinguent par une vaste diversité de séquences primaires, avec des poids moléculaires variant de moins de 20 kDa à environ 60 kDa pour les plus grandes d'entre elles, comme illustré par la lipase de *Geotrichum candidum*. Toutes ces lipases fongiques partagent un repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase commun, toutefois, une hétérogénéité notable est observée au niveau de leurs éléments structurels caractéristiques, tels que le volet, le site de liaison au substrat et le trou d'oxyanion, présentant des topologies distinctes et servant de cibles pour la mutagenèse [104]

Selon la classification récemment mise à jour dans la base de données de Lipase Engineering (LED) (<http://www.led.uni-stuttgart.de>), les lipases de microorganismes et de mammifères sont classées en trois classes basées sur le trou d'oxyanion : GX, GGGX et Y (Figure 11). Les lipases provenant de levures et de champignons sont regroupées en cinq sous-classes distinctes, dont deux appartiennent à la classe GX (lipases des champignons filamenteux et lipases de type *Candida antarctica B*), deux à la classe GGGX (lipases de type *Yarrowia lipolytica* et *Candida rugosa*) et une à la classe Y (lipases de type *Candida antarctica A*) [105]. Ces lipases fongiques sont caractérisées par leur grande versatilité en termes de propriétés enzymatiques et de spécificité de substrat, ce qui en fait un groupe d'enzymes d'un grand intérêt pour des applications industrielles. Par ailleurs, un grand nombre de levures et de champignons

lipolytiques, comme *Aspergillus sp.*, *Malassezia sp.*, *Candida sp.*, *C. neoformans*, *Blumeria graminearum*, *Trichosporon asahii*, etc., sont pathogènes et constituent des facteurs de virulence chez les plantes et l'homme. Ils ont la capacité d'antagoniser l'immunité de l'hôte, de former des biofilms, de modifier la sensibilité aux antibiotiques et de s'adapter rapidement à des conditions environnementales difficiles. Toutefois, le rôle immunologique des lipases n'a été étudié que chez quelques agents pathogènes, comme *Malassezia sp.*, *C. albicans* et *C. parapsilosis*, et nécessite d'être approfondi chez d'autres champignons pathogènes et levures. Par conséquent, une attention particulière doit être accordée à l'étude de la structure et de la fonction de ces lipases, qui non seulement aidera à concevoir des biocatalyseurs efficaces, mais servira également de guide pour la conception de médicaments contre ces agents pathogènes.

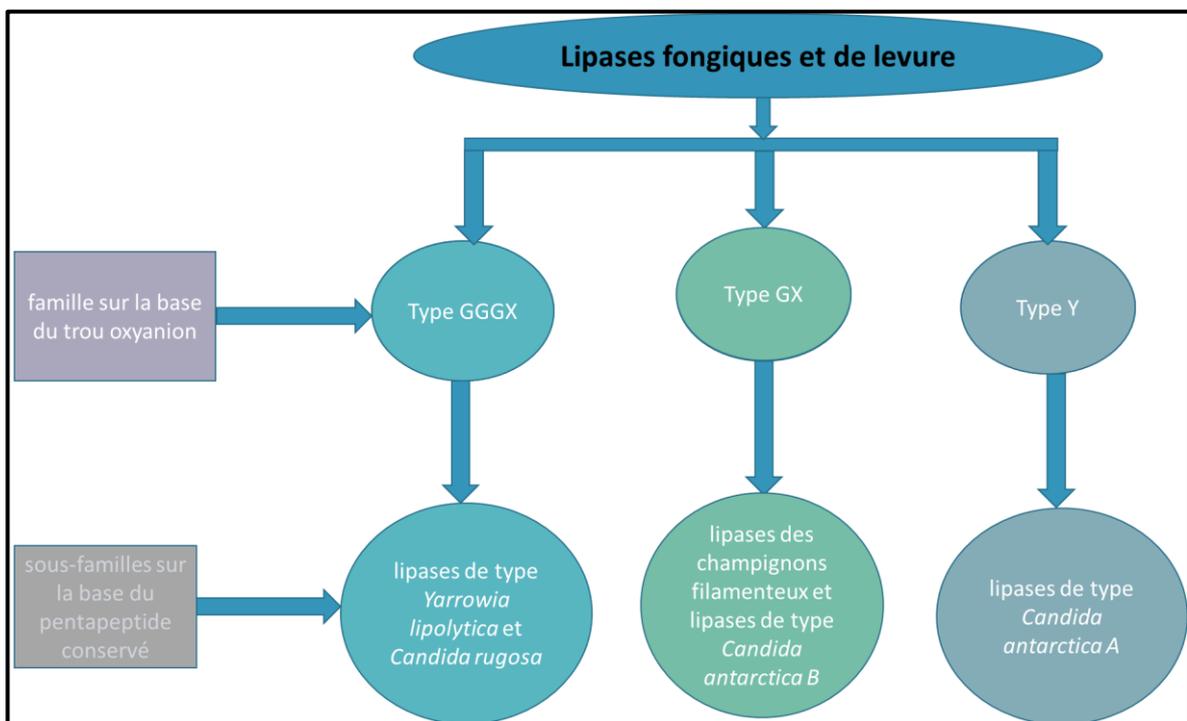


Figure 11 : La classification des lipases fongiques et de levures (107, 118].

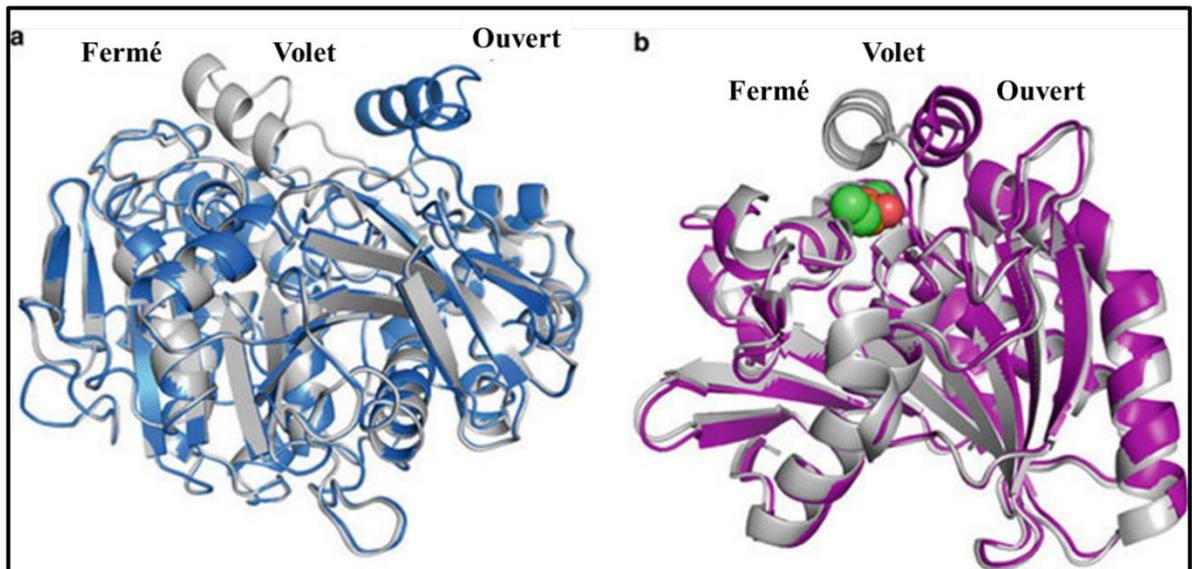
**Tableau 2 :** Analyse comparative des déterminants structuraux des lipases fongiques ont structuré tridimensionnelles élucidées.

Organisme	Resolution et ID de la structure	helices $\alpha$	Feuillets beta	Triade catalytique	Volet	Trou oxyanion	Référence
<i>Candida rugosa</i>	1.97 Å, 1GZ7 ( <i>Candida rugosa</i> Lipase2)	16	-un feuillet $\beta$ à 11 brins -un feuillet à trois brins perpendiculaire	S203, E341 and H449	Deux hélices $\alpha$ ; F69-T72; K75-S84.	G124 et A210	[106]
<i>Candida antarctica</i>	1.55 Å, 1TCA ( <i>Candida antarctica</i> Lipase B)	10	Un feuillet $\beta$ à 7 brins	S105, N187 and H224	Une hélice $\alpha$ A141-L147	T40 et Q106	[107]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1.70 Å, 3O0D ( <i>Yarrowia lipolytica</i> Lipase2)	5	Un feuillet $\beta$ à 9 brins	S162, H289 and N230	Une hélice $\alpha$ T88-L105.	T88 et Leu163	[108]
<i>Malassezia globosa</i>	2.60 Å, 3UUF ( <i>Malassezia globosa</i> SMG1 lipase)	4	Un feuillet $\beta$ à 8 brins	S171, N228 and H281	Une hélice $\alpha$ ; T101-D119	L172 et T101	[109]
<i>Geotrichum candidum</i>	1.80 Å, 1THG ( <i>Geotrichum candidum</i> LipaseII)	17	Un feuillet $\beta$ à central à 14 brins Un autre Feuillet $\beta$ à 3 brins perpendiculaires	S217, H453 and E354	Une hélice $\alpha$ ; T88-L105	A218, A132	[110]

La première détermination de la structure cristalline d'une lipase issue d'un champignon, celle de *Rhizomucor miehei*, a été réalisée en 1990. Depuis lors, de nombreuses autres structures ont été élucidées. L'analyse de ces données structurales a grandement enrichi nos connaissances sur les sites catalytiques des lipases et a permis d'approfondir notre compréhension de leur mécanisme d'action.

La compilation suivante offre un aperçu des informations structurales recueillies sur diverses lipases fongiques.

L'analyse des structures cristallographiques de ces lipases, sous leurs deux conformations - ouverte et fermée - a révélé l'importance du mouvement du volet qui recouvre le site catalytique pendant l'adsorption de l'enzyme à l'interface (voir Figure).



**Figure 12 :** Structures 3d de (a) la lipase de *Candida rugosa* et (b) lipase de *Rhizomucor miehei*. (a) en bleu sa conformation ouverte, pdb 1crl, et en gris sa conformation fermée, pdb 1trh ; (b) lipase de *Rhizomucor miehei*, en magenta sa conformation ouverte avec du phosphonate de diéthyle, pdb 4tgl, et en gris sa conformation fermée, pdb 3tgl [163].

Dans la section suivante, nous allons explorer en détail des exemples représentatifs de lipases fongiques pour mieux comprendre leur structure et fonction.

### 7.2.1. Exemples de lipases fongiques

#### ✚ TLL

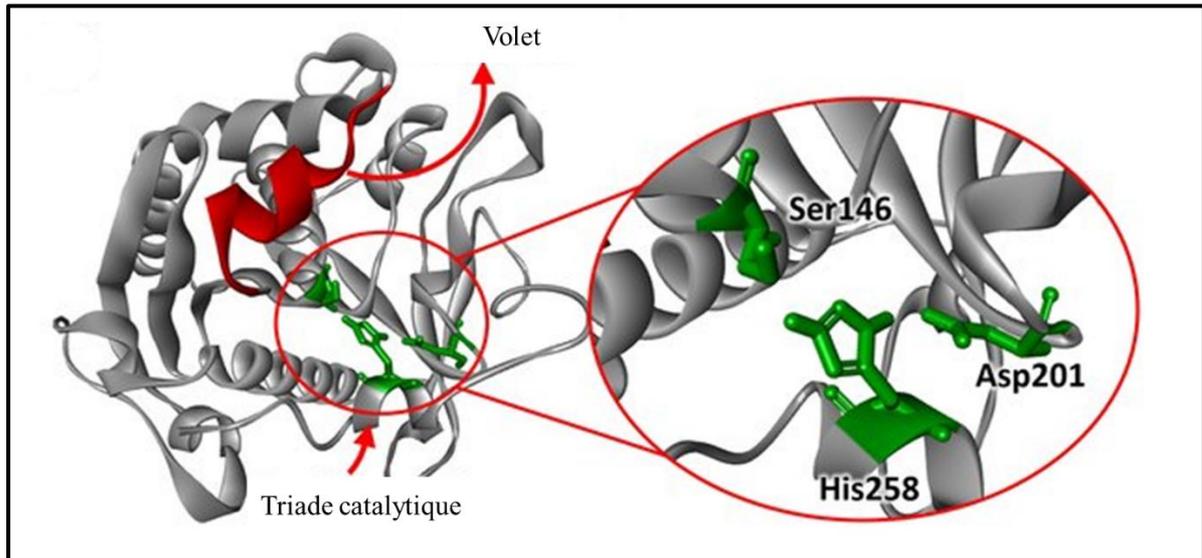
La lipase issue de *Thermomyces lanuginosus*, désignée sous l'acronyme TLL, est produite par ce champignon qui était auparavant connu sous le nom de *Humicola lanuginosa*. Cette enzyme extracellulaire thermophile a été isolée et purifiée pour la première fois en 1987 [111]. D'un poids moléculaire de 32 kDa, la TLL est caractérisée par son activation interfaciale, présentant une activité relativement faible en solution, mais nettement plus élevée à l'interface [112, 113]

Une recherche plus récente menée par Jakob et al. [114] a identifié par mutagenèse dirigée les résidus du volet catalytique impliqués dans cette activation interfaciale. L'enzyme TLL a été clonée et exprimée dans *Aspergillus oryzae* [115]. Des études de ses propriétés biochimiques ont révélé un optimum d'activité à un pH alcalin et une température de 37°C [27]. La TLL présente une robustesse thermique exceptionnelle, conservant l'intégralité de son activité même après une incubation de 2 heures à 55°C. En outre, la TLL fait preuve d'une 1,3-régiospécificité et affiche une stéréoprédilection pour la position sn-1 des triglycérides prochiraux [116].

L'activité enzymatique de la TLL sur les triglycérides à chaînes moyennes est remarquablement supérieure à celle observée sur les triglycérides à chaînes longues [117]. Cette lipase a été cristallisée dans ses deux conformations : fermée et ouverte [118]. Elle est structurée

en cinq hélices  $\alpha$  interconnectées par huit feuilles  $\beta$  et trois ponts disulfure (C22-C268, C36-C41 et C104-C107).

La triade catalytique, constituée de la sérine 146, de l'histidine 258 et de l'aspartate 201, est protégée par un petit volet de 6 acides aminés (85-90) (Figure 13). Le rôle crucial du résidu Trp89 du volet dans l'activation a été mis en lumière. En effet, sa mutation en résidus Phe, Leu, Gly ou Glu entraîne une diminution significative de l'activité catalytique [113].



**Figure 13:** Structure tridimensionnelle de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL, PDB ID : 1DTE) avec une triade catalytique (Ser146, Asp201 et His258 ; en vert) et un domaine de volet en rouge. (TLL, PDB ID : 1DTE) avec une triade catalytique (Ser146, Asp201 et His258 ; en vert) et un domaine de volet en rouge)

#### ✚ GZEL

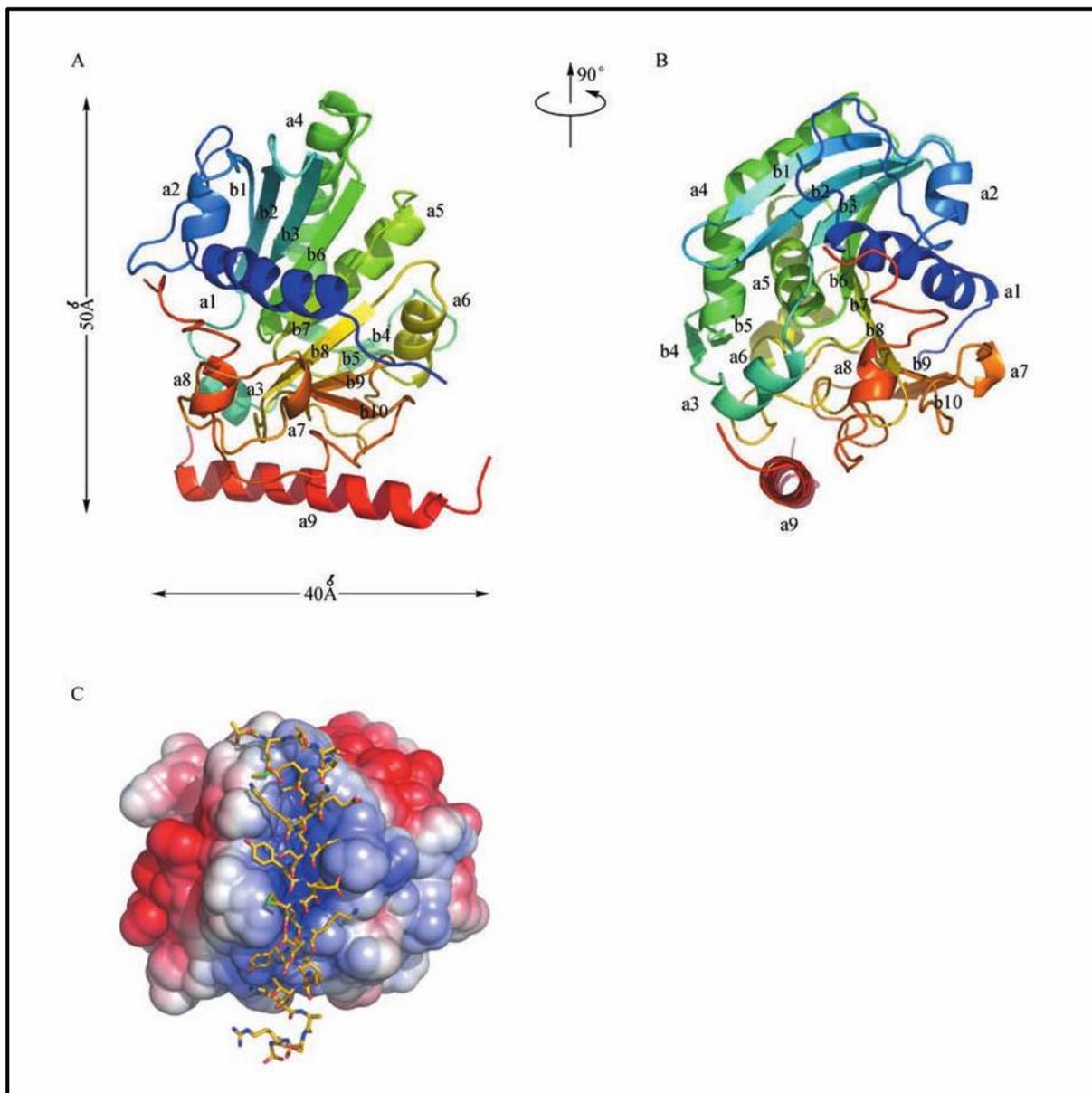
La lipase de *Fusarium graminearum*, ou GZEL. Cet enzyme, unique en son genre, a fait l'objet d'études approfondies pour comprendre sa structure et son mécanisme d'action.

Le gène qui encode la lipase de *Fusarium graminearum*, également connue sous le nom de GZEL, a été cloné et séquencé [119]. Cet enzyme est constitué de 319 acides aminés, allant de la méthionine au 1er résidu à la serine au 319e résidu. Une structure cristalline de cette lipase, obtenue par diffraction aux rayons X à une résolution de 2,8 Å, révèle que les résidus Gly240 à Ser259 ne sont pas présents dans la carte de densité électronique, ce qui suggère une flexibilité de cette région [120].

La GZEL a une structure compacte globulaire qui est distinguée des autres lipases microbiennes par une hélice  $\alpha_9$  supplémentaire, suggérant un mécanisme enzymatique potentiellement distinct [121-123]. Bien que cette caractéristique soit unique au sein des lipases, la GZEL fait toujours partie de la famille des lipases.

La structure de base de la GZEL est composée de dix feuillets  $\beta$ , entourés par neuf hélices  $\alpha$ . L'hélice  $\alpha_9$ , située du côté C-terminal, est fortement accessible au solvant, ce qui implique une interaction importante entre l'hélice  $\alpha_9$ , le reste de la structure de la protéine et le solvant environnant.

Le site actif de la GZEL est constitué de la Ser144, l'Asp198 et l'His257, qui forment la triade catalytique, un motif que l'on retrouve également chez d'autres lipases.



**Figure 14 :** Représentation structurale de la lipase de *Fusarium graminearum*. (a) perspective latérale de la structure de gzel, illustrée sous forme de ruban. les hélices- $\alpha$  et les brins- $\beta$  sont identifiés respectivement par les étiquettes a1-a9 et b1-b10. (b) rotation de  $90^\circ$  de la structure de gzel par rapport à la surface dépeinte en (a). (c) surface potentielle d'interaction entre le noyau de l'enzyme et  $\alpha_9$ . le noyau est représenté comme une surface potentielle, et  $\alpha_9$  est représenté comme un bâton doré.

Malgré le fait que les tentatives de cristallisation de la GZEL sous une forme ouverte aient été infructueuses, l'homologie de séquence avec d'autres lipases fongiques, qui ont été cristallisées sous une forme ouverte, a permis d'anticiper une possible conformation de "couvercle ouvert" pour la GZEL. Notons que le volet de la GZEL, qui recouvre le site actif, est composé de dix acides aminés allant de l'Ile83 au Phe94.

L'enzyme GZEL, également désignée sous le nom FGL1, joue un rôle significatif dans la virulence du champignon face aux céréales, comme le souligne l'étude de Voigt et al [119].

L'implication cruciale des peptides situés à l'extrémité C-terminale pour les propriétés enzymatiques est largement reconnue. Ceci est particulièrement illustré par le cas de GZEL. En fait, les peptides C-terminaux de GZEL ne sont pas uniquement nécessaires pour les propriétés enzymatiques, mais ils servent également à ancrer les protéines à la membrane. Les recherches récentes ont mis en évidence la pertinence significative de l'hélice  $\alpha_9$ , localisée à l'extrémité C-terminale de l'enzyme GZEL. Ces études suggèrent que cette structure hélicoïdale participe activement non seulement à l'ancrage interfacial de l'enzyme, mais contribue également à sa pénétration au sein des monocouches phospholipidiques[124].

#### FSL

FSL est une lipase extracellulaire dérivée de *F. solani* de masse moléculaire 30 Kd. Cette lipase a montré une identité importante avec une GZEL[61]. Intriguingly, FSL démontre des activités élevées tant de lipase que de phospholipase, avec des activités spécifiques respectives de 1 600 et 2 414 U/mg à pH 8,0 et 37°C, utilisant une émulsion d'huile d'olive et du PC de jaune d'œuf comme substrats. Son activité sur les phospholipides est supérieure à celle des cutinases de *F. solani* et de *M. tuberculosis* et de la lipase Tgl4p de *Saccharomyces cerevisiae*. FSL peut être comparé à la lipase de *Staphylococcus hyicus* (SHL), reconnue pour son large spectre de substrats, comprenant des triglycérides de différentes longueurs de chaîne et des phospholipides[61].

Une étude utilisant la technique du film monomoléculaire a révélé des propriétés interfaciales distinctes de la FSL. La FSL s'est avérée capable d'hydrolyser des films de dicaprine sous diverses pressions de surface, montrant une préférence pour les groupes ester adjacents dans les isomères de diglycéride (1,2-*sn*-dicaprine et 2,3-*sn*-dicaprine), et une stéréospécificité marquée pour la position *sn*-1 du 1,2-*sn*-énantiomère de dicaprine. En outre, la FSL a démontré une forte activité sur les monocouches de phospholipides, avec une préférence notable pour les phospholipides zwitterioniques par rapport à ceux négativement chargés[125].

La lipase purifiée de *Fusarium solani* (FSL) a été évaluée pour son potentiel à hydrolyser les galactolipides dans cette étude[126]. Il a été constaté que la FSL hydrolyse à des taux élevés les monogalactosyldiacylglycérols à chaînes moyennes synthétiques ( $4658 \pm 146$  U/mg sur DiC8-MGDG) et les digalactosyldiacylglycérols ( $3785 \pm 83$  U/mg sur DiC8-DGDG), ainsi que le monogalactosyldiacylglycérol à chaîne longue naturel extrait des feuilles de poireau ( $991 \pm 85$  U/mg). La FSL est donc l'enzyme microbienne avec l'activité la plus élevée sur les galactolipides identifiés à ce jour, avec un niveau d'activité comparable à celui de la lipase pancréatique de type 2. L'activité maximale de la FSL sur les galactolipides a été mesurée à un pH de 8. L'analyse du produit d'hydrolyse du MGDG naturel du poireau a montré que la FSL hydrolyse préférentiellement la liaison ester à la position *sn*-1 des galactolipides. Le docking in silico de MGDG et DGDG à chaînes moyennes et de phospholipides dans le site actif de la FSL révèle des solutions structurelles en accord avec les tests in vitro[126].

Une production extracellulaire élevée de la (galactophospho)lipase de *Fusarium solani* (FSL) a été réalisée avec un système d'expression *Pichia pastoris* X33. Les protéines recombinantes pures ont montré des caractéristiques biochimiques similaires à l'enzyme native. De plus, la présence de transcrits de FSL lors d'infections de plantes par *F. solani* pourrait indiquer un rôle de la FSL dans le processus phytopathologique[126].

Une autre lipase de *F. solani*, désignée FSL2, avec un poids moléculaire apparent de 30 kDa a été étudiée[127]. La FSL2 présente une grande identité, de l'ordre de 55%, avec la lipase FSL. Une étude comparative entre ces deux lipases a révélé que bien que les deux enzymes possèdent des propriétés biochimiques similaires, elles diffèrent sensiblement en termes de spécificité de substrat. Notamment, il a été observé que la FSL2 n'est pas capable d'hydrolyser les phospholipides, contrairement à la lipase FSL.

## 8. Les champignons

### 8.1. Définition

Les champignons font partie du règne des *mycota*, ou mycètes, qui est l'un des cinq règnes de la vie sur Terre. Ils sont présents dans tous les écosystèmes et sont caractérisés par leur ubiquité et leur diversité. Les champignons sont des organismes eucaryotes qui peuvent être unicellulaires ou filamenteux, sans organisation tissulaire, et qui se reproduisent soit sexuellement soit de façon asexuée [128]. Ils sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas capables de faire la photosynthèse, et possèdent un appareil végétatif ou un thalle simplifié qui ne porte pas de cellules différenciées [129]. Les champignons possèdent également une paroi contenant de la chitine et des  $\beta$ -glucanes, et leur appareil végétatif se compose d'éléments de base appelés hyphes qui forment un réseau de filaments ramifiés, appelé mycélium.

Chez la plupart des mycètes, les hyphes sont divisés par des cloisons, ou septa, formant des unités qui sont similaires à des cellules distinctes avec un seul noyau, et on les appelle hyphes segmentés ou septés.

Il existe certaines classes de mycètes où les hyphes ne sont pas séparés par des cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues avec plusieurs noyaux. Ces champignons sont appelés cénocytes [130]

Il existe environ 100 000 espèces de champignons décrites à ce jour, mais il est estimé qu'il en existe en réalité plus de 2 millions dans le monde. Les champignons les plus simples sont les levures unicellulaires, qui peuvent être regroupées en levures vraies (issues d'une reproduction sexuée) et levures imparfaites (issues d'une reproduction asexuée). Les autres champignons, pluricellulaires et filamenteux, représentent la plupart des espèces connues [131].

### 8.2. Mode de vie

Les champignons, contrairement aux végétaux, ne possèdent pas de chlorophylle et ne peuvent pas utiliser la photosynthèse pour synthétiser leur nourriture. Pour se nourrir, ils doivent utiliser des substances déjà élaborées par d'autres organismes.

En conséquence, ils existent 3 catégories de mode de vie :

✚ Les parasites :

Vivent aux dépens d'autres organismes, appelés hôtes, en se nourrissant de leurs tissus, en s'abritant dans leur corps ou en se reproduisant à leurs dépens, sans leur apporter de bénéfices réciproques. Les champignons parasites peuvent causer des maladies chez les hôtes, en les affaiblissant ou en les tuant. Certains champignons parasites peuvent infecter les plantes, les animaux ou les humains.

✚ Les symbiotiques :

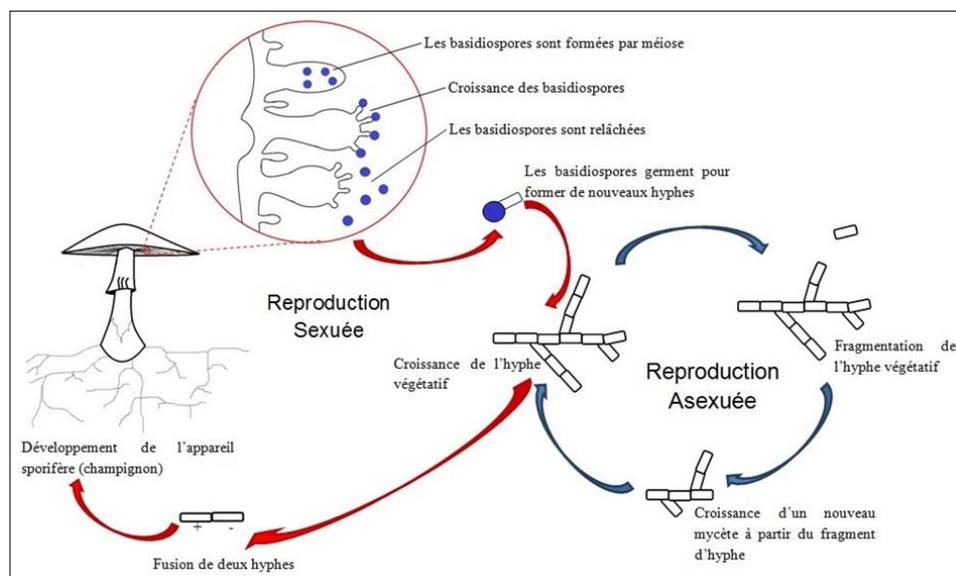
Les champignons symbiotes ont développé une relation mutualiste avec d'autres organismes vivants, comme les plantes ou les arbres. Cette association à bénéfice réciproque permet aux champignons de recevoir des composés organiques pour leur croissance, tandis que leurs partenaires bénéficient de l'apport en eau et en nutriments apporté par les champignons. Les champignons mycorhiziens, qui se développent en symbiose avec les racines des plantes, sont un exemple de cette association mutuelle.

✚ Les saprophytes :

Ils se nourrissent des restes organiques décomposés et participent ainsi au cycle de la matière organique dans l'écosystème forestier en transformant la matière végétale morte en humus.

### 8.3. Mode de reproduction

Les champignons se reproduisent principalement via des spores, des structures unicellulaires ou multicellulaires produites par des organes reproducteurs spécifiques. Les spores peuvent être formées de manière asexuée après une simple mitose, comme les conidies, ou de manière sexuée après fécondation, comme les zygospores et oospores, ou encore après méiose, comme les ascospores ou basidiospores (Figure 15). Ces diverses méthodes de reproduction permettent aux champignons de s'adapter à différentes conditions environnementales et de coloniser de nouveaux habitats.



**Figure 15 :** Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.

#### **8.4. Phylogénie des champignons**

La classification phylogénétique est une méthode de classification des êtres vivants fondée sur leur arbre généalogique ou arbre de la vie. Ce système utilise les informations de l'ADN et de la génétique pour déterminer les liens évolutifs entre différentes espèces et regrouper les organismes dans des catégories taxonomiques selon leur degré de parenté. Cette approche complète la classification traditionnelle en fournissant une perspective plus précise et objective de l'évolution des espèces au fil du temps.

Le règne fongique est un groupe diversifié d'organismes qui englobe quatre divisions principales : les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes. Chacune de ces divisions se distingue par des mécanismes de reproduction uniques et des adaptations écologiques spécifiques.

- ✚ Les Ascomycètes, également connus sous le nom de champignons à sac, se reproduisent en faisant mûrir des spores à l'intérieur de sacs appelés "asques". Ils représentent une grande partie des espèces de champignons connues, avec environ 67 000 sur les 100 000 répertoriées. Les Ascomycètes forment presque toutes les associations lichéniques et ont des modes de vie variés, tels que saprophyte et parasite. Ce groupe comprend également des champignons utilisés dans l'industrie agroalimentaire, comme *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie), et en pharmacologie, comme *Penicillium chrysogenum* (source de pénicilline).
- ✚ Les Basidiomycètes se caractérisent par leur reproduction via des spores situées sur des structures appelées "basides". Ce groupe comprend environ 22 000 espèces. Leur mode de vie est principalement saprophytique, et ils possèdent des capacités avancées pour décomposer les matériaux lignocellulosiques. On trouve aussi des espèces qui forment des symbioses avec les plantes ou qui agissent en tant que parasites sur les animaux.

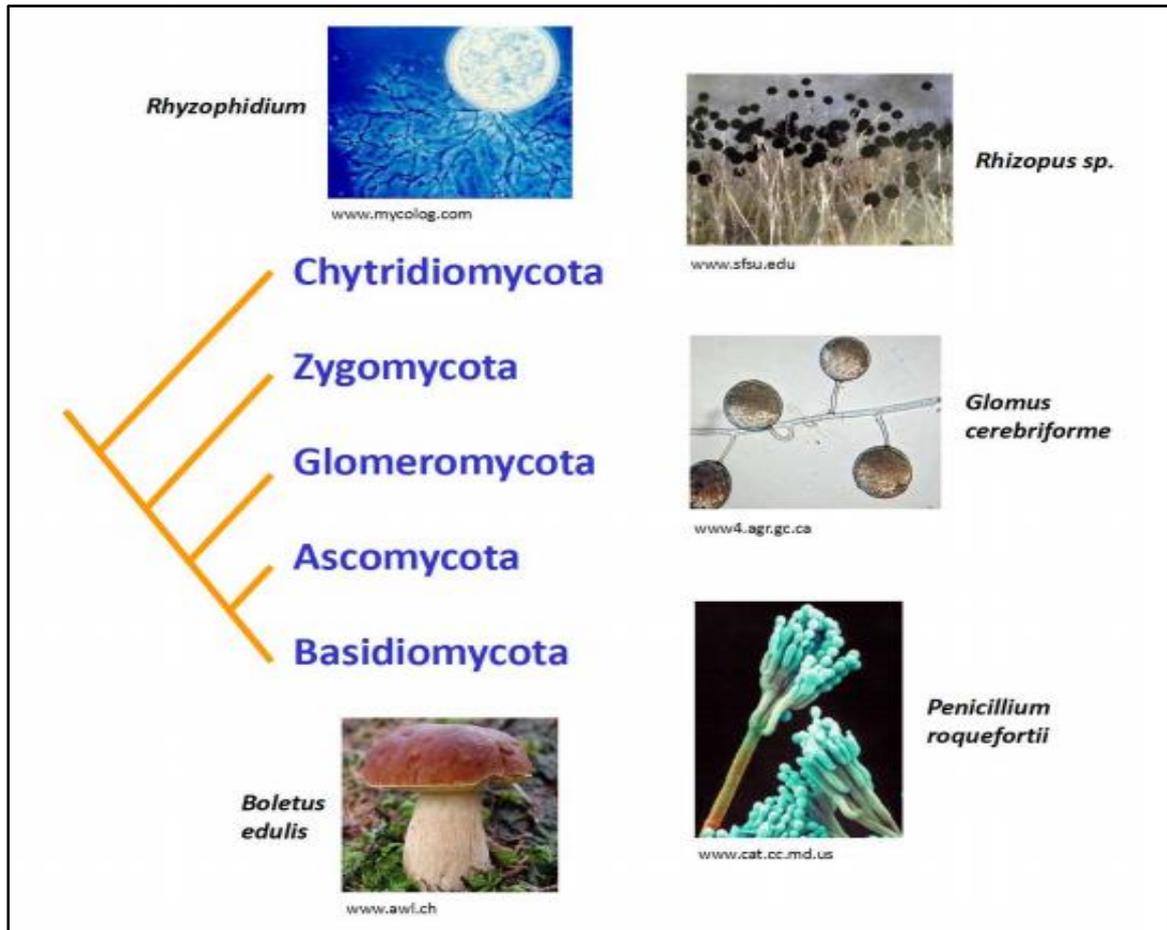


Figure 16 : Les diverses classes des champignons [132]

## 9. Les Fusariums

### 9.1. Classification :

*Fusarium annulatum* est une espèce de champignons appartenant à la famille des *Nectriaceae*. Sa classification taxonomique est la suivante :

- Règne : *Fungi* (Champignons)
- Sous-règne : *Dikarya* (Champignons à noyaux doubles)
- Division : *Ascomycota* (Ascomycètes)
- Sous-division : *Pezizomycotina*
- Classe : *Sordariomycetes*
- Sous-classe : *Hypocreomycetidae*
- Ordre : *Hypocreales*
- Famille : *Nectriaceae*
- Genre : *Fusarium*
- Espèce : *Fusarium annulatum*

Ce champignon possède des cycles de reproduction sexués et asexués, offrant une grande diversité génétique et une vaste distribution. Pendant le cycle asexué, *Fusarium annulatum* crée trois sortes de conidies : macroconidies, microconidies et chlamydospores. Les macroconidies,

les plus grandes, sont couramment observées, fusiformes, multicellulaires et dotées de parois épaisses et de septa transversaux. Les microconidies, plus petites, sont unicellulaires et ont une forme ovale ou allongée. Les chlamydospores sont des structures résistantes formées en réponse à des conditions défavorables, avec des parois épaisses, capables de persister dans le sol longtemps.

Pendant le cycle sexué, *Fusarium annulatum* produit des ascospores, libérées de structures appelées asques. Les ascospores sont généralement transparentes, unicellulaires et fusiformes, dispersées par le vent ou l'eau, facilitant la colonisation de nouvelles plantes hôtes.

Les *Fusarium* infecte un large éventail de plantes, dont les céréales, les légumes et les arbres fruitiers[133].

## **9.2. Le système lipolytique de *Fusarium***

Les *Fusarium* sont un genre de champignons filamenteux qui possèdent un système lipolytique robuste, leur permettant de produire une diversité d'enzymes lipolytiques, y compris des lipases et des cutinases. Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans la biologie de ces champignons, notamment en facilitant la dégradation des lipides pour la nutrition, la sporulation, et la pathogénicité.

### **9.2.1. Exemple de lipases de *Fusarium* :**

*Fusarium oxysporum* : est reconnu pour sa production d'une lipase extracellulaire utile pour la production de biodiesel [134].

*Fusarium solani* : Cette espèce a été étudiée pour sa production d'une lipase thermostable, capable de résister à des températures élevées sans perte d'activité enzymatique [135].

*Fusarium proliferatum* : Un autre exemple notable est la lipase produite par *Fusarium proliferatum*, qui a été utilisée dans le processus de production d'ester d'acide gras à partir d'huiles usagées [136].

### **Cutinases de *Fusarium*:**

La cutinase de *Fusarium solani pisi* est l'une des cutinases les plus étudiées. Cette enzyme a été largement utilisée comme modèle pour l'étude de la structure et de la fonction des cutinases, en raison de sa stabilité thermique et de sa tolérance à une large gamme de conditions de pH [137]. De plus, cette cutinase a démontré une capacité à dégrader efficacement la cutine, ce qui suggère son potentiel pour des applications telles que la dégradation des déchets et la bioremédiation [137].

### ✚ Phospholipases de *Fusarium*:

*Fusarium graminearum*, un pathogène des céréales largement répandu, produit une phospholipase C (PLC) qui joue un rôle important dans la virulence du champignon [138]. La PLC de *F. graminearum* a été impliquée dans la dégradation de la membrane cellulaire de l'hôte et dans la production de signalisation lipidique lors de l'infection [138]

*Fusarium culmorum* : Cette espèce a été identifiée comme produisant une phospholipase D, qui est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénicité du champignon [139]

*Fusarium solani* : Cette espèce a été étudiée pour sa production de phospholipases A1 et A2, qui ont été suggérées aussi comme facteurs de virulence [140].

### 9.3. Les lipases de *Fusarium* et pathologies

De nombreuses études ont rapporté que les lipases extracellulaires produites par les champignons phytopathogènes, tels que *Fusarium graminearum* [62], également connu sous le nom de *Gibberella zeae* [141], *Fusarium solani* [126], et *Fusarium oxysporum* [142] ont été identifiées comme des facteurs virulents impliqués dans la phytopathologie de diverses cultures légumières. Plus spécifiquement, *Gibberella zeae* est l'agent causal de la fusariose de l'épi (FHB), une maladie végétale très destructive affectant les céréales, qui peut causer des pertes significatives de rendement en grains, en particulier pour le blé et le maïs. La lipase de *Gibberella zeae* (GZEL) a été signalée comme responsable de sa pathogénicité.

Les espèces de *Fusarium*, y compris *Fusarium annulatum*, peuvent s'adapter à divers substrats et conditions environnementales. Toutefois, cette adaptation implique souvent d'importants changements morphologiques, tels que la modification de la taille et de la forme des conidies ou la production de nouvelles structures résistantes. Ces changements permettent au champignon de mieux faire face aux défis environnementaux, de coloniser de nouveaux hôtes et de survivre dans des conditions potentiellement défavorables.

## **10. Applications biotechnologiques des enzymes lipolytiques**

Les lipases microbiennes, y compris celles dérivées de champignons, sont largement reconnues pour leur applicabilité multifonctionnelle dans divers secteurs industriels [143]. Elles sont impliquées dans plusieurs processus techniques, tels que le conditionnement du cuir dans le domaine de la tannerie, l'augmentation de l'efficacité des agents nettoyants dans l'industrie des détergents, l'amélioration des soins capillaires, la gestion optimisée des déchets industriels, et le raffinement de la soie. Une discussion plus approfondie de l'application de ces lipases en tant qu'agents détergents sera abordée dans les sections suivantes.

### **10.1. Détergence**

Aujourd'hui, l'incorporation d'enzymes dans la formulation des produits de nettoyage est largement adoptée, particulièrement dans les pays à haut niveau de développement économique. En 1994, le marché mondial des enzymes industrielles était estimé à environ 1,3 milliard de dollars. De façon notable, le secteur de la détergence est le plus grand consommateur d'enzymes, absorbant près de 40% des ventes globales [144]. Historiquement, les lipases ont été parmi les premières enzymes introduites dans cette industrie et elles maintiennent toujours une place prépondérante.

#### **10.1.1. Définition**

Le processus de détergence est défini comme une procédure de nettoyage par laquelle des impuretés sont dissociées d'une matrice solide par leur mise en suspension ou en solution dans un liquide, généralement de nature aqueuse, par l'intermédiaire d'un détergent. Ce dernier remplit trois principales fonctions. Sa fonction principale réside dans l'élimination de toutes formes de salissures, y compris les odeurs corporelles adsorbées sur les fibres textiles. Les fonctions secondaires englobent la préservation ou le rétablissement de la souplesse du textile, ainsi que le réhaussement des couleurs. Les fonctions tertiaires sont liées à la satisfaction du consommateur, tout en respectant les contraintes environnementales [145].

#### **10.1.2. Composition d'un détergent**

Les détergents sont composés d'une combinaison d'ingrédients actifs et d'auxiliaires qui jouent différents rôles (Tableau 3). Parmi ces composants, les enzymes jouent un rôle crucial mais ne sont pas suffisantes par elles-mêmes. Les détergents contiennent de multiples composants qui ciblent divers types de salissures et de taches. Ces composants ont pour but de maintenir la blancheur du linge, de traiter l'eau dure pour optimiser les conditions de

fonctionnement des ingrédients actifs, de préserver l'éclat des couleurs et l'apparence générale du linge, et d'éviter la réapparition de saletés.

Depuis 1998, les fabricants de détergents se sont engagés à faire les ajustements nécessaires pour minimiser l'impact des composants des détergents sur l'environnement. Ces ajustements comprennent la réduction de la taille des doses unitaires de détergent tout en maintenant leur efficacité, la diminution de la taille des emballages, la réduction de la quantité d'ingrédients organiques peu biodégradables, et la réduction de l'énergie nécessaire pour le lavage (Tableau 4). Ces critères obligent les fabricants de détergents à constamment innover dans leurs formulations de détergent en incorporant de nouveaux ingrédients qui permettent d'éliminer les taches de manière plus efficace, à des températures plus basses, tout en respectant le linge et l'environnement [145].

