

Remerciements

"Avant d'exposer ce travail, je tiens à exprimer ma respectueuse gratitude à Monsieur le professeur Kushner, membre de l'Institut, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire au Département de Biologie de l'Université d'Ottawa, et qui a constamment inspiré et dirigé ces recherches.

Messieurs les professeurs Armstrong et Kates qui m'ont prodigué leurs précieux conseils et fait bénéficier de leurs expériences qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde admiration.

Je remercie le professeur Gounot de l'Université des Sciences de Lyon en France, pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la rédaction de cette thèse.

J'apprécie l'assistance technique et les suggestions qui m'ont été offertes par les membres du laboratoire de microbiologie, ou par d'autres membres du département.

Je remercie également l'office du Conseil des Arts du Canada pour la bourse d'étude qui m'a été octroyé. Finalement, le professeur Kushner et moi-même tenons à remercier le Département de l'Environnement qui a subventionné une partie du coût de cette recherche grâce à un octroi.

Remerciements i

Sommaire ii

Liste des Tableaux vi

Liste des Figures viii

Abstract x

Résumé xii

Chapitre I

Introduction

 I Répartition des enzymes lipolytiques 1

 II Terminologie 5

 III Purification et propriétés des lipases bactériennes 10

 IV La psychrophilie 13

 V Thème de recherche 16

Chapitre II

Méthodes d'analyses

 I Numération du nombre de microorganismes lipolytiques viables 18

 II Tests biochimiques d'identification 18

 III Dosage de l'activité lipolytique 19

 1- Titration directe des acides gras libérés .. 19

 2- Dosage des acides gras libérés par colorimétrie: méthode de Lippi 20

 3- Hydrolyse des esters du β naphtol 21

 IV Détermination de la teneur en protéines 22

 V Préparations des colonnes pour la chromatographie sur sephadex 22

 VI Electrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide: "disc electrophoresis" 23

 VII Extraction et chromatographie sur couche mince des lipides 24

 VIII Notes additionnelles sur les méthodes d'analyses. 24

Chapitre III

Etude d'Acinetobacter 0₁₆

I	Provenance et isolement	25
II	Morphologie et identification	25
III	Problème taxonomique	32
IV	Exigences et particularité nutritionnelles d'Acinetobacter 0 ₁₆	33

Chapitre IV

Mise en évidence et localisation des activités
lipasique et estérasique

I	Introduction	36
II	Résultats	40
	1- Croissance d'Acinetobacter 0 ₁₆	40
	2- Mise en évidence des 2 types d'enzymes	40
	3- Localisation des deux enzymes	48
III	Conclusions	52

Chapitre V

Facteurs affectant la production des enzymes
lipolytiques, et plus particulièrement la lipase
d'Acinetobacter 0₁₆

I	Introduction	56
II	Résultats	60
	1- Influence des facteurs nutritionnels	60
	a) milieux complexes ou empiriques	60
	b) milieux synthétiques	60
	2- Influence de quelques autres facteurs	69
	a) la température d'incubation	69

b) Le pH du milieu de culture	73
c) l'agitation ou aération du milieu	73
III Discussion et conclusion	75
Chapitre VI	
<u>Isolement, purification et quelques propriétés de</u>	
<u>la lipase d'Acinetobacter 0₁₆</u>	
I Introduction	78
II <u>Isolement et purification de la lipase</u> <u>d'Acinetobacter 0₁₆</u>	83
1- Concentration de l'enzyme	83
2- Purification de la lipase	87
a) sur séphadex G ₂₀₀ ou G ₁₀₀	87
b) sur diethyl-amino-ethyl-cellulose: D.E.A.E. cellulose	90
c) sur diethyl-amino-ethyl-sephadex: D.E.A.E. sephadex	94
d) Essais de vérification de l'état de pureté des échantillons provenant de sephadex G ₂₀₀ et de D.E.A.E. sephadex	97
3- Discussion	101
III <u>Etude de quelques propriétés de la lipase</u> <u>d'Acinetobacter 0₁₆</u>	105
1- <u>Activité lipasique de l'extrait brut en</u> <u>fonction de la concentration de la solution</u> <u>enzymatique ou du temps</u>	106
2- <u>Action du pH sur l'activité lipasique</u>	109
a) <u>courbe d'activité du surnageant</u>	109
b) <u>courbe d'activité de l'enzyme partielle-</u> <u>ment purifiée (sur sephadex G₂₀₀ et</u> <u>D.E.A.E. sephadex)</u>	109
3- <u>Action de la température sur l'activité</u>	109
a) <u>activité du surnageant en fonction de la</u> <u>température d'incubation du substrat et</u> <u>de l'enzyme</u>	109

b) activité de l'enzyme provenant de
D.E.A.E. sephadex en fonction de la
température 113

4- Rôle de la température sur la stabilité de
la lipase 113

a) stabilité de l'extrait brut 113

b) stabilité de l'extrait partiellement
purifié provenant de D.E.A.E. sephadex ... 117