**Tableau 3 :** Exemple simplifié de formules de poudre de lavage du linge [145].

Ingrédients	Structures chimiques	Rôles	%
<b>Matières actives</b>			
<b>LAS</b>		• Abaissent la tension interfaciale et facilitent le "mouillage" du linge	10-20
<b>Tensioactifs PAS</b>	$C_nH_{2n+1}-SO_3Na$ $n = 12-15$	• Décrochent les salissures et les maintiennent en suspension dans le bain lessiviel	2-5
<b>FAE</b>	$C_nH_{2n+1}-(OCH_2CH_2)_7-OH$ $n = 12-15$		5-12
<b>Perborate de sodium</b>		• Décolore, par oxydation, les taches colorées	12-18
<b>TAED (tétraacétyléthylènediamine)</b>		• Activateur du perborate de sodium	5-8
<b>Enzymes</b>	Lipase, protéase, amylase, cellulase	• Dégradent les salissures d'origine biologiques et les fibrilles de coton	1-2
<b>Azurant optique</b>		• Confère au linge un blanc éclatant en fluoresçant dans le bleu	0-1
<b>Auxiliaires de formulation</b>			
<b>Savon</b>	$C_nH_{2n+1}-COONa$ $n = 16-22$		0-1
<b>Silice hydrophobée</b>	Silicones adsorbées sur silice	• Antimousses	0-1
<b>Zéolithe</b>	$Na_{12}(AlO_2)_{12}(SiO_2)_{12} \cdot 27H_2O$	• Anticalcaire	15-20
<b>Copolymère maléique et acrylique</b>		• Renforce l'action des anticalcaires	4-6
<b>Disilicate de sodium</b>	$Na_2Si_2O_6$	• Alcalinisant, anticalcaire, inhibiteur de corrosion	4-8
<b>Carbonate de sodium</b>	$Na_2CO_3$	• Alcalinisant (anticalcaire)	12-16
<b>Carboxyméthylcellulose de sodium</b>		• Empêche la redéposition sur le linge des salissures du bain lessiviel	0-1
<b>Parfum</b>	Mélange complexe de molécules organiques volatiles	• Confère au linge une odeur agréable après lavage	0-1
<b>Eau et sulfate de sodium</b>	$Na_2SO_4$	• Charges assurant la cohésion des granules	Qsp 100

**Tableau 4** : Historique de l'innovation technologique dans le domaine des lessives [145].

Année	Innovation	Marque
1907	1 <sup>er</sup> détergent à base de perborate et de silicate mélangé au savon en poudre : « lave tout seul »	<b>PERSIL (Henkel)</b>
1946	1 <sup>er</sup> détergent de synthèse lancé aux Etats-Unis à base d'alkylbenzènesulfonate (ABS) : « un océan de mousse »	<b>TIDE (P &amp; G)</b>
1952	Agents complexants ou « builders » : Les tripolyphosphates de sodium (STPP)	<b>OMO (Unilever)</b>
1959	1 <sup>ère</sup> lessive en poudre non moussante : « recommandé par 49 marques de machines à laver »	<b>SKIP (Unilever)</b>
1964	Remplacement des ABS par les LAS (« linearalkylbenzenesulfonate ») en Allemagne puis en France, en Italie et au Japon	<b>Toutes les marques selon la réglementation</b>
1968	1 <sup>ères</sup> lessives biologiques en poudre contenant des enzymes dégradant les taches protéiniques à basse température : (« enzymes glutons »)	<b>ARIEL poudre (P &amp; G) ALA (Unilever)</b>
1978	Activateur du perborate : Le tétra-acétyl-éthylène-diamine (TAED)	<b>SKIP (Unilever)</b>
1982	Lessives liquides isotropes à dissolution rapide dans l'eau	<b>VIZIR (P &amp; G)</b>
1983	Lessives liquides structurées à base de liposomes permettant d'incorporer un taux important de STPP 1 <sup>ère</sup> lessive concentrée pour tous lavages	<b>WISK (Unilever)</b>
1987	1 <sup>ère</sup> lessive en poudre compacte lancée au Japon : « 10 fois plus concentrée »	<b>ATTACK (Kao Corporation)</b>
1989	1 <sup>ère</sup> lessive à base de zéolithes en remplaçant les phosphates : « la propreté éclatante et la contribution à un meilleur environnement »	<b>LECHAT(Henkel)</b>
1994	1 <sup>ère</sup> lessive à base de catalyseur au manganèse permettant d'éliminer les taches à basse température : « un concentré d'innovations »	<b>SKIPpower (Unilever)</b>
1998	1 <sup>ère</sup> lessives en pastilles : « la propreté au meilleur de sa forme »	<b>SKIP tablets (Le ChatTabs)</b>

### 10.1.3. Les enzymes détergentes

En raison de l'évolution vers des lessives plus compactes et des températures de lavage plus basses, les enzymes, notamment celles provenant de champignons, sont désormais largement employées et sont probablement les composants essentiels pour la formulation des détergents du futur [146]. Ces enzymes, même en très faibles quantités et à des températures modérées (20-40 °C), peuvent efficacement éliminer certaines taches réputées difficiles [145]. L'utilisation de ces enzymes dans les produits détergents pourrait être la solution au problème environnemental créé par l'usage excessif de détergents chimiques, qui sont souvent corrosifs, toxiques, non biodégradables et, par conséquent, nuisibles à l'environnement.

En ce qui concerne leur forme, les enzymes détergentes peuvent être présentées en poudre, en granules ou en liquide. Bien que leur incorporation sous forme liquide soit pratique, il a été observé que les enzymes en granulés maintiennent une stabilité supérieure pendant le stockage, aussi bien dans les formulations détergentes solides que liquides.

#### **10.1.4. Critère de choix**

La conservation de l'activité enzymatique est une préoccupation majeure pour les fabricants de détergents. Ils cherchent à garantir la stabilité de ces biomolécules depuis leur incorporation dans le produit jusqu'à leur utilisation finale.

La sélection d'une enzyme adaptée pour les applications détergentes est influencée par plusieurs paramètres essentiels :

- Le point isoélectrique (pI) de l'enzyme est un critère fondamental. Les performances des biocatalyseurs dans un milieu détergent sont optimales lorsque le pH de la solution détergente est approximativement le même que la valeur du pI de l'enzyme.
- La compatibilité de l'enzyme avec divers constituants du détergent, tels que les agents de surface (surfactants), les parfums, et les agents de blanchiment est également primordiale [147, 148]. Les surfactants anioniques, couramment utilisés dans les détergents, peuvent former des complexes peu solubles avec les enzymes, potentiellement conduisant à leur inactivation. Dans certains cas, ils peuvent même provoquer une dénaturation complète des enzymes, comme c'est le cas pour l'effet des sulfonates d'alkylbenzène linéaire (LAS) sur les protéases et les amylases.
- Plusieurs autres adjuvants de détergence peuvent avoir un effet déstabilisant sur les enzymes. Par exemple, les agents de blanchiment peuvent accélérer la dégradation des protéases. De plus, les enzymes protéolytiques comme les protéases peuvent décomposer différents types d'enzymes, dont les lipases, les cellulases et les amylases, pendant le stockage. Les protéases peuvent même se dégrader mutuellement, entraînant des phénomènes de dénaturation et d'agrégation.
- La concordance avec la force ionique de la solution détergente : Les ions peuvent influencer l'efficacité de l'enzyme.
- L'efficacité d'élimination des taches : Les enzymes doivent décomposer efficacement les composants des taches.
- L'activité à des pH alcalins et des températures modérées : Les enzymes doivent être stables et actives dans les conditions courantes d'utilisation des détergents.

- La stabilité des enzymes dans les conditions de détergence : Les enzymes doivent résister aux conditions de la détergence, y compris la présence de surfactants et d'agents de blanchiment, ainsi que les variations de température et de pH.

#### **10.1.5. Exemples de lipases dans la détergence**

Dans le domaine des détergents, les lipases sont spécifiquement choisies pour leur faible spécificité de substrat, leur stabilité en conditions alcalines et leur résistance aux surfactants et autres enzymes présentes dans de nombreuses formulations de détergents. L'utilisation de lipases dans les détergents permet de réduire ou de remplacer les détergents synthétiques, qui posent de nombreux problèmes environnementaux [146, 149]. En 1994, Novo Nordisk a lancé la première lipase commerciale, Lipolase, dérivée du champignon *T. lanuginosus* et exprimée dans *A. oryzae*. En 1995, deux lipases bactériennes ont été introduites : Lumafast provenant de *Pseudomonas mendocina* et Lipomax issue de *Pseudomonas alcaligenes*, toutes deux produites par Genencor International, AU-KBC Research Center, Life Sciences, Anna University, Chennai, Inde [149]. Ainsi que plusieurs études rapportent des lipases provenant de diverses sources, y compris *Humicola lanuginosa*, *Talaromyces thermophilus*, *Rhizopus oryzae*, et *Candida sp*, sont utilisées dans la préparation de détergents qui promettent une meilleure performance de lavage et des économies d'énergie [150-154]. Wang et al. [155] ont rapporté une lipase recombinante de *Trichoderma lentiform* ACCC30425 dans *Pichia pastoris GS115*, qui est alcaline, tolère les basses températures et les surfactants forts, la rendant appropriée pour une utilisation dans l'industrie des détergents.

Xiao et al. à 2021 [156] ont également rapporté une lipase recombinante, Lip486, sans homologie claire avec d'autres lipases connues. Lip486 a été découverte en utilisant la technologie de la métagenomique fonctionnelle et appartient à une nouvelle sous-famille d'enzymes lipolytiques. Cette lipase montre une grande activité et stabilité même dans des conditions alcalines et à température moyenne-basse. Ces propriétés pourraient rendre cette lipase particulièrement importante pour l'usage dans l'industrie des détergents et autres industries à l'avenir.

Les projections suggèrent une croissance jusqu'à une valorisation de 590.2 millions de dollars US d'ici fin 2023. Cette augmentation est prédite avec un taux de croissance annuel composé (TCAC) estimé à 6.8% à partir de 2018 [157].

**Tableau 5 :** Les lipases commerciales utilisées dans l'industrie des détergents [158]

Lipases	Source	Fournisseur	Expression
Lipolase®	<i>Humicola lanuginosa</i>	Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>
LipoPrime™	Variante de Lipolase	Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>
Lipolase Ultra®	Variante de Lipolase	Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>
Lipex®	Variante de Lipolase	Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>
lipomax™	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Genencor Inc	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
LiposeP	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano Pharmaceutical CO.Ltd	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Luma fast	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Genencor,USA	<i>Bacillus</i> sp.

Dans l'industrie des détergents, plusieurs lipases commerciales trouvent une utilisation significative, à savoir :

- ✚ **Lipolase et Lipex :** Ces lipases, produites par Novozymes, sont dérivées de la souche fongique *Thermomyces lanuginosus*. Elles montrent une stabilité optimale à des pH alcalins (entre 8 et 9) et à des températures modérées (40 à 50°C), ce qui les rend idéales pour leur intégration dans les formulations de détergents.
- ✚ **Lumafast et Lipomax :** Ces lipases bactériennes sont produites par Genencor, une division de DuPont, à partir respectivement de *Pseudomonas mendocina* et *Pseudomonas alcaligenes*. Elles sont choisies pour leur efficacité dans le nettoyage et leur compatibilité avec diverses formulations de détergents. Leur pH optimal est généralement autour de 9 et la température optimale est d'environ 50°C.
- ✚ **Lecitase Ultra® :** est une phospholipase A1 génétiquement modifiée par Novozymes. C'est une fusion de gènes de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) et de la phospholipase A1 de *Fusarium oxysporum*, optimisée pour un pH de 5 à 7 et une température de 50 à 60°C, adaptée aux détergents[159].

En complément des lipases qui se chargent de la dégradation des taches lipidiques comme les huiles ou les sauces, une multitude de détergents à lessive incorporent différentes enzymes, soit individuellement, soit en mélange. Parmi ces enzymes, on trouve :

- ✚ **l'Alcalase®** de Novozymes, une protéase générée à partir de la subtilisine A de Carlsberg et issue d'une souche de *B. licheniformis*. Cette enzyme est fréquemment utilisée en raison de son efficacité dans des conditions neutres à légèrement alcalines (pH 7-9), ce qui la rend parfaitement adaptée aux détergents ménagers liquides dont le pH est généralement compris entre 8 et 9. Son activité est optimale à 60 °C et elle est efficace sur les salissures protéiques en favorisant l'hydrolyse des protéines, telles que celles contenues dans le sébum.

D'autres enzymes comme les amylases (par exemple, **Termamyl®**) cassent les liaisons  $\alpha$ -(1,4) des molécules d'amidon, communes dans les aliments comme les pâtes ou les pommes de terre. Enfin, les cellulases (comme le **Celluzyme®**) agissent sur les microfibrilles qui émergent sur le coton après plusieurs lavages. Ainsi, ces enzymes, seules ou en cocktail, optimisent l'efficacité des détergents à lessive.

## **10.2. Production de biodiésel**

Face à l'accroissement continu de la population mondiale, du transport et de l'industrialisation, la demande en énergie pour des applications industrielles et domestiques s'est intensifiée [160]. Pour répondre à cette demande croissante, notre dépendance se concentre essentiellement sur les combustibles fossiles tels que le diesel issu du pétrole. Cependant, ces réserves fossiles sont quantitativement limitées et seront à terme inévitablement épuisées. La combustion de diesel dégage d'importants volumes de CO<sub>2</sub>, CO et NO<sub>x</sub> dans l'environnement, exacerbant la pollution et contribuant à l'effet de serre [161, 162]. Il est donc impératif de rechercher des sources d'énergie renouvelables alternatives susceptibles de répondre à nos besoins énergétiques futurs.

Le biodiesel émerge comme une ressource alternative potentiellement efficace, offrant plusieurs avantages comparativement aux combustibles fossiles [160]. Composé d'un mélange d'esters alkyliques d'acides gras, le biodiesel est non toxique, biodégradable et présente une faible teneur en carbone et en soufre, ainsi qu'une teneur élevée en hexadécane. Ainsi, il génère des émissions de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), de monoxyde de carbone (CO) et d'oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) inférieures à celles du diesel dérivé du pétrole [162]. Par conséquent, l'usage accru de biodiesel permettrait de diminuer la pollution et l'effet de serre.

De nombreuses méthodes de fabrication de biodiesel existent, incluant la dilution, la pyrolyse, la micro-émulsion et la transestérification. Les substrats utilisés pour la production de biodiesel par transestérification comprennent les graisses animales (saindoux et suif de boeuf), les graisses récupérées, les huiles de cuisson usagées et les huiles végétales (colza, coton, palme, soja, maïs, jatropha, arachide, tournesol et canola). Le processus de transestérification peut être catalytique ou non catalytique, et la production de biodiesel via des enzymes est de plus en plus privilégiée pour sa faible consommation énergétique et ses conditions de réaction douces [163-165].

Diverses lipases provenant de levures et de champignons sont employées comme catalyseurs. Parmi ces enzymes, les lipases sont particulièrement utilisées comme catalyseurs dans le processus de transestérification pour la production de biodiesel. Les lipases se

distinguent par leur activité catalytique élevée, leur régiosélectivité et leur stéréosélectivité dans des conditions physiques modérées comme le pH, la température et la pression.

Parmi celles-ci, on compte celles d'*Aspergillus niger*, *Rhizomucor miehei*, *Ralstonia sp*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosa*, et *Magnusiomyces capitatus* [166]. Winayanuwattikun et al. a 2011,[165] ont mis en œuvre une méthode d'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa B* sur Sepabeads EC-OD, utilisant ensuite ce biocatalyseur pour la synthèse de biodiesel par voie enzymatique. De manière analogue, Tian et al. a 2021[167], ont indiqué que la lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), formée d'une unique chaîne de protéine de type  $\alpha/\beta$ , est préférentiellement utilisée pour la préparation de biodiesel, notamment grâce à sa forte activité catalytique et sa résistance au méthanol.

### **10.3. Les industries du cuir**

Les industries du cuir, engagées dans la création d'articles tels que des chaussures, des sacs, des vêtements, des ceintures et des portefeuilles, ont un rôle économique considérable à l'échelle mondiale, participant activement aux gains en devises et à la création d'emplois [168, 169]. Néanmoins, ces industries présentent également des conséquences environnementales défavorables, déchargeant diverses substances chimiques nocives employées durant les multiples phases du procédé de tannage.

La production de cuir implique la transformation des peaux et des cuirs bruts d'animaux en cuir au moyen d'une variété de procédés chimiques et mécaniques. Un grand nombre de produits chimiques utilisés dans ces procédés de tannage sont éliminés en tant que déchets, contribuant à une augmentation significative de la demande chimique en oxygène (COD), des solides totaux dissous (TDS), des sulfates, des chlorures et des métaux lourds dans les eaux usées, qui sont ensuite déversés dans les plans d'eau, polluant ainsi fortement les rivières, les lacs et les mers [161, 168, 170]

Dans le but de diminuer l'emploi de ces substances chimiques toxiques, les enzymes ont été identifiées comme une alternative pratique optimale à utiliser durant le tannage, et ces enzymes peuvent contribuer à la gestion des déchets [161]. Les lipases représentent un groupe crucial d'enzymes dans les différentes procédures de fabrication du cuir, car la peau et les cuirs d'animaux contiennent des protéines et des graisses dans les fibres de collagène. Ces éléments doivent être partiellement ou entièrement retirés avant le tannage. Les lipases dégradent spécifiquement les lipides sans nuire au cuir, montrant ainsi le processus de dégraissage avec un impact environnemental plus faible [170-172].

De plus, les lipases de source fongique sont plus performantes que celles d'origine animale et végétale en raison de leur rendement élevé, de la croissance rapide des champignons sur des milieux économiques, et de méthodes de production plus stables, faciles et sécurisées. Dans une étude, *Aspergillus tamaris* MTCC5152 a été identifié pour sa capacité à produire une grande quantité de lipase ( $758 \pm 3.61$  u/g) par fermentation en milieu solide. Cette lipase brute (3%) a été utilisée pour le dégraissage dans le processus de tannage, affichant une solubilité dans les graisses de 92% [170]. Par ailleurs, une autre étude menée par Moujehed et al. [173] a révélé que la lipase Lip2, produite par la levure *Yarrowia lipolytica*, est efficace pour dégraisser les peaux de mouton. Cette lipase nécessite seulement 6 mg/kg de peau brute et est capable de réduire le gras en seulement 15 minutes à pH 8.0 et 30°C.

#### **10.4. Les industries textiles**

Les industries textiles, qui jouent un rôle significatif dans l'économie de nombreux pays en développement, sont confrontées à de sérieux défis environnementaux et de ressources, notamment en raison de leur utilisation intensive de produits chimiques [148]. Afin de minimiser ces problèmes et de réduire la pollution, ces industries s'orientent de plus en plus vers des méthodes biologiques, notamment l'utilisation d'enzymes comme les lipases d'origine fongique.

Ces lipases jouent un rôle essentiel dans divers processus de l'industrie textile, y compris l'élimination des lubrifiants de calibrage et la modification des fibres synthétiques comme le polyester. Par exemple, le traitement enzymatique du polyéthylène téréphtalate (PET) avec la lipase produite par *Aspergillus oryzae* améliore sa polarité et sa capacité antistatique [148, 172]. De plus, une étude récente a démontré l'utilisation de la lipase produite par *Aspergillus niger* NRRL-599, immobilisée sur des nanoparticules de titane, pour le traitement de la laine après teinture, améliorant ainsi sa couleur et sa résistance [174].

#### **10.5. La bioremédiation des eaux usées**

La bioremédiation des eaux usées par l'intermédiaire des lipases s'est avérée être une approche précieuse dans la gestion des déchets de la biotechnologie des lipases. Ces enzymes sont impliquées dans des processus tels que l'épuration par boues activées et autres systèmes aérobies, dans lesquels elles facilitent l'élimination continue de fines couches de graisses accumulées à la surface des cuves d'aération [175]. Plusieurs espèces fongiques sont connues pour leur capacité à dégrader les marées noires dans les environnements côtiers, contribuant ainsi à la restauration écologique et offrant des opportunités pour la transformation enzymatique de l'huile à des fins industrielles [176]. Des genres tels que *Aspergillus*, *Fusarium*,

*Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Beauveria* et *Engyodontium* ont récemment été identifiés comme des agents de bioremédiation potentiels dans les sols [177].

En outre, les lipases jouent un rôle significatif dans la dégradation efficace des matières solides et dans l'élimination et la prévention des obstructions graisseuses dans les systèmes de gestion des déchets de diverses industries, y compris le traitement des eaux usées et le nettoyage des cuves [178]. Les lipases d'*Aspergillus terreus* et *Aspergillus niger* ont été utilisées pour la bioremédiation des sols pollués et la dégradation des films de polyvinyl alcool, respectivement [172, 179]. Les lipases produites par *Aspergillus uvarum* et *Aspergillus ibericus* sont également connues pour leur utilisation dans les processus de bioremédiation [180].

Leal et al. (2006) ont noté que les eaux usées synthétiques de laiterie, avec ou sans pré-hydrolyse, peuvent être traitées anaérobiquement par *Penicillium restrictum* et *Aspergillus niger*. Les lipases obtenues ont montré une capacité à biodégrader les hydrocarbures polyaromatiques présents dans les sols contaminés par le pétrole. Basheer et al [181] ont isolé un champignon, *Aspergillus awamori* BTMFW032, capable de produire des lipases réduisant environ 92% de la teneur en matières grasses et huileuses des effluents d'usine contenant de l'huile usée. Une lipase isolée de *Geotrichum candidum* a été utilisée pour la bioremédiation et la décoloration des eaux usées provenant des moulins à olive [148].

## **10.6. Médecine**

Les lipases, en particulier celles produites par divers microorganismes, jouent un rôle crucial dans la médecine et la pharmacologie. Elles servent non seulement d'outils diagnostiques pour certaines maladies, comme les lésions pancréatiques et la pancréatite aiguë [148], mais sont également utilisées dans la synthèse de médicaments. Par exemple, une lipase de *Candida rugosa* a été utilisée pour la synthèse de la lovastatine, un médicament couramment utilisé pour la réduction du cholestérol sérique [182, 183]. De plus, une lipase produite par *Serratia marcescens* est utilisée dans la synthèse du diltiazem hydrochloride, un vasodilatateur coronaire [184]. En outre, les lipases peuvent potentiellement être utilisées comme agents thérapeutiques pour le traitement de divers troubles gastro-intestinaux [96, 172].

# Matériel et méthodes

## I. Réactifs

La rhodamine B, la benzamidine, l'acide taurodésoxycholique sodique (NaTDC), gomme arabique (GA), la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD), le butylhydroxytoluène (BHT), le butyrate de 4-méthylumbelliférone (MUFB), l'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), l'extrait de levure, le N-éthylmaléimide (NEM), oxyde de phénylarsine (PAO), l'iodoacétamide, et les autres réactifs chimiques ont été fournis par Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin-Fallavier, France). La peptone de caséine provenait de Carl Roth (Lauterbourg, France). L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), la membrane de transfert en fluorure de polyvinylidène (PVDF) et les protéines de marquage de la masse moléculaire provenaient d'Euromedex (Souffelweyersheim, France). L'Orlistat, un inhibiteur de lipase digestive, a été acheté auprès de Hoffmann-La Roche Ltd à Bâle, en Suisse, et la Lipolase®, une lipase spécifique 1,3 de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), a été fournie par Novozymes Biopharma DK A/S (Bagsvaerd, Danemark). La protéine GZEL a été purifiée comme décrit précédemment [34]. La colonne de chromatographie d'exclusion de taille préemballée Cytiva Lifescience™ Superdex® 200 Increase 10/300 GL (L x ID. 30 cm x 10 mm, taille des particules 8,6  $\mu$ m), le système de purification de protéines ÄKTA™ prime FPLC™ et les colonnes Cytiva Life Sciences™ HiTrap™ Q-Sepharose Fast Flow (FF) d'un volume de 5 mL, provenaient tous de GE Healthcare, Bio-Sciences AB (Uppsala, Suède). Toutes les endonucléases de restriction proviennent de New England BioLabs, le kit de purification d'ADN et le kit Midi-Prep ont été obtenus auprès de Macherey-Nagel (France). Les plaques de gel de silice 60 F245 utilisées pour la chromatographie sur couche mince (CCM) ont été achetées auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). Tous les autres réactifs sont de qualité analytique.

### ✚ Lipides :

- La triacétine (TC2), la tributyrine (TC4), la trihexanoïne (TC6), la trioctanoïne (TC8) (99%, puriss), l'huile d'olive (OO), (99%, pureté) proviennent de Fluka (Buchs, Suisse). La phosphatidylcholine (PC)(Egg PC) , sont de chez de Sigma (99%, pureté).
- Les phospholipides synthétiques ont été estérifiés avec l'acide  $\alpha$ -éleostéarique pour donner les molécules [1- $\alpha$ -éleostéaroyl-2-octadécyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine (nommé *sn*-EOPC)] et [1-octadécyl-2- $\alpha$ -éleostéaroyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine (nommé *sn*-OEPC)] aux positions *sn*-1 et *sn*-2, respectivement. Ainsi, ces substrats contiennent un dérivé l'acide  $\alpha$ -éleostéarique avec de fortes propriétés d'absorption dans

UV, ainsi qu'une chaîne alkyle non absorbante aux UV et une liaison éther non hydrolysable à l'autres positions *sn* pour éviter la migration de la chaîne acyle après l'hydrolyse de la première liaison ester de lipolyse[185] .

- Les substrats des TG estérifiés avec de l'acide  $\alpha$ -éléostéarique (acide 9Z, 11E, 13E-octadécatriénoïque) soit en position *sn*-1 [1- $\alpha$ -éléostéaroyl-2,3-octadécyl-*sn*-glycérol (*sn*-EOO)] ou en position *sn*-3 [1,2-octadécyl-3- $\alpha$ -éléostéaroyl-*sn*-glycérol (*sn*-OOE)] ont été synthétisés en laboratoire selon le protocole décrit précédemment [185] .

## II. Matériel

### 1. Souches

#### 1.1. Souches productrices d'enzymes lipolytiques

Dans le cadre de la recherche de nouvelles enzymes lipolytiques, une sélection de souches fongiques a été effectuée à partir de contaminants prélevés sur les olives de deux principaux biotopes tunisiens situés à Gabès (El Amarat, coordonnées GPS : 34°33' N, 10°07' E) et Tataouine (Henchir El Ghazal, coordonnées GPS : 33°40' 12N, 10°38' E) dans le sud-est de la Tunisie. La souche sélectionnée a été choisie sur la base d'un test qualitatif de révélation de l'activité lipasique à l'aide de la rhodamine B. Son identification a été réalisée par séquençage des régions *ITS1* et *ITS2* (Internal Transcribed Spacer), du facteur d'élongation de la traduction  $1\alpha$  (*TEF1- $\alpha$* ) et de fragments de la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (*RPB2*) à l'Institut de la biodiversité fongique Westerdijk (CBS, Utrecht, Pays-Bas).

#### 1.2. Souche d'*Escherichia coli*

*Escherichia coli* Top 10 : *F*<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*,  $\Delta$ *lacX74*, *nupG*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, 85 *rpsL*(StrR), *endA*. Cette souche a été utilisée pour le clonage du gène codant la lipase de *F. annulatum* étudiées.

#### 1.3. Souche de *Pichia pastoris*

La souche *Pichia pastoris* X33 WT : est de type sauvage. Cette souche Mut<sup>+</sup> présente deux copies des gènes codantes l'alcool oxydase AOX1 et AOX2, ce qui lui confère une croissance améliorée sur un milieu contenant du méthanol. Cette caractéristique avantageuse favorise l'expression optimale de protéines recombinantes.

## 2. Vecteurs de clonage et plasmides

### 2.1. Vecteurs de clonage et d'expression

✚ Les vecteurs pPIC $\alpha$  A



### 3. Techniques de biologie moléculaires

#### 3.1. Digestion d'ADN

##### 3.1.1. Enzymes de restriction :

La digestion enzymatique a été réalisée durant 2 h à 37°C avec 5 µg d'ADN et de 1 à 10 Unités ou U de SacI (produite par NEB® Inc) pendant 1 h à 37°C dans un volume réactionnel total de 50 µL).

##### 3.1.2. Amplification d'ADN par PCR :

La Taq polymérase provenant de *Thermus aquaticus* (Invitrogen™), a été employée pour effectuer le « A-tailing », c'est-à-dire l'incorporation de terminaisons adénylates aux fragments d'ADN obtenus par PCR, destinés à être clonés dans le vecteur pGM-T Easy (Promega). Au cours de cette étape, l'enzyme est placée dans un tampon contenant du MgCl<sub>2</sub> et des dNTPs, avec l'ADN matrice, et incubée à 72°C pendant 20 minutes.

La polymérase Q5 haute-fidélité, disponible chez NEB® Inc, est une enzyme dotée d'une activité de relecture (proof-reading) 3'-5'. PCR

#### 3.2. Oligonucléotides

Les amorces employées pour l'identification de la souche *Fusarium* sont présentées dans le tableau 6 ci-dessous :

**Tableau 6 :** Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

Nom	Séquences
<b>ITS:LS266</b>	GCATTCCCAAACAACCTCGACTC
<b>V9G</b>	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA
<b>EF1α: EF1-728F</b>	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
<b>RPB2: RPB2-5F2</b>	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC
<b>RPB2-7CR</b>	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT

#### 3.3. Identification Moléculaire et Analyse Phylogénétique de l'Isolat CBS

Le séquençage des gènes de l'espaceur transcrit interne (*ITS*) et du facteur d'élongation de la traduction 1α (*TEF1-α*), ainsi que de la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (*RPB2*), a été effectué pour identifier le genre auquel appartient l'isolat CBS. Du mycélium frais a été utilisé pour extraire l'ADN génomique à l'aide du kit de préparation d'ADN animal et fongique (Jena Bioscience). L'identité de l'isolat CBS a été déterminée en fonction des descriptions morphologiques macroscopiques et microscopiques en utilisant la méthode rapportée par Visagie et al. [40]. L'isolat CBS a été identifié en utilisant de l'ADN extrait avec un kit d'isolement de l'ADN microbien Qiagen DNeasy Ultraclean et des fragments

des régions ITS 1 et 2, comprenant l'ADNr 5.8S, qu'ont été analysés à l'Institut de biodiversité fongique Westerdijk à Utrecht, aux Pays-Bas. L'identification moléculaire de l'isolat CBS a été effectuée à l'Institut de biodiversité fongique Westerdijk (CBS, Utrecht, Pays-Bas) en utilisant la procédure suivante : L'ADN a été extrait en utilisant un kit d'isolement de l'ADN microbien Qiagen DNeasy Ultraclean™. Des fragments des régions ITS 1 et 2, y compris l'ADNr 5.8S (*ITS*), une partie du *TEF1-α* et des fragments du *RPB2*, ont été amplifiés et séquencés. Les amorces utilisées étaient illustrées dans tableau 7. L'amplification de l'ADN par PCR, l'électrophorèse de l'ADN et la purification, la restriction, la ligation et la transformation, ainsi que le séquençage de l'ADN et l'analyse phylogénétique, ont tous été réalisés selon les méthodes récemment définies par les auteurs [187, 188].

#### 4. Milieux

Sauf mention contraire, tous les milieux de culture sont soumis à une stérilisation.

##### 4.1. Les milieux d'isolement et de culture

Afin de cultiver des souches sauvages productrices d'enzymes lipolytiques, des milieux modifiés sont utilisés (Tableau 7), dont la composition et les conditions d'incubation sont optimisées à l'aide des approches classiques.

Les milieux sont solidifiés avec 15 g/L d'agar et stérilisés par autoclavage pendant 20 minutes à 120 °C. Les antibiotiques sont ajoutés à une concentration finale de 0,1 mg/mL dans les milieux de culture. Une boîte de Petri contient 25 mL de milieu solide avec ou sans antibiotique. Les souches d'*E. coli* et de *P.pastoris* sont cultivées à 37°C ou 30°C respectivement. La souche *Fusarium annulatum* est cultivée à 25°C.

**Tableau 7 :** Composition des milieux de culture pour les différentes souches utilisées.

Souches	Composition (g/L)
<i>Fusarium annulatum</i>	Milieu optimisé : Peptone de caséine : 15 ; extrait de levure : 5 ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 1.75 ; MgSO <sub>4</sub> : 0.5 ; 1% (v/v) huile d'olive (pH= 6).
<i>E. coli</i> sauvage	Milieu LB (Lysogeny Broth) : bactopeptone : 10 ; extrait de levure : 5 ; NaCl : 10 (pH=7).
<i>E. coli</i> transformée	Milieu LBLS (LB low salt): bactopeptone : 10 ; extrait de levure : 5 ; NaCl : 5 ; avec 0,1 mg/mL de Zeocin™ (pH=7)
<i>Pichia pastoris</i> X33 sauvage	Milieu YPG (Yeast, Peptone, Glucose) : Peptone : 20 ; extraits de levure : 10 ; glucose :20. (pH=6)
<i>Pichia pastoris</i> X33 transformée	BMMY (Buffred Methanol-complex Medium) : extrait de levure :10 ; peptone :20 ; phosphate de potassium : 100Mm pH6 ; Yeast Nitrogen Base (YNB) :13.4 ; glycerol :10 ; biotin : 4×10 <sup>-5</sup> ; avec 1% de methanol et 0,1 mg/mL de Zeocin™

## 5. Logiciels

Les principales applications des divers logiciels se présentent comme suit :

- ✚ **Alignement de séquences** : BioEdit, Discovery Studio, Multialin
- ✚ **Prédiction de la structure secondaire** : [http://npsapbil.ibcp.fr/cgibin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_seccons.html](http://npsapbil.ibcp.fr/cgibin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html)
- ✚ **Modélisation** : Alphafold 2.2.0
- ✚ **Amarrage moléculaire** : AutoDockVina intégré dans PyRx 0.8

### III. Méthodes

#### 1. Culture et conservation des souches

##### 1.1. Cultures

###### 1.1.1. Culture de *Fusarium annulatum*

Afin d'optimiser la productivité en lipase, la souche fongique CBS a été pré-cultivée avec une agitation continue, à 160 tours par minute (rpm) pendant 24 heures et à une température de 25 °C, dans des flacons de 250 mL contenant 50 mL de milieu A (Tableau 8). Deux millilitres de pré-culture de *Fusarium annulatum* ont été utilisés pour inoculer des flacons de 2 litres contenant 500 mL de milieu A avec de l'huile d'olive à 1% (v/v) comme inducteur de l'expression de la lipase et comme seule source de carbone. Le champignon a été cultivé en aérobic pendant 5 jours, à 25 °C, sur une agitatrice rotative à 160 tours par minute. Des échantillons ont été prélevés quotidiennement pendant 8 jours.

###### 1.1.2. Culture de *E. coli*

Pour la croissance sur milieu solide, les clones cultivés sont élevés sur des boîtes de Pétri qui contiennent du milieu agar-LB, supplémenté par un antibiotique si cela s'avère nécessaire. Ces plaques sont ensuite incubées à une température stable de 37°C sur une durée de 24 heures. D'autre part, dans un milieu liquide, les cellules sont cultivées dans un milieu LB liquide, qui peut être aussi être enrichi par un antibiotique si cela est requis. Le processus d'ensemencement est effectué systématiquement à partir d'une colonie isolée ou d'une pré-culture issue de cette colonie. Cette culture est par la suite incubée à 37°C avec une agitation soutenue à 250 rotations par minute pendant une durée de 24 heures.

###### 1.1.3. Culture de *P. pastoris*

Sur milieu solide, *Pichia pastoris* est cultivée sur des plaques de Pétri contenant du milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose) et éventuellement un antibiotique, incubées à 30°C pendant 72 heures. En milieu liquide, les cellules sont cultivées dans du milieu YPD, enrichi d'antibiotique si nécessaire, en partant toujours d'une colonie ou de sa pré-culture. L'incubation se fait à 30°C avec une agitation constante de 250 rpm pendant 24 heures. Pour induire l'expression extracellulaire, un ajout de méthanol à 1% final est effectué toutes les 24 heures.

##### 1.2. Conservation des souches

Pour préserver les souches, elles sont cultivées dans un milieu liquide adéquat, avec ou sans ajout d'antibiotique. Ensuite, la suspension cellulaire est combinée avec du glycérol stérile

jusqu'à obtenir une concentration finale de 20%. Cette préparation est ensuite distribuée dans des cryotubes avant d'être stockée à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

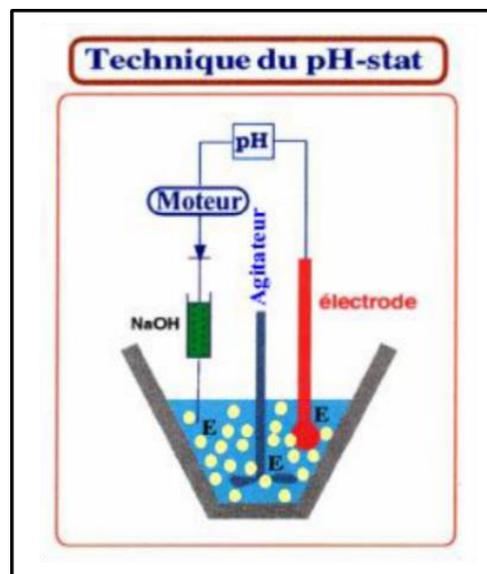
## 2. Dosage des activités enzymatiques en milieu liquide

### 2.1. Activité lipolytique :

Le pH-stat est un système potentiométrique utilisé pour quantifier les activités lipolytiques sur des substrats émulsionnés à un pH stable. Durant l'hydrolyse d'une émulsion de lipides par une lipase, les acides gras qui sont libérés sont titrés en ajoutant du NaOH 0,1 N au milieu réactionnel afin de maintenir le pH constant. L'activité de la lipase est exprimée en unités enzymatiques, une unité correspondant à la libération d'une micromole d'acide gras neutralisé par minute.

Les substrats employés pour cette analyse incluent :

- **L'émulsion d'huile d'olive** : Le milieu réactionnel de volume final de 30 mL est constitué de 10 ml d'émulsion d'huile d'olive à 10% (10 ml d'huile d'olive combinée à 90 ml de gomme arabique à 10%) et 20 ml d'eau distillée.
- **TC2, TC4, TC6, TC8** : Le milieu réactionnel pour ce substrat contient 250  $\mu\text{l}$  de substrat dans 30 ml de tampon Tris-HCl 2,5 mM, NaCl 150 mM, en présence de NaDC 4 mM et  $\text{CaCl}_2$  4 mM.
- **La phosphatidylcholine** : Le milieu réactionnel pour ce substrat consiste en 10 ml d'une émulsion de phosphatidylcholine à 1% et 20 ml de tampon Tris-HCl 2,5 mM, NaTDC à 6 mM.



**Figure 18** : Représentation schématique condensée de la technique du pH-stat. Le milieu réactionnel contenant le substrat et l'enzyme est placé dans une cuve de 30 ml et mélangé avec un agitateur pour assurer une interaction constante. Une électrode pH mesure les variations du pH, indiquant l'activité lipolytique par la libération d'acides gras. Lors d'une baisse de pH, une pompe doseuse ajoute de la soude pour maintenir le pH constant. Le volume de soude ajouté est enregistré et utilisé pour quantifier l'activité lipolytique.

## 2.2. Etude de la stéréopréférence de la lipase

Afin d'établir de manière précise la préférence stéréosélective *sn*-1 ou *sn*-3 de la lipase, nous avons recours à une technique spectrophotométrique continue et directe. Cette méthode s'appuie sur l'emploi d'analogues de triglycérides, tels que 1-éléostéaroyl-2, 3-octadécyl-*sn*-glycérol (EOO) et 1,2-octadécyl-3-éléostéaroyl-*sn*-glycérol (OOE).

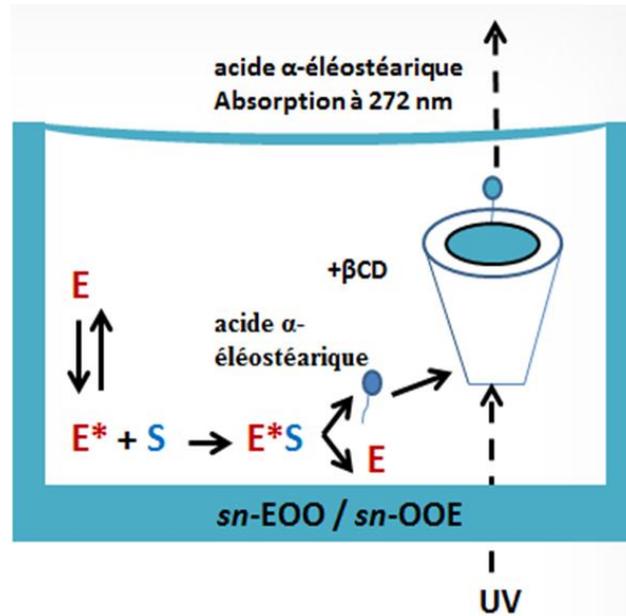
Les triglycérides contenant de l'acide  $\alpha$ -éléostéarique ont été fixés au fond des puits d'une plaque de microtitration par une technique de "coating". Après évaporation du substrat pour assécher, les puits ont été lavés trois fois avec 200  $\mu$ L de tampon de dosage (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA et 2,5 mM  $\beta$ -CD) [185]. Ils ont ensuite été laissés à équilibrer avec le tampon de dosage (200  $\mu$ L) pendant un minimum de 10 min à 37°C. Ensuite, les enzymes purifiées ont été injectées dans les puits de la plaque de microtitration.

L'hydrolyse du substrat lipidique par la lipase, introduite dans le milieu réactionnel, est surveillée en continu par l'accroissement de l'absorbance à 272 nm, qui correspond à la transition de l'acide  $\alpha$ -éléostéarique de la phase adsorbée à la phase aqueuse. L'absorbance à 272 nm a été mesurée en continu toutes les 60 secondes pendant 20 minutes, contre le tampon seul, grâce à un spectrophotomètre entre (Tecan Infinite M200 Pro) avec une agitation de la microplaque avant chaque lecture [185].

Afin de mesurer avec exactitude cette régio-sélectivité *sn*-1 ou *sn*-3, nous avons calculé l'Indice de Régio-sélectivité (RI%) en utilisant la formule suivante. Dans cette formule,  $A_{snEOO}$  et  $A_{snOOE}$  représentent respectivement les activités spécifiques en relation avec les substrats *sn*-EOO et *sn*-OOE.

$$IR = \frac{|A_{snEOO}| - |A_{snOOE}|}{|A_{snEOO} + A_{snOOE}|} \times 100$$

Les valeurs de RI obtenues ont été comparées avec celles qui ont été auparavant déterminées pour d'autres lipases microbiennes [182]. Selon leur préférence régionale, ces lipases ont été divisées en trois groupes distincts. Le premier groupe englobe des lipases comme la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) et la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), qui ne montrent pas une régio-préférence marquée. Le deuxième groupe est constitué de la cutinase de *Fusarium solani* (FSC), qui révèle une régio-préférence pour la position *sn*-3. Enfin, le troisième groupe, symbolisé par la Lecitase<sup>®</sup> et la lipase A de *Candida antarctica* (CALA), exhibe une régio-préférence significative pour la position *sn*-1 des triglycérides [185].



**Figure 19 :** Dosages spectrophotométriques des activités lipases. À l'aide de 1-éléostéaroyl-2, 3-octadécyl-*sn*-glycérol (EOO) et 1,2-octadécyl-3-éléostéaroyl-*sn*-glycérol (OOE).

Représentation schématique du test montrant l'hydrolyse enzymatique du film EOO ou OOE enduit sur les puits d'une plaque de microtitration, suivie de la solubilisation de l'acide  $\alpha$ -éléostéarique libre dans la phase par formation d'un complexe avec la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) ; E, lipase en solution ; E\*, lipase activée à l'interface; S, substrat.

Des phospholipides synthétiques ont également été estérifiés avec de l'acide  $\alpha$ -éléostéarique à la position *sn*-1 [1- $\alpha$ -éléostéaroyl-2-octadécyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine (EOPC)] ou à la position *sn*-2 [1-octadécyl-2- $\alpha$ -éléostéaroyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine (OEPC)]. Ils ont été utilisés pour tester la préférence de la lipase envers les phospholipides en fonction de leur position de substitution.

### 2.3. Dosage de l'activité galactolipase

Afin d'évaluer l'activité galactolipasique, le substrat employé était le 1,2-diacyl-3-O-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-*sn*-glycérol. Le protocole expérimental comprenait l'incubation de MGDG, à une concentration finale de 0,66 mM, avec rFAL (10  $\mu$ g) pour des durées respectives de 5, 10 et 20 minutes à une température de 50°C. Suite à l'extraction lipidique, chaque échantillon a été soumis à une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

### 3. Purification

#### 3.1. Lipase FAL

##### 3.1.1. Extraits lipolytiques à partir de la *Fusarium annulatum* Bugnicourt

Après cinq jours de culture, 500 mL de milieu de culture de la souche fongique CBS, où l'activité lipasique est à son maximum, ont été initialement filtrés à l'aide d'un papier filtre Whatman de grade No. 1 (taille 110 mm) pour éliminer le mycélium. Pour davantage clarifier le surnageant, le filtrat a été centrifugé pendant 20 minutes à  $7500 \times g$ . Le surnageant a ensuite subi une deuxième filtration en utilisant du papier filtre Whatman de grade No. 1 pour s'assurer de la suppression totale du mycélium et des débris résiduels. Le filtrat est conservé pour les étapes ultérieures de purification.

##### 3.1.2. Précipitation sélective au sulfate d'ammonium

La technique de précipitation est employée pour la concentration et la purification partielle des protéines solubles dans un échantillon de surnageant. Lorsqu'il est présent en haute concentration, le sulfate d'ammonium rivalise avec les protéines pour interagir avec les molécules d'eau, ce qui provoque une désolvation suivie d'une précipitation.

La procédure de précipitation des protéines du filtrat brut a été exécutée de la manière suivante : le surnageant est progressivement supplémenté avec du  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  solide, ajouté par petites quantités tout en maintenant une agitation douce et une température basse ( $4^\circ\text{C}$ ), jusqu'à atteindre 80% de saturation. Le précipité de protéines a été récupéré par centrifugation à  $8000 \times g$  pendant 30 minutes à  $4^\circ\text{C}$ , puis a été remis en suspension dans 5 mL de tampon A Tris-HCl (20 mM, pH 9) contenant de 20 mM NaCl.

##### 3.1.3. Chromatographie

L'échantillon obtenu (5 mL) a été chargé sur une colonne de chromatographie sur gel de filtration Cytiva Lifescience™ Superdex® 200 Increase 10/300 GL Prepacked Tricorn™ (L  $\times$  D.I. 30 cm  $\times$  10 mm, taille de particule de 8,6  $\mu\text{m}$ ), qui avait déjà été équilibrée avec du tampon A. Les protéines ont ensuite été éluées avec le même tampon, à un débit de 1 mL/min, et des fractions de 1 mL ont été collectées.

L'activité lipasique a été confirmée comme précédemment expliqué, et le profil d'éluion des protéines a été mesuré à 280 nm. Les fractions contenant une activité lipasique ont été rassemblées, largement dialysées contre un tampon de 20 mM Tris-HCl pH 9 (tampon A) et ensuite chargées sur une colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF (Cytiva, Sigma-Aldrich) (5 mL) qui avait été pré-équilibrée avec le tampon A. La colonne a été lavée avec au moins 5 volumes

de colonne du tampon A et les protéines adsorbées ont ensuite été éluées avec un gradient linéaire de NaCl (0-0.5 M NaCl dans le tampon A), à un débit de 1 mL/min. Les fractions chromatographiques de 1 mL, comprenant l'activité FAL, ont été combinées et utilisées pour la caractérisation de l'activité lipasique.