5- Discussion 117

Chapitre VII

Discussion générale 120

Références bibliographiques 123

Liste des Tableaux

No.		Page
1.	Données de Blaise	4
2	Procédés utilisés pour purifier les lipase bactériennes.....	11
3	Tests biochimiques et physiologiques sur <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆	30
3'	Croissance d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆ sur quelques milieux d'emploi courant en microbiologie	31
4	Utilisation de divers composés comme seule source de carbone et d'énergie par <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆	34
5	Activité lipasique vis à vis d'une émulsion d'huile d'olive (méthode de Lippi)	49
6	Localisation de l'estérase et de la lipase: activité au niveau des diverses fractions	51
7	Activités estérasique et lipasique des cellules avant et après un choc osmotique	53
8	Influence de la composition du milieu (milieu complexe) sur la production de la lipase	61
9	Influence de la composition du milieu (milieu complexe) sur la production de l'estérase	63
10	Composition détaillée des milieux synthétiques ...	64
11	Influence du milieu synthétique sur la production de la lipase	65
12	Influence du milieu synthétique sur la production de l'estérase	67
13	Rôle de la tributyrine (.1%) et du tween 80 (1%) ajoutés respectivement au milieu com- plexe, sur la production des enzymes	68
14	Influence du pH du milieu de culture, sur la production des enzymes lipolytiques	74
15	Essais de précipitations de la lipase par le sulfate d'ammonium en utilisant le monogramme de Dixon	85

16	Précipitation de la lipase par le sulfate d'ammonium	86
17	Comparaison de la purification de la lipase par 1 ou 2 précipitations par le sulfate d'ammonium saturé à 50%	88
18	Comparaison de la purification de la lipase sur sephadex G ₁₀₀ et G ₂₀₀	91
19	Action du triton X ₁₀₀ sur la lipase partiellement purifiée (sephadex G ₂₀₀)	93
20	Purification des fractions lipasiques provenant du premier pic de sephadex G ₂₀₀ sur D.E.A.E. cellulose	95
21	Procédé de purification de la lipase d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆	96
22	Dosage des activités estérasique et lipasique au cours de la purification sur D.E.A.E. sephadex	98
23	Action de la température sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase d'un <u>Acinetobacter</u> mésophile	114

No.	Liste des Figures	Page
0	Plan de la zone de prélèvement de l'échantillon	26
1	Courbe de croissance d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆	41
2	Activités lipasique et estérasique dans le surnageant et dans les cellules entières lavées, au cours de la croissance d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆	43
3	Activité estérasique du surnageant et des cellules entières vis à vis du naphthyl butyrate, en fonction de l'âge de la culture	45
4	Activité lipasique du surnageant en fonction de l'âge de la culture d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆ (dosage titrimétrique)	46
5	Activité lipasique du surnageant en fonction de l'âge de la culture d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆ vis à vis d'une émulsion d'huile d'olive	47
6	Procédé suivi pour localiser l'estérase et la lipase chez <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆	50
7	Courbe de croissance d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆ à différentes températures d'incubation, sans agitation	70
8	Courbes d'activité lipasique du surnageant de cultures d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆ incubées à 30°C, 20°C, 15°C	71
9	Courbes d'activité estérasique des cellules entières, de cultures d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆ incubées à 30°C, 20°C, 15°C	72
10	Chromatographie sur sephadex G ₂₀₀	89
11	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ordinaire (a) et (b), en présence de S.D.S. (c) et (d)	100
12	Activité lipasique en fonction de la concentration de la solution enzymatique (surnageant)	107
13	Activité lipasique du surnageant en fonction du temps	108
14	Action du pH sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase du surnageant de la culture d' <u>Acinetobacter</u> 0 ₁₆	110

15	Action du pH sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase partiellement purifiée	111
16	Action de la température sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase du surnageant	112
17	Action de la température sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase partiellement purifiée	115
18	Thermostabilité de la lipase du surnageant	116
19	Thermostabilité de la lipase partiellement purifié sur D.E.A.E. sephadex	118

-x-

Abstract

Acinetobacter 0₁₆ was isolated at 4°C from the mud of Brewery Creek, at its entry into the Ottawa River. It is gram-negative, non motile; the morphology is predominately diplococoid but appears at times as diplobacilloid or bacilloid. It does not grow at 37°C, but does grow between 0°C and 30°C, and therefore it can be considered as a facultatively psychrophilic bacterium. It grows aerobically in a minimal medium. This bacterium possesses a very strong lipolytic activity on different substrates.

Acinetobacter 0₁₆ produces two kinds of lipolytic enzymes during the logarithmic phase of its growth:

- 1- An extracellular lipase, able to hydrolyse naphtyl laurate and emulsified esters of glycerol. The maximum production of the enzyme is reached just before the cells stop dividing and enter the stationnary phase.
- 2- An esterase associated with the cells, degrading naphtyl acetate and naphtyl butyrate but not naphtyl laurate.

The production of both enzymes (lipase and esterase) is affected by several factors:

- 1- Composition of the growth medium. A good lipase production is possible in a complex medium (peptone and yeast extract). Synthetic media support the growth, but no lipase production. Production of the esterase is less affected by the composition of the medium.

- 2- Incubation temperature. The maximum production of lipase occurs at 20°C or below. The esterase production, how-

ever, is highest when Acinetobacter 0₁₆ is grown at 30°C.

3- pH of the medium. Initial pH level of 6.6 is best for lipase production.

4- Effect of aeration of growth medium. Shaking the cultures to increase aeration results in decreased lipase activity.

The lipase can be precipitated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ from the cell-free medium, and purified by gel filtration, first on sephadex G₂₀₀, then on D.E.A.E. sephadex columns. However, the losses of activity are after precipitation very large.

A 250 fold purification was obtained.

By analytical centrifuge techniques and electrophoresis the enzyme was shown to be not pure.

The crude extract (supernatant of a culture) shows two peaks of activity. The enzyme partially purified has an activity optimum at pH 8. The maximum activity is observed at temperature near 35°C with the crude extract, and near 32 with the partially purified enzyme. The effect of heat on inactivation of lipase in both case (crude extract, partially purified enzyme) is nearly the same.

Résumé

Cinetobacter 0₁₆ a été isolé à partir d'un échantillon de sédiment d'eau douce (confluence de la rivière Ottawa et du ruisseau de la brasserie). C'est une bactérie gram négative, immobile, caractérisée par un certain pléomorphisme. Son développement à 0°C et son absence de croissance à 37°C permettent de la classer comme une bactérie psychrophile facultative. Ses besoins nutritifs sont faibles. Son fort pouvoir de dégradation des graisses permet de la définir comme lipolytique.

Au cours de sa phase exponentielle de croissance la bactérie produit deux systèmes enzymatiques:

1- La lipase active sur les émulsions de tributyrine et d'huile d'olive, et vis à vis du naphthyl laurate. Elle est rejetée très tôt dans le milieu et elle s'y accumule jusqu'à ce que la croissance ralentisse.

2- L'estérase qui est essentiellement intracellulaire, elle hydrolyse le naphthyl acétate ou le naphthyl butyrate. A la fin de la croissance, l'enzyme se retrouve en partie dans le milieu externe, conséquence probable de la lyse cellulaire.

La production des enzymes lipolytiques par cette bactérie est très variable. Elle dépend largement:

1- de la composition du milieu de croissance de la bactérie. Les milieux complexes (peptones et extrait de levure) favorisent la production de la lipase, à l'inverse les milieux synthétiques sont de piètres supports pour la

production de cette enzyme.

2- de la température d'incubation du milieu de culture. La lipase est produite en plus forte quantité pour des températures \leq à 20°C , ce qui peut être attribué au caractère psychrophile de la bactérie. Quant à l'estérase sa production est plus importante pour des températures voisines de 30°C .

3- du pH du milieu. Un pH légèrement acide (6.6) convient mieux pour la production de la lipase.

4- de l'aération du milieu qui est néfaste pour la lipase.

La lipase présente dans le surnageant de la culture est précipitée par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, puis elle est purifiée par un premier passage sur sephadex G_{200} suivi d'un deuxième passage sur D.E.A.E. sephadex. En dépit d'une perte importante de l'activité au moment de la précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; l'activité spécifique de l'échantillon après le passage sur D.E.A.E. sephadex, est de 22.2 unités/mg de protéines, ce qui représente une enzyme purifiée 250 fois par rapport à l'échantillon initial. L'ultracentrifugation et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ont permis de démontrer l'hétérogénéité des échantillons provenant de sephadex G_{200} ou de D.E.A.E. sephadex.

La lipase d'Acinetobacter O_{16} présente à l'état brut deux pH optimum d'activité. A l'état partiellement purifié seul subsiste le pH optimum voisin de 8. L'activité optimale est à 35°C pour l'extrait brut et à 32°C pour l'extrait

partiellement purifié. Enfin l'inactivation par la température de l'enzyme à l'état brut est peu différente de celle obtenue avec l'enzyme partiellement purifiée.

Chapitre I

INTRODUCTION

L'existence des enzymes lipolytiques a été reconnue depuis plus de 130 ans. Leur présence est mise en évidence dans le règne animal (pancréas) dès 1846 par Claude Bernard (1), dans le règne végétal (graines de plantes) en 1871 par Muntz (2), enfin dans le domaine microbien en 1901 par Eijkman (3). Ce n'est qu'à partir de 1950 qu'on leur porte un plus grand intérêt, par suite de leur action favorable ou préjudiciable dans l'industrie alimentaire et dans le domaine médical.