### **3.1.4. Dosage de protéines, électrophorèse et zymographie**

La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford [189], en utilisant le colorant Bio-Rad Protein Assay. L'absorbance est mesurée à 595 nm, en se référant à une gamme standard de BSA préparée dans des conditions identiques. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) [10% (v/v) en présence de  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)], selon la technique de Laemmli, a été utilisée pour examiner les fractions chromatographiques actives de lipase et de phospholipase [190]. Ensuite, les bandes de protéines ont été visualisées par la coloration avec le Coomassie Brilliant Blue G-250 de Bio-Rad Laboratories, Inc., (Hercules, CA, USA).

### **3.1.5. Zymographie**

Différentes fractions ont été testées par zymographie en utilisant le butyrate de 4-méthylumbelliférone (MUFb) comme substrat. Les extraits d'enzyme n'ont été ni bouillis ni traités avec le 2-ME avant d'être chargés sur le gel. Après la migration des protéines, les gels ont été trempés à  $25 \pm 2$  °C dans du Triton X-100 (2,5%) pendant 30 min, lavés dans un tampon phosphate 50 mM (pH 8), et recouverts d'une solution de MUFb (100  $\mu$ M) dans le même tampon [45]. Les bandes d'activité de la lipase sont devenues visibles rapidement après exposition à la lumière UV.

### **3.1.6. Analyse de la séquence terminale NH<sub>2</sub>**

Après purification, l'échantillon de FAL a été soumis à une analyse SDS-PAGE et transféré sur une membrane PVDF en utilisant la cellule de transfert électrophorétique Bio-Rad Trans-Blot®, en suivant les directives du fabricant. La membrane a été lavée deux fois avec de l'eau bi-distillée, puis colorée avec du rouge Ponceau. Les séquences d'acides aminés de la protéine FAL dans les bandes colorées ont été déterminées sur le séquenceur de protéines PPSQ-31B (Shimadzu Co., Kyoto, Japon) par dégradation d'Edman automatisée.

Cette méthode implique trois étapes cruciales après le transfert des protéines sur la membrane de PVDF Bio-rad [191] et leur bande excisée.

 **Couplage** : Dans cette étape, le Phényl-Iso-Thio-Cyanate (PITC) réagit avec les groupes amines primaires et secondaires des protéines en présence d'un tampon de N-méthyl

pipéridine. Cette réaction se déroule à 45°C pendant 18 minutes, aboutissant à la formation d'une Phénylthiocarbamyl-protéine (PTC-Protéine).

✚ **Coupure** : La liaison peptidique subséquente à la liaison au PTC est affaiblie, facilitant ainsi sa coupure par l'acide trifluoroacétique (TFA) après 3 minutes. Cette réaction produit l'anilino-thiazolinone (ATZ) du premier acide aminé (AA), laissant la protéine dépourvue de son premier résidu.

✚ **Conversion** : L'ATZ-AA est alors éliminé du milieu réactionnel et converti en milieu acide (TFA à 25% dans l'eau) en phényl thio-hydantoïne (PTH-AA), une molécule plus stable. L'acide aminé phénylthiohydantoiné peut alors être analysé par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et sa nature est déterminée en comparaison à un standard de PTH-AAs. Ce cycle réactionnel est répété, aboutissant finalement à la séquence primaire de la protéine.

### **3.2. La lipase recombinante rFAL**

Une étape de pré-culture liquide a été réalisée dans un flacon Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu BMMY (phase de croissance) et incubée à 30 °C et 200 rpm pendant 24 h. Cette pré-culture a été utilisée pour inoculer des cultures plus grandes. La culture de production a été initiée dans un flacon Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu BMMY sans Zeocin<sup>TM</sup> à une densité optique de 1, facilitant ainsi l'entrée directe de la culture dans la phase de croissance exponentielle et garantissant des conditions reproductibles. La culture a été cultivée à 30°C avec une agitation orbitale à 230 tr/min. Pour induire la production de protéines, 1% de méthanol a été ajouté toutes les 24 heures. À l'issue de six jours de culture, lorsqu'un maximum d'activité lipolytique est observé, 500 mL du milieu de culture ont été soumis à une centrifugation à 9500 × g pendant 20 minutes pour éliminer tout débris cellulaire. L'échantillon obtenu a été purifié par chromatographie d'affinité Ni-IDA, préalablement équilibrée avec le tampon A. La protéine recombinante pure a été par la suite éluée au moyen d'une solution d'imidazole à 250 mM dans tampon A.

### **3.3. Purification de lipides**

#### **3.3.1. Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)**

✚ Isolation des acylglycérols

La séparation des acylglycérols suite à une hydrolyse enzymatique a été réalisée en utilisant des solvants non polaires tels que l'hexane. Le milieu réactionnel (200 µL) a été transvasé dans un tube en verre de 3 mL. Pour solubiliser les triglycérides (TG) résiduels, 200 µL d'hexane ont

été introduits dans les puits. Cette procédure a été répétée cinq fois, et les fractions collectées ont été ajoutées au volume d'extraction dans de tubes en verre de 3mL. Après une centrifugation (1000 x g) de 30 secondes, la phase organique a été séparée, évaporée et analysée par CCM.

#### ✚ Extraction des phospholipides

L'isolation des phospholipides après l'hydrolyse enzymatique a été réalisée en utilisant la technique Folch (Folch et al. 1957). Le milieu réactionnel (200  $\mu$ L) a été recueilli, le puits a été rincé avec de l'eau (200  $\mu$ L) et les phospholipides ont été solubilisés avec 200  $\mu$ L d'éthanol. Cette opération a été répétée. Les fractions collectées ont été réunies dans un tube en verre de 3 mL. L'extraction a été effectuée avec 1 mL de mélange chloroforme/méthanol, 2/1, v/v. Après une centrifugation à 1000 x g pendant 3 min, la phase organique a été recueillie, séchée avec du MgSO<sub>4</sub> et évaporée. Les lipides ont été solubilisés à nouveau avec 50  $\mu$ L d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v).

#### ✚ Analyse par CCM

Les dérivés lipolytiques générés par l'hydrolyse des phospholipides ont été séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur une plaque d'aluminium revêtue de gel de silice de 0,2 mm. Un système d'élution tridimensionnel composé de chloroforme, de méthanol et d'eau dans un ratio volumétrique de 65 :35:5, avec addition de BHT à 0,001% (w/v) en tant qu'agent antioxydant, a été utilisé. Pour les cas où des contaminants étaient détectés au front de migration, une seconde élution était réalisée dans une autre cuve après séchage complet de la plaque. Cette élution secondaire utilisait un système d'hexane/diéthyl éther/acide acétique (86/14/1, v/v/v), incluant 0,001% (w/v) de BHT. En ce qui concerne les produits lipolytiques issus des triglycérides, une séparation a été effectuée avec un système d'élution heptane:diéthyl éther:acide acétique (55:45:1, v/v/v). L'identification des lipides incorporant l'acide  $\alpha$ -oléostéarique a été réalisée sous une lampe UV à une longueur d'onde de 254 nm. La visualisation globale des lipides a été obtenue par carbonisation suite à une pulvérisation de la plaque de CCM avec une solution aqueuse combinant du sulfate de cuivre (10%) et de l'acide phosphorique (10%). Par la suite, la plaque a été incubée à 150°C pendant 10 minutes, permettant une représentation irréversible de toutes les chaînes carbonées présentes sur le chromatogramme.

## 4. Caractérisation biochimique

### 4.1. Les lipases Native et recombinantes

#### 4.1.1. Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique

##### ✚ L'effet de l'orlistat :

L'Orlistat, un inhibiteur puissant des lipases digestives, est un analogue de la lipstatine qui a été initialement isolés à partir de *Streptomyces toxytricini* [192]. Des études ont démontré que l'interaction entre l'anneau  $\beta$ -lactone ouvert de l'Orlistat et le résidu de la sérine catalytique de la lipase pancréatique forme un complexe acyl-enzyme stable avec une demi-vie prolongée, inhibant ainsi efficacement l'enzyme de manière stœchiométrique. Le taux d'hydrolyse du TC8 ou de la PC d'œuf par la FAL a été mesuré avec de l'Orlistat (40  $\mu$ M, concentration finale) à 40°C et à un pH de 9.

##### ✚ L'effet d'autres inhibiteurs :

La lipase FAL est incubée avec divers inhibiteurs spécifiques pendant une durée de 30 minutes à température ambiante, avec un rapport inhibiteur/enzyme de 100. Les activités enzymatiques résiduelles sont évaluées dans les conditions optimales pour l'enzyme. Parmi les inhibiteurs de protéases utilisés, on compte : le phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et le diisopropylfluorophosphate (DFP), qui sont des inhibiteurs spécifiques des protéases à sérine, l'inhibiteur de trypsine de Soja (SBTI), un inhibiteur spécifique de la trypsine, le N $\alpha$ -p-tosyl-L-phenylalanine chlorométhyl cétone (TPCK) et le N $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone (TLCK), des inhibiteurs spécifiques des protéases trypsine-like, la benzamidine, l'acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB), le N-éthylmaléimide (NEM), l'iodoacétamide, des inhibiteurs spécifiques des protéases à thiol, et l'acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA).

#### 4.1.2. Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique

Les conditions standard pour la mesure de l'activité enzymatique sont les suivantes : l'activité triglycéride lipase est évaluée à pH 9 et à 40°C pour l'enzyme native, tandis que pour l'enzyme recombinante, elle est évaluée à pH 9 et à 45°C. Par ailleurs, l'activité de la phospholipase est testée à pH 11 et à 45°C, et à pH 10 et à 50°C pour la forme recombinante. Ces mesures sont effectuées en absence (contrôle avec 2 mM d'EDTA, un agent chélatant) ou en présence de 2 mM de sels de métaux bivalents : Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>) ; Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub>) ; Mn<sup>2+</sup> (MnSO<sub>4</sub>) ; Zn<sup>2+</sup> (ZnSO<sub>4</sub>) ; Fe<sup>2+</sup> (FeSO<sub>4</sub>) ; Ni<sup>2+</sup> (NiCl<sub>2</sub>) ; Hg<sup>2+</sup> (HgCl<sub>2</sub>) ; Co<sup>2+</sup> (CoSO<sub>4</sub>) et Cu<sup>2+</sup> (CuSO<sub>4</sub>).

#### **4.1.3. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la lipase FAL**

Afin d'explorer le pH optimal pour l'activité de la FAL, celle-ci a été évaluée à diverses valeurs de pH, variant de 4 à 11, aux températures de 40 et 45 °C. La stabilité de la FAL vis-à-vis du pH a été déterminée en pré-incubant l'enzyme à une température de 25±2 °C pendant 1 heure dans les tampons suivants : 50 mM d'acétate de sodium (pH 4-6), 50 mM de phosphate de potassium (pH 6-8), 50 mM de Tris-HCl (pH 7-9), ou 50 mM de glycine-NaOH (pH 8-12).

#### **4.1.4. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la lipase FAL**

L'évaluation de la thermoactivité de FAL a été réalisée à des températures variées, allant de 25 °C à 55 °C, en utilisant un porte-cellule à température contrôlée. Quant à la thermostabilité de la FAL, des échantillons d'enzyme purifiée ont été incubés à quatre différentes températures (30 °C, 37 °C, 40 °C, et 45 °C) pour des durées variées (5 min, 15 min, 30 min, 60 min, et 90 min). Après la période d'incubation, les activités lipase et phospholipase résiduelles ont été déterminées en utilisant les conditions d'essai standard après centrifugation. L'enzyme qui n'a pas été chauffée et qui a été maintenue à 25±2 °C a été considérée comme étant à 100% (contrôle).

#### **4.1.5. Effet du CaCl<sub>2</sub> sur l'activité lipolytique**

Pour étudier la dépendance de l'enzyme vis-à-vis du calcium, nous avons ajouté de diverses concentrations de CaCl<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel puis les activités Lipolytiques résiduelles sont mesurées aux conditions optimales de l'enzyme.

#### **4.1.6. Effet de certains détergents synthétiques sur la stabilité de lipase**

La pertinence de l'utilisation de FAL en tant qu'ingrédient dans les biodétergents a été évaluée en testant sa stabilité en présence de certains agents de blanchiment tels que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NaBO<sub>3</sub>, des tensioactifs, de la zéolite, du SDS (sulfonate de linéaralkylbenzène) et du LAS (sulfobétaïne), des tensioactifs non ioniques (Triton X-100 et Tween-20, -40, -60, et -80), ainsi que des agents anti-redéposition [tétraacéthylènediamine (TAED), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tripolyphosphate de sodium (STPP), et Na<sub>2</sub>CMC]. D'autres composants de détergents ont également été testés comme précédemment rapporté par les auteurs [193]. L'activité lipase résiduelle a été déterminée à 40 °C et à un pH de 9. L'activité de FAL contrôle, en absence de tout additif, a été considérée comme étant à 100%.

#### 4.1.7. Effet des détergents liquides et solides commerciaux sur la stabilité enzymatique de lipase

La compatibilité et la stabilité des enzymes FAL, GZEL et Lipolase® en présence de divers détergents à lessive ont été étudiées, comme récemment décrit par les auteurs [187] et ailleurs [194]. Les détergents à lessive liquides utilisés étaient : Maison DET (CHIMI-DET, Mahdia, Tunisie), Det, et New Det (Sodet, Sfax, Tunisie), Skip (Unilever, France), et Class (EJM, Sfax, Tunisie). Les détergents à lessive solide utilisés étaient : Fino (FINO GmbH, Mangelsfeld, Allemagne), OMO (Unilever, France), Ariel (Procter & Gamble, Suisse), EcoVax, Omino Bianco, Dipex, Dixan, et Nadhif (Henkel-Alki, Tunisie). Chaque enzyme a été incubée avec chaque détergent à 40 °C pendant 1 heure avec 7 mg/mL des détergents commerciaux susmentionnés, et l'activité lipase résiduelle a été mesurée à une température et un pH optimal pour chaque enzyme utilisée, en utilisant le TC4 ou TC8 comme substrat. L'activité enzymatique en l'absence de tout détergent testé et incubée dans des conditions d'essai similaires a été considérée comme le témoin.

#### 4.1.8. Analyse de la Performance de lavage de la FAL

L'efficacité de la FAL en tant que composant de détergent a été testée sur des morceaux de tissu en coton blanc (7 cm × 7 cm) qui avaient été tachés avec de la sauce tomate, du ketchup ou du jaune d'œuf. Les pièces de tissu tachées ont été soumises à divers cycles de traitements de lavage utilisant une combinaison d'eau du robinet, de détergent Class (à une concentration finale de 7 mg/mL) et de solution de FAL (à 500 U/mL). Ces traitements ont été effectués à 40°C en agitant la solution pendant 30 min dans des flacons Erlenmeyer de 100 mL à 200 tours par minute. Ensuite, les morceaux de tissu ont été rincés deux fois à l'eau distillée et séchés. Ils ont ensuite été évalués visuellement pour déterminer l'efficacité de la lipase dans l'élimination des taches. L'extraction de trioléine (TC18) ou d'OO a été réalisée à l'aide d'un extracteur Soxhlet et d'éther de pétrole pendant 6 heures. La quantité d'OO éliminée a été déterminée en utilisant l'équation suivante [195]:

$$\% \text{ d'élimination} = \left[ \frac{\text{Poids total d'OO avant lavage (mg)} - \text{Poids total d'OO après lavage (mg)}}{\text{Poids total d'OO avant lavage (mg)}} \right] \times 100$$

#### 4.1.9. Analyse Statistique

Les essais ont été réalisés avec un minimum de trois expériences distinctes et les résultats ont été évalués dans des conditions identiques à celles du témoin, qui ne contenait pas de lipase. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne des résultats et de leur écart-

type ( $\pm$  SD). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls et de l'ANOVA. Les résultats obtenus ont été comparés pour identifier d'éventuelles différences statistiquement significatives. Une valeur P inférieure à 0,05 a été utilisée pour déterminer le niveau de signification. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Statgraphics 18.1.08.

#### **4.1.10. L'analyse de dichroïsme circulaire (CD)**

Les mesures de dichroïsme circulaire (CD) ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Chirascan (Applied Photophysics, SFR BioSciences UMS3444/US8, Protein Science Facility, Lyon, France), en utilisant un système de contrôle de température de type Peltier pour maintenir la température à l'intérieur de la cellule. Pour l'analyse de la structure secondaire, l'enzyme purifiée et homogène a été diluée dans différents tampons dans différentes conditions. Les données ont été recueillies de 260 à 190 nm à 20°C avec un pas de 0,5 nm, un temps de réponse de 1 s et une largeur de bande de 0,5 nm, en utilisant un débit de N<sub>2</sub> de 10 ml/min. L'enzyme purifiés ont été dilués dans du phosphate de potassium 10 mM pH 7,5 à 150 µg/ml pour ED-1 et ED-4 et 100 µg/ml pour ED-2 et ED-3. Sept spectres ont été collectés et moyennés pour chaque échantillon et le signal du tampon a été soustrait. Le signal CD a été enregistré en milli-degrés (mdeg) et converti en ellipticité molaire résiduelle moyenne par résidu ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\text{residue}^{-1}$ ).

La spectroscopie CD a également été utilisée pour déterminer la stabilité de la protéine dans des conditions de dénaturation, en mesurant le dépliage thermiquement induit et la température de fusion. À cette fin, l'échantillon a été chauffé de 20°C à 80°C à une vitesse de 1,0°C/min. La réversibilité de l'effet de la température a été évaluée en refroidissant l'échantillon dénaturé de 80°C à 20°C, en utilisant les mêmes paramètres décrits ci-dessus. Les valeurs obtenues dans les mesures CD (mDeg) ont été normalisées à l'ellipticité molaire résiduelle (MRE), et la température à la transition de mi-chemin (T<sub>m</sub>) a été obtenue en ajustant les données CD à une fonction de Boltzmann sigmoïdale. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Origin 8.1 (OriginLAB Corporation).

#### **4.1.11. Essai de déglycosylation**

Une quantité de 35 µg de protéines extracellulaires brute, préalablement dessalées, a été digérée avec 2 unités d'endo H (New England Biolabs, Frankfurt, Allemagne) à 37°C pendant 2 heures.

## 5. Techniques d'extraction et de manipulation de l'ADN

### 5.1. Extraction de l'ADN plasmidique

La préparation de plasmides à midi échelle se réalise suivant une série d'étapes bien définies. On commence par préparer une culture de 200 mL contenant l'antibiotique approprié pour chaque souche et plasmide. Cette culture est ensuite centrifugée à  $4\,000 \times g$  à  $20\text{ °C}$  pendant 10 minutes. Suite à la centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de resuspension contenant 50 mM de Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM d'EDTA, et 100 µg/mL de RNase A. Les cellules sont ensuite lysées grâce à une solution contenant 200 mM de NaOH et 1 % de SDS, ce qui dénature les ADN chromosomique et plasmidique. Par la suite, on ajoute un tampon de neutralisation constitué de 2,8 M d'acétate de potassium (pH 5,1) afin de renaturer l'ADN plasmidique et précipiter les débris cellulaires. Une colonne de purification est alors préparée en l'équilibrant avec un tampon d'équilibration contenant 100 mM de Tris (pH 6,3), 15 % d'éthanol, 900 mM de KCl, et 0,15 % de Triton X-100. L'échantillon est chargé sur la colonne et le filtre est lavé avec un tampon composé de 100 mM de Tris (pH 6,3), 15 % d'éthanol, et 1,15 M de KCl. L'élution est réalisée avec le même tampon mais à pH 8,5 et contenant seulement 1 M de KCl. Pour précipiter l'ADN, on utilise de l'isopropanol. L'ADN précipité est ensuite récupéré sur un filtre 0,2 µm, lavé successivement à l'éthanol puis à l'isopropanol, et séché avec des passages successifs d'air. Finalement, l'ADN est resolubilisé et élué dans l'eau.

### 5.2. Extraction de l'ADN génomique à partir de *Pichia*

Les souches sauvage ou recombinantes sont mises en culture en milieu riche (YPD) à  $30\text{ °C}$  durant une nuit. L'ADN est préparé comme suit : L'isolement de l'ADN génomique de la levure *P. pastoris* s'effectue en suivant une méthode élaborée par Marko Lõoke et ses collègues [196]. Les étapes, après une légère modification, sont comme suit :

D'abord, une colonie de levure est prélevée et suspendue dans 100 µL d'une solution composée de 200 mM d'acétate de lithium et de 1 % (p/v) de SDS. Cette suspension est ensuite incubée à  $70\text{ °C}$  pendant 10 minutes. Ensuite, 300 µL d'éthanol à une concentration de 96 % (v/v) sont ajoutés à la suspension. Ce mélange est agité vigoureusement puis centrifugé à  $10\,000 \times g$  pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu dans 500 µL d'éthanol à 70 % (v/v). Une fois encore, le mélange est agité et centrifugé à  $10\,000 \times g$  pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé pour une seconde fois, et le culot est resuspendu dans 100 µL d'eau. Après une agitation et une centrifugation à  $10\,000 \times g$  pendant 10 minutes, l'ADN génomique est récupéré dans le surnageant final. de levure est recueillie et mise en

suspension dans 100  $\mu$ L d'une solution contenant 200 mM d'acétate de lithium et 1 % (p/v) de SDS.

### **5.3. Quantification de l'ADN**

La détermination de la concentration et l'évaluation de la qualité des ADN, qu'ils soient génomiques ou plasmiques à 260 nm, sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre de type NanoDrop™.

### **5.4. Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les échantillons d'ADN sont différenciés à l'aide d'un gel d'agarose, dont la concentration varie entre 0,8 et 2 %, en fonction de la taille des fragments à distinguer. Ce gel contient du bromure d'éthidium à une concentration de 0,2 mg/L. La séparation des fragments d'ADN se produit au cours d'une migration de 15 à 25 minutes dans un tampon TAE, qui comprend 40 mM de Tris-acétate à pH 8,0, 24,2 g de Tris Base, 5,71 mL d'acide acétique glacial et 1,81 g d'EDTA (pour 1 L). L'identification des bandes d'ADN est facilitée par la fluorescence du bromure d'éthidium, qui se loge entre les bases nucléiques à la lumière UV.

## **6. Préparation des cellules compétentes et transformation**

### **6.1. Souche d'E. coli**

Les bactéries sont rendues réceptives à l'électroporation grâce à quatre cycles de rinçage avec de l'eau froide et sont ensuite stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une solution contenant 10% de glycérol. Ensuite, 40  $\mu$ L de ces bactéries sont mélangés avec 1 ng d'ADN (concentration de 1 ng/ $\mu$ L) et laissés pendant 5 minutes dans des cuvettes d'électroporation de 2 mm à  $0^{\circ}\text{C}$ . Ces bactéries sont ensuite soumises à une impulsion électrique de 1,5 kV pendant 5 millisecondes en utilisant un appareil MicroPulser 11 (BioRad). Ce choc électrique induit la création de pores dans la membrane cellulaire, facilitant l'entrée de l'ADN. Les bactéries sont ensuite récupérées dans 200  $\mu$ L de milieu LB sans antibiotique et incubées pendant 30 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Après cette période, 50  $\mu$ L de chaque échantillon transformé sont étalés sur des boîtes contenant du milieu LB-agar avec des antibiotiques ajoutés (concentration finale de 0,1 mg/mL).

#### **• Transformation par choc thermique**

Il faut mélanger 200  $\mu$ L de cellules compétentes fraîchement préparées avec 100 ng d'ADN plasmidique ou la moitié du produit de ligation, puis les mettre dans la glace pendant 1 heure. Ensuite, on applique un choc thermique en placent le mélange à  $42^{\circ}\text{C}$  pendant 2 minutes. On

ajoute ensuite 1,5 ml de milieu LB et on incube le tout pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Enfin, on étale le mélange sur une boîte de Pétri contenant l'antibiotique pour la sélection.

## 6.2. Souche de *Pichia pastoris*

La préparation des cellules compétentes de *Pichia pastoris* et leur transformation s'effectuent en suivant ces étapes :

- Un échantillon de *P. pastoris* est cultivé dans 50 mL de milieu YPG et incubé pendant 24 heures à une température stable de 30°C avec une agitation continue 200 rpm.
- Les cellules sont ensuite centrifugées à une vitesse relative de 1500 x g pendant 5 minutes à température ambiante.
- Les cellules sont lavées deux fois avec 40 mL d'eau stérile à température ambiante, puis à nouveau deux fois avec 20 mL de sorbitol 1M, également à température ambiante.
- Les cellules sont par la suite resuspendues dans un volume égal à 1,5 mL pour une densité optique initiale de 600 nm de 750 dans du sorbitol 1M. Ce mélange forme le stock de cellules compétentes.
- La transformation est effectuée avec de l'ADN plasmidique linéarisé par l'enzyme de restriction AvrII, puis purifié en utilisant le kit Qiaquick de Qiagen. Selon la concentration d'ADN, entre 400 ng et 2000 ng d'ADN sont combinés avec 80 µL de cellules compétentes dans une cuve d'électroporation.
- Un choc électrique de 2 kV est appliqué pendant 6 ms avec un MicroPulser (Bio-Rad) utilisant le programme Pic.
- Les cellules sont récupérées dans 1 mL de sorbitol 1M et incubées pendant au moins une heure à 30°C.
- Après l'incubation, les cellules sont centrifugées de la même manière qu'avant, et 500 µL de surnageant sont éliminés.
- Les cellules sont ensuite étalées en deux fractions (400 µL puis 100 µL) sur un milieu solide YPG contenant de la zéocine (100 µg/mL).
- Après une incubation de 48 heures à 30°C, les clones sélectionnés sont réétalés sur un milieu solide YPG contenant une concentration plus élevée de zéocine (200 µg/mL).

## 7. MÉTHODES ANALYTIQUES

### 7.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines a été réalisé en utilisant la technique de Bradford (1976). L'approche met en œuvre l'emploi du kit "Bio-Rad Protein Assay" de Bio-Rad, France. À chaque expérience, 200 µl de colorant, spécifiquement le bleu de Coomassie G250, sont mélangés avec 800 µl de solution protéique diluée. Dans les mêmes conditions expérimentales précédemment décrites. Cette méthode nécessite également la création d'une courbe standard, obtenue en utilisant l'albumine du sérum bovin comme protéine de référence, permettant ainsi d'estimer la quantité de protéine présente dans les échantillons.

## 7.2. Séparation des protéines sur gel d'acrylamide

L'évaluation de la pureté des protéines est effectuée grâce à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) à une concentration de 10 ou 12%. L'analyse des protéines dans des conditions dénaturantes par électrophorèse se fait selon le protocole établi par Laemmli en 1970. Pour chaque essai, 50 µg de protéines sont déposées dans chaque puits du gel et la séparation est effectuée par électrophorèse à une tension constante de 100 mV pendant 2 h.

## 7.3. Coloration au bleu de Coomassie

Cette technique permet d'évaluer les protéines, indépendamment de leur séquence. Suite à l'électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de coloration qui contient 1 g de bleu de Coomassie R250 (fourni par BioRad), mélangé à 50 ml d'acide acétique, 250 ml d'éthanol et 200 ml d'eau. Après cette étape, le gel est transféré dans une solution de décoloration composée de 100 ml d'acide acétique, 350 ml d'éthanol et 650 ml d'eau. Pour conserver le gel et achever le processus de décoloration tout en empêchant la croissance bactérienne, le gel est stocké dans de l'eau additionnée de 20% d'éthanol. Finalement, le gel est séché ou scanné pour analyse.

## 8. Modélisation et docking moléculaire :

Nous avons choisi de modéliser l'état ouvert de la FAL, qui est nécessaire pour l'ancrage du substrat dans son site actif. Comme aucune structure cristalline n'était disponible pour la FAL, la modélisation moléculaire a été réalisée en utilisant Alphafold 2.2.0 (service interne chez PRABI). Afin d'obtenir un modèle de FAL avec un couvercle ouvert, nous avons utilisé la structure de la TTL dans cette conformation comme modèle (PDB 1GT6) [197]. En bref, une superposition structurale de notre modèle fermé de FAL sur la structure ouverte de la TTL, suivie d'un échange manuel du couvercle fermé par le couvercle ouvert, a été réalisée à l'aide du programme COOT [198]. Le même programme a été utilisé pour effectuer des corrections mineures en réorientant les chaînes latérales du site actif de manière similaire à leur conformation trouvée dans la structure ouverte de la TTL et pour muter la sérine catalytique 144 en une glycine. Cette modification structurale permet l'ancrage des substrats imitant leurs états de transition dans le trou d'oxyanion du site actif après l'attaque nucléophile. Le docking d'un 1,2-diacyl-*sn*-phosphoglycérol (PG) ou d'un TG dans la structure du modèle FAL a été réalisé en utilisant AutoDockVina intégré dans PyRx 0.8 [199] [200]. En bref, le modèle FAL a été préparé pour le docking en ajoutant des atomes d'hydrogène polaires à l'aide de Discovery Studio Visualizer. Le même programme a été utilisé pour construire les molécules de substrats

en fichiers PDB et pour la minimisation de l'énergie. PyRx a été utilisé pour convertir toutes les molécules au format AutoDock Ligand (PDBQT). La grille tridimensionnelle pour la simulation de docking moléculaire a été obtenue en utilisant les outils Autodock. La boîte de grille a été centrée pour couvrir le site actif et tous les résidus essentiels. Les résultats du docking ont été analysés en comparant les interactions de liaison et les énergies de liaison entre les molécules de substrat et l'enzyme.

# Résultats et discussion

---

## *Chapitre I : Purification et caractérisation biochimique de la lipase de *Fusarium annulatum* Bugnicourt.*

---

### Article 1 :

- **Ahlem Dab**, Ismail Hasnaoui, Sondes Mechri, Fawzi Allala, Khelifa Bouacem, Alexandre Noiriel, Amel Bouanane-Darenfed, Ennouamane Saalaoui, Abdeslam Asehrou, Fanghua Wang, Abdelkarim Abousalham, Bassem Jaouadi. **Biochemical Characterization of an Alkaline and Detergent-Stable Lipase from *Fusarium annulatum* Bugnicourt Strain CBS Associated with Olive Tree Dieback.** *Plos one*, **2023**, vol. 18, no 5, p. e0286091. DOI : [10.1371/journal.pone.0286091](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286091)

## **1. Introduction**

Les lipases se sont révélées être des biocatalyseurs industriels importants en raison de leur capacité à catalyser un vaste éventail de réactions chimiques. Il a été démontré que les microorganismes, y compris les champignons et les bactéries, sont des sources préférentielles pour la production à grande échelle de lipases. Les atouts majeurs des lipases microbiennes résident dans leur (i) stabilité dans des solvants organiques, (ii) indépendance vis-à-vis des cofacteurs, (iii) large spectre de spécificité de substrat, (iv) haute énantiosélectivité, et (v) facilité de production à grande échelle [172, 201].

L'intérêt croissant de l'industrie pour les lipases microbiennes a stimulé la recherche de nouvelles souches microbiennes productrices de lipases. Les microorganismes ont démontré leur capacité d'adaptation à des environnements hostiles tels que les lacs alcalins, les sources thermales, les réservoirs de pétroliers, les sols et les effluents pollués, offrant un potentiel immense pour la production de lipases ayant une activité catalytique et une stabilité dans des conditions extrêmes [143]. L'identification de nouvelles souches microbiennes productrices de lipases fait l'objet de nombreuses recherches mondiales, grâce à des méthodes diversifiées de criblage et l'emploi croissant du criblage génétiquement et métagénomique [101, 202].

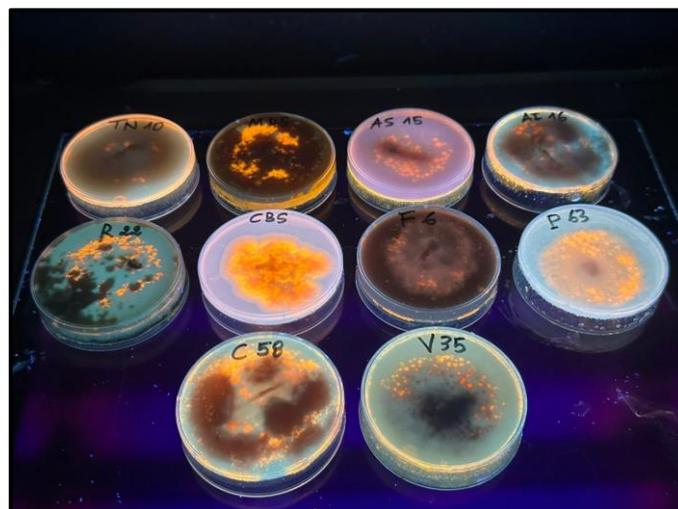
Les enzymes jouent un rôle fondamental dans l'industrie des détergents. Leurs propriétés uniques permettent d'éliminer une variété de taches courantes tout en minimisant l'impact sur les tissus et l'environnement. Elles offrent une efficacité de nettoyage exceptionnelle et sont faciles à utiliser. C'est cette nécessité croissante d'améliorer la qualité du nettoyage, tout en étant respectueuse de l'environnement, qui a permis aux enzymes d'occuper une place prépondérante dans ce secteur. En effet, la détergence se distingue comme l'application la plus significative des enzymes, représentant environ 40% de la part de marché mondiale des enzymes. Cela témoigne non seulement de la popularité croissante des enzymes dans l'industrie des détergents, mais aussi de leur rôle indispensable dans la promotion de méthodes de nettoyage plus durables et respectueuses de l'environnement [44, 203, 204]. L'objectif principal de ce premier chapitre consiste à :

- Cribler et identifier une nouvelle souche fongique productrice d'une lipase extracellulaire ayant des propriétés physicochimiques intéressantes.
- Purifier et déterminer les propriétés biochimiques de la lipase purifiée, par rapport aux lipases apparentées.
- Estimer l'efficacité et les performances enzymatiques de cette lipase dans la formulation de détergents de lavage.

## 2. Ciblage des souches fongiques productrices de lipases extracellulaires

Dans ce cadre des isolats de champignons ont été collectés dans deux régions géographiquement distinctes du sud Tunisien, notamment la région de Gabès (El Amarat, coordonnées GPS : 34°33' N, 10°07' E) et Tataouine (Henchir El Ghazal, coordonnées GPS : 33°40' 12N, 10°38' E). Ces deux régions se caractérisent par un climat aride. Au total, 67 isolats fongiques ont été prélevés du sol et de l'espèce d'olivier dominante, *Olea europaea* cv. Chemlali. Suite à ces échantillonnages, seuls 20 espèces fongiques ont été retenues. Ces espèces appartenaient à huit genres différents, à savoir *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Macrophomina*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Fusarium*, ont été isolés et amenés jusqu'à la phase de culture monomorphe. L'évaluation du potentiel lipolytique des différentes souches a été réalisée par un test de fluorescence, basé sur l'interaction des acides gras libérés avec la rhodamine B, produisant des halos fluorescents oranges visibles sous UV autour des colonies microbiennes [205]. L'utilisation de la Rhodamine B, n'affectant ni la croissance microbienne ni ses caractéristiques physiologiques, est avantageuse pour les études microbiologiques [206, 207].

Après 5 jours d'incubation à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , dix champignons (TN10, M45, AS15, AI16, R22, CBS, F6, P63, C58 et V35) ont montré une activité lipasique. (Figure19). Suite à l'évaluation de la production de lipases, la souche CBS a démontré une fluorescence significativement plus élevée comparée aux autres souches étudiées. Ceci indique une activité lipolytique supérieure et, par conséquent, cette souche a été sélectionnée pour le reste de ce travail.



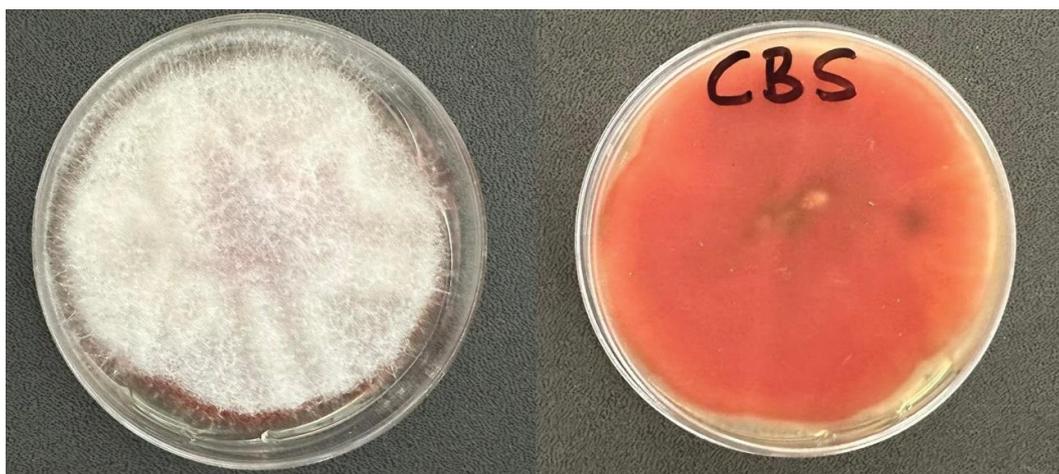
**Figure 20 :** Halos fluorescents de champignons producteurs de lipase. Sur un milieu d'agar à l'huile d'olive à 1% (v/v) avec rhodamine B, observés sous lumière UV à 365 nm. Dix champignons producteurs de lipase (TN10, M45, AS15, AI16, R22, CBS, F6, P63, C58, et V35) ont été obtenus, montrant des activités lipasiques variables. Après une incubation de 5 jours à  $25^\circ\text{C}$ , les boîtes de Pétri ont été soumises à UV.

### 3. L'identification de la souche CBS par taxonomie classique et moléculaire

#### 3.1. Caractéristiques morphologiques

Les colonies de la souche fongique CBS, cultivées sur milieu solide PDA, présentaient un diamètre moyen de  $55 \text{ mm} \pm 4 \text{ mm}$  après 4 jours d'incubation à l'obscurité à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Le développement de l'isolat a également été évalué sur PDA après six jours d'incubation, et le diamètre moyen de la colonie était de  $83 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$ . Le mycélium aérien observé sur PDA était limité et présentait une couleur blanc pâle, couvrant toute la surface du milieu dans chaque plaque de culture.

Les données ont révélé que la culture de la souche fongique CBS présentait une pigmentation pourpre profonde caractéristique sur PDA (Figure 20). Typiquement, le mycélium aérien avait une texture moelleuse qui apparaissait initialement blanche, mais en mûrissant, il prenait une teinte pourpre et devenait gris à certains endroits. Parfois, des sporodochies pourpres foncées étaient observées. Les macroconidies rares présentaient de fines septations droites (3-4). Les longueurs des macroconidies variaient de  $15 \text{ }\mu\text{m}$  à  $56 \text{ }\mu\text{m}$  et les largeurs allaient de  $1,9 \text{ }\mu\text{m}$  à  $3,5 \text{ }\mu\text{m}$ . Les cellules apicales des macroconidies étaient arrondies, et les cellules basales étaient en forme de pied. De nombreuses microconidies étaient observées en longues chaînes attachées à des monophylies et des polyphylies. Les microconidies ne présentaient aucune cloison, et leurs formes variaient largement, allant d'obovoïdes ou étroitement ovales avec une base tronquée à fusiformes, avec des tailles allant de  $4,8 \text{ }\mu\text{m}$  à  $14,1 \text{ }\mu\text{m} \times 1,8 \text{ }\mu\text{m}$  à  $2,4 \text{ }\mu\text{m}$ . Aucune chlamydospore n'était présente.



**Figure 21** : Colonie de la souche CBS isolée des champignons du sol de l'olivier, *Olea europaea* cv. Chemlali.

### 3.2. Identification moléculaire et analyse phylogénique

Pour l'identification moléculaire, les régions de l'ADN englobant les *ITS1-5.8S* et *ITS2* (les Espaceurs internes transcrits), *RPB2* (la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II), *TEF1- $\alpha$*  (le facteur d'élongation 1- $\alpha$ ) de l'ADN ribosomal a été séquencée. Cette région a été identifiée comme une cible appropriée pour l'analyse de la phylogénie fongique, ce qui en fait un choix approprié pour cette étude [208, 209]. La PCR a généré des fragments de 840 pb, 690 pb et 937 pb pour les gènes *ITS*, *TEF1- $\alpha$*  et *RPB2* de l'isolat CBS, respectivement. Ces séquences ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accessions (OQ122083, OQ181215, et OQ181216).

L'analyse BLAST a révélé une correspondance de 100% entre le gène *ITS* de CBS et celui de *Fusarium annulatum* (MH862668). Les gènes *TEF1- $\alpha$*  et *RPB2* ont montré respectivement 99,28% et 99,47% de similitude avec les séquences de *Fusarium annulatum* CBS 258.54 (MT010994 et MT010983).

La recherche BLAST dans la base de données *Fusarium-ID* a confirmé que CBS appartient au complexe d'espèces *Fusarium fujikuroi* (FFSC). L'arbre phylogénétique montre que l'isolat CBS fait partie d'un groupe de souches de la section *Fusarium* et il est maintenu par 86% des nœuds (Figure 21).

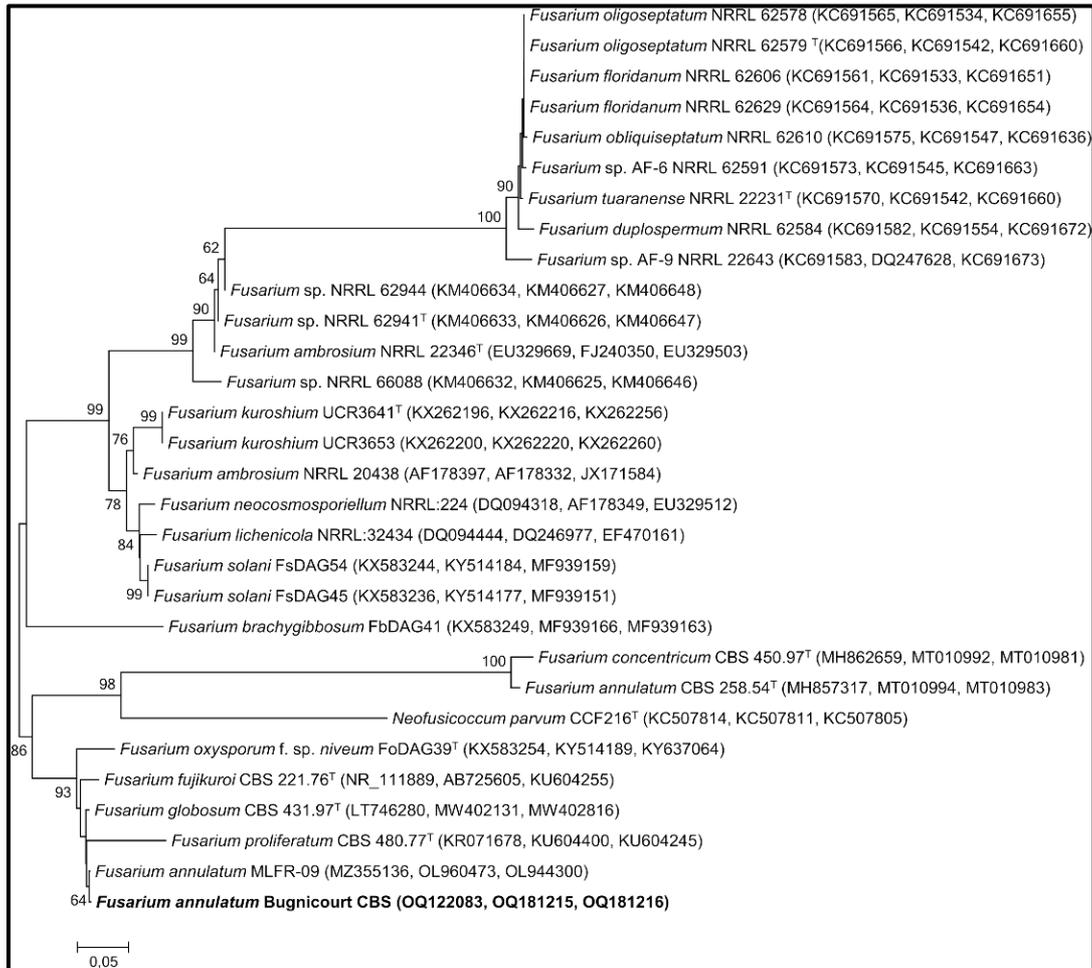


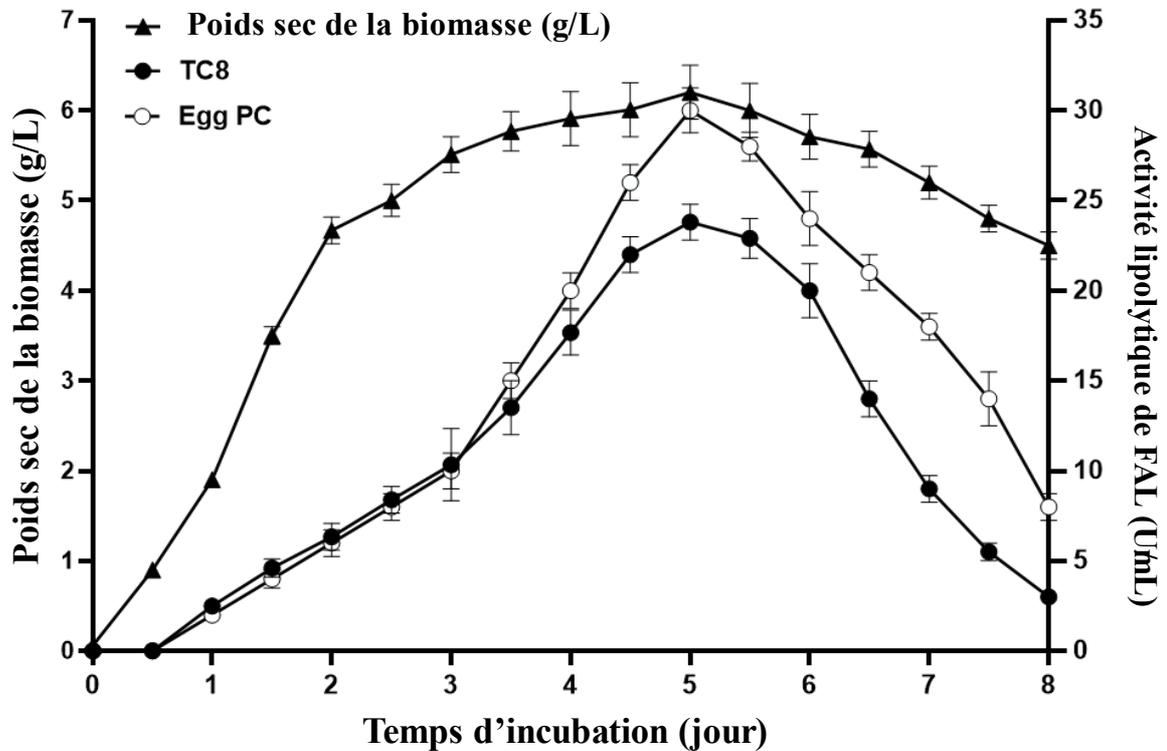
Figure 22 : Arbre phylogénétique de la souche CBS.

#### 4. Optimisation de la production de la lipase extracellulaire par *Fusarium annulatum*

La production des lipases fongiques, qui sont majoritairement des enzymes extracellulaires, est fortement conditionnée par la composition du milieu de culture et les conditions d'incubation. Plusieurs facteurs, tels que les sources de carbone et d'azote, la présence d'éléments activateurs ou inhibiteurs, la température et le pH d'incubation, ainsi que la dimension de l'inoculum peuvent impacter la production de lipase [101]. Dans le cas de la lipase de *Fusarium annulatum* CBS, aussi designer FAL, une amélioration de la production a été réalisée par le biais de l'approche classique, un facteur à la fois (OFAT), durant laquelle différentes sources de carbone ont été testé.

Ces analyses préliminaires indiquent que l'activité de la FAL est réprimée par le glucose, alors qu'elle est stimulée par l'huile d'olive (HO). Les conditions de culture de cette souche ont été affinées pour favoriser une production élevée de l'activité lipolytique. Un volume de 50ml de la pré-culture est placé dans des erlenmeyers de 250 ml, sans huile d'olive, pendant 24 heures à 30°C et à 160 rpm. Le milieu de culture est par la suiteensemencé avec 1% (v/v) de la pré-culture et 1% (v/v) d'huile d'olive. L'activité lipasique atteint son maximum de 25 U/mL ou 30

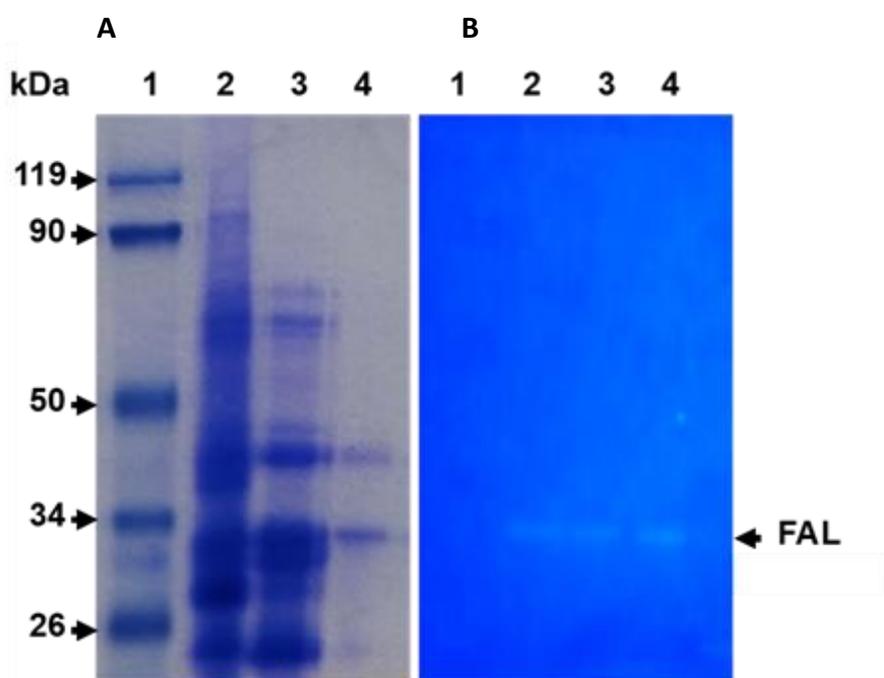
U/mL, respectivement, en utilisant TC8 ou le PC d'œuf comme substrats après 5 jours de culture. Ce maximum coïncide avec le pic de croissance microbienne (6g/l). Une baisse progressive de la production est observée après ce pic, probablement en raison de l'action d'autres protéases libérées durant la lyse cellulaire et/ou la sporulation (figure 22).



**Figure 23:** Cinétiques de production des activités lipolytiques de la souche *Fusarium annulatum* Bugnicourt CBS. La biomasse (poids sec des mycéliums) (Δ) et l'activité enzymatique lipolytique en utilisant le TC8 (●) ou Egg PC (○) comme substrat sur un milieu de culture optimisé sont présentées. Chaque point représente la moyenne (n = 3) ± écart type.

## 5. Purification et caractérisation biochimique de la lipase

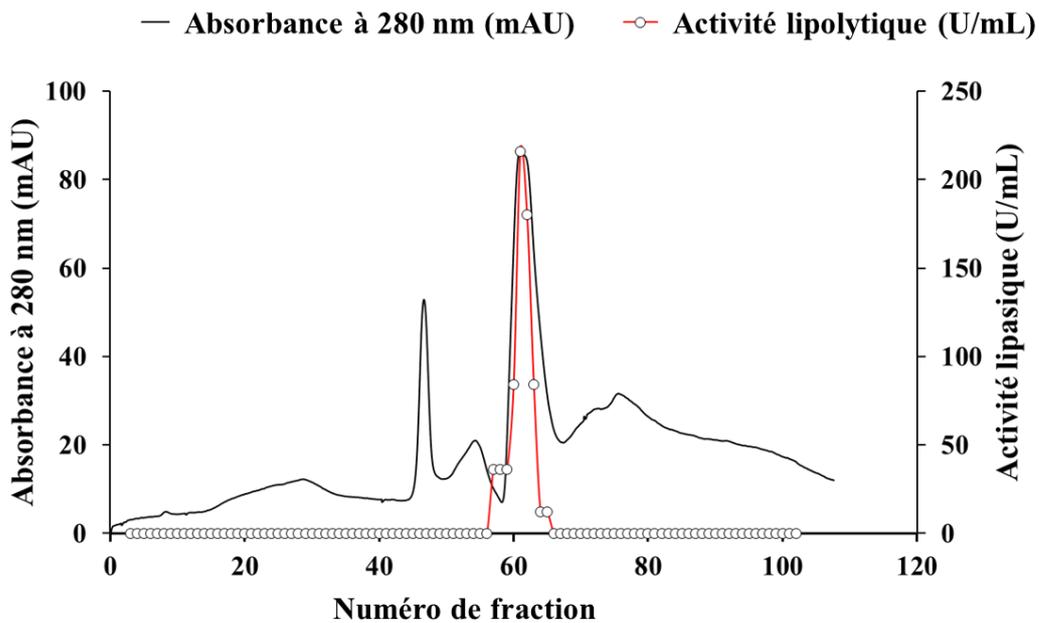
Après 5 jours, 500 mL du milieu de culture de la souche CBS ont été collectés et initialement filtrés en utilisant du papier filtre Whatman n°1. Par la suite, le filtrat a été centrifugé pour obtenir un surnageant clair ayant une activité lipolytique spécifique de 225 U/mg sur TC8. Le surnageant a d'abord été soumis à une précipitation à 80% avec du sulfate d'ammonium. Par la suite, le précipité a été dialysé d'une nuit à 4°C contre le tampon B puis centrifugé pour extraire les protéines solubles. Cette fraction a été ensuite chargée sur une colonne de filtration sur gel Superdex® 200 Increase 10/300 GL. Les fractions présentant une activité lipasique ont été ultérieurement purifiées à l'aide de colonnes HiTrap® Q-Sepharose en utilisant un gradient linéaire de NaCl (0-500 mM) dans le tampon A. Le pic d'activité lipasique est apparu entre 180 et 200 mM de NaCl (Fig 5).



**Figure 24 :** Profil d'éluion de la purification de FAL sur une colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF. Piste 1, marqueurs de masse moléculaire ; piste 2, fraction de précipité au sulfate d'ammonium (80%) après dialyse ; piste 3, fraction obtenue après chromatographie de filtration sur gel sur colonne Sephacryl S-200 ; pistes 4 et 5, fractions purifiées à partir de la colonne Q-Sepharose FF.

L'analyse par électrophorèse dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE 10%) de la fraction protéique active a montré une bande protéique majeure avec une masse moléculaire d'environ 33 kDa, ainsi qu'une bande protéique d'intensité faible avec une masse moléculaire de 40 kDa (Figure 23). Alors que l'analyse du zymogramme des fractions purifiées a révélé une seule bande de lipase active colorée avec le substrat lipasique fluorogénique butyrate de 4-méthylumelliférone (MUFB) et cette activité est associée à une protéine de 33 kDa (Fig23B

droit, lignes 3, 4 et 5). Cette masse moléculaire est similaire à celle rapportée pour les lipases de *Fusarium solani* [61], *Fusarium oxysporum* [210], et *Fusarium graminearum* [124]. La première séquence NH<sub>2</sub>-terminale de la FAL électrotransférée sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) a permis d'identifier 15 résidus, qui se sont avérés être E-T-C-M-D-K-G-S-K-V-T-E-W-T-V. Des recherches BLAST ont révélé que cette séquence NH<sub>2</sub>-terminale présentait un haut degré d'identité (94%) avec diverses protéines non caractérisées du même genre qui n'ont été que partiellement séquencées (autour de 18 kDa). Par conséquent, il n'a pas été possible de trouver le motif du coude nucléophile hautement conservé (GX<sub>2</sub>SXG, où X peut être n'importe quel acide aminé sauf proline) qui comprend le résidu de sérine catalytique trouvé dans la famille des lipases. Il serait intéressant de réaliser le clonage moléculaire du gène *lipFAL* codant pour la protéine FAL afin de déterminer la séquence complète de la protéine. Les résultats du processus de purification de la FAL sont résumés dans le Tableau 9.



**Figure 25:** Profil chromatographique de la purification de FAL sur colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF. Les protéines adsorbées ont été éluées avec un gradient linéaire de NaCl de 0 à 5 M dans le tampon A.

**Tableau 8 :** Bilan de purification de FAL.

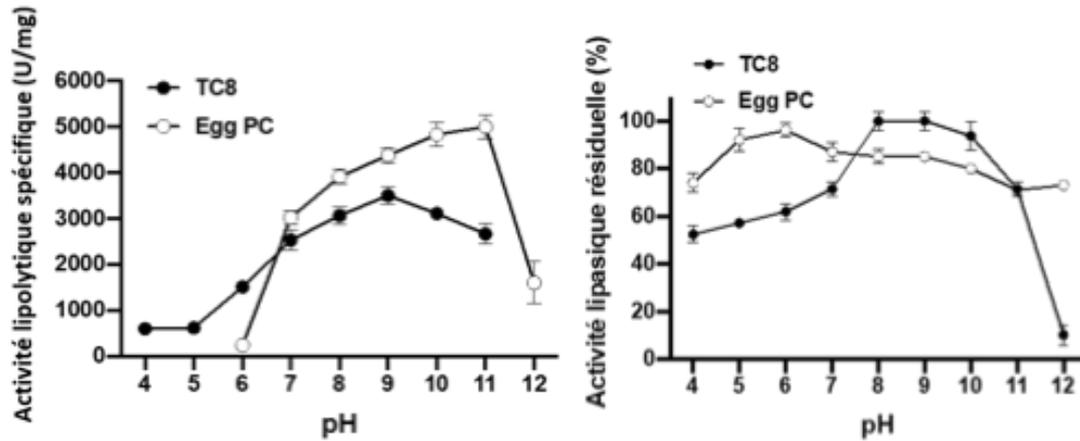
Étapes de purification <sup>a</sup>	Activité totale (U) <sup>b</sup>	Protéine totale (mg) <sup>c</sup>	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification (n-Fois)	Rendement de purification (%)
Extrait brut	11900 ± 34	225 ± 4	53 ± 2	1	100
Précipitation 80% par (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5800 ± 15	8 ± 1	725 ± 5	14	49
Colonne Superdex <sup>®</sup> 200 Increase 10/300 GL	3750 ± 10	1,5 ± 0	2500 ± 7	53	32
Colonne HiTrap <sup>™</sup> Q-Sepharose FF	560 ± 3	0,16 ± 0	3500 ± 9	62	21

Ces résultats indiquent que la lipase FAL, produite par souche *Fusarium annulatum* CBS, a été purifiée à partir du milieu de culture en trois étapes avec un facteur de purification de 62 fois et un rendement de 21 %. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée sur TC8, est de à 3500 U/mg.

## 6. Caractérisation biochimique de la lipase

### 6.1. Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la FAL

Les propriétés enzymatiques de FAL ont été testées en utilisant les substrats TC8 et l'Egg PC dans différents intervalles de pH. Le profil d'activité en fonction du pH est illustré à la Fig 25A. Il a été démontré que FAL est hautement actif sur les triglycérides (TGs et TC8) dans l'intervalle de pH de 8 à 10, atteignant un pH optimal à 9. Il est important de noter qu'à pH 7 et pH 11, cette activité lipasique sur TGs représente environ 70% de l'activité maximale enregistrée à pH 9. Toutefois, cette activité lipasique diminue considérablement à pH 5 (30% de l'activité maximale, Fig 25A). De manière intéressante, FAL a présenté une activité PLA1 maximale dans un intervalle de pH assez étroit de 9 à 11, avec un pH optimal à 11 (Fig 6A), classant ainsi FAL comme une enzyme alcaline. Afin de déterminer la stabilité de FAL en fonction du pH, l'enzyme a été pré-incubée à température ambiante (25±2 °C) dans un large intervalle de pH allant de 4 à 12 pendant 1 heure. Comme indiqué à la Fig 6B, FAL a démontré une stabilité exceptionnelle dans l'intervalle de pH de 5 à 11 et a conservé 100% de ses activités maximales entre pH 8 et 9 sur TC8, et entre 75 % et 100% de ses activités maximales dans l'intervalle de pH de 4 à 12 sur Egg PC.

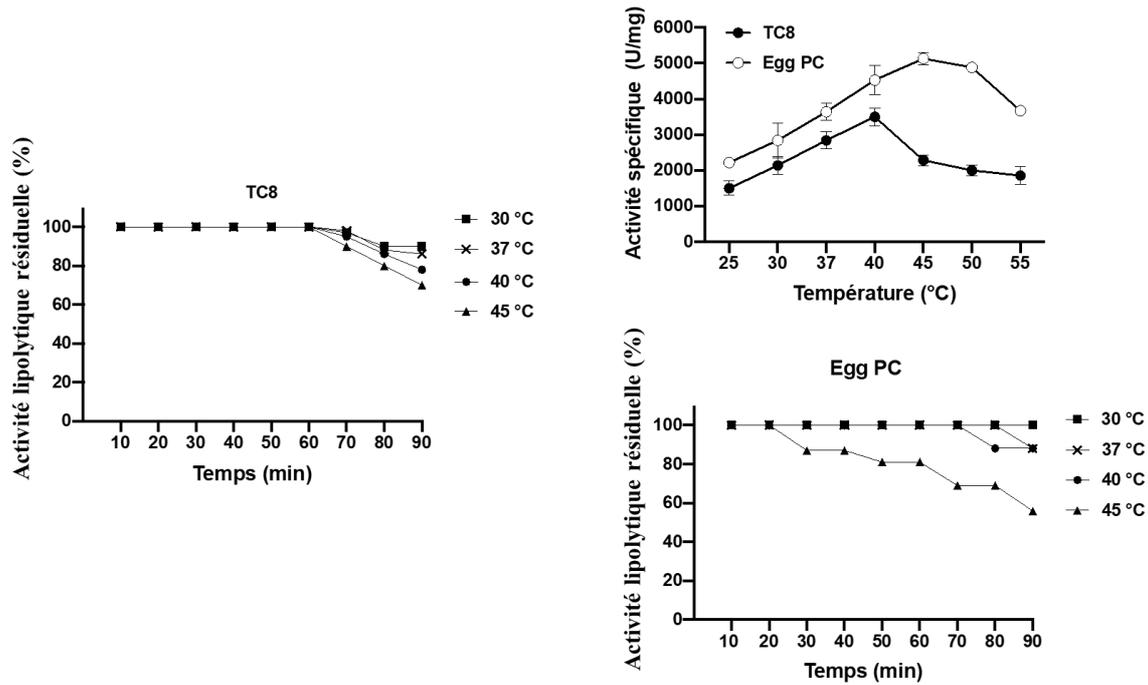


**Figure 26 :** Effets du pH sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la FAL. La caractérisation de la FAL purifiée a été faite en utilisant le TC8 ou Egg PC à 40 °C dans des conditions standard. Le profil de pH a été déterminé dans différents tampons en variant les valeurs de pH de 4 à 12. La stabilité au pH de la FAL a été déterminée en incubant l'enzyme à différentes valeurs de pH, allant de 4 à 12, pendant 1 h à 40 °C et l'activité résiduelle a été mesurée à pH 9 sur le TC8 ou à pH 11 sur Egg PC, également à 40 °C. L'activité maximale sur TC8, obtenue à pH 9, ou sur Egg PC, à pH 11, a été considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

## 6.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la FAL.

L'activité de FAL a été évaluée dans les conditions standard de test à des températures allant de 25°C à 55 °C. Les données révèlent que FAL montre une activité maximale de TG lipase et PLA1 à 40°C et 45 °C respectivement (Fig 7A).

Le profil de thermostabilité de FAL démontre que la lipase conserve toute son activité à des températures relativement élevées (supérieures à 40 °C). Les activités de lipase TG (Fig 7B) et PLA1 (Fig 7C) de FAL sont maintenues à 100% après une incubation de l'enzyme à 30 °C, 37 °C, ou 40 °C pendant 1 heure. Alors que l'activité de lipase TG de FAL est conservée à 100% après une incubation de l'enzyme à 45 °C pendant 1 heure (Fig 7B), l'activité PLA1 est réduite à 80% de l'activité PLA1 maximale dans les mêmes conditions (Fig 7C).



**Figure 27 :** Effets de la température sur l'activité et la stabilité de FAL. A: L'activité enzymatique à différentes températures a été déterminée en utilisant TC8 ou le PC d'œuf à pH 9. B: La stabilité de FAL a été évaluée en mesurant l'activité résiduelle sur "TC8" à pH 9 après une incubation à diverses températures pendant des durées indiquées. C: L'activité résiduelle de FAL sur le PC d'œuf à pH 11 a été mesurée après incubation à différentes températures. Toutes les expériences ont été réalisées dans des conditions standard.

### 6.3. Effect of Metal Ions on FAL Activity

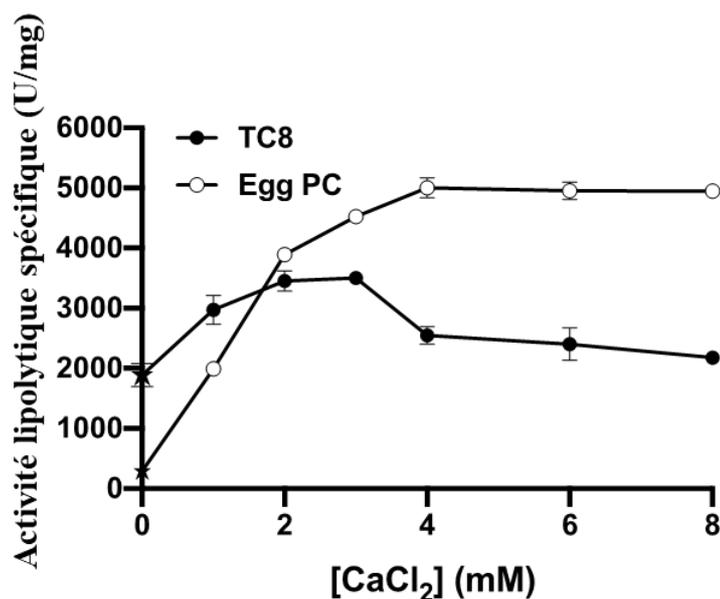
Des agents chélateurs tels que l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et l'acide éthylène glycol-bis-(β-aminoéthyl éther)-N,N-tétra-acétique (EGTA) ont entravé l'activité de la FAL, suggérant l'importance des cofacteurs métalliques pour la fonction enzymatique (Tableau 4).

En conséquence, l'impact de divers ions divalents sur l'activité de la FAL a été évalué. Selon les données du Tableau 4, l'incubation a entraîné une augmentation de l'activité lipasique (1 mM) en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  (augmentation de 176%, 150% et 116% respectivement) par rapport au témoin. À l'inverse,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  ont réduit l'activité de la FAL de 92% et 34% respectivement (Tableau 4). Plusieurs ions de métaux lourds ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , et  $\text{Cd}^{2+}$ ) ont complètement inhibé la FAL, tandis que  $\text{Zn}^{2+}$  a réduit l'activité enzymatique de 60% (Tableau 4). Un effet inhibiteur modeste (10%) a été observé avec  $\text{Ba}^{2+}$ . Aucun impact sur l'activité de la FAL n'a été détecté en présence de  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Tableau 9** : Effets de divers ions métalliques sélectionnés, d'inhibiteurs et de réactifs chimiques sur l'activité lipolytique de FAL purifiée à partir de la souche de *Fusarium annulatum* bugnicourt CBS.

Ions métalliques /Inhibiteurs/Réactifs chimiques	Concentration (mM) <sup>a</sup>	Activité lipasique résiduelle (%) <sup>b</sup>
None	–	100 <sup>b</sup> ± 3
Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> )	1	176 <sup>a</sup> ± 6
Fe <sup>2+</sup> (FeSO <sub>4</sub> )	1	66 <sup>bc</sup> ± 2
Mn <sup>2+</sup> (MnCl <sub>2</sub> )	1	150 <sup>a</sup> ± 5
Mg <sup>2+</sup> (MgCl <sub>2</sub> )	1	116 <sup>b</sup> ± 4
Ba <sup>2+</sup> (BaCl <sub>2</sub> )	1	90 <sup>b</sup> ± 3
Zn <sup>2+</sup> (ZnSO <sub>4</sub> )	1	40 <sup>cd</sup> ± 1
Cu <sup>2+</sup> (CuCl <sub>2</sub> )	1	100 <sup>b</sup> ± 3
Co <sup>2+</sup> (CoCl <sub>2</sub> )	1	8 <sup>d</sup> ± 0
Ni <sup>2+</sup> (NiCl <sub>2</sub> )	1	0
Hg <sup>2+</sup> (HgCl <sub>2</sub> )	1	0
Cd <sup>2+</sup> (CdCl <sub>2</sub> )	1	0
None	–	100 <sup>b</sup> ± 3
PMSF	5	0
DIFP	2	0
Benzamidine	2	103 <sup>b</sup> ± 3
DTNB	10	69 <sup>bc</sup> ± 2
NEM	2	90 <sup>b</sup> ± 2
Iodoacetamide	5	102 <sup>b</sup> ± 3
PAO	10	97 <sup>b</sup> ± 2
β -ME	10	98 <sup>b</sup> ± 2
DL-DTT	10	96 <sup>b</sup> ± 2
EDTA	10	57 <sup>b</sup> ± 2

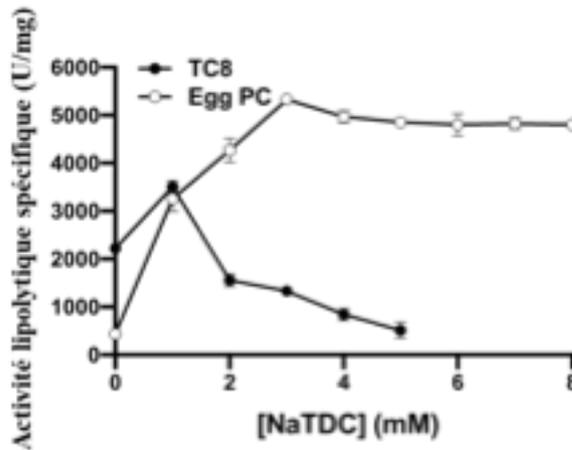
Etant donné que la présence de calcium a considérablement augmenté l'activité lipolytique de la FAL, l'impact de différentes concentrations de Ca<sup>2+</sup> sur l'activité de la FAL a été évalué. En absence de Ca<sup>2+</sup> et en présence de 10 mM d'EDTA (Figure 27), seulement 57% de l'activité lipasique TG (Tableau 4) et 6% de l'activité PLA1 ont été mesurées. Avec l'addition de Ca<sup>2+</sup>, l'activité lipasique TG a augmenté, jusqu'à 3500 U/mg en utilisant le TC8 comme substrat à 40 °C et pH 9 en présence de 2-3 mM de CaCl<sub>2</sub>. Au-delà, l'activité lipasique TG a légèrement diminué, pour se stabiliser à 2100 U/mg en présence de 4-8 mM de CaCl<sub>2</sub> (Figure 27). Notamment, l'activité PLA1 de la FAL s'est accrue avec l'augmentation des concentrations de Ca<sup>2+</sup>, atteignant un maximum à 5000 U/mg en présence de 4 mM de CaCl<sub>2</sub>.



**Figure 28:** Effet du calcium sur l'activité de la FAL. Impact de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'activité de la FAL. L'activité enzymatique a été mesurée à des concentrations croissantes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les émulsions de TC8 utilisées comme substrat pour l'activité lipasique en présence de 2 mM de NaTDC, et l'Egg PC utilisé comme substrat pour l'activité PLA1 en présence de 4 mM de NaTDC.

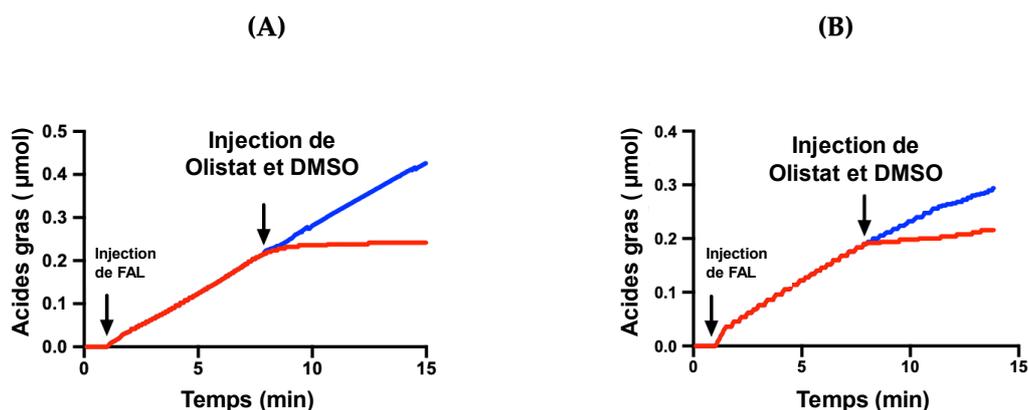
#### 6.4. Effet des sels biliaries, des inhibiteurs et des réactifs chimiques sur l'activité de la FAL.

Comme les agents tensioactifs sont fréquemment utilisés dans les tests de lipase, augmentant potentiellement l'activité de la lipase par activation interfaciale [211], nous avons examiné l'effet du NaTDC sur l'activité de la FAL. Comme la montre la Fig 28, la présence de sels biliaries semble augmenter l'activité lipasique TG de la FAL jusqu'à une concentration limitante de 1 mM, pour atteindre son activité spécifique maximale de 3500 U/mg. Cependant, au-delà de 1 mM de NaTDC, l'activité lipasique TG diminue rapidement, jusqu'à 60% et 20% de l'activité résiduelle à 2 et 5 mM NaTDC, respectivement (Figure 27). L'inhibition exercée sur l'activité lipasique de la FAL par NaTDC, à des concentrations supérieures à 1 mM, pourrait être due au fait que le NaTDC empêche la liaison de l'enzyme à l'interface du substrat lipidique. Concernant l'activité PLA1 de la FAL, l'enzyme a une faible activité PLA1 (410 U/mg) en l'absence de NaTDC et cette activité augmente progressivement avec l'augmentation des concentrations de NaTDC, atteignant une activité maximale (5000 U/mg) à 3 mM NaTDC. Au-delà de 3 mM de NaTDC, l'activité PLA1 de l'enzyme diminue légèrement jusqu'à se stabiliser à 90% de l'activité maximale.



**Figure 29:** Effet de l'augmentation des concentrations de sel biliaire (NaTDC) sur l'activité lipasique. En présence de 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  et l'activité phospholipase en présence de 4 mM de  $\text{CaCl}_2$ , en utilisant respectivement l'émulsion TC8 et la phosphatidylcholine comme substrats. L'étoile indique l'activité de la FAL mesurée en l'absence de  $\text{CaCl}_2$  et en présence de 10 mM d'EDTA. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

Afin de déterminer si FAL est une enzyme à sérine, l'impact de l'Orlistat sur l'activité de la FAL pendant la lipolyse du TC8 (comme illustré à la Figure 29A) ou du Egg PC (comme décrit à la Figure 29B) a été étudié. L'orlistat, un inhibiteur puissant des lipases digestives, se lie de manière covalente à la sérine du site catalytique. L'injection d'Orlistat (40  $\mu\text{M}$ , concentration finale) à 8 min (Figure 29A, courbe rouge) et 8 min (Fig 29B, courbe rouge) a complètement inhibé respectivement l'activité de la lipase TG et de la PLA1 de la FAL. Comme contrôle, l'injection de DMSO seule n'avait aucun effet sur l'activité de la FAL (Fig 29, courbe bleue). De plus, d'autres inhibiteurs spécifiques modifiant la sérine, tels que le PMSF et le DIFP, ont complètement inhibé l'activité de la FAL (Tableau 4).

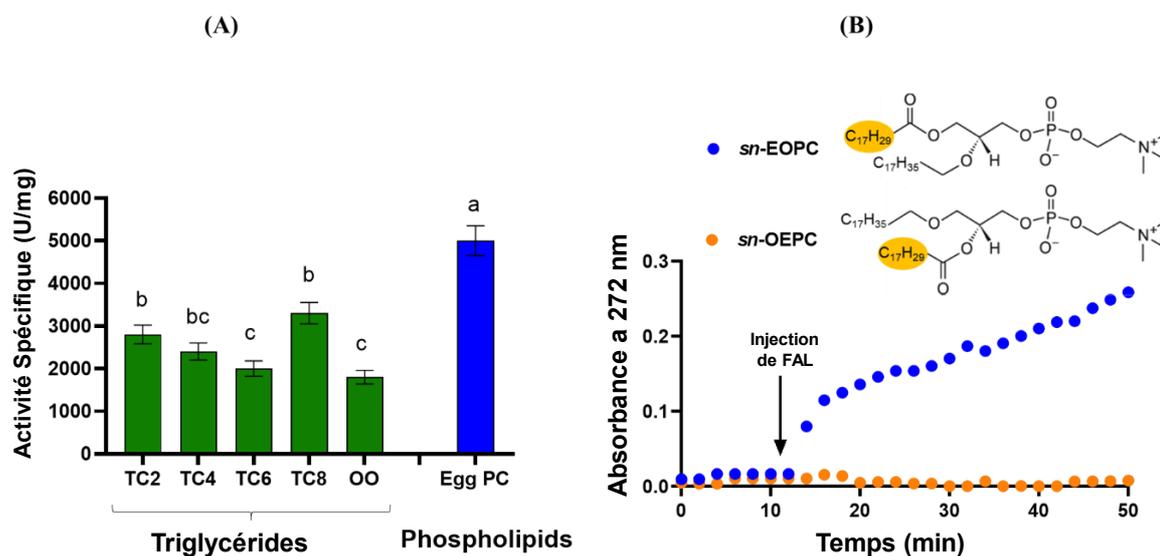


**Figure 30 :** Effet de l'Orlistat sur les activités de la FAL. Du DMSO (lignes bleues) ou de l'Orlistat dans du DMSO (40  $\mu\text{M}$ , concentration finale, courbes rouges) a été injecté dans le milieu de réaction à 8 min (A) et 8 min (B) après le début de la lipolyse avec la FAL sur TC8 et sur PC d'œuf, respectivement. Les activités lipase et PLA1 ont été mesurées, à pH 9 et 40 °C et à pH 11 et 45 °C, en utilisant TC8 et Egg PC comme substrats, respectivement. Les courbes sont représentatives de trois expériences indépendantes.

Comme le montre le tableau 4, FAL était légèrement affecté par les agents thiol. FAL a conservé 70%, 90%, 102% ou 97% de son activité originale lorsqu'il a été traité pendant 60 min avec DTNB (10 mM), NEM (2 mM), iodoacétamide (5 mM), ou PAO (10 mM), respectivement (Tableau 4). Le traitement de FAL avec des agents réducteurs (10 mM), tels que le 2-ME ou le DL-DTT, pendant 60 min n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité catalytique (Tableau 4) avec des activités résiduelles respectivement de 98% ou 96% (Tableau 4).

### 6.5. Spécificité de substrat de la FAL.

La spécificité du substrat de FAL a été déterminée en utilisant des TG de longueur de chaîne acyle variable et du Egg PC comme substrats (Figure 30). FAL hydrolyse les TG à chaîne courte à moyenne avec une activité optimale sur le TC8 (3500 U/mg), suivie du TC2 (2800 U/mg), du TC4 (2400 U/mg) et du TC6 (2000 U/mg) (Figure 30). L'activité de FAL sur l'émulsion de OO représente environ 60% (1800 U/mg) de celle sur le TC8 (Figure 30A). De manière intéressante, FAL est capable de catalyser efficacement l'hydrolyse des phospholipides, en présence d'une concentration de 4 mM de CaCl<sub>2</sub>, de 3 mM de NaTDC et à pH 11 et 45 °C, avec une activité spécifique de 5000 U/mg sur Egg PC.



**Figure 31:** Spécificité du substrat de FAL. (A) Sélectivité en fonction de la longueur de la chaîne de FAL. L'activité spécifique a été mesurée dans des conditions standard en utilisant TC2, TC4, TC8, l'huile d'olive (OO) ou Egg PC en tant que substrat, comme décrit dans les Matériaux et Méthodes. (B) Enregistrements cinétiques de la lipolyse de lipides enrobés de *sn*-*sn*-EOPC ou *sn*-OEPC par FAL. Les variations de l'absorbance à 272 nm ont été enregistrées pendant 10 minutes pour la stabilisation, puis pendant 40 minutes après l'injection de FAL (0,65 µg par puits).

Pour examiner la régiosélectivité de FAL pour les positions sn-1 ou sn-2 du PC, le degré d'hydrolyse de l'ester sn-EOPC estérifié en position sn-1 ou de l'ester sn-OEPC estérifié en position sn-2 a été déterminé (Figure 30B). Il convient de noter que chaque substrat ne contient qu'une seule liaison ester et une seule liaison éther non-hydrolysable avec une chaîne alkyle non absorbant les UV, afin de prévenir la migration de la chaîne acyle pendant la lipolyse. Lors de l'injection de FAL sur le sn-EOPC, observe une augmentation rapide de l'absorbance à 272 nm, indiquant la haute activité PLA1 de l'enzyme. En revanche, l'injection de FAL sur le sn-OEPC n'a entraîné aucune hydrolyse, confirmant ainsi la haute activité PLA1 de l'enzyme (Figure 30B).

## 7. Performance enzymatique de la FAL

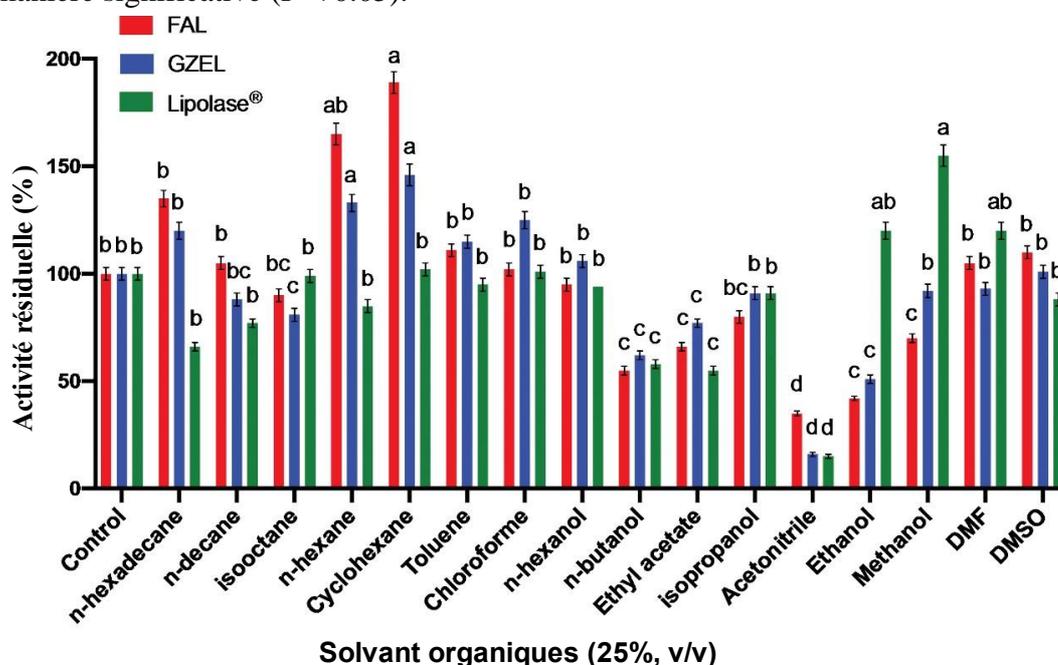
### 7.1. Effet des solvants organiques sur la stabilité de la FAL

Dans cette étude, la stabilité de FAL en présence de divers solvants organiques miscibles et immiscibles à l'eau ( $\text{Log } P > 1.8$ ) a été évaluée et comparée à celle de la lipase de *Gibberella zeae* (GZEL), une enzyme extracellulaire sécrétée par *Fusarium oxysporum* [141], et la lipase commercial Lipolase®. Les résultats ont été analysés en termes d'activité résiduelle par rapport à un témoin non traité. Il a été constaté que FAL est très stable lorsqu'il est incubé pendant 24 heures à une concentration finale de 25% (v/v) des solvants organiques non polaires suivants ( $\text{Log } P > 1.8$ ) - cyclohexane, n-hexane, n-hexadécane, toluène, n-décane, chloroforme, n-hexanol et isooctane, retenant respectivement 189%, 165%, 135%, 111%, 105%, 102%, 95% et 90% de son activité initiale (Figure 29). Dans les mêmes conditions expérimentales, GZEL et Lipolase® montrent, relativement parlant, la même stabilité que FAL dans ces solvants, à l'exception du n-hexadécane et du n-décane qui réduisent l'activité de Lipolase® de 34% et 23%, respectivement (Figure 29). Cependant, FAL est moins stable lorsqu'il est incubé avec des solvants polaires protiques. En présence d'isopropanol, de méthanol, de n-butanol ou d'éthanol, FAL a conservé respectivement 80%, 56%, 55% ou 42% de son activité (Figure 29), tandis que GZEL a conservé respectivement 91%, 92%, 62% ou 51% de son activité. Lipolase®, dans les mêmes conditions expérimentales, a conservé respectivement 91%, 155%, 58% ou 120% de son activité initiale.

L'effet des solvants polaires aprotiques a également été testé sur l'activité enzymatique. FAL est très stable lorsqu'il est incubé avec du diméthylformamide (DMF) ou du DMSO, avec des activités résiduelles respectivement de 105% ou 110%. Le DMF ou le DMSO ont également un effet positif sur la stabilité de GZEL et Lipolase®, avec des activités restantes respectivement de 93% ou 101% pour GZEL et 120% ou 88% pour Lipolase®. Il convient de noter que les

autres solvants organiques polaires aprotiques, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle, ont tous deux eu un effet négatif sur l'activité de FAL, GZEL et Lipolase®, avec des activités restantes de 66% ou 35% pour le FAL, 77% ou 16% pour GZEL et 55% ou 15% pour Lipolase®.

L'effet des solvants organiques a été déterminé en incubant chaque enzyme avec le solvant [concentration finale de 25% (v/v)] pendant 24 h. Les activités lipasiques résiduelles ont été déterminées dans les mêmes conditions, en utilisant le TC8 comme substrat à 40 °C et à pH 9, comme décrit dans la section Materials et Méthodes, puis exprimées en pourcentage du niveau d'activité en l'absence de solvants organiques. L'activité de l'enzyme sans aucun solvant organique a été considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n = 3). <sup>a-d</sup> Les moyennes des enzymes indicateurs avec des lettres minuscules différentes diffèrent de manière significative (P < 0.05).



**Figure 32 :** Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité de FAL, GZEL, et Lipolase®. L'effet des solvants organiques a été déterminé en incubant chaque enzyme avec le solvant [concentration finale de 25% (v/v)] pendant 24 h. Les activités lipasiques résiduelles ont été déterminées dans les mêmes conditions, en utilisant le TC8 comme substrat à 40 °C et à pH 9, comme décrit dans la section Matériaux et Méthodes, puis exprimées en pourcentage du niveau d'activité en l'absence de solvants organiques. L'activité de l'enzyme sans aucun solvant organique a été considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n = 3). <sup>a-d</sup> Les moyennes des enzymes indicateurs avec des lettres minuscules différentes diffèrent de manière significative (P < 0.05).

### 7.2. Effects of Detergent Additives on the Stability of FAL and GZEL

La stabilité d'une enzyme lipolytique en présence de composants détergents est une caractéristique cruciale dans le choix d'une bonne lipase détergente. Pour cette raison, la stabilité de FAL et GZEL a été examinée et comparée à celle de Lipolase® en incubant l'enzyme avec des additifs détergents, qui étaient soit disponibles commercialement, soit couramment

trouvés dans les laboratoires, pendant 1 h. Comme le montre le tableau 11, le FAL était plus stable et a montré 145%, 128%, 182% ou 155% de son activité initiale avec les agents anti-redéposition suivants TAED (0.5%, p/v), Na<sub>2</sub>CMC (1%, p/v), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mM), ou STPP (0.2%, p/v), respectivement. Dans les mêmes conditions expérimentales, GZEL a montré 131%, 95%, 151% ou 138% de son activité initiale, respectivement (Tableau 5). Pour les oxydants, l'activité de FAL, avec 5% ou 10% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou 1% ou 5% (v/v) de perborate de sodium, a été augmentée de 150% et 124% ou 122% et 105%, respectivement, tandis que GZEL a montré 133% et 106% ou 102% et 74% de son activité initiale, respectivement (Tableau 11). FAL a montré une stabilité considérable envers les tensioactifs anioniques forts car il a conservé 110%, 93% ou 125% de son activité initiale avec le SDS (2%, p/v), le Galaxy LAS (1%, v/v), ou le Galaxy LES 70 (2%, v/v), respectivement. Alors que GZEL et Lipolase<sup>®</sup> n'ont conservé que 86% et 75% (Tableau 11) de leur activité initiale, respectivement, en présence de 2% (p/v) de SDS.

De plus, après traitement avec des tensioactifs non ioniques, tels que les Tweens (20, 40, 60 et 80) à 1% (v/v), le FAL s'est révélé relativement stable en conservant 93%, 107%, 80% ou 80% de son activité initiale, respectivement (Tableau 11). Des résultats similaires ont été observés avec GZEL et Lipolase<sup>®</sup>. Cependant, le traitement de l'enzyme avec des concentrations plus élevées (5%, v/v) de ces tensioactifs a diminué l'activité résiduelle à 30%-50% pour FAL, 40%-77% pour GZEL et 36%-50% pour Lipolase<sup>®</sup> (Tableau 11). FAL et GZEL se sont révélés très stables lorsqu'ils étaient traités avec du Triton-X100 (5%, v/v) avec des activités résiduelles de 111% et 107%, respectivement, tandis que Lipolase<sup>®</sup> n'a conservé que 85% ou 68

De plus, une activité résiduelle de 156%, 162%, ou 191% a été observée en présence de Dehydol<sup>®</sup>LT 7, SAFOL 23E7 ou SURFAC<sup>®</sup> LM 30, comme additifs détergents commerciaux, à 0,5% (v/v), respectivement. Des résultats similaires ont été observés pour GZEL, avec une activité résiduelle de 140%, 138%, ou 146%, respectivement et pour Lipolase<sup>®</sup>, avec une activité résiduelle respectivement de 142%, 164% et 120%.