I. Répartition des enzymes lipolytiques

Chez les mammifères, elles sont présentes dans la plupart des organes (pancréas, cerveau, coeur, poumon, ovaire etc.), dans un certain nombre de tissus (peau, tissu adipeux, rétine, etc.), et également dans les fluides (lait, salive, sang, certains sucs ...). Elles ont été signalées chez d'autres vertébrés comme le poulet, le pigeon, les poissons, etc. (4).

Quant aux invertébrés, des spongiaires aux insectes, ils sont largement pourvus d'enzymes lipolytiques, que ce soit au niveau des sucs digestifs, de l'haemolymphe, des glandes salivaires, des muscles ou des oeufs.

Chez les végétaux, la localisation de ces enzymes dans les différentes parties de la plante n'a pas été étudiée de

façon très approfondie. Elles sont présentes dans les graines ou les fruits de l'huile de palme, de la laitue, du houblon, du blé, du coton..., où elles provoquent parfois des détériorations.

Chez les microorganismes, la lipolyse a été d'abord, et surtout étudiée en microbiologie alimentaire (5) par suite de son impact économique. Il est généralement admis, que les microorganismes lipolytiques jouent un rôle important dans la maturation des fromages et dans la dégradation des produits laitiers. Ainsi, le rancissement du beurre débute par l'hydrolyse des graisses sous l'action de divers organismes dont des moisissures du type Aspergillus et Penicillium (6). Depuis de nombreuses années, et plus particulièrement depuis les expériences de Witter en 1961 (7), le genre Pseudomonas est reconnu comme le genre provoquant le plus grand nombre de préjudices. Ces bactéries ou leurs lipases qui sont le plus souvent thermostables, sont à l'origine des odeurs désagréables qui peuvent se développer dans les crèmes, les beurres, et ce, même aux basses températures (8).

En 1967 Fryer et al (9) montrent que les bactéries lipolytiques du lait cru peuvent représenter 40 à 10% de la microflore totale. Ils testent l'activité d'une quarantaine de bactéries isolées des produits laitiers (9), dont 22 coques gram positif (Micrococcus, Sarcina, Staphylococcus) et 20 bâtonnets gram négatif (Achromobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Pseudomonas), toutes exercent une activité plus ou moins intense vis à vis de la tributyrine ou des graisses du

fait. Les mêmes auteurs (10) mettent en évidence la même année la dégradation de la tributyrine par 56 bactéries productrices d'acide lactique.

Peu d'études ont été entreprises pour déterminer l'importance et la nature des microorganismes lipolytiques dans les sols, les sédiments et les eaux. Les germes lipolytiques psychrophiles facultatifs y sont pourtant bien représentés, ils constituent le 1/5 de la microflore totale pour les échantillons d'eau (11), le 1/2 pour les échantillons de sédiments d'eau douce (13), le 1/8 dans le cas de certains sols (13). Parmi les microorganismes isolés de ces échantillons les gram négatifs sont en très forte majorité (12) (13), en particulier, comme le montre Blaise (tableau no. 1) les Pseudomonas et les Acinetobacter prédominent. On trouve, en quantité non négligeable, des Aeromonas dans les eaux polluées (tableau no. 1) et des Flavobacterium dans certains échantillons d'eaux et de sols glaciaires (12).

En 1969 Tysset (14) met en évidence l'importance de la lipolyse chez les bactéries marines; sur 234 souches isolées de l'eau de mer, des animaux marins, du plancton, 89% des Pseudomonas, 83.8% des Phytobacterium, 76% des Achromobacter, 92.6% des Vibrio, 100% des Serratia sont pourvus d'enzymes dégradant les graisses.

Dans les diagnostics de laboratoires médicaux, le test de lipolyse est encore rarement utilisé, bien que cette détermination puisse contribuer à l'identification des agents responsables de diverses maladies (15). En 1967, Lenetsner (16)

TABLEAU no. 1
Données de Blaise (12)

Classification of 450 lipolytic psychrophiles isolated from Brewery Creek

Group	Downstream (Fournier Blvd.)	Upstream (Wright St.)	20C incubation	Sewage 4C incubation	Total
Pseudomonas	153	44	10	5	202
Acinetobacter	108	4	19	20	151
Aeromonas	30	0	5	0	35
Alcaligenes	9	7	0	1	17
Moraxella	10	3	0	0	13
Chromobacterium	5	3	0	0	8
Enterobacteriaceae	2	3	1	0	6
Vibrio	1	0	0	0	1
Streptococcus	1	0	0	0	1
Lost ¹	11	2	2	1	16

¹ Failed to grow after sub-culturing

étudie cette activité chez des entérobactéries et chez des bactéries infectieuses du pus, la majorité de ces dernières (Microcoques, Staphylocoques, Pseudomonas aeruginosa) dissocient les tweens qui sont des esters du sorbitol et d'acides gras; ces faits avaient été également rapportés par Baird-Parker (15) et par Sierra (17). Les résultats sont très variables dans le cas des Enterobactéries. Cependant d'après Lenetsner (16), toutes les souches qui possèdent une activité lipolytique dissocient le tween 20 monolaurate de sorbitol, par contre le tween 80 monooléate de sorbitol est plus rarement hydrolysé, il est dégradé par Serratia marcescens et Enterobacter aerogenes. Les données concernant l'activité lipolytique des microorganismes sont encore fragmentaires et parfois contradictoires, et ce, en raison de l'absence d'une méthode unique communément admise pour déterminer cette activité, et du trop grand nombre de substrats naturels (graisses de porc, de boeuf, du lait, des graines etc...) ou synthétiques (tributyrine, tweens etc...) testés.

II. Terminologie

Le terme de lipolyse ou hydrolyse des graisses, laisse prévoir vu la grande variété des corps gras, différents types d'enzymes. La famille des estérases est la plus couramment étudiée. Ces enzymes hydrolysent les liaisons esters de divers substrats lipidiques. Le terme est très général et mal défini. A l'intérieur de cette famille, il est coutumier de faire une place particulière aux lipases; cependant la ligne de démarcation entre les deux n'est pas définie de façon absolue.

Dans le passé la différence est établie sur la nature du substrat, et plus particulièrement sur la longueur de la chaîne d'acide gras; les lipases s'attaquent préférentiellement aux substrats à longues chaînes d'acides gras, alors que les estérases hydrolysent les corps gras à courtes chaînes; très souvent le nom d'ali-estérase est attribué à ces dernières (18). En 1961 l'Union Internationale de Biochimie nomme lipases les enzymes qui hydrolysent les esters du glycérol en émulsion, et estérases celles qui hydrolysent ces substrats à l'état soluble. A la même époque Desnuelle (19) publie des travaux sur la lipase pancréatique, il insiste sur l'état physique des substrats de la lipase, ils doivent être sous forme d'émulsion.

Actuellement la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, définit une vingtaine d'hydrolases ayant une action sur les esters carboxyliques, et donne le nom "d'hydrolase des esters du glycérol" à la lipase; ce qui ne signifie pas, que la lipase agisse uniquement sur les esters du glycérol, en réalité la plupart des lipases possèdent des activités additionnelles vis à vis d'autres substrats comme les esters phénoliques ou les alcools monoaliphatiques. Les lipases peuvent donc être considérées comme une classe particulière d'estérases, qui hydrolysent préférentiellement sous forme d'émulsion les triesters gras du glycérol ou glycérides, constituants principaux des huiles et des graisses pour les transformer en diglycérides, monoglycérides et acides gras.

L'état physique des substrats de la lipase est

primordial, il convient donc de déterminer si les différences de comportements entre une estérase et une lipase peuvent s'expliquer en termes de structure moléculaire.

La lipase étant considérée comme une estérase de type particulier, on peut supposer à priori, que les centres catalytiques de ces deux systèmes enzymatiques sont analogues.

Effectivement, c'est ce que démontrent Lawrence, Fryer, Reiter en 1967 (20) avec les lipases de Micrococcus freudenreichii et de Pseudomonas fragi, et Desnuelle en 1971 (21) avec la lipase pancréatique. Ces enzymes possèdent, tout comme l'estérase, un centre catalytique du type sérine-histidine, et il fonctionne sur le même principe. Où se trouve alors la différence? Desnuelle (21) et Brockmerhoff (22) émettent 3 hypothèses possibles pour résoudre ce point d'interrogation:

-1 La molécule de lipase possède à sa surface, contrairement à la plupart des protéines, une large région hydrophobe responsable de l'attachement de la molécule à des interfaces également hydrophobes. Il est à noter que ce fait n'est pas l'apanage exclusif de la lipase, d'autres protéines possèdent la même propriété.

-2 La lipase en solution est une sorte de prolipase dépourvue de centre catalytique fonctionnel. L'adsorption de la molécule à l'interface provoque une variation limitée de sa conformation, et par suite son activation. Il n'a jamais été possible de titrer un centre actif au sein de la molécule de lipase dans un milieu sans interface.

-3 Le centre actif de la lipase est construit de telle sorte, que l'étape d'acylation de l'acte catalytique, ne peut pas avoir lieu lorsque les molécules de substrat sont complètement entourées d'eau. La réaction peut alors être schématisée de la façon suivante: le complexe enzyme/substrat résultant de l'attaque du carbone carboxylique par l'enzyme se décompose en libérant d'abord un anion alcoolate; en présence d'eau celui-ci se transforme en alcool tandis que l'hydroxyle se fixe sur le complexe dont la décomposition est complétée par la libération de l'acide et la régénération de l'enzyme. Par contre, au niveau d'une interface l'environnement est pauvre en eau, ce qui facilite cette attaque.