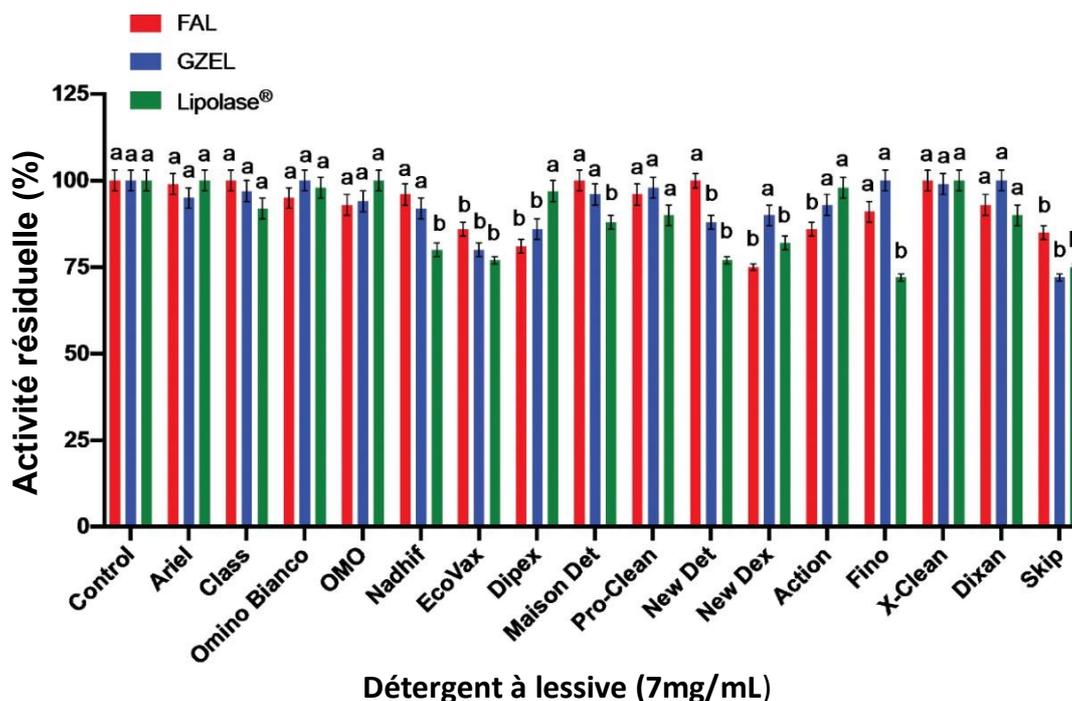
Le FAL a montré une remarquable stabilité, conservant une activité résiduelle de 121%-180% en présence de plusieurs autres additifs détergents disponibles sur le marché, tels que 0,5% Tinopal<sup>®</sup> CBS-X, 0,5% Formol, 0,5% Perfume I Class, et 1% Perfume II Class 0,2% EDTA (Tableau 6). GZEL a également montré une bonne stabilité en présence (v/v) de 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5% Formol ou 0,5% Tinopal<sup>®</sup> CBS-X et a conservé respectivement 133%, 111% ou 151% d'activité (Tableau 11), contre Lipolase<sup>®</sup> qui a conservé respectivement 80%, 84% ou 122% (Tableau 11).

**Tableau 10 :** Effets de divers additifs détergents de laboratoire sur la stabilité de FAL comparativement à GZEL et Lipolase®.

Detergent Additives	Final Concentration	Residual Lipase Activity (%) <sup>a,b</sup>		
		FAL	GZEL	Lipolase®
Control	0	100 <sup>cd</sup> ± 3	100 <sup>cd</sup> ± 3	100 <sup>cd</sup> ± 3
Zeolite	1% (w/v)	99 <sup>cd</sup> ± 3	95 <sup>cd</sup> ± 2	86 <sup>cd</sup> ± 2
STPP	0,2% (w/v)	155 <sup>ab</sup> ± 4	138 <sup>ab</sup> ± 4	150 <sup>ab</sup> ± 4
	0,5% (w/v)	95 <sup>cd</sup> ± 2	90 <sup>cd</sup> ± 2	93 <sup>cd</sup> ± 2
SDS	1% (w/v)	135 <sup>a</sup> ± 4	97 <sup>cd</sup> ± 2	96 <sup>cd</sup> ± 2
	2% (w/v)	110 <sup>bc</sup> ± 3	86 <sup>cd</sup> ± 2	75 <sup>d</sup> ± 2
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	50 mM	182 <sup>a</sup> ± 4	151 <sup>a</sup> ± 4	154 <sup>ab</sup> ± 4
	100 mM	152 <sup>ab</sup> ± 4	144 <sup>ab</sup> ± 4	126 <sup>bc</sup> ± 3
Tween 20	1% (v/v)	93 <sup>cd</sup> ± 2	88 <sup>cd</sup> ± 2	73 <sup>d</sup> ± 2
	5% (v/v)	52 <sup>de</sup> ± 1	77 <sup>d</sup> ± 2	54 <sup>de</sup> ± 1
Tween 40	1% (v/v)	107 <sup>bc</sup> ± 3	96 <sup>cd</sup> ± 2	87 <sup>cd</sup> ± 2
	5% (v/v)	36 <sup>e</sup> ± 1	39 <sup>e</sup> ± 1	36 <sup>e</sup> ± 1
Tween 60	1% (v/v)	80 <sup>cd</sup> ± 2	90 <sup>cd</sup> ± 2	98 <sup>cd</sup> ± 2
	5% (v/v)	28 <sup>e</sup> ± 1	61 <sup>de</sup> ± 2	60 <sup>de</sup> ± 2
Tween 80	1% (v/v)	80 <sup>cd</sup> ± 2	91 <sup>cd</sup> ± 2	90 <sup>cd</sup> ± 2
	5% (v/v)	33 <sup>e</sup> ± 1	48 <sup>de</sup> ± 1	50 <sup>de</sup> ± 1
Na <sub>2</sub> CMC	1% (w/v)	128 <sup>ab</sup> ± 4	95 <sup>cd</sup> ± 2	92 <sup>cd</sup> ± 2
	10% (w/v)	104 <sup>c</sup> ± 3	65 <sup>de</sup> ± 2	52 <sup>de</sup> ± 1
Triton X-100	1% (v/v)	147 <sup>ab</sup> ± 4	125 <sup>cd</sup> ± 2	85 <sup>cd</sup> ± 2
	5% (v/v)	111 <sup>bc</sup> ± 3	107 <sup>bc</sup> ± 3	68 <sup>de</sup> ± 2
TAED	0.5% (w/v)	145 <sup>ab</sup> ± 4	131 <sup>bc</sup> ± 3	116 <sup>bc</sup> ± 3
	5% (w/v)	105 <sup>cd</sup> ± 3	96 <sup>cd</sup> ± 2	75 <sup>d</sup> ± 2
Sodium perborate	1% (v/v)	122 <sup>ab</sup> ± 3	102 <sup>ab</sup> ± 3	113 <sup>bc</sup> ± 3
	5% (v/v)	105 <sup>bc</sup> ± 3	74 <sup>b</sup> ± 2	88 <sup>cd</sup> ± 2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5% (v/v)	150 <sup>ab*</sup> ± 4	133 <sup>ab*</sup> ± 3	80 <sup>cd*</sup> ± 2
	10% (v/v)	124 <sup>ab*</sup> ± 4	106 <sup>bc*</sup> ± 3	66 <sup>de*</sup> ± 2

### 7.3. Stabilité et compatibilité des lipases avec divers détergents à lessive commerciaux

Afin d'examiner l'utilisation potentielle de FAL comme additif bio-détergent, sa stabilité et sa compatibilité avec des formulations de détergents commercialement disponibles ont été mesurées et comparées à celles de GZEL et Lipolase®. Comme la montre la Figure 30, il a été constaté que FAL est très stable et compatible avec tous les détergents à lessive liquides et solides commerciaux testés, dans lesquels il a conservé 75% à 100% de son activité initiale contre 72% à 100% pour GZEL et Lipolase®. FAL a conservé 100% de son activité initiale avec Class, Maison Det et New det tandis que GZEL a conservé 97%, 96% et 88% de son activité initiale, respectivement, et Lipolase® a conservé 92%, 88% et 77% de son activité initiale, respectivement. GZEL était complètement stable en présence de Fino, Dixan et Omino Bianco tandis que Lipolase® était entièrement stable avec Ariel, OMO et X-Clean, conservant 100% de son activité initiale (Figure 30). Ces résultats apportent un appui additionnel à l'utilité de FAL en tant qu'additif de nettoyage dans la formulations des détergents de lavage pour des applications industrielles futures.

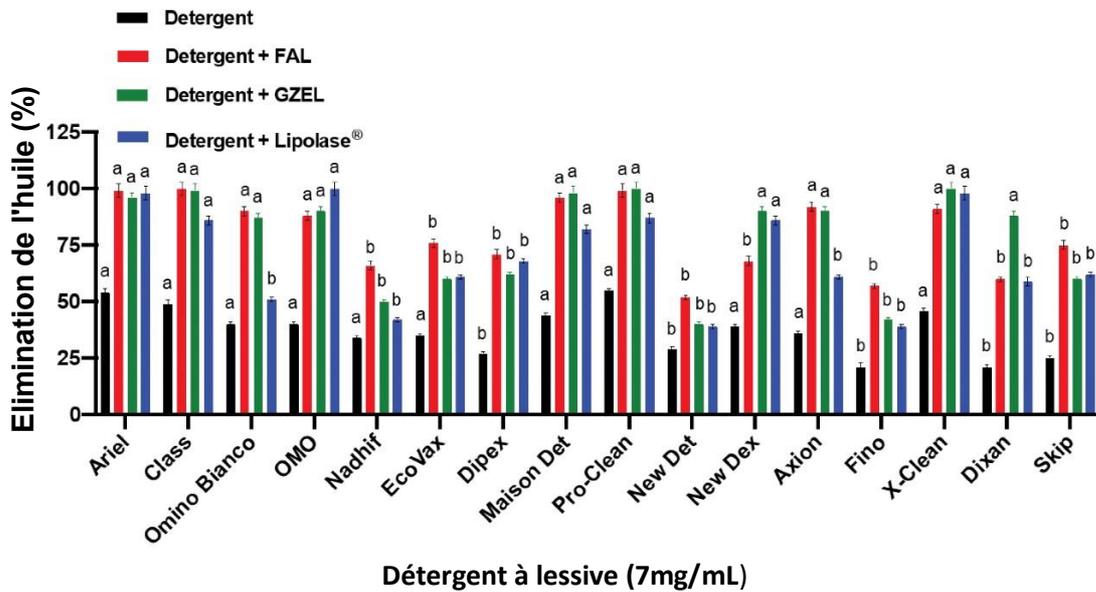


**Figure 33 :** Stabilité et compatibilité des lipases testées (FAL, GZEL et Lipolase®) en présence de détergents à lessive commerciaux. Pendant 60 min à 40°C l'activité enzymatique de l'échantillon témoin, sans additif et incubé dans des conditions similaires, a été considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n = 3). <sup>a-b</sup> Les moyennes des enzymes indicateurs avec différentes lettres minuscules diffèrent significativement (P < 0.05).

#### 7.4. Performance enzymatique de la FAL dans la lavage et le détachement des huiles

L'effet de divers détergents commerciaux, en l'absence ou en présence de lipase, sur l'élimination de l'huile est illustré dans la Figure 30. Quel que soit le détergent utilisé, l'ajout de la lipase augmente l'efficacité de nettoyage de l'élimination de l'huile, ce qui montre l'avantage d'inclure cette enzyme dans la composition du détergent. L'efficacité de la lipase dépend du détergent utilisé. Par exemple, FAL est plus efficace avec Nadhif, EcoVax, New Det, Fino et Skip, augmentant l'efficacité de 32%, 41%, 23%, 36% et 50% respectivement, contre 16%, 25%, 11%, 21% et 35% respectivement pour GZEL et 8%, 26%, 10%, 18% et 37% respectivement pour Lipolase® (Figure 31). Avec d'autres détergents, tels que Class, Omino, Maison Det, Pro-Clean et Axion, l'ajout de FAL ou GZEL apporte une amélioration plus importante (44%-56%) que l'ajout de Lipolase® (11%-38%) (Figure 31). Dans certains autres détergents, comme Dixan, GZEL apporte une amélioration de 67% contre 39% pour FAL et

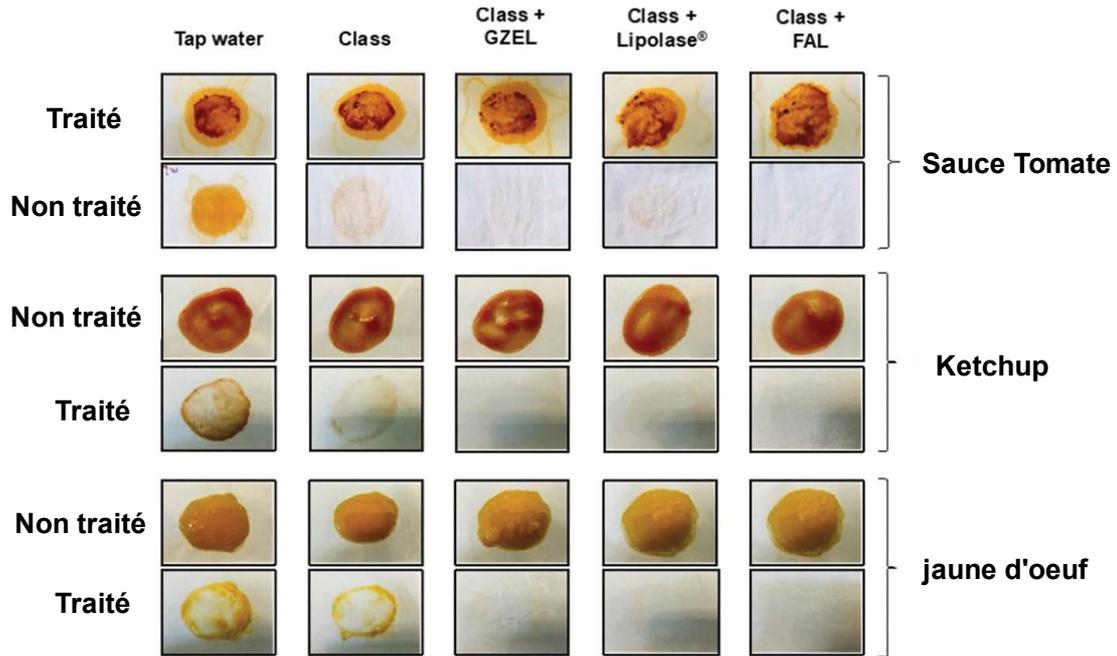
38% pour Lipolase®. Dans OMO, c'est Lipolase® qui est plus efficace, apportant une amélioration de 60% contre 48% et 50% pour FAL et GZEL, respectivement.



**Figure 34 :** Évaluation de l'efficacité des lipases utilisées sur l'élimination de l'huile d'olive des tissus de coton avec des détergents. Effet de FAL, GZEL et Lipolase® sur l'élimination de l'huile d'olive des tissus de coton avec divers détergents à lessive liquides et solides. a-b Les moyennes pour toutes les colonnes de chaque paramètre avec des lettres minuscules différentes diffèrent significativement ( $P < 0.05$ ). Les valeurs représentent les moyennes de 3 réplicats indépendants et l'erreur standard est indiquée.

Effet de FAL, GZEL et Lipolase® sur l'élimination de l'huile d'olive des tissus de coton avec divers détergents à lessive liquides et solides. a-b Les moyennes pour toutes les colonnes de chaque paramètre avec des lettres minuscules différentes diffèrent significativement ( $P < 0.05$ ). Les valeurs représentent les moyennes de 3 réplicats indépendants et l'erreur standard est indiquée.

L'importance de l'utilisation des lipases comme bio-additif dans les détergents commerciaux a été établie par un examen visuel de l'élimination des taches d'huile sur le tissu de coton. Comme la montre Figure 14, l'utilisation du détergent Class complété par FAL, GZEL, ou Lipolase® augmente significativement l'élimination de la composante grasse des taches de sauce de tomate, de ketchup et de jaune d'œuf. En particulier, FAL et GZEL, grâce à leur double activité de lipase TG et PLA1, sont beaucoup plus efficaces pour éliminer les taches d'huile du tissu de coton que le Lipolase® actuellement utilisé.



**Figure 35:** Test de performance de lavage sur l'élimination de l'huile avec un détergent commercial en présence de FAL, GZEL ou Lipolase®. Le test d'analyse de la performance de lavage de la lipase a été réalisé avec le détergent commercial Class (7 mg/mL) en utilisant un tissu de coton taché de sauce tomate, de ketchup ou de jaune d'oeuf. Le tissu taché d'huile a été rincé à l'eau du robinet, lavé avec Class (7 mg/mL), lavé avec Class complété avec GZEL (500 U/mL), lavé avec Ariel complété avec Lipolase® (500 U/mL), ou lavé avec Ariel complété avec FAL (500 U/mL).

## 8. Discussion

Actuellement, les affections les plus graves menaçant les oliviers (*Olea europaea* cv. *Chemlali*) en Tunisie et, probablement, dans de nombreux pays de la zone méditerranéenne [30, 32, 33], sont les symptômes de dépérissement et de flétrissement provoqués par un groupe de champignons du sol [212-215]. Le genre *Fusarium* est l'un des principaux genres phytopathogènes liés aux symptômes de dépérissement des oliviers. Après des tests pathogènes sur de jeunes oliviers (cv. *Chemlali*), il a été déterminé que, sur 104 isolats de *Fusarium* spp., 23 étaient pathogènes tandis que le reste présentait une pathogénicité faible ou inexistante. À notre connaissance, c'est la première étude à suggérer que *Fusarium annulatum* pourrait être une cause importante de la maladie du dépérissement des oliviers en Tunisie. De plus, cette étude visait à isoler une nouvelle souche fongique d'un biotope tunisien relativement extrême dans l'espoir de trouver une nouvelle souche intéressante produisant de la lipase. Sur la base d'analyses morphologiques et moléculaires, la souche sélectionnée CBS a été identifiée comme *Fusarium annulatum* Bugnicourt.

Nos observations indiquent que la FAL atteint son optimum thermique entre 40 °C et 45 °C, un comportement cohérent avec les lipases de *Fusarium* [216] et de *Fusarium graminearum* [62]. Diverses lipases fongiques ont été reportées pour exhiber un optimum thermique entre 37 °C et 50 °C, comme par exemple la lipase d'*Aspergillus* sp. ST11 avec une activité optimale à 37 °C [217], celle de *Galactomyces geotrichum* à 45 °C [209], et la lipase de *Talaromyces thermophilus* montre un maximum est à 50 °C [218], and *Talaromyces thermophilus* lipase showing maximum activity at 50 °C [153]. En ce qui concerne l'influence de la température sur la stabilité de la FAL, cette lipase a montré une capacité à conserver l'essentiel de son activité catalytique à des températures supérieures à 40 °C. Ces observations sont en accord avec celles effectuées pour la lipase de *Fusarium oxysporum* [219]. De plus, la FAL semble être plus thermostable que la lipase de *Fusarium solani* qui, comme la majorité des lipases fongiques, qui a montré une tolérance réduite à des températures supérieures à 40°C [61].

La caractéristique la plus notable de la FAL est sa haute stabilité en milieu alcalin ainsi que sa résistance aux détergents. Il est intéressant de noter que la majorité des lipases fongiques et de levures présentent leur activité maximale à un pH neutre ou alcalin. De manière similaire, cette lipase atteint son activité maximale dans un intervalle de pH variant de 9 à 11, indiquant qu'elle est une enzyme alcalinophile. Sous des conditions similaires, Jalouli et al.[61] ont rapporté que un maximum d'activité lipolytique de la lipase de *Fusarium solani* était observée à pH 8,5, une activité qui décroît drastiquement à pH 6[61]. En contraste, Wang et al.[141] ont

rapporté que la lipase extracellulaire GZEL, qui est sécrétée par *Fusarium graminearum* (également connu sous le nom de *Gibberella zeae*), présente une activité maximale de lipase sur les triglycérides (TG) et la phospholipase A1 (PLA1) dans un intervalle de pH de 5 à 6, et que son activité commence à diminuer à un pH de 9.

Nos résultats confirment que la FAL présente un spectre exceptionnel de stabilité de pH, conservant son activité dans une gamme de pH allant de 5 à 11. Cela contraste avec ce qui est généralement rapporté pour la majorité des lipases fongiques, qui sont stables uniquement dans un intervalle de pH de 4 à 7 et présentent une tolérance moindre à des niveaux de pH alcalins [220], comme observé pour les lipases de *Rasamsonia emersonii* [221], *Aspergillus niger* [222], et *Penicillium aurantiogriseum* [223]. Alors que *Fusarium solani* a été rapportée comme stable entre pH 8 et 9 [61]. Sa forte activité ainsi que la stabilité à un pH alcalin font de la FAL un candidat approprié pour une utilisation dans la production de détergents. De telles enzymes alcalines sont déjà utilisées dans les détergents pour vaisselle et pour linge [146, 224, 225].

L'activité de la FAL a démontré une stabilité notable en présence d'agents chélatants, la rendant particulièrement attrayante comme additif dans les détergents. Cela est particulièrement avantageux puisque de grandes quantités d'agents chélatants sont ajoutées pour améliorer le retrait des taches et agir comme adoucisseurs d'eau [226, 227]. Une augmentation de l'activité de la FAL a été détectée avec  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , et  $\text{Mn}^{2+}$ , tandis que  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  l'ont réduite. D'autres études sur les lipases de *Fusarium solani* ont également rapporté des résultats similaires [61, 193] où  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ont été identifiés comme les principaux amplificateurs d'activité, tandis que  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  ont montré un effet inhibiteur. Mehta et al. [228] ont démontré que  $\text{Co}^{2+}$  inhibe l'activité de la lipase extracellulaire d'*Aspergillus fumigatus*. L'inhibition de plusieurs lipases par des ions métalliques pourrait être due à l'interaction entre ces ions et les groupes thiol des résidus de cystéine situés à proximité du site actif de l'enzyme [229]. Cependant, une réduction considérable de l'activité PLA1 de la FAL a été observée en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Des résultats similaires ont été rapportés pour une (phospho)lipase de *Peziza* sp. [65] qui nécessite la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il semble que  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait avoir trois fonctions différentes dans l'action des lipases : l'élimination des acides gras sous forme de sels insolubles de  $\text{Ca}^{2+}$ , une activation directe de l'enzyme découlant de la concentration de l'enzyme à l'interface eau-lipide, et un effet stabilisateur de la structure sur l'enzyme [45]. Le comportement de la FAL en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ressemble à celui du groupe connu de phospholipases A2 (PLA2) dépendantes du calcium [230]. Les analyses structurales des PLA2 ont révélé l'existence d'une boucle conservée pour la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les structures 3D de ces enzymes. Néanmoins, une étude a indiqué que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ne sont pas indispensables pour une lipase qui démontre

une activité PLA1 [51]. Pour obtenir une meilleure compréhension de l'impact des ions calcium sur l'activité PLA1 de cette FAL, des analyses structurales supplémentaires sont nécessaires.

L'inhibition de l'activité lipolytique de la FAL sur triglycérides par le NaTDC (>1 mM), pourrait être due au fait que le NaTDC maintient la liaison de l'enzyme FAL à l'interface substrat lipidique. Des résultats comparables ont été obtenus avec les lipases de *Fusarium solani* [231, 232] ainsi qu'avec certaines autres lipases bactériennes, par exemple, les lipases de *Serratia* sp.W3[233], *Staphylococcus simulans* [234], et *Staphylococcus aureus* [235]. L'activité PLA1 de la FAL est faible (410 U/mg) sans NaTDC et augmente progressivement pour atteindre une activité maximale (5000 U/mg) à 4 mM en NaTDC. Cet impact stimulant sur l'activité PLA1, déjà noté pour de nombreuses phospholipases [65, 236], pourrait être expliqué en premier lieu par son impact sur la qualité de la tension interface eau-lipide par solubilisation des phospholipides substrat et/ou du produit de réaction. En effet, l'effet d'émulsification des sels biliaires peut favoriser la disponibilité du substrat à une quantité autour de sa concentration micellaire critique[237, 238]. Deuxièmement, l'augmentation de la concentration en sels biliaires peut entraîner des changements conformationnels rendant la protéine plus active [239]. De plus, même à une concentration élevée de NaDTDC (5 mM), l'activité PLA1 reste stable, comme cela a été rapporté pour la phospholipase C de *Bacillus thuringensis* [236] et une lipase de *Fusarium solani* [61].

L'Orlistat est connu pour être un inhibiteur puissant des lipases digestives, et des hydrolases de carboxylestères en général, qui se lie de manière covalente au résidu de seryl sur le site catalytique [240]. Il a été observé que l'orlistat inhibe totalement les activités de lipase TG et PLA1, indiquant qu'un complexe covalent est formé entre l'anneau  $\beta$ -lactone de l'orlistat et l'hydroxyle du résidu seryl catalytique de la FAL. Ce mécanisme a été précédemment établi pour les lipases digestives, suggérant que l'orlistat peut également être un inhibiteur efficace de la FAL [240]. De plus, il a été démontré que la FAL était complètement inactivée en présence d'autres inhibiteurs spécifiques des enzymes à sérine (PMSF et DFP), ce qui renforce l'hypothèse que la FAL pourrait être une hydrolase de sérine ayant un triade catalytique composée de Ser-Asp(Glu)-His sur le site actif. Les activités de lipase TG et PLA1 étaient inhibées par les agents réactifs à la sérine, ce qui indique que c'est probablement le même site catalytique qui est impliqué dans l'hydrolyse des TG et des phospholipides. Des résultats similaires ont été trouvés avec *Fusarium solani* [61] et *Staphylococcus hyicus* [241] (phospho)lipases, qui ont le même site catalytique pour les activités de lipase TG et PLA.

L'une des propriétés les plus intéressantes de la FAL est qu'elle peut catalyser efficacement l'hydrolyse des TG de différentes longueurs de chaîne acyle et des phospholipides. Il faut

souligner que l'activité PLA1 est beaucoup plus élevée (5000 U/mg) que celle obtenue précédemment avec la lipase de *Fusarium solani* (2400 U/mg à pH 8,5), mesuré par la technique de pH-STAT et en utilisant l'émulsion de jaune d'œuf comme substrat [61]. Nos résultats de régiosélectivités démontrent que la FAL est une PLA1 avec une claire sélectivité pour la position *sn*-1 des phospholipides, en utilisant des substrats synthétiques qui distinguent les activités PLA1 et PLA2 [242]. Les résultats révèlent que la FAL hydrolyse favorablement les TG à chaîne moyenne (TC8), comme décrit pour les lipases *Fusarium solani* [61, 193], *Penicillium camembertii* Thom PG-3 [38] et *Penicillium cyclopium* [42]. Selon Simons et al les (phospho)lipases *staphylococciques* présentent une large gamme de substrats, comprenant des TG de différentes longueurs de chaîne, des phospholipides et des lysophospholipides. Les activités spécifiques de cette enzymes sur TC4 et Egg PC sont rapportées à 28 U/mg et 172 U/mg, respectivement [59]. De plus, Ishibashi et al [243] ont récemment identifié une nouvelle lipase/phospholipase provenant d'un *Traustochytrid*, connu comme microorganismes marins oléagineux, capable d'hydrolyser TG et PC.

Jusqu'à présent, bien que plusieurs lipases d'origine microbienne aient été intensivement utilisées dans la synthèse d'esters dans divers mélanges, y compris les mélanges solvant aqueux-organique et les solvants organiques purs [7,18], La tolérance des lipases provenant des espèces de *Fusarium* à l'égard des solvants organiques n'a pas été largement étudiée. L'enzyme FAL a montré une stabilité extrêmement élevée (Figure 31) à 25% de solvants organiques non polaires, après 24 heures d'incubation, avec une meilleure stabilité, 189%-95%, en présence de cyclohexane, *n*-hexane, *n*-hexadécane, toluène, chloroforme et *n*-hexanol. La stabilité de certaines lipases dans les solvants organiques non miscibles à l'eau est souvent attribuée à leur capacité à maintenir la couche d'hydratation de l'enzyme. Cette couche est cruciale pour conserver l'activité catalytique de l'enzyme. En évitant les perturbations de cette couche, l'enzyme lipolytique peut rester stable et active dans les solvants organiques [244]. De plus, l'enzyme n'a pas montré de forte baisse de l'activité résiduelle en présence de certains solvants polaires, tels que le méthanol, le *n*-butanol, et l'iso-propanol, bien qu'il soit bien reconnu que les lipases fongiques [194, 245] sont rarement stables dans les solvants miscibles, surtout lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations qui seraient optimales pour la réaction d'alcoolyse. Nos données sont en accord avec Rade et al. [221] qui ont décrit une nouvelle lipase fongique avec une haute stabilité envers le méthanol. De plus, Ogino et al [244, 246] et Careri et al. [244, 246] ont signalé une lipase psychrophile tolérante aux solvants organiques. En effet, en présence de ce solvant miscible à l'eau, l'hydrophobicité du milieu change et subit une perturbation considérable du noyau hydrophobe de la protéine, ce qui entraîne la désactivation de la protéine.

Ainsi, la stabilité remarquable de la lipase de *Fusarium annulatum* dans divers solvants organiques en fait candidate prometteuse pour son utilisation dans le processus de synthèse d'esters.

Actuellement, les producteurs industriels sont engagés dans la fabrication de détergents enzymatiques contenant de la lipase, destinés à éliminer les molécules lipidiques des surfaces souillées[247]. L'objectif est de trouver une enzyme qui maintient sa stabilité face à des variations de température et de pH, et qui reste stable en présence d'ingrédients variés tels que les tensioactifs, les agents de blanchiment, les constructeurs et autres enzymes [187, 248]. En conclusion, dans le processus de nettoyage industriel, les tensioactifs sont utilisés pour augmenter la force répulsive en réduisant la tension de surface aux interfaces, alors que l'effet de blanchiment est généré par l'oxydation grâce aux agents de blanchiment. Les agents anti-redéposition servent à empêcher les taches de se redéposer sur les tissus et à prévenir la corrosion. L'utilisation des enzymes est donc d'un grand intérêt pour améliorer l'efficacité du détachage, où l'action catalytique des enzymes ajoutées est combinée à une action mécanique. Récemment, une nouvelle tendance dans les détergents biologiques consiste à utiliser un mélange d'enzymes (lipases, protéase et peroxydase) qui a démontré une plus grande efficacité.

## 9. Conclusions

Cette étude présente un nouveau membre de la famille des (phospho)lipases produit par la souche fongique *Fusarium annulatum* Bugnicourt nouvellement isolée CBS. L'enzyme a été purifiée avec un facteur de purification de 62 fois et un rendement de 21% présente une activité spécifique élevée à la fois sur les triglycérides (3500 U/mg sur TC8) et sur les phospholipides, avec 5000 U/mg sur le PC de jaune d'œuf. Une fois caractérisée, la FAL a prouvé avoir un haut niveau d'activité dans un intervalle de pH et à des températures relativement élevées, en plus d'une stabilité alcaline significative qui est rare chez les lipases fongiques. Par ailleurs, cette lipase alcaline a démontré une remarquable stabilité lorsqu'elle est exposée à des tensioactifs non ioniques, à des agents oxydants et blanchissants, ainsi qu'à divers détergents liquides et solides. Ces qualités sont particulièrement remarquables par rapport à la lipase GZEL de *Gibbrella zea*.

---

***Chapitre 2 : Expression hétérologue et  
caractérisation moléculaire de la lipase de  
Fusarium annulatum.***

---

**Article 2:**

**Ahlem Dab et al**

Overexpression, kinetic characterization, and molecular modeling of a (Galactophospho)lipase from newly isolated *Fusarium annulatum*.

## 1. Introduction

Des études récentes ont souligné le potentiel des lipases du genre *Fusarium* en tant qu'enzymes biotechnologiques précieuses [61, 193, 219]. Un avantage des lipases de *Fusarium* réside dans leur haute stabilité et activité sur un large intervalle de pH et de température. Par exemple, une lipase produite par *Fusarium oxysporum* [219] a été trouvée active à un pH de 4 à 9 et jusqu'à 55°C, ce qui est idéal pour les applications industrielles nécessitant une stabilité à haute température. Cette stabilité peut réduire la nécessité de remplacer fréquemment l'enzyme, rendant le processus plus rentable. Un autre avantage des lipases de *Fusarium* est leur capacité à présenter une haute régio et stéréosélectivité, les rendant idéales pour la synthèse chemoenzymatique de divers esters et glycérides. De plus, les lipases de *Fusarium* ont été trouvées pour agir sur une variété de substrats contenant des liaisons ester, comme les phospholipides et les glycolipides [125]. Par exemple, certaines galactolipases ont été largement utilisées dans la production de biosurfactants. Ces biosurfactants trouvent diverses applications dans les industries cosmétique, pharmaceutique et alimentaire, en faisant un composant essentiel de ces secteurs. De plus, ces galactolipases sont également utilisées dans la production de biocarburants, soulignant davantage leur importance dans le domaine de la biotechnologie[249]. Lecitase Ultra, une phospholipase qui a été créée en combinant les gènes de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* et de la phospholipase A1 de *Fusarium oxysporum*, a étendu ses applications traditionnelles et a trouvé une large gamme d'utilisations dans la modification des aliments. Elle a été utilisée dans la production de phospholipides structurés, tels que les dérivés de phosphatidylcholine, ainsi que dans la chimie fine pour la résolution de mélanges racémiques, et dans la production d'arômes, de parfums et de modifications de polymères [159]. De plus, il y a eu des rapports sur l'utilisation de l'enzyme dans la production de biodiesel. Elle peut également être utilisée dans l'industrie pétrolière pour le dégommeage[250]. Par conséquent, elles sont considérées parmi les enzymes les plus prometteuses et demandées de leur classe pour diverses applications industrielles et biotechnologiques.

Dans notre étude précédente, nous avons sélectionné un nouveau champignon *Fusarium annulatum* pour son potentiel de production d'une (phospho)lipase alcaline, grâce à un processus de criblage de champignons isolés d'olivier infectés par microorganismes en Tunisie. De nombreuses études ont rapporté que les lipases extracellulaires produites par des champignons phytopathogènes, tels que *Fusarium graminearum* [62], *Fusarium solani* [126], *Fusarium oxysporum*[142], et *Gibberella zeae* [141] ont été identifiées comme des facteurs de

virulence impliqués dans la phytopathologie vis-à-vis de diverses cultures végétales. En particulier, *Gibberella zeae* est l'agent causal de la fusariose de l'épi (FHB), qui est une maladie végétale très destructive qui affecte les céréales, causant de grandes pertes de rendement de grain, en particulier pour le blé et le maïs. La lipase de *Gibberella zeae* (GZEL) a été rapportée comme étant responsable de sa pathogénicité.

Lou et al ont été les premiers à rapporter la structure cristalline de GZEL au niveau atomique, et ils ont trouvé que sa structure était différente de celle d'autres enzymes similaires[120]. Il semble que GZEL a une caractéristique structurale distincte par rapport à d'autres lipases. En particulier, GZEL a une structure très compacte avec une faible surface accessible aux solvants, alors que d'autres lipases ont une structure plus ouverte et accessible. De plus, ils ont proposé un mécanisme enzymatique unique de "double verrou", ce mécanisme implique deux étapes différentes qui se produisent dans un ordre spécifique pour activer l'enzyme et lui permettre d'effectuer sa fonction catalytique. Malgré les nombreuses études sur cette famille d'enzymes, il reste encore de nombreuses questions sans réponse concernant leur régiosélectivité et leurs propriétés structurales. Le dichroïsme circulaire est une méthode fréquemment employée pour étudier la structure secondaire des enzymes. Cette méthode peut fournir des informations précieuses sur le repliement de l'enzyme, sa stabilité et son interaction avec diverses molécules [251]. Cependant, peu d'études ont utilisé cette technique pour examiner la structure intrigante de la lipase de *Fusarium*.

Dans ce contexte, ce chapitre vise à approfondir les recherches antérieures sur cette famille de lipases. Une étude sera menée pour déceler le lien entre la structure et la fonction de ces enzymes. Nous chercherons à fournir des explications structurales pour chaque propriété biochimique identifiée. Pour ce faire, nous envisageons une expression hétérologue dans *Pichia pastoris*, de la lipase recombinante de notre souche *Fusarium annulatum* nouvellement isolé. L'objectif principal est d'étudier les caractéristiques fondamentales de cette enzyme, en explorant d'abord ses propriétés biochimiques et cinétiques, évaluant sa spécificité et sa régiosélectivité, et en les comparant à celles de GZEL, qui demeurent non étudiées. De plus, une étude approfondie de sa structure sera menée *in silico* par une modélisation tridimensionnelle et un docking moléculaire, ainsi qu'*in vitro* par dichroïsme circulaire afin d'évaluer sa stabilité structurale et son mécanisme catalytique. Enfin, une comparaison sera effectuée entre les résultats issus de l'analyse *in silico* et ceux obtenus *in vivo* à partir du dichroïsme circulaire.

## 2. Clonage de gène et analyse de séquence

Le gène responsable de la production de la protéine rFAL a été initialement désigné sous le nom de *LipFAL*. La protéine déduite, composée de 322 acides aminés, possède une étiquette à six histidines à son extrémité C-terminale. Le gène *lipFAL* contient un cadre de lecture ouvert de 1269 paires de bases. Le gène a été sous-cloné dans le vecteur pPICZ $\alpha$ A sous le contrôle transcriptionnel de AOX1, contenant la séquence signal  $\alpha$ -factor de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le plasmide pPicZ $\alpha$ A-rFAL(Figure33) a été utilisé pour transformer les cellules de *P. pastoris* X-33, qu'ont ensuite été sélectionnées sur des boîtes de YPD (Yeast Peptone Dextrose) contenant de la Zeocine<sup>TM</sup>. Parmi les transformants obtenus, huit ont été choisis pour la production de lipase dans des conditions totalement inductrices en utilisant le méthanol (1% v/v) comme seule source de carbone. Le clone exhibant l'activité lipase la plus élevée a été choisi pour produire l'enzyme recombinante. L'évaluation de l'activité lipolytique du milieu de culture a été effectuée en utilisant TC8 comme substrat. Les données obtenues ont révélé un maximum d'activité lipolytique de 750 U/ml après 6 jours de culture à 30 °C, comme illustré dans la Figure 34.

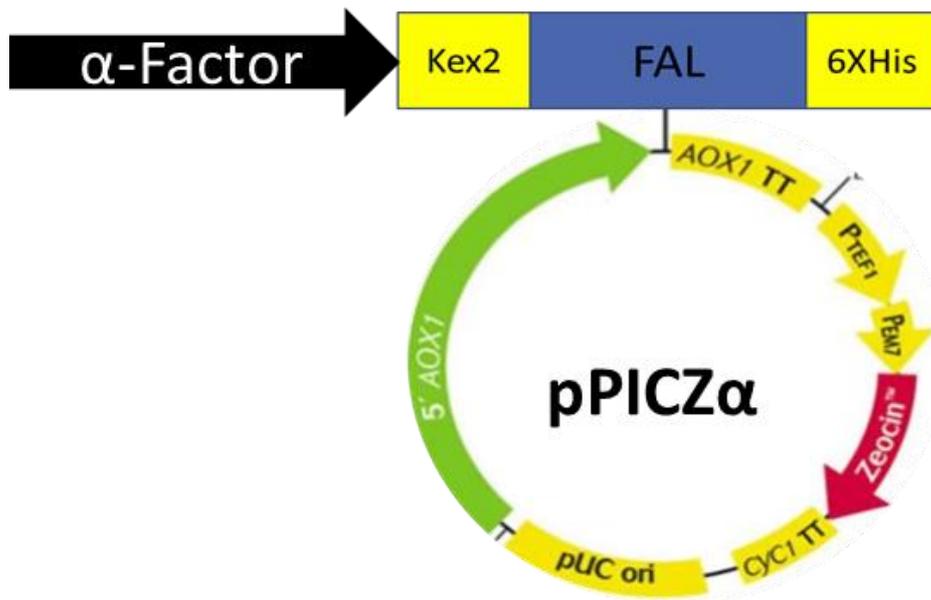
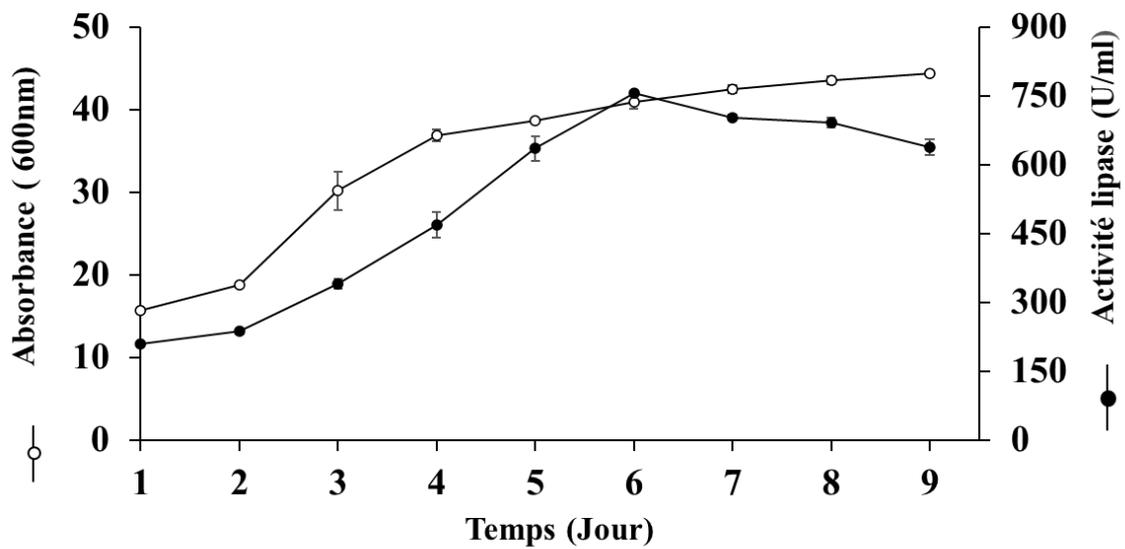
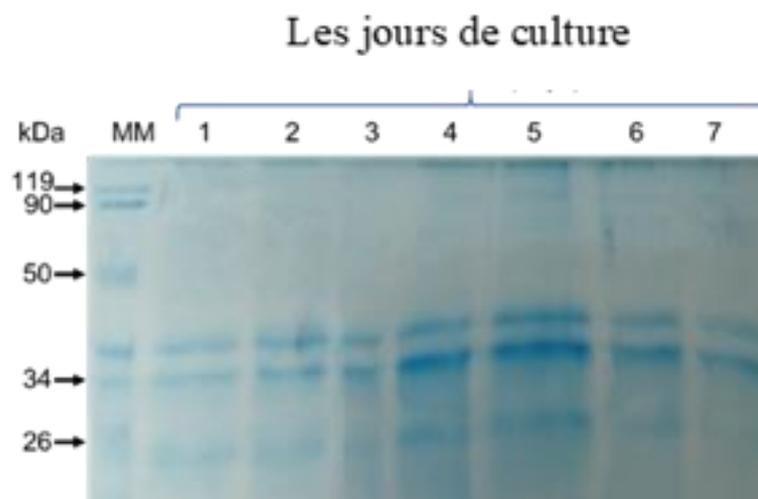


Figure 36 : Carte de plasmide pPICZ-LipFAL.



**Figure 37 :** Cinétique de croissance microbienne (o) et production de lipase extracellulaire de X33-rFAL. L'activité a été mesurée sur le substrat trioctanoïne (TC8) en utilisant la technique du pH-stat. Les cultures ont été réalisées dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL de milieu liquide BMMY et incubées à 30 °C sous agitation de 250 tr/min. Le méthanol [1 % (v/v)] a été ajouté toutes les 24 heures pour induire le fort promoteur AOX1. Des aliquotes ont été prélevées toutes les 24 heures pour suivre la croissance et l'activité lipasique. Chaque point représente la moyenne (n = 3) ± l'écart-type.

L'analyse par gel SDS de surnageant de milieu de culture a révélé deux bandes protéiques proéminentes. L'une de ces bandes avait la masse moléculaire attendue de rFAL 34 kDa et l'autre bande avait une masse approximative de 36 kDa. Ces résultats suggèrent que rFAL est potentiellement sécrété sous deux formes extracellulaires. L'intensité de rFAL a augmenté pendant le 5<sup>ème</sup> jour de culture puis a diminué après 8 jours, probablement en raison de la dégradation de rFAL par les protéases (Figure 38).



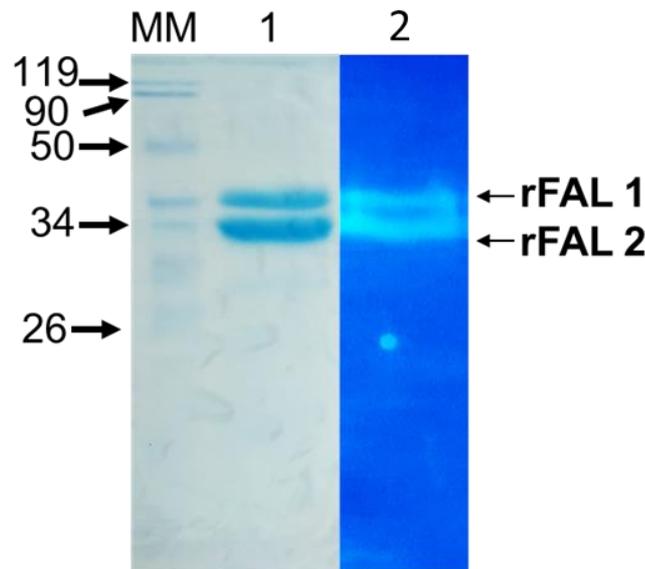
**Figure 38:** Analyse par SDS-PAGE de l'expression de rFAL à partir du milieu surnageant. Pour chaque jour, 100 µl de surnageant du milieu ont été chargés. MM désigne le marqueur de masse moléculaire.

La purification de cette nouvelle lipase recombinante, rFAL, a été réalisée en une seule étape de chromatographie d'affinité sur métal immobilisé en utilisant une colonne Ni-IDA, ce qui a donné un rendement final de 46,5%, comme le montre le Tableau 11 et illustré à la Figure 36.