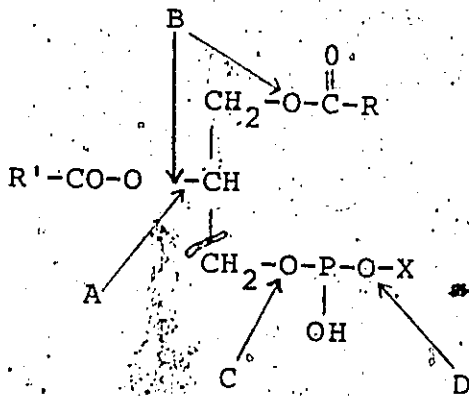
Nos connaissances sur cette enzyme très originale qui catalyse une réaction en milieu hétérogène, sont encore incomplètes. Il est probable que dans un proche avenir, un bon nombre de questions seront résolues.

En plus des deux types d'enzymes préalablement décrites, il convient de citer deux autres familles d'enzymes lipolytiques: les phospholipases, et les lipoprotéines lipases.

Les lipoprotéines lipases ou "clearing factor lipase" sont des hydrolases des esters du glycérol; tout comme la lipase elles agissent sur les triglycérides en émulsion, mais ces triglycérides ne peuvent pas exister à l'état libre, ils doivent être liés à des protéines, et, ils constituent alors des lipoprotéines. Ces enzymes ont été isolées en premier lieu, chez les mammifères au niveau des tissus (foie, rein, tissu vasculaire) et dans le sang après une injection d'hépa-

rine, puis, en second lieu chez les bactéries vers 1963 (23). Mais ce n'est qu'en 1966 qu'Arima et al' (24) décrivent des microorganismes produisant des lipoprotéines lipases dont les propriétés sont semblables à celles des mammifères.

Les phospholipases, appelées lécithinases dans le passé, hydrolysent les phospholipides. Plusieurs revues ont été publiées sur ces enzymes, notamment, par Kates (25) Ansell (26). En 1967 Brisou (27) dans un traité technique d'enzymologie bactérienne reconnaît 4 groupes de phospholipases:



Sites d'activité des phospholipases (X = choline, éthanolamine, sérine, inositol, glycérol ou un cation.

R et R' = chaînes d'acides gras. Saturés: R, et insaturés: R')

-1 La phospholipase A qui coupe l'acide gras en position 2

Elle est présente chez Serratia, Escherichia coli, chez les mammifères dans le pancréas et le foie, également dans le venin de serpent (27).

-2 La phospholipase B agit sur les lysolécithine on la trouve chez Vibrio et Escherichia coli (28).

-3 La phospholipase C ou phosphatidylcholine-choline phosphohydrolase, elle correspond à certaines toxines élaborées par les bactéries anaérobies de la gangrène.

-4 La phospholipase D, tout comme la précédente c'est une phosphodiesterase. Elle est très répandue chez les plantes, elle est plus rare chez les bactéries, elle a été cependant mise en évidence chez Phytobacterium tumefaciens (29).

En définitive, là (phospholipase et lipase) comme ailleurs, c'est le caractère du substrat qui gouverne la terminologie. En fait, que connaissons nous des lipases bactériennes?

III.. Purification et propriétés des lipases bactériennes

Pour élucider le mécanisme complet d'action d'une enzyme, il est indispensable de connaître de façon précise sa structure et son comportement vis à vis de divers substrats. Qu'une voie ou l'autre soit adoptée, il est nécessaire en tout premier lieu d'isoler l'enzyme dans un état de pureté aussi élevé que possible. Or parmi les multiples lipases connues, seule la lipase pancréatique a été suffisamment purifiée pour permettre une telle étude (21) (22) (30).

Parmi les lipases bactériennes, des essais de purification partiels ou plus complets ont été tentés dans une dizaine de cas (tableau no. 2). Que nous ont apporté ces essais? Peu de résultats, en ce qui concerne le nombre et la structure des lipases synthétisées par ces divers organismes. Cependant, au cours de l'étude de Pseudomonas fragi Mencher (35) signale l'existence de 2 lipases ou plus exacte-

TABLEAU no. 2

Procédés utilisés pour purifier les lipases bactériennes

<u>Première étape</u>	<u>Micro-organismes</u>	<u>Chercheurs</u>
Précipitation par (NH ₄) ₂ SO ₄ ou par l'acétone	<u>Pseudomonas fragi</u> <u>Pseudomonas mephitica</u> <u>Achromobacter lipolyticum</u> <u>Leptospira biflexa</u>	Nashif et al. (31) Kosugi et al. (32) Khan et al. (33) Chorvath et al. (34)
<u>Deuxième étape</u>		
Passage sur colonne sephadex D.E.A.E. cellulose ou autres.	<u>Pseudomonas fragi</u> <u>Pseudomonas fragi</u> <u>Micrococcus freudenreichii</u> <u>Corynebacterium acnes</u> <u>Pseudomonas aeruginosa</u> <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Mencher et al. (35) Lawrence et al. (20) Lawrence et al. (20) Hassing (37) Nadkarni (36) Finkelstein (38)
<u>Troisième étape</u>		
Passage sur 2 ^{ème} colonne, sephadex ou D.E.A.E. cellulose, ou autres.	<u>Pseudomonas fragi</u> <u>Propionibacterium</u> <u>shermanii</u>	Lu et al. (40) Oterholm (39)
ou		
Ultracentrifugation sur un gradient de densité.	<u>Anaerovibrio lipolytica</u>	Henderson (42) (43)

ment d'une lipase existant sous deux formes, l'une des formes serait la lipase, l'autre serait la lipase sous sa forme dimère ou encore la lipase liée à d'autres molécules de protéines, ou de lipides ou de carbohydrates. Deux ans plus tard, Lu (40) qui étudie le même organisme n'identifie qu'une lipase et sous une seule forme. Dans un cas comme dans l'autre, il est regrettable que les chercheurs se soient contentés d'une simple électrophorèse comme seul critère de pureté.

Par contre, les données concernant les propriétés de ces lipases sont beaucoup plus consistantes. Dans tous les cas, le pH optimum de l'activité de l'enzyme se présente sous la forme d'un seul pic situé dans une zone légèrement (39) ou franchement (38) alcaline, soit 7.2 et 8.9 respectivement. La température optimum de l'activité de l'enzyme est comprise entre 35°C et 40°C, exceptions faites pour Anaerovibrio lipolyticum: 22°C (42) et Propionibacterium shermanii: 47°C (39). La thermostabilité est très variable, de plus elle est fonction de l'état de pureté de l'enzyme, elle diminue lorsque le degré de pureté augmente; c'est ainsi que la lipase de Pseudomonas fragi partiellement purifiée (31) est inactivée après un stage de 20 minutes à 99°C, alors que l'inactivation survient après 10 minutes à 45°C lorsque l'enzyme est dans un état de pureté supérieur (35). Il est très difficile de tirer des conclusions sur les effets inhibiteurs ou stimulateurs de certains ions ou composés; ceci est dû en partie au fait que chaque chercheur établit sa propre liste d'ions ou de composés,

il en est de même en ce qui concerne l'utilisation de différents substrats par l'enzyme.

En dehors des lipases bactériennes, quelques lipases fongiques ont été l'objet d'une étude approfondie, c'est le cas de celles d'un Mucor (44) mais surtout de celles de Rhizopus arrhizus (45) (46).

De nombreux travaux devront être réalisés avant de pouvoir déterminer si les lipases bactériennes diffèrent ou si elles possèdent des caractéristiques communes avec les lipases animales et végétales.

IV La psychrophilie

Il va de soi que je ne pouvais terminer cet exposé sans consacrer quelques lignes au "problème du froid", résumé par le terme psychrophile, qui étymologiquement provient des mots grecques psychros (froid) et philos (qui aime). Les manuels de microbiologie (47) (48) définissent comme psychrophiles les organismes ayant une température optimale de croissance inférieure à 20°C. Rares sont les chercheurs qui ont adopté cette caractéristique comme ligne de pensée, le plus souvent ils préfèrent celle de Rose et Evison (49), pour qui l'important est la température minimale à laquelle peuvent se développer les microorganismes, ou encore celle de Stokes (50) qui définit comme psychrophiles les germes capables de croître à 0°C. Ces deux définitions sont très proches de celle des psychrotrophes de Keogh (51), qui désigne sous ce terme les microorganismes capables de pousser à des tempéra-

tures inférieures à 5°C , quelle que soit leur température optimale de croissance. Quant à Baxter et Gibbons en 1962 (52), ils ont subdivisé ce groupe en deux, et différencient les psychrophiles obligatoires qui se développent bien aux températures inférieures à 20°C , des psychrophiles facultatifs dont la croissance est plus rapide aux températures supérieures à 20°C . La même année, Rose (53) propose de prendre en considération la température maximale de croissance, soit; 25°C pour les psychrophiles obligatoires, et 30°C pour les psychrophiles facultatifs. Bien que, les psychrophiles puissent se définir d'après leurs températures optimales de croissance, cette catégorie de germes se caractérise, en fait, par les températures extrêmes entre lesquelles ses membres se développent. Ainsi les psychrophiles peuvent en règle générale être cultivées à des températures beaucoup plus basses que les mésophiles.

Les psychrophiles prolifèrent sélectivement dans des biotopes naturels dont la température leur est favorable, comme les sédiments océaniques dont la température est voisine de 0°C , et les aliments réfrigérés (51) (54) où leur prolifération détermine de sérieuses altérations. Néanmoins on les trouve également dans d'autres milieux naturels: sols (13) (55), eaux (12) (55), sédiments (13) (55), air, plantes; même là où les conditions écologiques permanentes ou temporaires leur sont défavorables.