**Tableau 11** : Bilan de purification de rFAL.

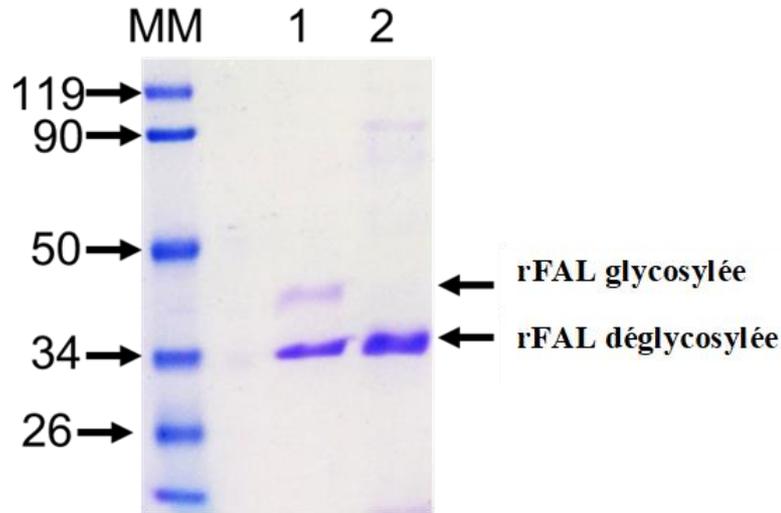
Étapes de purification <sup>a</sup>	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification (n-Fois)	Rendement de purification (%)
Extrait brute	6,45	2389	1	100
Colonne d'affinité Ni-IDA	1,2	6000	2,51	46,51

La masse moléculaire de rFAL purifiée a été évaluée par SDS-PAGE et western blot. Les résultats de ces tests ont révélé la présence de deux bandes, avec des masses moléculaires apparentes d'environ 34 kDa, qui correspondaient à la masse moléculaire attendue de rFAL, et une autre bande de 36 kDa. En utilisant le logiciel NetNGlyc v1.0, un site potentiel de N-glycosylation (Asn-X-Ser-Cys) a été identifié en position Asn147. Pour vérifier si les deux bandes présentes sont bien deux formes de rFAL, un test de zymographie a été réalisé, qui a révélé que les deux bandes contiennent une activité lipolytique.



**Figure 39** : Analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE de la rFAL (12% de polyacrylamide) des protéines éluées. MM désigne le marqueur de masse moléculaire ; piste 1, rFAL purifiée ; Piste 2, coloration de l'activité lipolytique du zymogramme du rFAL purifié. Après l'électrophorèse, le gel a été incubé dans 10  $\mu$ M de butyrate de méthylumbelliféryle pendant 15 min, à 37°C. Les bandes ont été analysées sous UV pour révéler l'activité. MM, marqueur de masse moléculaire.

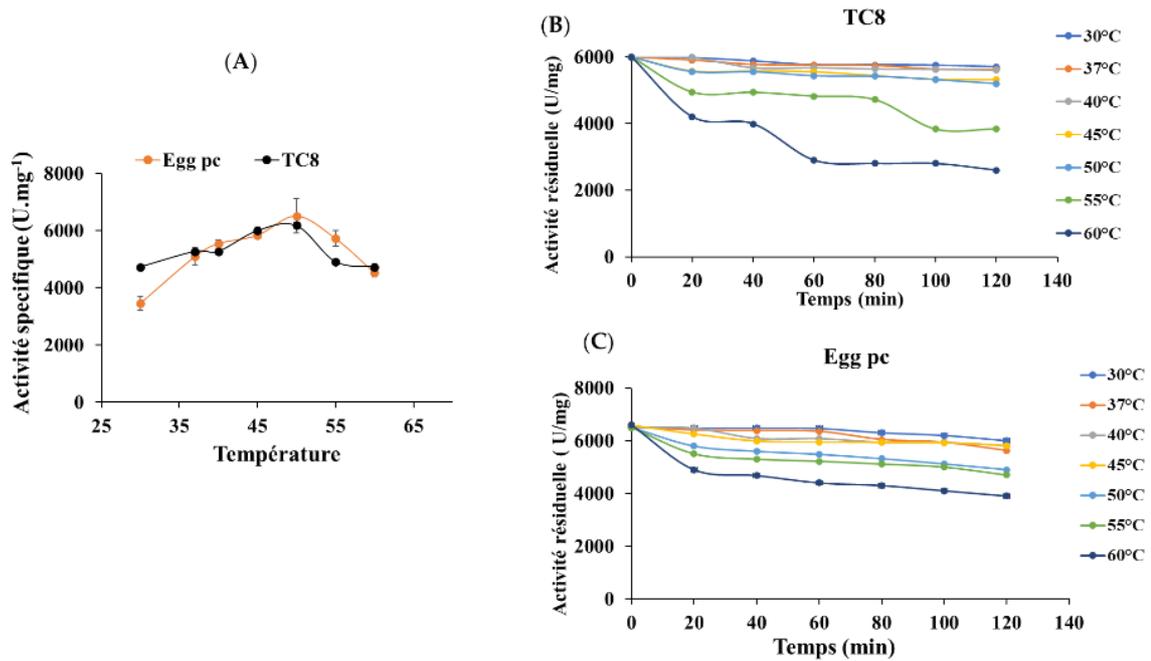
La séquence de l'extrémité N-terminale a ensuite été analysée pour les deux formes purifiées, révélant que les deux protéines ont le même N-terminal : A-V-G-V-T, qui est également le N-terminal de rFAL. L'hypothèse que la protéine est exprimée sous une forme glycosylée secondaire a été renforcée par une analyse de la fraction purifiée avec l'endoglycosidase (Endo H). Ce traitement a produit une réduction considérable du poids moléculaire de la bande de 36kDa qui a passé à 34 kDa, suggérant que la protéine a été initialement produite sous une seconde forme glycosylée.



**Figure 40** : Analyse SDS-PAGE de la rFAL après déglycosylation avec l'endoglycosidase (Endo H). piste 1, rFAL glycosylée ; piste 2, rFAL digérée avec Endo H. MM, marqueur de masse moléculaire.

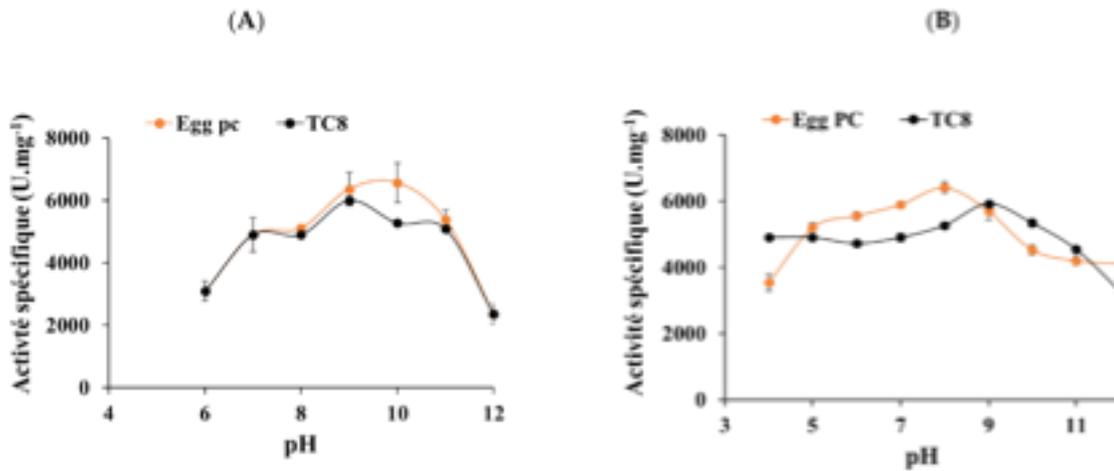
### 3. Étude des propriétés physico-chimiques de rFAL

L'activité de rFAL a progressivement augmenté avec l'augmentation de la température jusqu'à atteindre 50-55°C, qui a été déterminée comme la température optimale pour les activités phospholipase et triglycérides lipases (comme illustré à la Figure 38A). En ce qui concerne la stabilité thermique, rFAL est restée stable dans un intervalle de températures de 25-50°C. Cependant, ses activités ont montré une diminution significative à des températures supérieures à 60°C (Figure 38 C).



**Figure 41** : Effets de la température sur l'activité(A) et la stabilité (B) de la rFAL purifiée en utilisant TC8 ou Egg PC . L'activité enzymatique à différentes températures (de 25 °C à 55 °C) a été déterminée en utilisant TC8 à pH 9 ou PC d'œuf à pH 11. La stabilité de FAL a été mesurée sur TC8 (B) ou PC d'œuf (C) à pH 9. Les activités résiduelles sont exprimées en pourcentage de l'activité initiale (point au temps 0, mesuré immédiatement après l'ajout de l'enzyme), qui a été fixée à 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

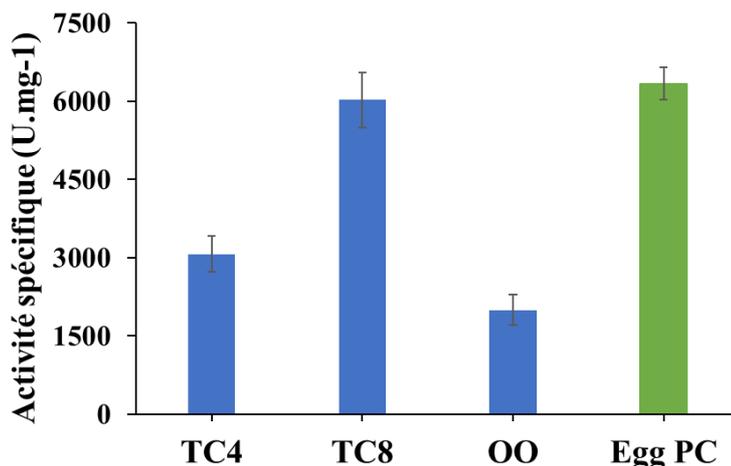
L'activité lipolytique maximale de l'enzyme a été observée à un pH de 10 (comme le montre la Figure 38 A). De plus, l'enzyme a montré une activité notable à pH 8 et 9, équivalent respectivement à 60% et 75% de son activité maximale. À l'inverse, l'activité a diminué dans des conditions de pH acides, avec seulement 30% de son activité initiale à pH 6 et presque aucune activité en dessous de pH 6. De plus, l'activité lipolytique de l'enzyme purifiée rFAL a conservé environ 80% de son activité initiale après une heure d'incubation lorsqu'elle a été exposée à un pH de 9, 10, et 11 (comme le montre la Figure 39B). En revanche, lorsqu'elle a été soumise à un pH de 5 ou 6, l'enzyme a conservé plus de 65% de son activité résiduelle après une heure d'incubation. Ces résultats suggèrent que l'enzyme peut résister à un pH neutre à alcalin mais a une résistance plus faible à un pH acide.



**Figure 42 :** Effets du pH sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la rFAL purifiée. En utilisant TC8 ou Egg PC dans des conditions standard. Les activités résiduelles ont été estimées après 20, 40, 60 et 90 minutes d'incubation à différentes valeurs de pH allant de 4 à 12 à 45°C. Les activités résiduelles sont exprimées en pourcentage de l'activité initiale qui était l'activité maximale sur TC8 obtenue à 50°C ou sur PC d'œuf à 55 et était considérée comme 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

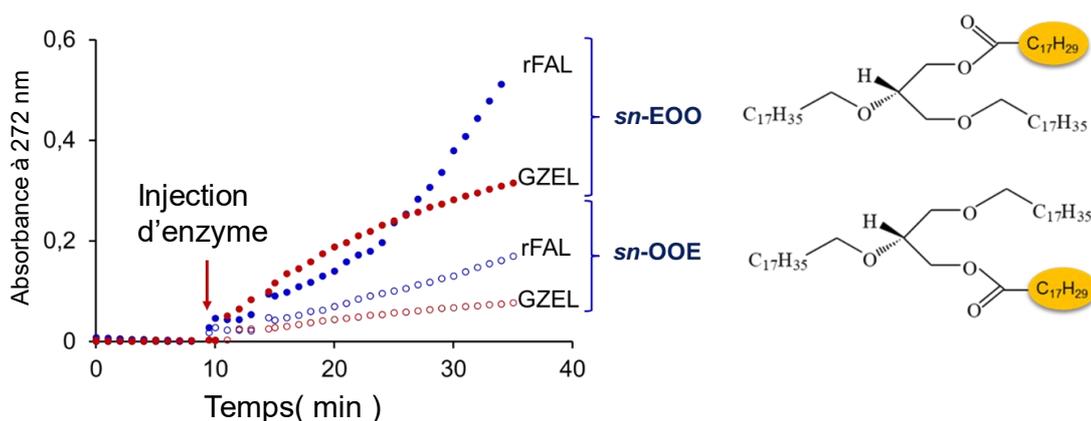
### 3.1. Spécificité du substrat de rFAL

Différents substrats, dont des triacylglycérols à chaîne courte (tributyryne), des triacylglycérols à chaîne moyenne (trioctanoïne), des triacylglycérols à longue chaîne (huile d'olive), des phospholipides (PC de jaune d'œuf) et des galactolipides (1,2-diacyl-3-O-( $\alpha$ -glucopyranosyl-*sn*-glycerol) ont été utilisés pour mesurer l'activité lipolytique de la lipase recombinante (figure 40) et pour déterminer sa spécificité de substrat. L'activité la plus significative sur les substrats triglycérides a été observée avec la longueur de chaîne moyenne TC8, avec une activité spécifique de 6000 U/mg, qui était environ trois fois plus élevée que l'activité observée avec les émulsions d'huile d'olive (2000 U/mg). De même, rFAL a hydrolysé efficacement le TC4 (3000 U/mg). En outre, rFAL a montré une activité élevée sur les phospholipides (PC de jaune d'œuf) avec une mesure de 6500 U/mg. Cette lipase recombinante a montré aussi une activité sur les monogalactolipides, avec une mesure de XX U/mg (Figure39).



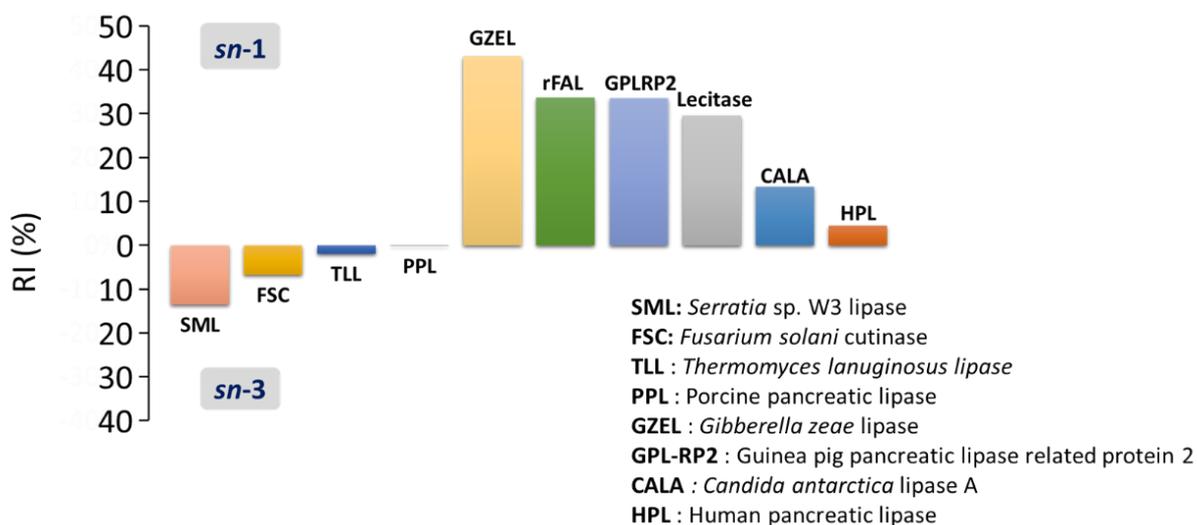
**Figure 43 :** Le profil de spécificité de substrat de la rFAL purifiée. La sélectivité de la longueur de chaîne de FAL sur divers triacylglycérols, l'activité spécifique a été mesurée dans des conditions standards en utilisant le tributyrine (TC4), la trioctanoïne (TC8), et la trioléine (TC18) ou l'émulsion d'huile d'olive (OO) ainsi que le PC d'œuf comme substrat, comme décrit dans le Matériel et les Méthodes.

La régiosélectivité de rFAL et de GZEL envers les positions *sn*-1 ou *sn*-3 du substrat TG (triacylglycérol) a été étudiée en déterminant le taux d'hydrolyse de 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2,3-octadecyl-*sn*-glycérol (*sn*-EOO) ou 1,2-octadecyl-3- $\alpha$ -eleostearoyl-*sn*-glycérol (*sn*-OOE) enrobé en surface. Les résultats ont montré, comme le montre la Figure 41 A, que la pente cinétique de rFAL et de GZEL était plus élevée lors de l'utilisation de *sn*-EOO que lors de l'utilisation de *sn*-OOE, indiquant une préférence claire de ces enzymes pour la position *sn*-1 du substrat TG. Les activités spécifiques de rFAL ont été calculées à  $11,99 \pm 0,7$  U/mg en utilisant *sn*-EOO et  $5,95 \pm 0,4$  U/mg en utilisant *sn*-OOE.



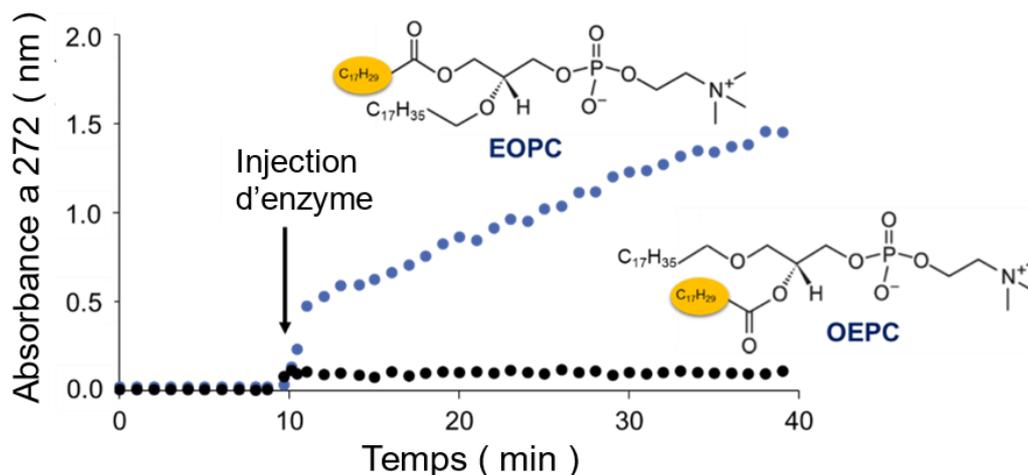
**Figure 44 :** Régiosélectivité de rFAL et GZEL envers les TG synthétiques. (A) Cinétique de l'hydrolyse de *sn*-EOO ou *sn*-OOE par rFAL et GZEL enrobés sur des puits de plaque de microtitration. La variation d'absorbance à 272 nm a été enregistrée pendant 10 min, pour stabilisation, puis pendant 30 min après l'injection des enzymes (0,1  $\mu$ g par puits). Les enregistrements cinétiques présentés ici sont typiques de ceux obtenus dans trois expériences indépendantes.

L'efficacité de rFAL dans l'hydrolyse sélective de positions spécifiques un substrat TG donné a été évaluée à l'aide de l'indice de régiosélectivité (RI). Comme le montre la Figure 42B, FAL a montré une préférence pour la position *sn*-1, avec un RI de 33%, par opposition à l'hydrolyse des positions *sn*-1 et *sn*-3. Cette valeur a ensuite été comparée aux valeurs RI précédemment déterminées pour d'autres lipases microbiennes, comme cité dans la référence [252].



**Figure 45 :** RI% de rFAL en utilisant *sn*-EOO ou *sn*-OOE. Comparé à ceux de SML, FSC, TLL, Lecitase, CALA et CALB rapportés dans nos études précédentes.

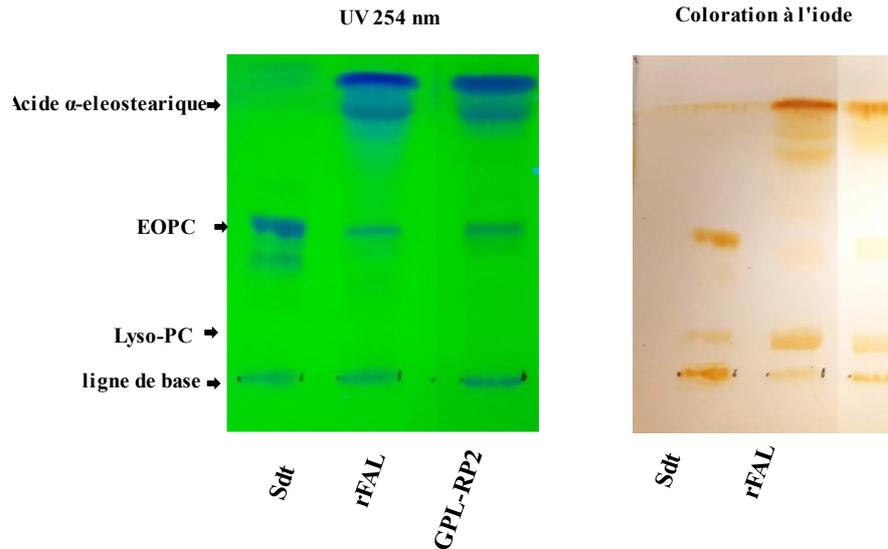
Les activités PLA1 et PLA2 de FAL ont été évaluées en utilisant la même technique spectrophotométrique, qui implique l'utilisation de phospholipides sur mesure tels que EOPC et OEPC. EOPC, 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-rac-glycéro-3-phosphocholine estérifiée en position *sn*-1, et OEPC, 1-octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-rac-glycéro-3-phosphocholine, estérifiée en position *sn*-2, ont été utilisées comme substrats. Le dosage mesure la quantité d'acide  $\alpha$ -éléostéarique qui est libérée en continu des substrats phospholipidiques. Comme on peut le voir sur la Figure 43, lorsque FAL a été injectée sur EOPC, l'absorbance à 272 nm a rapidement augmenté, indiquant une forte activité PLA1. Cependant, aucune hydrolyse n'a été observée lorsque FAL a été injectée sur OEPC, indiquant ainsi une faible activité PLA2.



**Figure 46 :** Suivi cinétique de la lipolyse de l'EOPC enduit et de l'OEPC par rFAL. Les variations de l'absorbance à 272 nm ont été suivies pendant 10 min pour la stabilisation, puis pendant 40 minutes après l'injection de rFAL.

### 3.2. Analyse par chromatographie sur couche mince (TLC) des produits de lipolyse

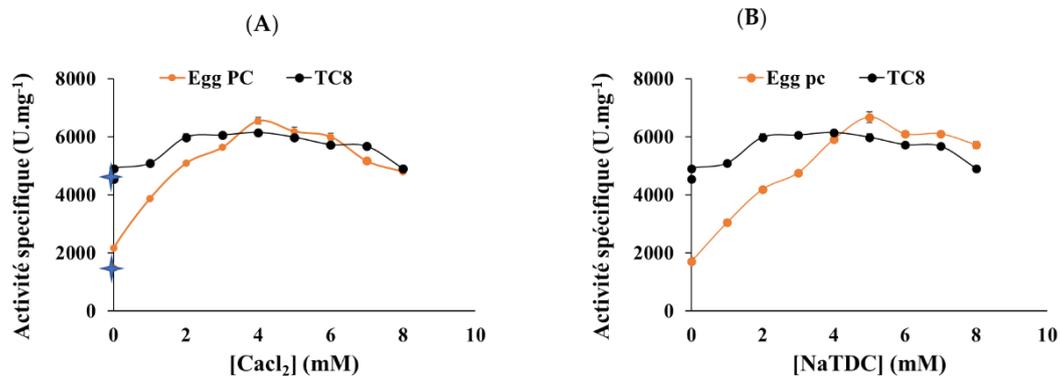
Pour confirmer davantage la précision du test de régiosélectivité des phospholipides de rFAL, les produits de la lipolyse ont été recueillis à partir des puits de la plaque de microtitration et examinés par chromatographie sur couche mince (TLC). L'examen par TLC des produits de lipolyse de rFAL et de GPLR-RP2 sur EOPC a démontré une réduction notable de l'EOPC et la présence d'acide  $\alpha$ -éléostéarique, qui était visible sous lumière ultraviolette (UV 254 nm), mais le lyso-PC, qui n'absorbe pas la lumière, n'a pas été observé (Figure 44B, UV 254 nm). Lorsque la même plaque TLC de l'expérience sur l'EOPC a été analysée à l'aide d'iode, l'acide  $\alpha$ -éléostéarique et le lyso-PC étaient clairement visibles (Figure 7B, iode). Il est important de noter que la production de lyso-PC par rFAL ou GPL-RP2 sur EOPC (Figure 45A, iode) ne peut être observée qu'après exposition à l'iode en raison de l'absence de groupes absorbant les UV (comme l'acide  $\alpha$ -éléostéarique) dans l'octadécyl-PC.



**Figure 47 :** Analyse par TLC de l’hydrolyse de l’EOPC enduit révélée par lumière UV à 254 nm (panneau de gauche) et par coloration à l’iode pendant 15 minutes (panneau de droite). Les standards (Sdt) utilisés étaient l’EOPC et l’acide  $\alpha$ -eleostearique. L’EOPC enduit a été hydrolysé par rFAL ou GPL-RP2, et l’enzyme avec une activité PLA1 connue (El Alaoui et al. 2016)

### 3.3. Effet des sels biliars et des ions calcium

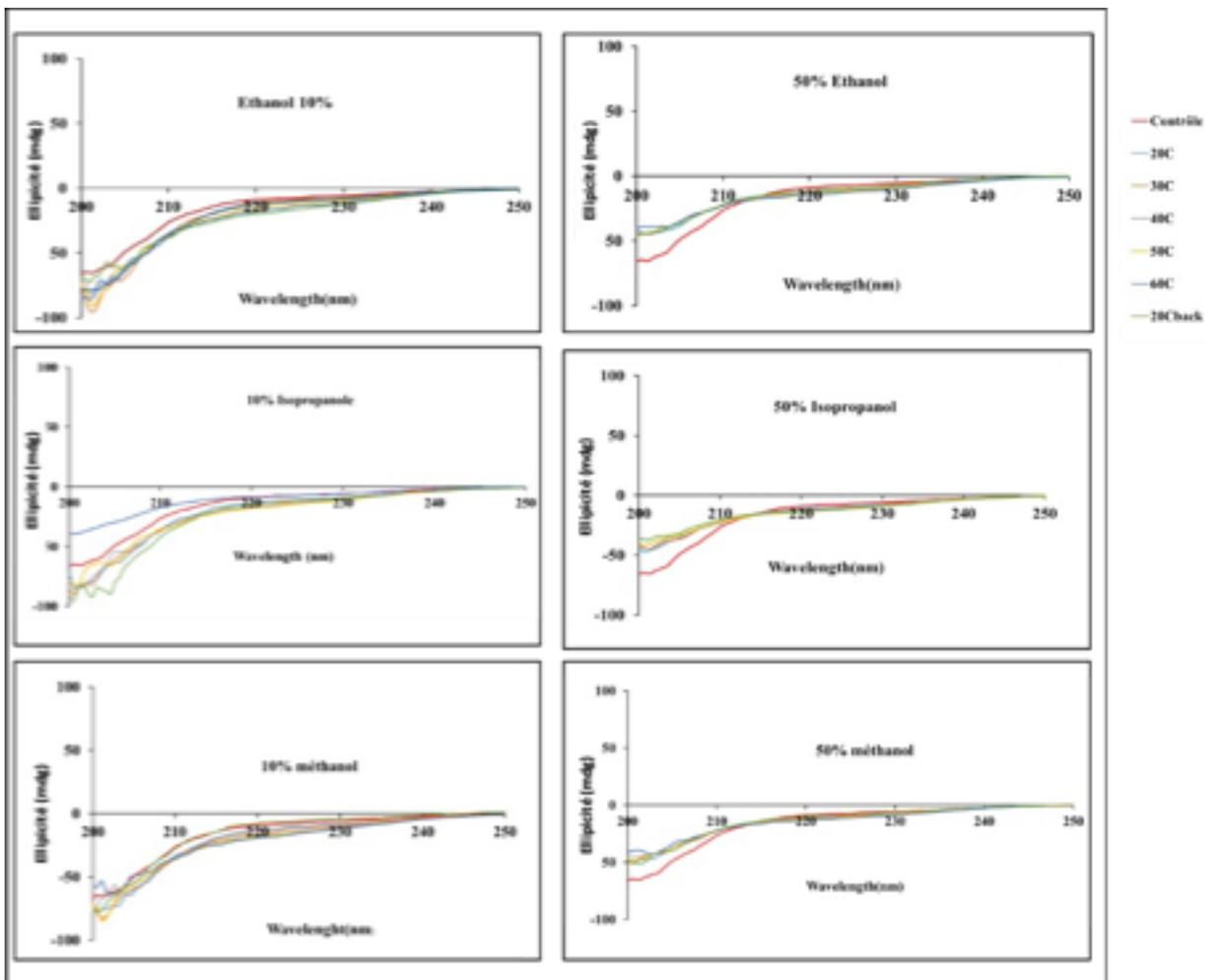
L’impact de différentes concentrations d’acide taurodésoxycholique sodique (NaTDC) sur la rFAL a été étudié. Nos résultats montrent que les niveaux les plus élevés d’activités de triglycéride lipase et de phospholipase ont été observés à 5mM de NaTDC. De plus, nos résultats montrent que le rFAL conserve plus de 80% de ses activités à 8mM de NaTDC (Figure 5A). Par ailleurs, nous avons examiné la dépendance de la rFAL vis-à-vis du calcium en mesurant les taux d’hydrolyse de TC8 et de Egg PC en présence de concentrations variables de  $\text{CaCl}_2$ . Nos données suggèrent que l’ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  augmente les activités du rFAL, atteignant un maximum de 4mM de  $\text{CaCl}_2$  pour l’enzyme (Figure 45B).



**Figure 48 :** Influence des concentrations croissantes d’ions calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) et de taurodésoxycholate de sodium (NaTDC) sur les activités de rFAL.

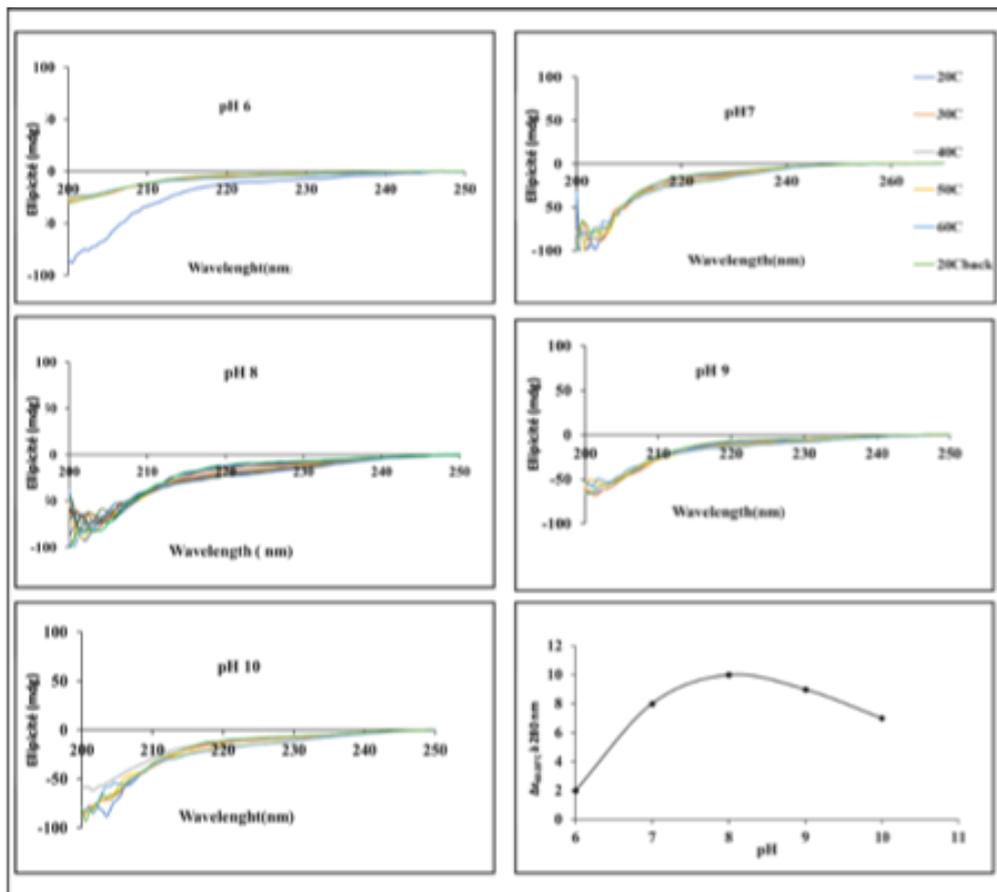
### 3.4. Analyse par dichroïsme circulaire (CD)

La dichroïsme circulaire (DC) est une technique utilisée pour déterminer la structure secondaire des protéines. Dans ce cas, elle a été utilisée pour évaluer la stabilité conformationnelle de rFAL, dans des conditions difficiles telles que le pH alcalin, une température élevée et la présence de solvants organiques. Les profils de dénaturation thermique de rFAL à pH 8, mesurés à 218 nm, ont montré que l'enzyme maintenait sa conformation structurale jusqu'à 55°C. La structure de la rFAL semblait être plus compacte à 80°C sans subir de dénaturation. Ces résultats indiquent également que ces changements conformationnels étaient réversibles à tous les pH supérieurs à 6. L'analyse de la structure secondaire de rFAL à différents niveaux de pH a révélé qu'elle restait pratiquement inchangée de pH 7 à 11, comme le montre la figure 49.



**Figure 49 :** Profil de dénaturation thermique de rFAL de 20°C à 60°C surveillé par spectroscopie de dichroïsme circulaire à pH 8 et en présence de différentes concentrations (de 10% à 50% v/v) d'éthanol, d'isopropanol et de méthanol. Chaque échantillon a été scanné 5 fois et chaque spectre est la moyenne de 5 scans.

Cependant, à pH 6 et à des températures supérieures à 30°C, les résultats ont indiqué des changements conformationnels irréversibles significatifs. De plus, l'analyse a indiqué que la structure secondaire de la rFAL n'était pas particulièrement tolérante à la présence de jusqu'à 50% d'éthanol et d'isopropanol à des températures variables. Notamment, rFAL a montré une stabilité remarquable à 50% de méthanol, et les changements étaient réversibles, comme le montre la Figure 46. Ces résultats démontrent la capacité de la protéine à tolérer des niveaux élevés de solvants organiques, ce qui est similaire à ce qui est utilisé dans des contextes industriels.



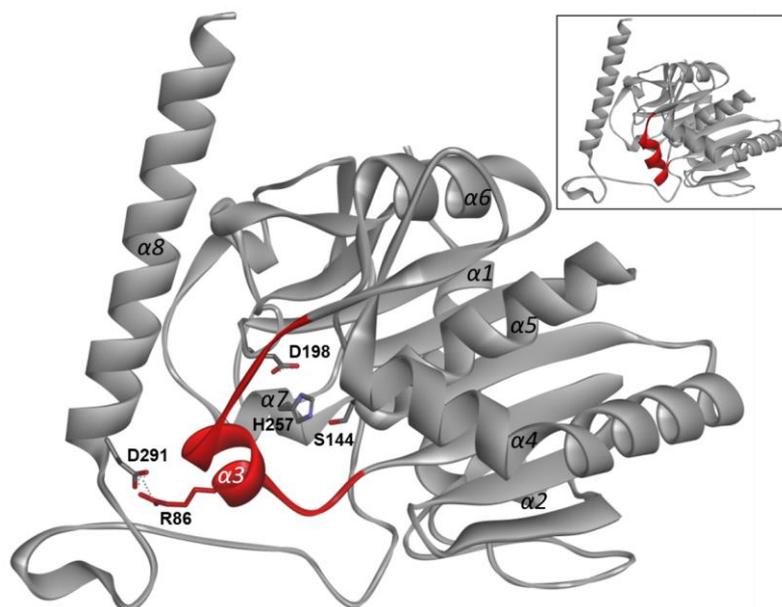
**Figure 50 :** Profil de dénaturation thermique de rFAL de 20°C à 60°C. surveillé par spectroscopie de dichroïsme circulaire à pH 8 et en présence de différentes concentrations (de 10% à 50% v/v) d'éthanol, d'isopropanol et de méthanol. Chaque échantillon a été scanné 5 fois et chaque spectre est la moyenne de 5 scans.

#### 4. Modélisation et docking de rFAL

Le modèle tridimensionnel de la rFAL obtenu à partir du serveur Alphafold (Figure 49) présente le repliement typique de l' $\alpha/\beta$ -hydrolase que l'on trouve dans d'autres lipases, avec un noyau central composé de dix feuilles  $\beta$  entourés de huit hélices  $\alpha$ . Le modèle a identifié la présence d'un triade catalytique constitué de Ser144, Asp198 et His257, qui est conservé dans la plupart des lipases fongiques. Quatre ponts disulfures ont été détectés aux positions 24-267,

36-41, 99-105 et 237-245. Le "lid" du site actif de la rFAL, qui joue un rôle dans la régulation de l'accès au substrat, a été localisé à l'hélice  $\alpha_3$  et est formé par les résidus Ile83 à Phe94.

L'extension C-terminale de la rFAL (résidus 269-319) est une caractéristique unique qui la distingue des autres lipases. Un segment en boucle a été identifié entre les résidus 269 et 289, où une structure secondaire  $\alpha$ -hélicoïdale classique a été observée. Cette structure est principalement située au niveau du site actif catalytique. La surface d'interaction entre le noyau et l' $\alpha$ -hélice suggère la présence d'une rainure positivement chargée au fond du noyau, qui est occupée par l' $\alpha$ -hélice dans la structure de la rFAL. La stabilité de la structure en  $\alpha$ -hélice au sein de la rFAL est due à son microenvironnement unique, qui comprend des contributions d'acides aminés hydrophiles par le biais d'interactions de liaisons hydrogène. Les caractéristiques structurales uniques de la boucle et des segments  $\alpha$ -hélicoïdaux de l'extrémité C-terminale distinguent la rFAL des autres lipases et suggèrent la possibilité d'un mécanisme enzymatique distinct.



**Figure 51 :** Vue d'ensemble de la structure 3D de rFAL. Prédite par les outils Alphafold (A). Les hélices  $\alpha$  sont étiquetées de  $\alpha_1$  à  $\alpha_8$ . Les résidus catalytiques S144, D198 et H257 sont représentés sous forme de bâtonnets CPK tandis que le couvercle (hélice  $\alpha_3$  / 82-95) dans sa conformation fermée est coloré

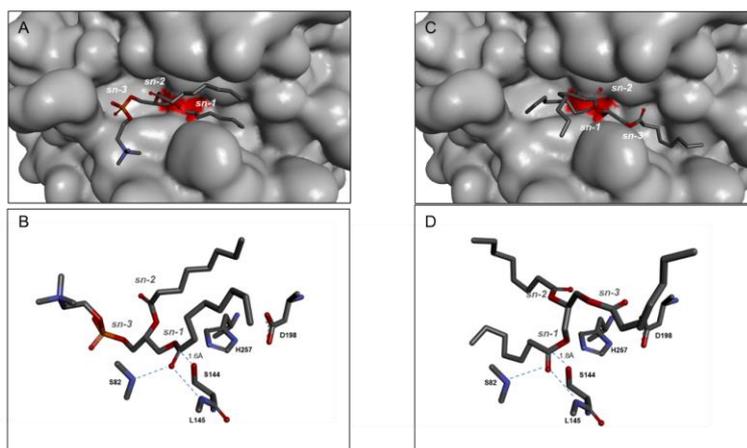
Afin de comprendre l'interaction entre rFAL et les substrats triglycéride, phospholipide et galactolipide, et de tenter de relier les caractéristiques structurales aux données expérimentales, des simulations de docking moléculaire ont été effectuées avec divers substrats (Trioctanoïne et DiC8-PC). Les expériences de docking ont été réalisées en utilisant un modèle de la conformation ouverte de rFAL, le site actif étant entièrement accessible aux substrats.

Le docking de ces substrats a abouti à plusieurs conformations possibles à l'intérieur de la poche catalytique de rFAL. Pour une analyse plus poussée, les conformations les plus favorables ont été sélectionnées, exposant directement soit les atomes de carbone réactifs sn-1,

*sn*-2, ou *sn*-3 du substrat à la sérine catalytique (Ser244). Les conformations qui avaient une distance calculée inférieure à 4 Å, permettant une attaque nucléophile, ont été choisies. Les conformations trouvées pour la Trioctanoïne ont révélé que les deux modèles des positions réactives *sn*-1 et *sn*-3 pouvaient s'adapter précisément dans la poche catalytique de rFAL. Cette poche se compose d'une crevasse d'environ 20 Å de long et 10 Å de large, la rendant suffisamment profonde pour accueillir des triglycérides à chaîne courte à longue.

L'analyse a en outre révélé que bien que les modèles de position réactive *sn*-1 et *sn*-3 aient des distances appropriées pour la catalyse, il y avait des différences notables dans leurs distances d'interaction avec les résidus catalytiques. On a constaté que le carbone réactif *sn*-3 avait une distance plus longue de l'oxygène réactif Ser244 (2.2 Å) par rapport au modèle réactif *sn*-1 (1.6 Å).

Avec la molécule de phospholipide, les conformations trouvées indiquaient que seul le modèle de la position réactive *sn*-1 pouvait s'adapter correctement dans la poche catalytique de rFAL. Le carbone réactif *sn*-1 était situé à 1.8 Å de l'oxygène réactif de la Ser244, tandis que la conformation *sn*-2 n'était pas à une distance acceptable de la sérine catalytique.



**Figure 52 :** Docking moléculaire in silico de la phosphatidylcholine (A) ou du triacylglycérol (B) dans la poche de substrat de rFAL, positionnant dans les deux cas le carbone réactif *sn*-1 vers la ser144 catalytique (représentée en rouge). B et D : vues du site actif de FAL avec PC (B) ou TG (D) dans leurs formes réactives *sn*-1. L'azote du squelette de s82 et i145 constitue le trou oxyanion de FAL

## 5. Discussion

L'objectif de notre étude était de mieux comprendre la physiologie des champignons dérivés de l'olive, en particulier leurs systèmes enzymatiques lipolytiques, et leur capacité à tolérer les conditions sévères de leur biotope tunisien extrême. Dans des recherches précédentes, nous avons criblé des souches fongiques isolées de la région sud de la Tunisie et évalué leurs activités lipasiques. L'une de ces souches, *F. annulatum* CBS, a été sélectionnée pour une étude plus approfondie en raison de ses activités élevées sur les triglycérides et le phospholipide. Le

génomique complet de ce champignon a été séquencé et son protéome a été analysé. Cela nous a permis d'identifier un gène nommé *lipFAL* codant pour une lipase putative nommée rFAL, a ensuite été exprimée de manière hétérologue dans *Pichia pastoris* X33 et la lipase résultante, rFAL, a été caractérisée.

La séquence protéique déduite a été trouvée avec un motif Gly-His-Ser-Leu-Gly qui s'aligne avec le motif largement observé Gly-X-Ser-X-Gly retrouvé dans les lipases microbiennes et mammifères. Une analyse plus approfondie a montré que la séquence rFAL partage 60% de similarité avec la FSL et la FSL2 clonées précédemment à partir de *Fusarium solani* [126]. De plus, rFAL a montré une identité de séquence de 98% avec la lipase de *Fusarium oxysporum* [142] et une identité de 82% avec la lipase de *Fusarium graminearum* (FGL) [141].

Comme le montrent les analyses SDS-PAGE (Figure 35), la rFAL recombinante était la protéine prédominante dans le surnageant de culture. Une purification à l'homogénéité a été réalisée via une unique étape de colonne d'affinité NI-IDA, avec un rendement global final de 46,51 (Tableau 11). Nos résultats confirment que la rFAL a été exprimée sous deux formes, glycosylée et non-glycosylée.

Dans *Pichia pastoris*, la glycosylation est cruciale pour le repliement adéquat et la stabilité des enzymes recombinantes. Cependant, l'effet précis de la glycosylation sur l'activité et la stabilité de certaines lipases recombinantes n'est pas totalement élucidé. Des études ont été menées sur la glycosylation de lipases recombinantes produites dans *Pichia pastoris*, comme celle de Yang et al [253], axée sur l'expression d'une lipase de *Rhizopus chinensis*. Ils ont comparé la productivité, l'activité et la stabilité des formes glycosylées et non-glycosylées de l'enzyme, révélant une activité et une stabilité supérieures de la forme glycosylée. Une autre étude a corroboré que l'expression élevée de l'élastase recombinante dans *P. pastoris* est liée à ses sites de N-glycosylation [254]. Dès lors, des recherches supplémentaires s'imposent pour examiner l'effet de la glycosylation sur la stabilité, l'expression et l'activité de la rFAL en modifiant son site de glycosylation.

L'étude biochimique de cette nouvelle lipase recombinante indique qu'elle présente une thermo-activité. Les données de la Figure 37A démontrent que l'activité lipolytique la plus élevée de l'enzyme est à 55°C, un niveau d'activité deux fois plus élevée que le niveau d'activité à 30°C. Cette caractéristique est très recherchée pour les applications industrielles, car la réalisation de réactions enzymatiques à des températures élevées peut offrir de nombreux avantages [255]. Bien que certaines lipases fongiques aient été trouvées avec une température optimale élevée, la majorité des lipases de *Fusarium* présentent une activité plus grande dans un intervalle de 37°C à 40°C [61, 172]. De plus, l'activité lipolytique de rFAL a été évaluée à

55°C en fonctions de différentes valeurs de pH en utilisant du Egg PC et du TC8 comme substrats. Les résultats du profil pH en fonction de l'activité lipolytique (représenté à la Figure. 4A) indiquent que rFAL présente une activité dans un large intervalle de pH de 7 à 11, avec une activité optimale se produisant à pH 10. Au-delà de cet intervalle de pH, l'activité lipolytique diminue. Dans ce contexte, la rFAL est analogue aux majorités de lipases fongiques, qui présentent leur activité maximale dans des conditions de pH neutre ou alcalin. [127]. Ceci est en opposition avec le comportement de GZEL lors de sa surexpression dans *P. pastoris* X-33, où une activité maximale est observée dans des conditions de pH légèrement acides (pH 5-6).[141].

La thermostabilité de la lipase recombinante rFAL s'est avérée assez remarquable. Même soumise à des températures aussi élevées que 60°C, l'enzyme conserve plus de 60% de son activité. Cette thermostabilité a été confirmée par les résultats de dichroïsme circulaire, qui illustrent clairement que la structure secondaire de rFAL demeure intacte jusqu'à 55°C. Un changement conformationnel se produit au-dessus de cette température 55°C, provoquant un compactage de la structure de l'enzyme. Cette nouvelle configuration peut réduire l'activité de l'enzyme, mais l'enzyme reste non dénaturée. De plus toutes ces changements conformationnel causé par l'effet combinée des pH de 7 à 11 et de températures de 20°C à 80 °C sont réversibles. Des lipases thermotolérantes telles que *Thermomyces lanuginosus*, *Bacillus licheniformis*, *Thermomyces lanuginosus* et *Aspergillus niger* ont été rapportées dans la littérature, avec une stabilité thermique jusqu'à environ 60°C [35, 256, 257]. La thermostabilité des lipases est attribuée à plusieurs caractéristiques structurelles. Un facteur important est la présence d'un plus grand nombre de ponts disulfure dans les lipases thermostables par rapport aux lipases mésophiles. Ces ponts disulfure contribuent à stabiliser la structure de l'enzyme, empêchant ainsi le dépliage de la protéine à des températures élevées [258]. Un autre facteur important est la structure secondaire des lipases thermostables, qui ont généralement un nombre plus élevé d'hélices  $\alpha$  et un nombre plus faible de feuillets  $\beta$ , conduisant à une structure protéique plus compacte qui est moins sujette au dépliage à des températures élevées [259]. De plus, les lipases thermostables peuvent avoir un site actif plus protégé, ce qui peut empêcher l'enzyme de subir des changements conformationnels qui pourraient diminuer son activité catalytique. Enfin, les lipases thermostables peuvent présenter un plus grand nombre de ponts salins, de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes au sein de leur structure protéique, favorisant la stabilité à des températures élevée [258, 260, 261].

Nos données indiquent que la rFAL montre un remarquable intervalle de stabilité en termes de pH, entre pH 5 et 11, ce qui est nettement différent de la littérature précédente sur les lipases

fongiques. La plupart des lipases fongiques ont été observées comme étant stables dans un intervalle de pH de 4 à 7, avec moins de résistance au pH alcalin [220] comme observé pour les lipases de *Rhizopus sp. ZAC3* [262], *Aspergillus niger* [222], et *Penicillium aurantiogriseum* [223]. Sa capacité à fonctionner dans des conditions alcalines la rend particulièrement utile pour de nombreuses applications, notamment la production de détergents et de savons, la transformation des aliments et la production de biocarburants, son importance est attendue pour augmenter à mesure que ces industries continuent de croître et d'évoluer [263]. Les données de dichroïsme circulaire ont démontré que la structure secondaire de l'enzyme alcaline présente une stabilité remarquable dans un intervalle de pH de 7-10. Cependant, à pH 6, l'enzyme subit un changement conformationnel distinct de manière irréversible, ce qui confirme la sensibilité de l'enzyme aux conditions de pH acide. Ces résultats sont en désaccord avec certaines lipases de *Fusarium* qui présentent une haute activité et une stabilité à des niveaux de pH acides [264, 265]. La stabilité des lipases fongiques à pH alcalin peut être attribuée à plusieurs caractéristiques structurelles de ces enzymes. La stabilité des lipases fongiques peut être influencée par leur composition en acides aminés par rapport au pH [266]. Les lipases fongiques avec une plus grande abondance d'acides aminés basiques, tels que la lysine, l'arginine et l'histidine, peuvent créer des ponts salins avec des groupes chargés négativement à des valeurs de pH élevées, ce qui peut améliorer la structure globale de l'enzyme. De plus, la stabilité de la protéine peut également être influencée par les interactions hydrophobes entre les résidus d'acides aminés non polaires. Dans des conditions de pH élevé, la protonation de ces résidus peut augmenter leur hydrophobicité et contribuer à une plus grande stabilité de la protéine [267].

On a observé une baisse significative dans les activités phospholipase et triglycéride lipase de rFAL en présence d'EDTA et en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.5A). Cet effet a également été rapporté pour d'autres lipases, comme la lipase lipoprotéine et la lipase pancréatique, qui nécessitent également des cations divalents pour leur activité enzymatique [268].

Cette diminution d'activité peut être attribuée à la dépendance de certaines lipases vis-à-vis des cations divalents, en particulier les ions calcium, pour leur activation et stabilisation. Néanmoins, l'activité de certaines lipases, comme celle de la phospholipase A2, est indépendante du calcium. La présence de calcium est susceptible d'avoir un impact sur les enzymes lipolytiques pour une variété de raisons. D'abord, le calcium peut aider à stabiliser la structure tridimensionnelle de lipase, ce qui aide à maintenir sa forme active. Cette stabilisation est particulièrement significative lorsque des sels biliaires sont présents, car ils ont le potentiel de faire déplier la lipase, la rendant inactive. Deuxièmement, les ions calcium peuvent aider à positionner le substrat lipidique au site actif de la lipase, ce qui permet une hydrolyse plus

efficace des liaisons ester au sein du substrat. La forte attraction électrostatique entre les groupes carboxylate chargés négativement dans le substrat et les ions calcium joue un rôle dans ce processus, aidant à l'orientation du substrat pour la catalyse[51].

L'activité PLA1 de rFAL présente une faible valeur de 1714 U/mg en l'absence de NaTDC, qui augmente ensuite progressivement pour atteindre une activité maximale de 6500 U/mg à une concentration de 5 mM de NaTDC (fig5B). Cet effet stimulant du NaTDC sur l'activité PLA1 a été précédemment noté pour plusieurs autres phospholipases[65, 236]. Les enzymes fonctionnant dans des environnements aqueux nécessitent des molécules amphipathiques, comme les détergents, pour soutenir leur activité. Le NaTDC, un dérivé d'acide biliaire avec des propriétés hydrophiles et hydrophobes, fonctionne comme un agent solubilisant efficace pour les lipases et les phospholipases. Le groupe sulfate du NaTDC est hydrophile, et le cycle stéroïdien est hydrophobe, lui permettant d'interagir avec les régions hydrophobes des enzymes et de maintenir leur activité dans les solutions aqueuses. De plus, le NaTDC peut améliorer l'activité catalytique des lipases et des phospholipases en modifiant leur conformation et en améliorant leur accessibilité aux molécules de substrat [237-239]. De plus, la stabilité de l'activité PLA1 de rFAL est maintenue même à des concentrations élevées (8 mM) de NaTDC, comme précédemment rapporté pour certaines autres phospholipases[61, 65, 236].

Une caractéristique remarquable de rFAL est sa capacité catalytique efficace pour l'hydrolyse des triglycérides avec des longueurs de chaîne acyle variées, ainsi que des phospholipides et des galactolipides. Comme démontré dans la figure 5, rFAL montre une préférence pour l'hydrolyse des TG à chaîne moyenne (en particulier, TC8), ce qui est cohérent avec les résultats de diverses autres lipases fongiques [61, 193, 194, 269]. Il convient de noter que l'activité phospholipase de rFAL est l'une des phospholipases de *Fusarium* les plus actives [127, 264, 270]. En fait, sous des conditions similaires, ces phospholipases étaient capables d'hydrolyser l'Egg pc avec une activité spécifique de 2400 U/mg-1 pour la phospholipase de *Fusarium solani*, 1170 U mg<sup>-1</sup> pour la Phospholipase B de *Fusarium oxysporum*. La large spécificité de substrat de certaines enzymes peut être attribuée à la flexibilité structurale et biochimique de leur site actif, leur permettant d'accueillir une variété de substrats [271].

Afin d'obtenir une compréhension plus précise de la spécificité de rFAL, la régiosélectivité de ses activités triglycéride lipase et phospholipase ont été évaluées. Nos résultats montrent que La rFAL a démontré la capacité d'hydrolyser à la fois les positions *sn*-1 et *sn*-3 de triglycérides. Cependant, cette enzyme a montré une préférence marquée pour la position *sn*-1 (Figure.6A). L'indice de régiosélectivité a été calculé à 33% puisque l'activité lipase triglycéride de rFAL sur EOO a été trouvée presque 2 fois plus élevée que sur le OOE. Dans cette étude, nous avons

étudié pour la première fois la régiosélectivité de GZEL envers TG en prouvant sa nette préférence pour la position *sn*-1. Comme le montre la Figure 41, les résultats indiquent que rFAL a montré une activité seulement envers la position *sn*-1 des substrats synthétiques des phospholipides, EOPC/ OEPC, qui distinguent entre les activités PLA1 et PLA2 [242]. Ces résultats suggèrent que la rFAL est une PLA1 stricte. Ces observations pourraient expliquer la haute productivité des TG lipases aux fortes activités phospholipases observées chez les espèces de *Fusarium*. Ces lipases pourraient jouer un rôle dans la dégradation des phospholipides membranaires végétales via leur activité PLA1.

L'activité phospholipase a été détectée dans les triglycérides lipases provenant de sources bactériennes et fongiques. En particulier, la lipase TG dérivée de staphylocoques a été signalée comme présentant à la fois une activité PLA avec 172 U/mg d'activité spécifique sur l' Egg PC[59], tandis que la lipase du champignon du bois *Peziza sp* a démontré une activité PLA[65]. De plus, dans une étude précédente [271], il a été démontré que plusieurs lipases classiques, y compris la lipase pancréatique de dinde (TPL), la lipase pancréatique de lapin (RPL) et la lipase pancréatique d'autruche (OPL), avaient la capacité d'hydrolyser la phosphatidylcholine (PC) de jaune d'œuf dans les mêmes conditions expérimentales. Les activités spécifiques de TPL, RPL et OPL ont été déterminées à  $28 \pm 5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $3 \pm 1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  et  $4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , respectivement [271].

Les lipases à haute activité et stabilité en présence de solvants organiques sont les plus demandées pour diverses applications biotechnologiques, telles que la production de biodiesel, la synthèse de produits chimiques fins et la transformation des aliments [184]. Dans cette étude, rFAL a montré une excellente thermostabilité avec des solvants organiques polaires à chaîne courte (méthanol, éthanol, isopropanol) (Figure 46). Bien qu'il soit bien connu que les lipases fongiques[194, 245, 272] ont tendance à être instables dans les solvants miscibles, surtout lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations qui seraient autrement optimales pour la réaction d'alcoololyse, les données de dichroïsme circulaire (CD) ont indiqué que rFAL présente une grande stabilité surtout en présence de méthanol. La présence d'un solvant miscible à l'eau peut modifier de manière significative l'hydrophobicité de l'environnement environnant, entraînant une perturbation du noyau hydrophobe de l'enzyme. En conséquence, cela peut entraîner la désactivation de la protéine[244, 246]. Cependant, dans une étude menée par S. Chamorro et al [273], montre que l'incubation de la lipase de *Candida rugosa* avec des solvants organiques polaires à chaîne courte tels que le méthanol et l'éthanol à augmenter son activité d'esterification et de transestérification. De même, Paula Speranza et al [274] ont rapporté que

*F. oxysporum* a montré une activité accrue après incubation dans des solvants organiques, ce qui est une caractéristique critique pour plusieurs synthèses organiques.

Afin d'enquêter sur le mécanisme par lequel rFAL est capable d'hydrolyser les substrats phospholipides, nous avons mené une analyse comparative de sa séquence d'acides aminés avec celle de lipases TG homologues, en particulier les membres de la famille de gènes lipase fongique TLL et FSL2 (comme montré à la Figure 4). Il a été observé que la principale différence entre rFAL et ces autres lipases était une région C-terminale supplémentaire qui n'est pas présente dans d'autres lipases. Cette région est composée d'une extension de 55 résidus, allant de Asn269 à Ser317. La structure cristalline de la lipase de GZEL révèle que cette extension C-terminale est constituée d'une hélice  $\alpha$  9 et d'une boucle. Plusieurs études ont montré que la région C-terminale joue un rôle crucial dans cette famille de lipases, notamment dans la liaison interfaciale [275], la transduction du signal [276], et le trafic et la perturbation de la membrane [277]. Une étude plus approfondie, et comme Lou et al. l'ont démontré pour GZEL[120] la région  $\alpha$ -hélice 9 dans rFAL a été impliquée dans un mécanisme de "double verrou", qui impliquait une interaction de pont salin entre le résidu Arg87 du couvercle  $\alpha$ 3 hélice dans une configuration fermée et le résidu Asp294 au début de l'hélice alpha9 (comme illustré dans la figure "double-verrou" 11).

Une analyse comparative de la cinétique et des spécificités de substrat de la Phospholipase A1 de *Fusarium oxysporum* a été récemment menée par RuiPu Xin et al. Ils ont observé que l'hélice  $\alpha$ 9 de la région C-terminale dans PLA1 ne régule pas seulement l'ouverture du couvercle, mais fonctionne également comme une ancre de membrane, facilitant la liaison à PC [278] .

Cependant, l'absence de l'hélice 9 dans TLL ne peut pas expliquer totalement son incapacité à hydrolyser les phospholipides puisqu'il a été observé que la région de l'hélice 9 était conservée dans FSL2, mais qu'elle était toujours incapable d'hydrolyser les phospholipides. Par conséquent, la faible activité de FSL2 sur les phospholipides ne peut pas être attribuée à l'absence de l'hélice 9, mais plutôt à des différences dans son fonctionnement.

Jallouli et al [127] ont proposé que des différences de polarité et de charge dans la poche de liaison de FSL2 et FSL pourraient être responsables de certains effets observés. Plus précisément, ils suggèrent que la poche de liaison dans FSL2 est plus hydrophobe sur le côté droit en raison du remplacement de Ser83 par Ile. Cependant, il convient de noter que Ile83 est conservé dans rFAL et GZEL, mais ces enzymes présentent encore une activité phospholipase.

Bien que FSL2, rFAL, GZEL et FSL partagent une grande quantité d'identité de séquence, une analyse structurale de leurs lipases (comme représenté à la Figure 12) indique que la région

de boucle (268-292) reliant l'hélice C-terminale peut être plus restreinte structurellement dans FSL2. De plus, comparé à rFAL, la boucle dans FSL2 est plus courte et plus hydrophobe et il y a moins de résidus basiques dans FSL2. Cela peut empêcher une interaction entre ces résidus positivement chargés et la tête polaire négativement chargée des phospholipides, en particulier pour la phosphatidylsérine (PS). De plus, comme le montre la Figure 14, une analyse des quatre  $\alpha$ -hélice 9 de rFAL, GZEL, FSL et FSL2 révèle un résidu de glutamate conservé aux positions où se trouve la phénylalanine dans FSL2. Par conséquent, la taille du radical phénylalanine peut en effet être assez grande, et elle pourrait potentiellement entraver l'accès de substrats de phospholipases plus grands au site actif.

L'activité de la phospholipase peut être influencée par divers acides aminés, mais dans certains cas, une seule substitution d'acide aminé peut être responsable de cette activité, comme observé dans la lipase de *Staphylococcus hyicus* [279], où une mutation de sérine en valine influence fortement son activité de phospholipase. Par conséquent, pour identifier les facteurs clés qui conduisent l'activité de la phospholipase dans cette classe particulière de lipases, des analyses de mutation supplémentaires sont nécessaires.

## 6. Conclusions

Dans cette étude, nous avons réussi à cloner le gène de la lipase de *Fusarium annulatum* dans *Pichia pastoris* et à exprimer l'enzyme marquée à des niveaux élevés. L'enzyme purifiée a montré une activité spécifique élevée envers les triglycérides (6000 U/mg sur TC8) et les phospholipides (6500 U/mg sur Egg PC), produisant 210 mg L<sup>-1</sup> d'enzyme pure et entièrement active. Bien que l'ajout d'une étiquette His puisse affecter les caractéristiques de liaison ou la structure de l'enzyme recombinante par rapport à la protéine native, nous avons constaté que rFAL maintenait une bonne stabilité à haute température et à un pH alcalin. Les résultats du dichroïsme circulaire ont montré une grande stabilité de cette phospholipase alcaline en présence de solvants polaires. Les expériences de docking moléculaire in silico ont révélé que les triglycérides et les phospholipides s'ajustent bien dans le site actif de rFAL, avec une orientation favorisant la régiospécificité *sn*-1, en accord avec les expériences in vitro. Une analyse structurale a fourni de nouvelles perspectives sur la fonction vitale du C-terminal pour la présence d'activité phospholipase. Dans l'ensemble, cette étude fournit des informations importantes sur les relations structure-fonction de la (phosphor)lipase dans rFAL. Les expériences futures pourraient inclure la comparaison de séquences de diverses hydrolases ayant une activité (galacto)phospholipase, ainsi que la mutagenèse dirigée dans le domaine C-terminal de rFAL pour approfondir encore notre compréhension.



## **Synthèse, Conclusions et Perspectives**

Les enzymes, en tant qu'agents biocatalytiques, occupent une position stratégique dans le secteur biotechnologique. Leur capacité à catalyser les réactions chimiques avec efficacité, tout en minimisant la consommation énergétique et l'usage de solvants organiques, revêt une importance considérable. Par rapport aux catalyseurs chimiques traditionnels, qui nécessitent souvent des conditions de température et de pression élevées, les enzymes peuvent opérer dans des conditions plus douces, présentant ainsi un attrait particulier pour des applications respectueuses de l'environnement. Leur spécificité envers les substrats offre en outre des possibilités d'exploration dans l'élaboration de procédés de production et de transformation novateurs et durables. Parmi cette diversité enzymatique, les enzymes lipolytiques, et plus particulièrement celles d'origine fongique, attirent une attention particulière.

Les enzymes lipolytiques, et en particulier celles d'origine fongique, sont réputées et largement sollicitées pour des utilisations dans le domaine de la détergence. Les lipases constituent actuellement l'un des groupes d'enzymes les plus commercialisés et les plus employés dans l'industrie biotechnologique. En chiffres, ces hydrolases représentent 21% du marché global des enzymes, constituant une part significative des ventes mondiales d'enzymes détergentes pour les lessives et 50% pour les lave-vaisselles automatiques. De nos jours, presque toutes les poudres à laver en Europe et en Amérique du Sud intègrent au moins une enzyme dans leur formulation.

Cependant, la part des lipases dans le marché mondial est principalement monopolisée par les lipases alcalines fongiques. L'incorporation des lipases dans les détergents contribue à améliorer l'efficacité de ces derniers pour éliminer les taches, préserver la luminosité des couleurs et lutter contre la ré-adhérence de la saleté. De plus, on observe une tendance à intégrer des lipases dotées d'une activité phospholipase dans les formulations détergentes afin d'optimiser l'élimination de tous types de lipides.

Ces enzymes se doivent d'être plus performantes et de fonctionner à des pH alcalins, tout en présentant une stabilité optimale face aux agents de blanchiment et oxydants, composants majeurs des détergents. Par conséquent, il est nécessaire de continuer à cribler, étudier et tester de nouvelles enzymes locales pour répondre à ces exigences.

Au cours du premier chapitre, et dans le cadre de notre projet pHC-maghreb de code Campus France : 43791TM & code PHC : 01MAG20 intitulé "Biodiversité des microorganismes d'intérêt biotechnologique, isolés de biotopes extrêmes : procédés enzymatiques et leur impact

sur l'environnement", une collaboration est établie entre quatre universités situées en Tunisie, Maroc, Algérie et France. Ce travail, qui fait l'objet d'une thèse en co-tutelle entre le laboratoire LBMIE-CBS et le laboratoire GEMBAS-UCBL, vise la production de nouvelles hydrolases à intégrer dans diverses applications biotechnologiques pour un environnement moins pollué. Parmi ces applications, on compte notamment les produits de nettoyage visant à améliorer l'efficacité des détergents pour éliminer les taches, préserver la brillance des couleurs et combattre la ré-adhérence de la saleté, tout en respectant l'environnement.

L'objectif principal de ce projet est de produire et de fournir à l'industrie des préparations enzymatiques à base de lipases, pouvant être utilisées comme agents détergents pour éliminer les taches lipidiques les plus tenaces. Dans cette optique, nous avons lancé un nouveau programme de recherche qui vise notamment l'isolement et le criblage de champignons provenant de différents biotopes extrêmes tunisiens, producteurs de lipases. Par la suite, l'identification des souches les plus prometteuses ainsi que la purification et la caractérisation de l'enzyme la plus active et stable dans les détergents sont envisagées.

Le processus d'isolement a donné lieu à la sélection de 69 souches fongiques distinctes. De plus, nous avons procédé au criblage de 42 souches déjà existantes issues de la collection ENIS du laboratoire LBGL. L'ensemble de ces souches a été évalué sur un milieu solide PDA, enrichi d'huile d'olive et de Rhodamine B, dans le but d'identifier les activités lipasiques potentielles. En conséquence, 10 de ces souches ont manifesté une activité lipolytique dans ces conditions spécifiques.

Cela nous a permis de sélectionner une souche fongique unique, dénommée CBS, nouvellement isolée à partir d'un sol salé pollué par des déchets d'olive et provenant du désert du sud tunisien notamment Gabès (El Amarat, coordonnées GPS : 34°33' N, 10°07' E) et Tataouine (Henchir El Ghazal, coordonnées GPS : 33°40' 12N, 10°38' E). Cette souche a été identifiée comme une *Fusarium annulatum*.

De la culture de cette souche, nous avons purifié et caractérisé une nouvelle lipase, appelée FAL. Il s'agit d'une protéine monomérique d'une masse moléculaire apparente de 30 kDa. Cette enzyme démontre une activité lipolytique sur un zymogramme utilisant le butyrate de 4-méthylumelliféronne (MUFB) comme substrat fluorogénique.

La caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée a révélé qu'elle ne se limite pas à une simple activité de triglycérides lipase, mais qu'elle est également capable d'hydrolyser les phospholipides. Les conditions optimales d'activité pour cette enzyme se situent à un pH de 11 et une température de 45 °C, en utilisant le TC8 et l'Egg PC comme substrats. Sa performance

est améliorée en présence de 4mM de Ca<sup>2+</sup> et de NaTDC. Il s'agit d'une phospholipase capable de catalyser l'hydrolyse d'une large gamme de substrats.

La lipase FAL catalyse efficacement l'hydrolyse du TC8, de l'huile d'olive, du TC2, du TC4 et de l'Egg PC. Son activité est inhibée par le THL, ce qui indique qu'il s'agit d'une lipase à sérine. Cette enzyme demeure active et stable en présence d'agents oxydants et dénaturants, et montre une compatibilité notable avec les détergents à lessive, ce qui en fait une candidate potentiellement intéressante pour des applications en détergence.

L'utilisation de détergent de type Class, complété par FAL, GZEL, ou Lipolase®, améliore significativement l'élimination de la composante grasse des taches de sauce tomate, de ketchup et de jaune d'oeuf. En particulier, FAL, grâce à sa double activité lipase TG et PLA1, démontre des performances prometteuses comme biocatalyseur pour la décoloration de colorants textiles synthétiques.

Ainsi, la nouvelle lipase purifiée à partir de la souche *Fusarium annulatum* présente des caractéristiques physico-chimiques et cinétiques très recherchées dans diverses applications, notamment dans la formulation de détergents de lavage, qu'ils soient solides ou liquides. Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à l'isolement de nouvelles souches lipolytiques à partir de biotopes tunisiens. Dans le premier chapitre de cette thèse on s'est intéressé à la purification et à la caractérisation biochimique d'une nouvelle lipase d'une

Au cours du deuxième chapitre de cette thèse, Compte tenu de l'activité lipolytique notable de cette souche et des données antérieures suggérant que le système lipolytique de tels champignons peut cibler les fruits d'olivier, l'étude du système lipolytique de cette souche est apparue comme un point d'intérêt majeur. Pour cela, un séquençage complet du génome de cette nouvelle souche fongique a été réalisé. Suite à l'analyse des séquences génétiques obtenues, un gène, désigné lipFAL (1269 pb), a été identifié. Il a présenté une identité de séquence élevée de 98% avec la lipase de *Fusarium oxysporum* et une identité de 82% avec la lipase de *Fusarium graminearum* (FGL).

Afin d'étudier plus avant les propriétés de cette lipase, le gène lipFAL a été surexprimé chez *P. pastoris*. L'enzyme recombinante, rFAL, a ensuite été isolée par chromatographie d'affinité NI-IDA en une seule étape, donnant lieu à une production de 210 mg L<sup>-1</sup> d'enzyme pure et totalement active. Cette enzyme s'est révélée présente sous deux formes : glycosylée et non glycosylée, comme le démontrent les analyses N-terminales et les zymogrammes.

L'enzyme purifiée a démontré une activité spécifique élevée à la fois sur les triglycérides (6000 U/mg sur TC8) et les phospholipides (6500 U/mg sur le PC du jaune d'œuf). En outre, rFAL a démontré une bonne stabilité à haute température et à un pH alcalin. Dans le but

d'obtenir une caractérisation plus précise de la spécificité enzymatique de rFAL, les activités de lipase et de phospholipase ont été évaluées. Il a été observé que rFAL est capable d'hydrolyser à la fois les positions *sn*-1 et *sn*-3 des triglycérides, avec une préférence marquée pour la position *sn*-1.

En ce qui concerne l'activité phospholipase, rFAL a montré une activité d'hydrolyse sélective pour la position *sn*-1 des substrats synthétiques EOPC, agissant en tant qu'enzyme PLA1. Ces observations pourraient aider à expliquer le taux élevé de production de lipases TG avec une forte activité phospholipase observé chez les espèces de *Fusarium*, ce qui pourrait à son tour avoir un rôle dans la dégradation des phospholipides des membranes végétales par l'activité PLA1.

Bien que la rFAL partage un pourcentage élevé d'identité de séquence avec une autre lipase de *F. solani*, la FSL2, cette dernière ne présente pas d'activité sur les phospholipides. Pour comprendre ces différences de spécificité de substrat entre ces deux lipases, des modèles tridimensionnels de la rFAL en conformation fermée et ouverte ont été construits. La comparaison de ces modèles a révélé que la liaison entre l'hélice  $\alpha 9$  et le corps principal de la protéine est plus courte pour la FSL2, ce qui pourrait limiter l'accès des phospholipides à son site actif.

Par conséquent, les futures études envisagées sont les suivantes :

- ✚ Analyser le rôle de l'hélice  $\alpha 9$ , qui est présente dans la séquence de la FSL2 mais absente dans les autres lipases fongiques, pour comprendre son influence sur les propriétés catalytiques et interfaciales de l'enzyme, ainsi que sur la sélection du substrat.
- ✚ Optimiser les conditions de cristallisation de la rFAL dans sa forme ouverte pour observer le mouvement de l'hélice  $\alpha 9$  pendant le recrutement du substrat.
- ✚ Explorer l'utilisation de la rFAL dans le traitement de déchets gras

## Références bibliographiques

1. Howling, D., L. Morris, M. Gurr and A. James, *The specificity of fatty acid desaturases and hydroxylases: the dehydrogenation and hydroxylation of monoenoic acids*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1972. **260**(1): p. 10-19.
2. Fahy, E., D. Cotter, M. Sud and S. Subramaniam, *Lipid classification, structures and tools*. J Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Biology of Lipids, 2011. **1811**(11): p. 637-647.
3. Small, D.M., *A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems*. J Journal of the American Oil Chemists Society, 1968. **45**(3): p. 108.
4. Fahy, E., S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama and W. Shaw, *A comprehensive classification system for lipids I*. Journal of lipid research, 2005. **46**(5): p. 839-861.
5. Fahy, E., S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J. Wakelam and E.A. Dennis, *Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids I*. Journal of lipid research, 2009. **50**: p. S9-S14.
6. Stillman, M.A., H.I. Maibach and A.R. Shallita, *Relative irritancy of free fatty acids of different chain length*. Contact Dermatitis, 1975. **1**(2): p. 65-69.
7. Weatherby, K. and D.J.A.i.a.m. Carter, *Chromera velia: the missing link in the evolution of parasitism*. 2013. **85**: p. 119-144.
8. Holwerda, K., P. Verkade and A. De Willigen, *Vergleichende untersuchungen über die verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger triglyceride unter einfluss von pankreasextrakt. I. Der einfluss des verteilungszustandes der triglyceride auf die verseifungsgeschwindigkeit*. Recueil des Travaux Chimiques des Pays - Bas, 1936. **55**(1): p. 43-57.
9. SCHØNHEYDER, F. and K. VOLQVARTZ, *On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution*. Acta Physiologica Scandinavica, 1945. **9**(1): p. 57-67.
10. Sarda, L. and P. Desnuelle, *Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion*. Biochimica et Biophysica Acta, 1958. **30**(3): p. 513-521.
11. Winkler, F., A. d'Arcy and W. Hunziker, *Structure of human pancreatic lipase*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 771-774.
12. Brzozowski, A., U. Derewenda, Z. Derewenda, G. Dodson, D. Lawson, J. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. Patkar and L. Thim, *A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex*. Nature, 1991. **351**(6326): p. 491-494.
13. Noble, M., A. Cleasby, L. Johnson, M. Egmond and L. Frenken, *The crystal structure of triacylglycerol lipase from Pseudomonas glumae reveals a partially redundant catalytic aspartate*. FEBS letters, 1993. **331**(1-2): p. 123-128.
14. Uppenberg, J., M.T. Hansen, S. Patkar and T.A. Jones, *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. Structure, 1994. **2**(4): p. 293-308.
15. Reis, P., K. Holmberg, R. Miller, M.E. Leser, T. Raab and H.J. Watzke, *Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes*. Comptes Rendus Chimie, 2009. **12**(1-2): p. 163-170.

16. Derewenda, U., A.M. Brzozowski, D.M. Lawson and Z.S. Derewenda, *Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase*. *Biochemistry*, 1992. **31**(5): p. 1532-1541.
17. Jain, M.K. and O.G. Berg, *Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A2 for interfacial activation*. *Current opinion in chemical biology*, 2006. **10**(5): p. 473-479.
18. Verger, R., M.C. Mieras and G.H. De Haas, *Action of phospholipase A at interfaces*. *Journal of Biological Chemistry*, 1973. **248**(11): p. 4023-4034.
19. Verger, R. and G.H. De Haas, *Enzyme reactions in a membrane model 1: A new technique to study enzyme reactions in monolayers*. *Chemistry and physics of lipids*, 1973. **10**(2): p. 127-136.
20. Deems, R.A., B.R. Eaton and E.A. Dennis, *Kinetic analysis of phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1975. **250**(23): p. 9013-9020.
21. Pin, C., M.L. Marín, D. Selgas, M.L. García, J. Tormo and C. Casas, *Differences in production of several extracellular virulence factors in clinical and food *Aeromonas* spp. strains*. *Journal of applied bacteriology*, 1995. **78**(2): p. 175-179.
22. Deeb, S.S. and R. Peng, *Structure of the human lipoprotein lipase gene*. *Biochemistry*, 1989. **28**(10): p. 4131-4135.
23. Haiker, H., H. Lengsfeld, P. Hadváry and F. Carrière, *Rapid exchange of pancreatic lipase between triacylglycerol droplets*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2004. **1682**(1-3): p. 72-79.
24. Carrière, F., K. Thirstrup, S. Hjorth, F. Ferrato, P.F. Nielsen, C. Withers-Martinez, C. Cambillau, E. Boel, L. Thim and R. Verger, *Pancreatic lipase structure–function relationships by domain exchange*. *Biochemistry*, 1997. **36**(1): p. 239-248.
25. Casas-Godoy, L., S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval and A. Marty, *Lipases: an overview*. *Lipases and phospholipases: methods and protocols*, 2012: p. 3-30.
26. Cai, J.-F., Z. Guan and Y.-H. He, *The lipase-catalyzed asymmetric C–C Michael addition*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011. **68**(3-4): p. 240-244.
27. Malmos, G., *A new lipase for the detergent industry*. *HAPPI (Household & Personal Products Industry)*, 1991. **28**(10): p. 122-125.
28. Albayati, S.H., M. Masomian, S.N.H. Ishak, M.S.b. Mohamad Ali, A.L. Thean, F.b. Mohd Shariff, N.D.b. Muhd Noor and R.N.Z. Raja Abd Rahman, *Main structural targets for engineering lipase substrate specificity*. *Catalysts*, 2020. **10**(7): p. 747.
29. Barriuso, J., M.E. Vaquero, A. Prieto and M.J. Martínez, *Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review*. *Biotechnology advances*, 2016. **34**(5): p. 874-885.
30. Laguerre, M., M. Nlandu Mputu, B. Briys, M. Lopez, P. Villeneuve and E. Dubreucq, *Regioselectivity and fatty acid specificity of crude lipase extracts from *Pseudozyma tsukubaensis*, *Geotrichum candidum*, and *Candida rugosa**. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017. **119**(8): p. 1600302.
31. Kapoor, M. and M.N. Gupta, *Lipase promiscuity and its biochemical applications*. *Process Biochemistry*, 2012. **47**(4): p. 555-569.
32. Lanser, A.C., L.K. Manthey and C.T. Hou, *Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein*. *Current microbiology*, 2002. **44**: p. 336-340.
33. Yan, Q., X. Duan, Y. Liu, Z. Jiang and S. Yang, *Expression and characterization of a novel 1, 3-regioselective cold-adapted lipase from *Rhizomucor endophyticus* suitable for biodiesel synthesis*. *Biotechnology for Biofuels*, 2016. **9**: p. 1-13.

34. Tong, X., P.K. Busk and L. Lange, *Characterization of a new sn - 1, 3 - regioselective triacylglycerol lipase from Malbranchea cinnamomea*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016. **63**(4): p. 471-478.
35. Fernandez-Lafuente, R., *Lipase from Thermomyces lanuginosus: uses and prospects as an industrial biocatalyst*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010. **62**(3-4): p. 197-212.
36. Ota, Y., T. Sawamoto and M. Hasuo, *Tributyryl specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in Geotrichum sp. FO401B*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2000. **64**(11): p. 2497-2499.
37. Colton, I.J., D. Yin, P. Grochulski and R.J. Kazlauskas, *Molecular Basis of Chiral Acid Recognition by Candida rugosa Lipase: X - Ray Structure of Transition State Analog and Modeling of the Hydrolysis of Methyl 2 - Methoxy - 2 - phenylacetate*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011. **353**(13): p. 2529-2544.
38. Kobayashi, S., *Lipase-catalyzed polyester synthesis—a green polymer chemistry*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2010. **86**(4): p. 338-365.
39. Zhou, W.-J., Y. Ni, G.-W. Zheng, H.-H. Chen, Z.-R. Zhu and J.-H. Xu, *Enzymatic resolution of a chiral chlorohydrin precursor for (R)- $\alpha$ -lipoic acid synthesis via lipase catalyzed enantioselective transacylation with vinyl acetate*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014. **99**: p. 102-107.
40. Chen, H., X. Meng, X. Xu, W. Liu and S. Li, *The molecular basis for lipase stereoselectivity*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2018. **102**: p. 3487-3495.
41. Xu, L., C. He, L. Hui, Y. Xie, J.-M. Li, W.-D. He and L. Yang, *Bactericidal dendritic polycation cloaked with stealth material via lipase-sensitive intersegment acquires neutral surface charge without losing membrane-disruptive activity*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. **7**(50): p. 27602-27607.
42. Muralidhar, R., R. Chirumamilla, R. Marchant, V. Ramachandran, O. Ward and P. Nigam, *Understanding lipase stereoselectivity*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002. **18**: p. 81-97.
43. Li, J., J. Luo, H. Wang, H. Shi, J. Zhu, Y. Sun, K. Yu and D. Yao, *Adipose triglyceride lipase regulates lipid metabolism in dairy goat mammary epithelial cells*. *Gene*, 2015. **554**(1): p. 125-130.
44. Jaeger, K., B. Dijkstra and M. Reetz, *Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*. *Annual Reviews in Microbiology*, 1999. **53**(1): p. 315-351.
45. Six, D.A. and E.A. Dennis, *The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000. **1488**(1-2): p. 1-19.
46. Dennis, E.A., J. Cao, Y.H. Hsu, V. Magrioti and G. Kokotos, *Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention*. *Chem Rev*, 2011. **111**(10): p. 6130-85.
47. Kohler, G.A., A. Brenot, E. Haas-Stapleton, N. Agabian, R. Deva and S. Nigam, *Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(11): p. 1391-9.
48. Kim, M., J. Kim and J.S. Rhee, *Isolation of a phospholipase A 1-producing microorganism*. *Journal of industrial microbiology*, 1996. **16**: p. 171-174.
49. Richmond, G.S. and T.K. Smith, *Phospholipases A1*. *International journal of molecular sciences*, 2011. **12**(1): p. 588-612.
50. Van Tilbeurgh, H., S. Bezzine, C. Cambillau, R. Verger and F. Carriere, *Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase*. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1999. **1441**(2-3): p. 173-184.

51. Aoki, J., A. Inoue, K. Makide, N. Saiki and H. Arai, *Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family*. *Biochimie*, 2007. **89**(2): p. 197-204.
52. Rizo, J. and T.C. Sudhof, *C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(26): p. 15879-15882.
53. Schmiel, D.H., E. Wagar, L. Karamanou, D. Weeks and V.L. Miller, *Phospholipase A of Yersinia enterocolitica contributes to pathogenesis in a mouse model*. *Infect Immun*, 1998. **66**(8): p. 3941-51.
54. Givskov, M., L. Olsen and S. Molin, *Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for extracellular phospholipase A1 from Serratia liquefaciens*. *Journal of bacteriology*, 1988. **170**(12): p. 5855-5862.
55. Titball, R.W., *Bacterial phospholipases C*. *Microbiol Rev*, 1993. **57**(2): p. 347-66.
56. Merino, S., A. Aguilar, M.M. Nogueras, M. Regue, S. Swift and J.M. Tomas, *Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic Aeromonas sp. serogroup O:34*. *Infect Immun*, 1999. **67**(8): p. 4008-13.
57. Mazmanian, S.K., G. Liu, H. Ton-That and O. Schneewind, *Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall*. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 760-763.
58. Noiriél, A., P. Benveniste, A. Banas, S. Stymne and P. Bouvier-Nave, *Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(18): p. 3752-64.
59. Simons, J.-W.F., F. Götz, M.R. Egmond and H.M. Verheij, *Biochemical properties of staphylococcal (phospho) lipases*. *Chemistry and physics of lipids*, 1998. **93**(1-2): p. 27-37.
60. Viana, D., L. Selva, J.J. Callanan, I. Guerrero, S. Ferrián and J.M. Corpa, *Strains of Staphylococcus aureus and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits*. *Vet J*, 2011. **190**(3): p. 403-7.
61. Jallouli, R., F. Khrouf, A. Fendri, T. Mechichi, Y. Gargouri and S. Bezzine, *Purification and biochemical characterization of a novel alkaline (Phospho) lipase from a newly isolated Fusarium solani strain*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2012. **168**(8): p. 2330-2343.
62. Nguyen, L.N., T.T. Dao, T. Živković, M. Fehrholz, W. Schäfer and S. Salomon, *Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of Fusarium graminearum in vitro*. *Enzyme and microbial technology*, 2010. **46**(6): p. 479-486.
63. Dimarogona, M., E. Nikolaivits, M. Kanelli, P. Christakopoulos, M. Sandgren and E. Topakas, *Structural and functional studies of a Fusarium oxysporum cutinase with polyethylene terephthalate modification potential*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2015. **1850**(11): p. 2308-2317.
64. Sias, B., F. Ferrato, P. Grandval, D. Lafont, P. Boullanger, A. De Caro, B. Leboeuf, R. Verger and F. Carrière, *Human pancreatic lipase-related protein 2 is a galactolipase*. *Biochemistry*, 2004. **43**(31): p. 10138-10148.
65. Ktata, A., S. Bezzine, A. Sayari and A. Karray, *Newly Isolated Lipolytic and Oleaginous Fungal Strain, Production, Optimization and Biochemical Characterization of the Extracellular (phospho) lipase*. *Waste and Biomass Valorization*, 2020. **11**(12): p. 6677-6687.
66. Carrière, F., C. Withers-Martinez, H. van Tilbeurgh, A. Roussel, C. Cambillau and R. Verger, *Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1998. **1376**(3): p. 417-432.

67. Lowe, M.E., *The triglyceride lipases of the pancreas*. Journal of lipid research, 2002. **43**(12): p. 2007-2016.
68. Armand, M.J.C.O.i.C.N. and M. Care, *Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand?* 2007. **10**(2): p. 156-164.
69. Jawed, A., G. Singh, S. Kohli, A. Sumera, S. Haque, R. Prasad and D.J.S.A.J.o.B. Paul, *Therapeutic role of lipases and lipase inhibitors derived from natural resources for remedies against metabolic disorders and lifestyle diseases*. 2019. **120**: p. 25-32.
70. Phan, C.T. and P.J.F.B. Tso, *Intestinal lipid absorption and transport*. 2001. **6**(5): p. D299-D319.
71. Jenkins, C.M., D.J. Mancuso, W. Yan, H.F. Sims, B. Gibson and R.W.J.J.o.B.C. Gross, *Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities*. 2004. **279**(47): p. 48968-48975.
72. Villena, J.A., S. Roy, E. Sarkadi-Nagy, K.-H. Kim and H.S.J.J.o.B.C. Sul, *Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis*. 2004. **279**(45): p. 47066-47075.
73. Zimmermann, R., J.G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber and A.J.S. Hermetter, *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. 2004. **306**(5700): p. 1383-1386.
74. Zechner, R., P.C. Kienesberger, G. Haemmerle, R. Zimmermann and A.J.J.o.l.r. Lass, *Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores*. 2009. **50**(1): p. 3-21.
75. Lengsfeld, H., G. Beaumier-Gallon, H. Chahinian, A. De Caro, R. Verger, R. Laugier and F. Carrière, *Physiology of gastrointestinal lipolysis and therapeutical use of lipases and digestive lipase inhibitors*, in *Lipases and phospholipases in drug development*. 2004, Wiley Online Library. p. 195-229.
76. Sias, B., F. Ferrato, P. Grandval, D. Lafont, P. Boullanger, A. De Caro, B. Leboeuf, R. Verger and F.J.B. Carrière, *Human pancreatic lipase-related protein 2 is a galactolipase*. 2004. **43**(31): p. 10138-10148.
77. Brockman, H.J.B., *Kinetic behavior of the pancreatic lipase-colipase-lipid system*. 2000. **82**(11): p. 987-995.
78. Mukherjee, M.J.J.o.M.C.B.E., *Human digestive and metabolic lipases—a brief review*. 2003. **22**(5-6): p. 369-376.
79. Crandall, W.V. and M.E.J.J.o.B.C. Lowe, *Colipase residues Glu64 and Arg65 are essential for normal lipase-mediated fat digestion in the presence of bile salt micelles*. 2001. **276**(16): p. 12505-12512.
80. Winkler, F., A. d'Arcy and W.J.N. Hunziker, *Structure of human pancreatic lipase*. 1990. **343**(6260): p. 771-774.
81. Lowe, M.E.J.J.o.l.r., *The triglyceride lipases of the pancreas*. 2002. **43**(12): p. 2007-2016.
82. El-Kouhen, K., S. Blangy, E. Ortiz, A.-M. Gardies, N. Ferté and V.J.F.l. Arondel, *Identification and characterization of a triacylglycerol lipase in Arabidopsis homologous to mammalian acid lipases*. 2005. **579**(27): p. 6067-6073.
83. Ishiguro, S., A. Kawai-Oda, J. Ueda, I. Nishida and K.J.T.P.C. Okada, *The DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis*. 2001. **13**(10): p. 2191-2209.

84. Matsui, K., S. Fukutomi, M. Ishii and T.J.F.I. Kajiwara, *A tomato lipase homologous to DAD1 (LeLID1) is induced in post - germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase*. 2004. **569**(1-3): p. 195-200.
85. Eastmond, P.J.J.J.o.B.C., *Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans*. 2004. **279**(44): p. 45540-45545.
86. de Sousa, J.S., E.d.A. Cavalcanti-Oliveira, D.A.G. Aranda and D.M.G.J.J.o.M.C.B.E. Freire, *Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production*. 2010. **65**(1-4): p. 133-137.
87. Ejedegba, B., E. Onyeneke and P.J.A.J.o.B. Oviasogie, *Characteristics of lipase isolated from coconut (Cocos nucifera linn) seed under different nutrient treatments*. 2007. **6**(6).
88. Bhardwaj, K., A. Raju and R.J.P.P. Rajasekharan, *Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family*. 2001. **127**(4): p. 1728-1738.
89. Pierozan, M.K., R.J. da Costa, O.A. Antunes, E.G. Oestreicher, J.V. Oliveira, R.L. Cansian, H. Treichel, D.b.J.J.o.a. de Oliveira and f. chemistry, *Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (Triticum aestivum) by response surface methodology*. 2009. **57**(20): p. 9716-9721.
90. Fiorillo, F., C. Palocci, S. Soro and G.J.P.S. Pasqua, *Latex lipase of Euphorbia characias L.: an aspecific acylhydrolase with several isoforms*. 2007. **172**(4): p. 722-727.
91. Chen, C.-C., S.-W. Tsai and P.J.J.o.M.C.B.E. Villeneuve, *Enantioselective hydrolysis of (R, S)-naproxen 2, 2, 2-trifluoroethyl ester in water-saturated solvents via lipases from Carica pentagona Heilborn and Carica papaya*. 2005. **34**(1-6): p. 51-57.
92. Rivera, I., J.C. Mateos-Díaz and G. Sandoval, *Plant lipases: partial purification of Carica papaya lipase*, in *Lipases and Phospholipases*. 2012, Springer. p. 115-122.
93. Babu, I.S. and G.H.J.R.J.o.M. Rao, *Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by Yarrowia lipolytica NCIM 3589*. 2007. **2**(1): p. 88-93.
94. Gupta, R., N. Gupta, P.J.A.m. Rathi and biotechnology, *Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties*. 2004. **64**(6): p. 763-781.
95. Treichel, H., D. de Oliveira, M.A. Mazutti, M. Di Luccio, J.V.J.F. Oliveira and b. technology, *A review on microbial lipases production*. 2010. **3**(2): p. 182-196.
96. Hasan, F., A.A. Shah and A. Hameed, *Industrial applications of microbial lipases*. Enzyme and Microbial technology, 2006. **39**(2): p. 235-251.
97. Rosenau, F. and K.-E. Jaeger, *Bacterial lipases from Pseudomonas: regulation of gene expression and mechanisms of secretion*. Biochimie, 2000. **82**(11): p. 1023-1032.
98. Stehr, F., M. Kretschmar, C. Kröger, B. Hube and W. Schäfer, *Microbial lipases as virulence factors*. Journal of molecular catalysis B: enzymatic, 2003. **22**(5-6): p. 347-355.
99. Dharmsthiti, S. and S. Luchai, *Production, purification and characterization of thermophilic lipase from Bacillus sp. THL027*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **179**(2): p. 241-6.
100. Mobarak-Qamsari, E., R. Kasra-Kermanshahi and Z. Moosavi-Nejad, *Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, Pseudomonas aeruginosa KM110*. Iranian journal of microbiology, 2011. **3**(2): p. 92.
101. Bharathi, D. and G. Rajalakshmi, *Microbial lipases: An overview of screening, production and purification*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019. **22**: p. 101368.

102. Hausmann, S. and K.-E. Jaeger, *Lipolytic enzymes from bacteria*, in *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. 2010.
103. Kovacic, F., N. Babic, U. Krauss, K.J.A.U.o.H. Jaeger, Oils, and Lipids, *Classification of lipolytic enzymes from bacteria*. 2019. **24**: p. 255-289.
104. Fischer, M. and J.J.N.a.r. Pleiss, *The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families*. 2003. **31**(1): p. 319-321.
105. Gupta, R., A. Kumari, P. Syal and Y.J.P.i.l.r. Singh, *Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology*. 2015. **57**: p. 40-54.
106. Mancheño, J.M., M.a.A. Pernas, M.a.J. Martínez, B. Ochoa, M.L. Rúa and J.A.J.J.o.m.b. Hermoso, *Structural insights into the lipase/esterase behavior in the Candida rugosa lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution*. 2003. **332**(5): p. 1059-1069.
107. Uppenberg, J., M.T. Hansen, S. Patkar and T.A.J.S. Jones, *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. 1994. **2**(4): p. 293-308.
108. Bordes, F., S. Barbe, P. Escalier, L. Mourey, I. André, A. Marty and S. Tranier, *Exploring the conformational states and rearrangements of Yarrowia lipolytica lipase*. Biophysical journal, 2010. **99**(7): p. 2225-2234.
109. Xu, T., L. Liu, S. Hou, J. Xu, B. Yang, Y. Wang and J.J.J.o.s.b. Liu, *Crystal structure of a mono- and diacylglycerol lipase from Malassezia globosa reveals a novel lid conformation and insights into the substrate specificity*. 2012. **178**(3): p. 363-369.
110. Schrag, J.D. and M.J.J.o.m.b. Cygler, *1.8 Å refined structure of the lipase from Geotrichum candidum*. 1993. **230**(2): p. 575-591.
111. Omar, I.C., M. Hayashi and S. Nagai, *Purification and some properties of a thermostable lipase from Humicola lanuginosa No. 3*. Agricultural and biological chemistry, 1987. **51**(1): p. 37-45.
112. Berg, O.G., Y. Cajal, G.L. Butterfoss, R.L. Grey, M.A. Alsina, B.-Z. Yu and M.K. Jain, *Interfacial activation of triglyceride lipase from Thermomyces (Humicola) lanuginosa: kinetic parameters and a basis for control of the lid*. Biochemistry, 1998. **37**(19): p. 6615-6627.
113. Martinelle, M., M. Holmquist and K. Hult, *On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1995. **1258**(3): p. 272-276.
114. Skjold-Jørgensen, J., J. Vind, A. Svendsen and M.J. Bjerrum, *Altering the activation mechanism in Thermomyces lanuginosus lipase*. Biochemistry, 2014. **53**(25): p. 4152-4160.
115. Bool, E. and B. Huge-Jensen, *Recombinant Humicola lipase and process for production of recombinant Humicola lipase*. European Patent Applied EP 030521600216, 1988.
116. Yang, R., X. Zhao and X. Liu, *Novel and highly efficient regioselective route to helcid esters by lipozyme TLL*. Plos One, 2013. **8**(11): p. e80715.
117. Fang, Z., L. Xu, D. Pan, L. Jiao, Z. Liu and Y. Yan, *Enhanced production of Thermomyces lanuginosus lipase in Pichia pastoris via genetic and fermentation strategies*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014. **41**(10): p. 1541-1551.
118. Brzozowski, A.M., H. Savage, C.S. Verma, J.P. Turkenburg, D.M. Lawson, A. Svendsen and S. Patkar, *Structural origins of the interfacial activation in Thermomyces (Humicola) lanuginosa lipase*. Biochemistry, 2000. **39**(49): p. 15071-15082.

119. Voigt, C.A., W. Schäfer and S. Salomon, *A secreted lipase of Fusarium graminearum is a virulence factor required for infection of cereals*. The Plant Journal, 2005. **42**(3): p. 364-375.
120. Lou, Z., M. Li, Y. Sun, Y. Liu, Z. Liu, W. Wu and Z. Rao, *Crystal structure of a secreted lipase from Gibberella zeae reveals a novel "double-lock" mechanism*. Protein & cell, 2010. **1**(8): p. 760-770.
121. Brady, L., A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen and L. Norskov, *A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 767-770.
122. Kohno, M., J. Funatsu, B. Mikami, W. Kugimiya, T. Matsuo and Y. Marita, *The crystal structure of lipase II from Rhizopus niveus at 2.2 Å resolution*. The journal of biochemistry, 1996. **120**(3): p. 505-510.
123. McAuley, K.E., A. Svendsen, S.A. Patkar and K.S. Wilson, *Structure of a feruloyl esterase from Aspergillus niger*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004. **60**(5): p. 878-887.
124. Wang, F., H. Zhang, A. Czarna, W. Chen, B. Yang and Y. Wang, *Function of C-terminal peptides on enzymatic and interfacial adsorption properties of lipase from Gibberella zeae*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018. **1862**(12): p. 2623-2631.
125. Jallouli, R., H. Othman, S. Amara, G. Parsiegla, F. Carriere, N. Srairi-Abid, Y. Gargouri and S. Bezzine, *The galactolipase activity of Fusarium solani (phospho) lipase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015. **1851**(3): p. 282-289.
126. Jallouli, R., M.B. Ali, M. Charfeddine, R. Gargouri-Bouزيد, Y. Gargouri and S. Bezzine, *Heterologous overexpression and biochemical characterization of the (galactophospho) lipase from Fusarium solani in Pichia pastoris that is expressed in planta*. International journal of biological macromolecules, 2016. **84**: p. 94-100.
127. Jallouli, R., G. Parsiegla, F. Carrière, Y. Gargouri and S. Bezzine, *Efficient heterologous expression of Fusarium solani lipase, FSL2, in Pichia pastoris, functional characterization of the recombinant enzyme and molecular modeling*. International journal of biological macromolecules, 2017. **94**: p. 61-71.
128. Wurtz, A., *Champignons, bactéries et algues des eaux polluées*. Bulletin Français de Pisciculture, 1956(182): p. 5-25.
129. GAVÉRIAUX, J.-P., *Les lichens et l'évolution de la classification des êtres vivants*. Bull. Ass. Fr. Lichénologie, 2006. **31**(2): p. 65-74.
130. TORTORA, G., B. FUNKE and C. CASE, *Les maladies infectieuses du système digestif*. Introduction à la microbiologie. Editions du Renouveau Pédagogique Inc (ERPI), Canada, 2003. **945**: p. 756-757.
131. Nagahama, T., M. Hamamoto, T. Nakase, H. Takami and K. Horikoshi, *Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean*. Antonie van Leeuwenhoek, 2001. **80**(2): p. 101-110.
132. James, T.Y., F. Kauff, C.L. Schoch, P.B. Matheny, V. Hofstetter, C.J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker and J. Miadlikowska, *Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 818-822.
133. Bentley, A., M. Cromey, R. Farrokhi-Nejad, J. Leslie, B. Summerell and L. Burgess, *Fusarium crown and root rot pathogens associated with wheat and grass stem bases on the South Island of New Zealand*. Australasian Plant Pathology, 2006. **35**(5): p. 495-502.
134. Kumar, A., K. Dhar, S.S. Kanwar and P.K. Arora, *Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications*. Biological procedures online, 2016. **18**: p. 1-11.

135. Sharma, R., Y. Chisti and U.C. Banerjee, *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnology advances, 2001. **19**(8): p. 627-662.
136. Salihu, A., M.Z. Alam, M.I. AbdulKarim and H.M. Salleh, *Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues*. Resources, Conservation and Recycling, 2012. **58**: p. 36-44.
137. Martinez, C., P. De Geus, M. Lauwereys, G. Matthyssens and C. Cambillau, *Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 615-618.
138. Barman, A., D. Gohain, U. Bora and R. Tamuli, *Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi*. Microbiological Research, 2018. **209**: p. 55-69.
139. Trümper, C., K. Paffenholz, I. Smit, P. Kössler, P. Karlovsky, H.-P. Braun and E. Pawelzik, *Identification of regulated proteins in naked barley grains (Hordeum vulgare nudum) after Fusarium graminearum infection at different grain ripening stages*. Journal of proteomics, 2016. **133**: p. 86-92.
140. Maschietto, V., A. Marocco, A. Malachova and A. Lanubile, *Resistance to Fusarium verticillioides and fumonisin accumulation in maize inbred lines involves an earlier and enhanced expression of lipoxygenase (LOX) genes*. Journal of plant physiology, 2015. **188**: p. 9-18.
141. Wang, F., W. Chen, A. Abousalham, B. Yang and Y. Wang, *Exploring the influence of phospholipid monolayer conformation and environmental conditions on the interfacial binding of Gibberella Zeae lipase*. International journal of biological macromolecules, 2019. **132**: p. 1051-1056.
142. Rocha, A.L.M., A. Di Pietro, C. RUIZ - ROLDÁN and M.I.G. Roncero, *Ctfl, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in Fusarium oxysporum is dispensable for virulence*. Molecular plant pathology, 2008. **9**(3): p. 293-304.
143. Thakur, S., *Lipases, its sources, properties and applications: a review*. Int J Sci Eng Res, 2012. **3**(7): p. 1-29.
144. Cameron, B.A., *Laundering in cold water: detergent considerations for consumers*. Family and Consumer Sciences Research Journal, 2007. **36**(2): p. 151-162.
145. Nardello-Rataj, V., L.H.T. Tai and J.-M. Aubry, *Les lessives en poudre*. l'actualité chimique, 2003: p. 3.
146. Hasan, F., A.A. Shah, S. Javed and A. Hameed, *Enzymes used in detergents: lipases*. African journal of biotechnology, 2010. **9**(31): p. 4836-4844.
147. Mehta, A., A. Gupta, K.K. Bhardwaj and R. Gupta, *A Purified Alkaline and Detergent-Tolerant Lipase from Aspergillus fumigatus with Potential Application in Removal of Mustard Oil Stains from Cotton Fabric*. Tenside Surfactants Detergents, 2021. **58**(6): p. 442-451.
148. Kumar, D., R. Bhardwaj, S. Jassal, T. Goyal, A. Khullar and N. Gupta, *Application of enzymes for an eco-friendly approach to textile processing*. Environmental Science and Pollution Research, 2021: p. 1-11.
149. Ito, S., T. Kobayashi, K. Ara, K. Ozaki, S. Kawai and Y. Hatada, *Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures*. Extremophiles, 1998. **2**(3): p. 185-190.
150. Nishioka, M., K. Joko and M. Takama, *Lipase manufacture with*. 1990, Candida.
151. Salleh, A.B., R. Musani, M. Basri, K. Ampon, W. Yunus and C. Razak, *Extra-and intra-cellular lipases from a thermophilic Rhizopus oryzae and factors affecting their production*. Canadian journal of microbiology, 1993. **39**(10): p. 978-981.
152. Jaeger, K.-E., S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel and O. Misset, *Bacterial lipases*. FEMS microbiology reviews, 1994. **15**(1): p. 29-63.

153. Romdhane, I.B.-B., A. Fendri, Y. Gargouri, A. Gargouri and H. Belghith, *A novel thermoactive and alkaline lipase from Talaromyces thermophilus fungus for use in laundry detergents*. Biochemical Engineering Journal, 2010. **53**(1): p. 112-120.
154. Dab, A., I. Hasnaoui, S. Mechri, F. Allala, K. Bouacem, A. Noiriél, A. Bouanane-Darenfed, E. Saalaoui, A. Asehraou and F. Wang, *Biochemical characterization of an alkaline and detergent-stable Lipase from Fusarium annulatum Bugnicourt strain CBS associated with olive tree dieback*. Plos one, 2023. **18**(5): p. e0286091.
155. Wang, Y., R. Ma, S. Li, M. Gong, B. Yao, Y. Bai and J. Gu, *An alkaline and surfactant-tolerant lipase from Trichoderma lentiforme ACCC30425 with high application potential in the detergent industry*. AMB Express, 2018. **8**(1): p. 95.
156. Xiao, Y., Y.-D. Liu, G. Yuan, R.-Q. Mao and G. Li, *An uncharacterized protein from the metagenome with no obvious homology to known lipases shows excellent alkaline lipase properties and potential applications in the detergent industry*. Biotechnology Letters, 2021. **43**: p. 2311-2325.
157. Chandra, P., R. Singh and P.K. Arora, *Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review*. Microbial Cell Factories, 2020. **19**(1): p. 169.
158. Priji, P., S. Sajith, P.A. Faisal and S. Benjamin, *Microbial lipases— properties and applications*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021. **2021**: p. 799-807.
159. Virgen-Ortiz, J.J., J.C. dos Santos, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, O. Barbosa, R.C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *Lecitase ultra: A phospholipase with great potential in biocatalysis*. Molecular Catalysis, 2019. **473**: p. 110405.
160. Santos, S., J. Puna and J. Gomes, *A review on bio-based catalysts (immobilized enzymes) used for biodiesel production*. Energies, 2020. **13**(11): p. 3013.
161. Quayson, E., J. Amoah, S. Hama, A. Kondo and C. Ogino, *Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2020. **134**: p. 110355.
162. Almeida, F.L., B.M. Travalía, I.S. Goncalves and M.B.S. Forte, *Biodiesel production by lipase - catalyzed reactions: bibliometric analysis and study of trends*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2021. **15**(4): p. 1141-1159.
163. Vilar, D.S., G.O. Carvalho, M.M. Pupo, M.M. Aguiar, N.H. Torres, J.H. Américo, E.B. Cavalcanti, K.I. Eguiluz, G.R. Salazar-Banda and M.S. Leite, *Vinasse degradation using Pleurotus sajor-caju in a combined biological–Electrochemical oxidation treatment*. Separation and Purification Technology, 2018. **192**: p. 287-296.
164. Pérez, M.M., E.C.S. Gonçalves, A.C. Vici, J.C.S. Salgado and M.d.L.T. de Moraes Polizeli, *Fungal lipases: versatile tools for white biotechnology*. Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives, 2019: p. 361-404.
165. Carvalho, R.S., I.A. Cruz, J.H.P. Américo-Pinheiro, R.N. Soriano, R.L. de Souza, M. Bilal, H.M. Iqbal, R.N. Bharagava and L.F.R. Ferreira, *Interaction between Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus fermentum during co-culture fermentation*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020. **29**: p. 101756.
166. Fan, M., P. Zhang and Q. Ma, *Enhancement of biodiesel synthesis from soybean oil by potassium fluoride modification of a calcium magnesium oxides catalyst*. Bioresource Technology, 2012. **104**: p. 447-450.
167. Tian, M., J. Fu, Z. Wang, C. Miao, P. Lv, D. He, Z. Li, T. Liu, M. Li and W. Luo, *Enhanced activity and stability of Rhizomucor miehei lipase by mutating N-linked glycosylation site and its application in biodiesel production*. Fuel, 2021. **304**: p. 121514.

168. Dixit, S., A. Yadav, P.D. Dwivedi and M. Das, *Toxic hazards of leather industry and technologies to combat threat: a review*. Journal of Cleaner Production, 2015. **87**: p. 39-49.
169. Khambhaty, Y., *Applications of enzymes in leather processing*. Environmental Chemistry Letters, 2020. **18**(3): p. 747-769.
170. Dayanandan, A., S. Rani, M. Shanmugavel, A. Gnanamani and G.S. Rajakumar, *Enhanced production of Aspergillus tamarii lipase for recovery of fat from tannery fleshings*. Brazilian Journal of Microbiology, 2013. **44**: p. 1089-1095.
171. Choudhary, R., A. Jana and M. Jha, *Enzyme technology applications in leather processing*. 2004.
172. Mehta, A., U. Bodh and R. Gupta, *Fungal lipases: a review*. Journal of Biotech Research, 2017. **8**: p. 58.
173. Moujehed, E., Z. Zarai, H. Khemir, N. Miled, M.S. Bchir, C. Gablin, F. Bessueille, A. Bonhommé, D. Leonard and F. Carrière, *Cleaner degreasing of sheepskins by the Yarrowia lipolytica LIP2 lipase as a chemical-free alternative in the leather industry*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022. **211**: p. 112292.
174. El Menoufy, H.A., S.K. Gomaa, A.A. Haroun, A.N. Farag, M.S. Shafei, Y.M. Shetaia and R.A. Abd El Aal, *Comparative studies of free and immobilized partially purified lipase from Aspergillus niger NRRL-599 produced from solid-state fermentation using gelatin-coated titanium nanoparticles and its application in textile industry*. Egyptian Pharmaceutical Journal, 2022. **21**(2): p. 143.
175. Cruz, Y.W., Y.A. Vieira, D.S. Vilar, N.H. Torres, M.M. Aguiar, E.B. Cavalcanti, J.H. Américo-Pinheiro, R.N. Soriano, R.N. Bharagava and Á.S. Lima, *Pulp wash: a new source for production of ligninolytic enzymes and biomass and its toxicological evaluation after biological treatment*. Environmental Technology, 2020. **41**(14): p. 1837-1847.
176. Gopinath, S., A. Hilda and V. Ramesh, *Detection of biodegradability of oils and related substances*. Journal of environmental biology, 1998. **19**(2): p. 157-165.
177. Islam, R. and B. Datta, *Fungal diversity and its potential in environmental cleanup*. Int J Res, 2015. **2**: p. 815-825.
178. Singh, A.K. and M. Mukhopadhyay, *Overview of fungal lipase: a review*. Applied biochemistry and biotechnology, 2012. **166**: p. 486-520.
179. Mahmoud, G.A., M.M. Koutb, F.M. Morsy and M.M. Bagy, *Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus Aspergillus terreus*. European Journal of Biological Research, 2015. **5**(3): p. 70-77.
180. Salgado, J.M., L. Abrunhosa, A. Venâncio, J.M. Domínguez and I. Belo, *Combined bioremediation and enzyme production by Aspergillus sp. in olive mill and winery wastewaters*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016. **110**: p. 16-23.
181. Basheer, S.M., S. Chellappan, P. Beena, R.K. Sukumaran, K. Elyas and M. Chandrasekaran, *Lipase from marine Aspergillus awamori BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment*. New Biotechnology, 2011. **28**(6): p. 627-638.
182. Yang, F., T.W. Weber, J.L. Gainer and G. Carta, *Synthesis of lovastatin with immobilized Candida rugosa lipase in organic solvents: effects of reaction conditions on initial rates*. Biotechnology and bioengineering, 1997. **56**(6): p. 671-680.
183. Mahfoudhi, A., S. Benmabrouk, A. Fendri and A. Sayari, *Fungal lipases as biocatalysts: A promising platform in several industrial biotechnology applications*. Biotechnology and Bioengineering, 2022. **119**(12): p. 3370-3392.
184. Sharma, S. and S.S. Kanwar, *Organic solvent tolerant lipases and applications*. The Scientific World Journal, 2014. **2014**.

185. El Alaoui, M., L. Soulère, A. Noiriél, Y. Queneau and A. Abousalham,  *$\alpha$ -Eleostearic acid-containing triglycerides for a continuous assay to determine lipase sn-1 and sn-3 regio-preference*. Chemistry and physics of lipids, 2017. **206**: p. 43-52.
186. Cregg, J.M., I. Tolstorukov, A. Kusari, J. Sunga, K. Madden and T. Chappell, *Expression in the yeast Pichia pastoris*. Methods in enzymology, 2009. **463**: p. 169-189.
187. Mechri, S., K. Bouacem, T.B. Chalbi, M. Khaled, F. Allala, A. Bouanane - Darenfed, H. Hacene and B. Jaouadi, *A Taguchi design approach for the enhancement of a detergent - biocompatible alkaline thermostable protease production by Streptomyces mutabilis strain TN - X30*. Journal of Surfactants and Detergents.
188. Hasnaoui, I., A. Dab, S. Mechri, H. Abouloifa, E. Saalaoui, B. Jaouadi, A. Noiriél, A. Asehraou and A. Abousalham, *Purification, Biochemical and Kinetic Characterization of a Novel Alkaline sn-1,3-Regioselective Triacylglycerol Lipase from Penicillium crustosum Thom Strain P22 Isolated from Moroccan Olive Mill Wastewater*. 2022. **23**(19): p. 11920.
189. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
190. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
191. Klose, U., *In vivo proton spectroscopy in presence of eddy currents*. Magnetic resonance in medicine, 1990. **14**(1): p. 26-30.
192. Weibel, E., P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer and H. Lengsfeld, *Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by Streptomyces toxytricini I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity*. The Journal of antibiotics, 1987. **40**(8): p. 1081-1085.
193. Liu, R., X. Jiang, H. Mou, H. Guan, H. Hwang and X. Li, *A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain Fusarium solani N4-2 for detergent formulation*. Biochemical Engineering Journal, 2009. **46**(3): p. 265-270.
194. Hasnaoui, I., A. Dab, S. Mechri, H. Abouloifa, E. Saalaoui, B. Jaouadi, A. Noiriél, A. Asehraou and A. Abousalham, *Purification, Biochemical and Kinetic Characterization of a Novel Alkaline sn-1, 3-Regioselective Triacylglycerol Lipase from Penicillium crustosum Thom Strain P22 Isolated from Moroccan Olive Mill Wastewater*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(19): p. 11920.
195. Saraswat, R., V. Verma, S. Sistla and I. Bhushan, *Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated Bacillus strain for detergent formulation*. Electronic Journal of Biotechnology, 2017. **30**: p. 33-38.
196. Lööke, M., K. Kristjuhan and A. Kristjuhan, *Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications*. Biotechniques, 2011. **50**(5): p. 325-328.
197. Noinville, S., M. Revault, M.-H. Baron, A. Tiss, S. Yapoudjian, M. Ivanova and R. Verger, *Conformational changes and orientation of Humicola lanuginosa lipase on a solid hydrophobic surface: An in situ interface Fourier transform infrared-attenuated total reflection study*. Biophysical journal, 2002. **82**(5): p. 2709-2719.
198. Emsley, P., B. Lohkamp, W.G. Scott and K. Cowtan, *Features and development of Coot*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. **66**(4): p. 486-501.
199. Dallakyan, S. and A.J. Olson, *Small-molecule library screening by docking with PyRx*. Chemical biology: methods and protocols, 2015: p. 243-250.
200. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. Journal of computational chemistry, 2010. **31**(2): p. 455-461.

201. Verma, N., S. Thakur and A. Bhatt, *Microbial lipases: industrial applications and properties (a review)*. International Research Journal of Biological Sciences, 2012. **1**(8): p. 88-92.
202. Glogauer, A., V.P. Martini, H. Faoro, G.H. Couto, M. Müller-Santos, R.A. Monteiro, D.A. Mitchell, E.M. de Souza, F.O. Pedrosa and N. Krieger, *Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach*. Microbial cell factories, 2011. **10**: p. 1-15.
203. Chandra, P., R. Singh and P.K. Arora, *Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review*. Microbial Cell Factories, 2020. **19**(1): p. 1-42.
204. Woolley, P., *Lipases; their structure, biochemistry and application*. sequence analysis of lipases, esterases and related proteins, 1994: p. 27-28.
205. Lanka, S. and J.N.L. Latha, *A short review on various screening methods to isolate potential lipase producers: lipases-the present and future enzymes of biotech industry*. International Journal of Biological Chemistry, 2015. **9**(5): p. 207-219.
206. Kouker, G. and K.-E. Jaeger, *Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases*. Applied and environmental microbiology, 1987. **53**(1): p. 211-213.
207. Thompson, N.L., *Fluorescence correlation spectroscopy*. Topics in fluorescence spectroscopy: Techniques, 1999: p. 337-378.
208. White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR protocols: a guide to methods and applications, 1990. **18**(1): p. 315-322.
209. Mirhendi, H., A. Ghiasian, H. Vismer, M. Asgary, N. Jalalizand, M. Arendrup and K. Makimura, *Preliminary identification and typing of pathogenic and toxigenic Fusarium species using restriction digestion of ITS1-5.8 S rDNA-ITS2 region*. Iranian Journal of Public Health, 2010. **39**(4): p. 35.
210. Hoshino, T., T. Sasaki, Y. Watanabe, T. Nagasawa and T. Yamane, *Purification and some characteristics of extracellular lipase from Fusarium oxysporum f. sp. lini*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1992. **56**(4): p. 660-664.
211. Mogensen, J.E., P. Sehgal and D.E. Otzen, *Activation, inhibition, and destabilization of Thermomyces lanuginosus lipase by detergents*. Biochemistry, 2005. **44**(5): p. 1719-1730.
212. Gharbi, Y., M. Barkallah, E. Bouazizi, M. Cheffi, R. Gdoura and M.A. Triki, *Differential fungal colonization and physiological defense responses of new olive cultivars infected by the necrotrophic fungus Verticillium dahliae*. Acta Physiol Plant, 2016. **38**(10).
213. Gharbi, Y., E. Bouazizi, M. Cheffi, F. Ben Amar and M.A. Triki, *Investigation of soil-borne fungi, causal agents of olive trees wilt and dieback in Tunisia*. Arch Phytopath Plant, 2020. **53**(17-18): p. 828-843.
214. Gharsallah, H., I. Ksentini, S. Naayma, K. Hadj Taieb, N. Abdelhedi, C. Schuster, M.A. Triki, M. Ksantini and A. Leclerque, *Identification of fungi in Tunisian olive orchards: characterization and biological control potential*. BMC Microbiol, 2020. **20**(1).
215. Trabelsi, R., H. Sellami, Y. Gharbi, M. Cheffi, A. Chaari, M. Baucher, M. El Jaziri, M.A. Triki and R. Gdoura, *Response of olive tree (Olea europaea L.cv. Chemlali) to infection with soilborne fungi*. J Plant Dis Protect, 2017. **124**(2): p. 153-162.
216. Facchini, F.D.A., A.C. Vici, M.G. Pereira, J.A. Jorge and M.d.L.T. de Moraes, *Enhanced lipase production of Fusarium verticillioides by using response surface methodology and wastewater pretreatment application*. Journal of Biochemical Technology, 2016. **6**(3): p. 996-1002.

217. Paitaid, P., J. Buatong, S. Phongpaichit and H. Aran, *Purification and Characterization of an Extracellular Lipase Produced by Aspergillus oryzae ST11 as a Potential Catalyst for an Organic Synthesis*. Trends in Sciences, 2021. **18**(21): p. 45-45.
218. Wang, J., Y. Liu, X. Guo, B. Dong and Y. Cao, *High-level expression of lipase from Galactomyces geotrichum mafic-0601 by codon optimization in Pichia pastoris and its application in hydrolysis of various oils*. 3 Biotech, 2019. **9**(10): p. 1-10.
219. Prazeres, J.N.d., J.A.B. Cruz and G.M. Pastore, *Characterization of alkaline lipase from Fusarium oxysporum and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity*. Brazilian Journal of Microbiology, 2006. **37**: p. 505-509.
220. Lima, V., N. Krieger, D. Mitchell and J. Fontana, *Activity and stability of a crude lipase from Penicillium aurantiogriseum in aqueous media and organic solvents*. Biochemical Engineering Journal, 2004. **18**(1): p. 65-71.
221. Rade, L.L., M.N. da Silva, P.S. Vieira, N. Milan, C.M. de Souza, R.R. de Melo, B.C. Klein, A. Bonomi, H.F. de Castro and M.T. Murakami, *A novel fungal lipase with methanol tolerance and preference for Macaw Palm oil*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2020. **8**: p. 304.
222. Nema, A., S.H. Patnala, V. Mandari, S. Kota and S.K. Devarai, *Production and optimization of lipase using Aspergillus niger MTCC 872 by solid-state fermentation*. Bulletin of the National Research Centre, 2019. **43**(1): p. 1-8.
223. Paluzar, H., D. Tuncay and H. Aydogdu, *Production and characterization of lipase from Penicillium aurantiogriseum under solid-state fermentation using sunflower pulp*. Biocatalysis and Biotransformation, 2021: p. 1-10.
224. Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami and B. Chauhan, *Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective*. Process biochemistry, 2003. **38**(11): p. 1599-1616.
225. Niyonzima, F. and S. More, *Microbial detergent compatible lipases*. 2015.
226. Haddar, A., R. Agrebi, A. Bougatef, N. Hmidet, A. Sellami-Kamoun and M. Nasri, *Two detergent stable alkaline serine-proteases from Bacillus mojavensis A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive*. Bioresour Technol, 2009. **100**(13): p. 3366-73.
227. Rahman, R.N., S.N. Baharum, M. Basri and A.B. Salleh, *High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from Pseudomonas sp. strain S5*. Anal Biochem, 2005. **341**(2): p. 267-74.
228. Mehta, A., C. Grover and R. Gupta, *Purification of lipase from Aspergillus fumigatus using Octyl Sepharose column chromatography and its characterization*. Journal of basic microbiology, 2018. **58**(10): p. 857-866.
229. Gurkok, S. and M. Ozdal, *Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from Aeromonas caviae LipT51 for application in detergent industry*. Protein expression and purification, 2021. **180**: p. 105819.
230. FLEER, E.A., H.M. VERHEIJ and G.H. de HAAS, *Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A2: identification of aspartate - 49 as Ca<sup>2+</sup> - binding ligand*. European Journal of Biochemistry, 1981. **113**(2): p. 283-288.
231. Shi, K., J. Jing, L. Song, T. Su and Z. Wang, *Enzymatic hydrolysis of polyester: Degradation of poly(epsilon-caprolactone) by Candida antarctica lipase and Fusarium solani cutinase*. Int J Biol Macromol, 2020. **144**: p. 183-189.
232. Jallouli, R., F. Khrouf, A. Fendri, T. Mechichi, Y. Gargouri and S. Bezzine, *Purification and biochemical characterization of a novel alkaline (phospho)lipase from a newly isolated Fusarium solani strain*. Appl Biochem Biotechnol, 2012. **168**(8): p. 2330-43.

233. Eddehech, A., Z. Zarai, F. Aloui, N. Smichi, A. Noiriél, A. Abousalham and Y. Gargouri, *Production, purification and biochemical characterization of a thermoactive, alkaline lipase from a newly isolated Serratia sp. W3 Tunisian strain*. International journal of biological macromolecules, 2019. **123**: p. 792-800.
234. Sayari, A., N. Agrebi, S. Jaoua and Y. Gargouri, *Biochemical and molecular characterization of Staphylococcus simulans lipase*. Biochimie, 2001. **83**(9): p. 863-871.
235. Horchani, H., H. Mosbah, N.B. Salem, Y. Gargouri and A. Sayari, *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, 2009. **56**(4): p. 237-245.
236. Eddehech, A., N. Smichi, Y. Arhab, A. Noiriél, A. Abousalham, Y. Gargouri and Z. Zarai, *Production, purification and functional characterization of phospholipase C from Bacillus thuringiensis with high catalytic activity*. Process Biochemistry, 2019. **83**: p. 122-130.
237. Moghimipour, E., A. Ameri and S. Handali, *Absorption-enhancing effects of bile salts*. Molecules, 2015. **20**(8): p. 14451-14473.
238. Aloulou, A., D. Puccinelli, A. De Caro, Y. Leblond and F. Carrière, *A comparative study on two fungal lipases from Thermomyces lanuginosus and Yarrowia lipolytica shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007. **1771**(12): p. 1446-1456.
239. Delorme, V., R. Dhouib, S. Canaan, F. Fotiadu, F. Carrière and J.-F. Cavalier, *Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition*. Pharmaceutical research, 2011. **28**(8): p. 1831-1842.
240. Tiss, A., N. Miled, R. Verger, Y. Gargouri and A. Abousalham, *Digestive lipases inhibition: an in vitro study*. Lipases and Phospholipases in Drug Development: From biochemistry to molecular pharmacology, 2004: p. 155-193.
241. Simons, J.-W.F., J.-W.P. Boots, M.P. Kats, A.J. Slotboom, M.R. Egmond and H.M. Verheij, *Dissecting the catalytic mechanism of staphylococcal lipases using carbamate substrates: chain length selectivity, interfacial activation, and cofactor dependence*. Biochemistry, 1997. **36**(47): p. 14539-14550.
242. El Alaoui, M., L. Soulère, A. Noiriél, F. Popowycz, A. Khatib, Y. Queneau and A.J.J.o.l.r. Abousalham, *A continuous spectrophotometric assay that distinguishes between phospholipase A1 and A2 activities [S]*. 2016. **57**(8): p. 1589-1597.
243. Ishibashi, Y., K. Aoki, N. Okino, M. Hayashi and M. Ito, *A thraustochytrid-specific lipase/phospholipase with unique positional specificity contributes to microbial competition and fatty acid acquisition from the environment*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1-17.
244. Ogino, H. and H. Ishikawa, *Enzymes which are stable in the presence of organic solvents*. Journal of bioscience and bioengineering, 2001. **91**(2): p. 109-116.
245. Lotti, M., J. Pleiss, F. Valero and P. Ferrer, *Effects of methanol on lipases: molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel*. Biotechnology journal, 2015. **10**(1): p. 22-30.
246. Careri, G., *Cooperative charge fluctuations by migrating protons in globular proteins*. Prog Biophys Mol Biol, 1998. **70**(3): p. 223-49.
247. Hemlata, B., Z. Uzma and K. Tukaram, *Substrate kinetics of thiol activated hyperthermostable alkaline lipase of Bacillus sonorensis 4R and its application in bio-detergent formulation*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016. **8**: p. 104-111.

248. Javed, S., F. Azeem, S. Hussain, I. Rasul, M.H. Siddique, M. Riaz, M. Afzal, A. Kouser and H. Nadeem, *Bacterial lipases: a review on purification and characterization*. Progress in biophysics and molecular biology, 2018. **132**: p. 23-34.
249. Amara, S., D. Lafont, G. Parsieglia, V. Point, A. Chabannes, A. Rousset and F. Carrière, *The galactolipase activity of some microbial lipases and pancreatic enzymes*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2013. **115**(4): p. 442-451.
250. Eddehech, A., N. Smichi, S. Violot, E. Bettler, L. Brizuela, A. Noiriél, A. Abousalham and Z. Zarai, *Deciphering the recombinant thermostable phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity from Bacillus thuringiensis: Biochemical and interfacial properties*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2021. **630**: p. 127629.
251. Miles, A., R.W. Janes and B.A. Wallace, *Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: A tutorial review*. Chemical Society Reviews, 2021. **50**(15): p. 8400-8413.
252. Eddehech, A., R. Rahier, N. Smichi, Y. Arhab, A. Noiriél, A. Abousalham, A. Sayari and Z. Zarai, *Heterologous expression, kinetic characterization and molecular modeling of a new sn-1, 3-regioselective triacylglycerol lipase from Serratia sp. W3*. Process Biochemistry, 2021. **103**: p. 87-97.
253. Yang, M., X.-W. Yu, H. Zheng, C. Sha, C. Zhao, M. Qian and Y. Xu, *Role of N-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of Rhizopus chinensis lipase expressed in Pichia pastoris*. Microbial Cell Factories, 2015. **14**(1): p. 1-14.
254. Han, M., X. Wang, H. Ding, M. Jin, L. Yu, J. Wang and X. Yu, *The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by Pichia pastoris*. Enzyme and microbial technology, 2014. **54**: p. 32-37.
255. Vivek, K., G. Sandhia and S. Subramanian, *Extremophilic lipases for industrial applications: A general review*. Biotechnology Advances, 2022: p. 108002.
256. Annamalai, N., S. Elayaraja, S. Vijayalakshmi and T. Balasubramanian, *Thermostable, alkaline tolerant lipase from Bacillus licheniformis using peanut oil cake as a substrate*. African Journal of Biochemistry Research, 2011. **5**(6): p. 176-181.
257. Liu, G., S. Hu, L. Li and Y. Hou, *Purification and characterization of a lipase with high thermostability and polar organic solvent-tolerance from Aspergillus niger AN0512*. Lipids, 2015. **50**: p. 1155-1163.
258. Acharya, P., E. Rajakumara, R. Sankaranarayanan and N.M. Rao, *Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved Bacillus subtilis lipase*. Journal of molecular biology, 2004. **341**(5): p. 1271-1281.
259. Zhang, L. and Y. Ding, *The relation between lipase thermostability and dynamics of hydrogen bond and hydrogen bond network based on long time molecular dynamics simulation*. Protein and peptide letters, 2017. **24**(7): p. 643-648.
260. Mohammadi, M., Z. Sepehrizadeh, A. Ebrahim-Habibi, A.R. Shahverdi, M.A. Faramarzi and N. Setayesh, *Enhancing activity and thermostability of lipase A from Serratia marcescens by site-directed mutagenesis*. Enzyme and Microbial Technology, 2016. **93**: p. 18-28.
261. Shariff, F.M., R.N.Z.R.A. Rahman, M. Basri and A.B. Salleh, *A newly isolated thermostable lipase from Bacillus sp*. International journal of molecular sciences, 2011. **12**(5): p. 2917-2934.
262. Ayinla, Z.A., A.N. Ademakinwa and F.K. Agboola, *Studies on the optimization of lipase production by Rhizopus sp. ZAC3 isolated from the contaminated soil of a palm oil processing shed*. 2017.
263. Sanchez, S. and A.L. Demain, *Useful microbial enzymes—an introduction*, in *Biotechnology of microbial enzymes*. 2017, Elsevier. p. 1-11.

264. Wang, F., H. Zhang, Z. Zhao, R. Wei, B. Yang and Y. Wang, *Recombinant lipase from Gibberella zeae exhibits broad substrate specificity: a comparative study on emulsified and monomolecular substrate*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(7): p. 1535.
265. Shimada, Y., C. Koga, A. Sugihara, T. Nagao, N. Takada, S. Tsunasawa and Y. Tominaga, *Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from Fusarium heterosporum*. Journal of fermentation and bioengineering, 1993. **75**(5): p. 349-352.
266. Ugwu, S.O. and S.P. Apte, *The effect of buffers on protein conformational stability*. Pharmaceutical Technology, 2004. **28**(3): p. 86-109.
267. Lindsay, R.J., R.A. Mansbach, S. Gnanakaran and T. Shen, *Effects of pH on an IDP conformational ensemble explored by molecular dynamics simulation*. Biophysical chemistry, 2021. **271**: p. 106552.
268. Wang, Y., L. Sternfeld, F. Yang, J.A. Rodriguez, C. Ross, M.R. Hayden, F. Carriere, G. Liu, W. Hofer and I. Schulz, *Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells*. Gut, 2009. **58**(3): p. 422-430.
269. Li, Y., G. Li, H. Sun and Y. Chen, *Characterization of a novel sn1, 3 lipase from Ricinus communis L. suitable for production of oleic acid-palmitic acid-glycerol oleate*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 6913.
270. Su, L., D. Ji, X. Tao, L. Yu, J. Wu and Y. Xia, *Recombinant expression, characterization, and application of a phospholipase B from Fusarium oxysporum*. Journal of biotechnology, 2017. **242**: p. 92-100.
271. Aloulou, A., F. Frikha, A. Noiriél, M.B. Ali and A. Abousalham, *Kinetic and structural characterization of triacylglycerol lipases possessing phospholipase A1 activity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014. **1841**(4): p. 581-587.
272. Huang, W., D. Lan, G.M. Popowicz, K.M. Zak, Z. Zhao, H. Yuan, B. Yang and Y. Wang, *Structure and characterization of Aspergillus fumigatus lipase B with a unique, oversized regulatory subdomain*. The FEBS Journal, 2019. **286**(12): p. 2366-2380.
273. Chamorro, S., J. Sanchez-Montero, A. Alcantara and J. Sinisterra, *Treatment of Candida rugosa lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities*. Biotechnology Letters, 1998. **20**: p. 499-505.
274. Speranza, P. and G.A. Macedo, *Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from Fusarium oxysporum*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013. **2**(4): p. 372-376.
275. de La Fournière, L., M.G. Ivanova, J.-P. Blond, F. Carrière and R. Verger, *Surface behaviour of human pancreatic and gastric lipases*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1994. **2**(6): p. 585-593.
276. Nalefski, E.A. and J.J. Falke, *The C2 domain calcium - binding motif: structural and functional diversity*. Protein Science, 1996. **5**(12): p. 2375-2390.
277. Gerber, S.H., J. Rizo and T.C. Südhof, *The top loops of the C2 domains from synaptotagmin and phospholipase A2 control functional specificity*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(34): p. 32288-32292.
278. Xin, R., F.I. Khan, Z. Zhao, Z. Zhang, B. Yang and Y. Wang, *A comparative study on kinetics and substrate specificities of Phospholipase A1 with Thermomyces lanuginosus lipase*. Journal of Colloid and Interface Science, 2017. **488**: p. 149-154.
279. Van Kampen, M., J.-W. Simons, N. Dekker, M. Egmond and H. Verheij, *The phospholipase activity of Staphylococcus hyicus lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation*. Chemistry and physics of lipids, 1998. **93**(1-2): p. 39-45.

## Résumé

Cette étude présente une nouvelle enzyme lipolytique de la famille des (phospho)lipases, produite par la souche fongique *Fusarium annulatum* Bugnicourt nouvellement isolée. L'enzyme purifiée présente une activité spécifique élevée à la fois sur les triglycérides (3500 U/mg sur TC8) et sur les phospholipides (5000 U/mg sur le PC de jaune d'œuf). Une fois caractérisée, cette lipase, nommée FAL, a démontré une activité élevée sur une large gamme de pH et à des températures relativement élevées, ainsi qu'une stabilité alcaline significative, ce qui est rare chez les lipases fongiques. De plus, cette lipase alcaline semble être une candidate parfaite pour une application dans la détergence puisqu'elle a montré une remarquable stabilité en présence de tensioactifs non ioniques, d'agents oxydants, de produits de blanchiment et de divers détergents liquides et solides. Dans le cadre de cette étude, un gène codant pour une autre lipase de *Fusarium annulatum* a été cloné dans *Pichia pastoris* et purifié en une quantité importante (210 mg L<sup>-1</sup>). L'enzyme purifiée a également montré une activité spécifique élevée envers les triglycérides (6000 U/mg sur TC8) et les phospholipides (6500 U/mg sur le PC de jaune d'œuf). Les résultats du dichroïsme circulaire ont également révélé que la lipase recombinante (rFAL) maintient une bonne stabilité à des températures élevées, à des pH alcalins et en présence de solvants polaires. Les expériences de docking moléculaire *in silico* ont révélé que les triglycérides et les phospholipides s'ajustent bien dans le site actif de rFAL, avec une orientation favorisant la régiospécificité *sn*-1, en accord avec les expériences *in vitro*. Nos analyses structurales démontrent le rôle crucial du C-terminal dans l'expression de l'activité phospholipase de cette enzyme.

**Mots clés :** phospholipase, lipase, galactolipase, *F. annulatum*, caractérisation, expression hétérologue, modélisation, régiospécificité.

## Summary

This study presents a new lipolytic enzyme from the (phospho)lipase family, produced by the newly isolated fungal strain *Fusarium annulatum* Bugnicourt. The purified enzyme exhibits a high specific activity on both triglycerides (3500 U/mg on TC8) and phospholipids (5000 U/mg on egg yolk PC). Once characterized, this lipase, named FAL, demonstrated high activity over a wide pH range and at relatively high temperatures, as well as significant alkaline stability, which is rare among fungal lipases. Furthermore, this alkaline lipase appears to be a perfect candidate for detergent applications, as it has shown remarkable stability in the presence of non-ionic surfactants, oxidizing agents, bleaching products, and various liquid and solid detergents. A gene encoding another lipase from *Fusarium annulatum* was successfully cloned into *Pichia pastoris* and purified in a significant quantity (210 mg L<sup>-1</sup>). The purified enzyme also exhibited high specific activity towards triglycerides (6000 U/mg on TC8) and phospholipids (6500 U/mg on egg yolk PC). Circular dichroism results revealed that the recombinant lipase (rFAL) maintains good stability at high temperatures, alkaline pH, and in the presence of polar solvents. Molecular docking experiments *in silico* demonstrated a favorable binding of triglycerides and phospholipids to the active site of rFAL, with an orientation that favors *sn*-1 regiospecificity, consistent with *in vitro* experiments. Our structural analyses demonstrate the crucial role of the C-terminal in the expression of phospholipase activity in this enzyme.

**Key-words:** phospholipase, lipase, galactolipase, *F. annulatum*, characterization, heterologous expression, modeling, regiospecificity.