La grande majorité de ces bactéries sont gram-négatives (55) (13) (12), asporulées et appartenant aux genres Pseudo-

monas, Achromobacter, Flavobacterium et Acinetobacter.

La psychrophilie ne peut s'expliquer que par l'effet de la température sur la cellule, à des niveaux structurels et fonctionnels. Ainsi, le maintien de la perméabilité aux basses températures chez les psychrophiles et non chez les mésophiles, semble être un facteur de première importance selon Baxter et Gibbons (52); ces auteurs comparent l'absorption de la glucosamine par deux souches de Candida, dont l'une est psychrophile obligatoire alors que l'autre est mésophile; l'absorption est plus faible chez la levure mésophile pour les températures comprises entre 0°C et 20°C qu'aux températures supérieures à 20°C, elle demeure inchangée chez la psychrophile. Les températures élevées, par contre, semblent affectées l'intégrité des parois cellulaires des psychrophiles. Ainsi, Hagen, Kushner et Gibbons (56) en 1964 ont montré, que les cellules d'une bactérie marine (qui peut se développer entre 0 et 19°C) se lysent rapidement lorsqu'elles sont placées à 21°C.

Il semble admis que les enzymes ou les systèmes permettant leur élaboration seraient moins affectés par l'effet des basses températures, chez les psychrophiles que chez les mésophiles; par contre ils seraient beaucoup plus sensibles à l'inactivation par des températures élevées. Sinclair et Stokes en 1965 (57) montrent, que lorsque la température est abaissée de 25°C à 10°C, le taux de fermentation chez une levure psychrophile du genre Candida décroît de 37%, alors qu'il décroît de 71% chez une mésophile du même genre. Par

contre, en 1963 Morita et Burton (58) montrent que la déshydrogénase malique de Vibrio marinus, psychrophile obligatoire dont la température optimum de croissance est de 24°C et la température maximum de 30°C, est très rapidement inhibée à 30°C. D'autres auteurs comme Hagen et Rose en 1962 (59), Purohit et Stockes en 1967 (60), ont également décrit la thermolabilité de certaines enzymes chez les psychrophiles. Cependant, certaines bactéries psychrophiles facultatives, isolées de produits laitiers, possèdent des enzymes thermostables voire même thermorésistantes; c'est le cas de la lipase de Pseudomonas fragi, qui est inactivée après un passage de 20 minutes à 99°C (31). Au contraire, la production de cette enzyme est favorisée par des températures comprises entre 15 et 20°C, cette production décroît aux températures plus élevées, alors que la croissance n'est pas affectée. C'est également ce que j'ai constaté au cours de mon étude sur Acinetobacter 0₁₆ (chap. V).

En définitive, il semble que la sensibilité des enzymes à la chaleur, soit un, sinon le principal facteur qui limite la croissance à des températures maximum plus élevées. Mais il serait faux de conclure, que toutes les enzymes des psychrophiles fonctionnent mieux aux basses températures, et qu'elles sont toutes également affectées par des températures élevées.

V / Thème de recherche

→ Au cours d'un travail préliminaire sur les bactéries lipolytiques psychrophiles des sols, des sédiments, et des

eaux (13) (et résultats non publiés), en liaison avec le problème de l'épuration des eaux en périodes froides, il est apparu que parmi les germes lipolytiques, les gram-négatifs prédominent, en particulier les Pseudomonas et les bactéries non pigmentées, parmi ces dernières les Acinetobacter semblent prendre de plus en plus d'importance (résultats non publiés) (12). Pour mieux comprendre la biodégradation de la matière organique (surtout des graisses) dans les sédiments ou dans l'eau, il semble opportun d'étudier en premier lieu l'activité de ces germes en cultures pures. Ne pouvant étudier tous les genres bactériens présents, et un grand nombre d'études ayant été faites sur les Pseudomonas, notre choix s'est porté sur le genre Acinetobacter qui semble prendre une place d'importance croissante. Bactéries considérées naguère, comme saprophytes ou commensales, parfois peu connues, certaines d'entre elles sont aujourd'hui promues au rang de bactéries pathogènes (61).

Après une brève description de l'organisme choisi, l'étude portera essentiellement sur:

- L'identification et la localisation des systèmes enzymatiques présents capables de dégrader les graisses.
- Les conditions d'activité (besoins nutritionnels, tolérance thermique, pH ...)
- L'isolement et la purification partielle de la lipase.
- L'étude de quelques propriétés de la lipase.

Chapitre II

Méthodes d'analyses

I Numération du nombre de microorganismes lipolytiques viables

Obtenue sur un milieu à l'extrait de terre peptoné à 5 g/l, gélosé à 1.2% et additionné de tweens, procédé décrit par Breuil et Gounot (13), ou sur une gélose au "spirit blue", milieu de Starr (62), actuellement commercialisé par la compagnie Difco sous la forme de "Spirit blue agar" (milieu de base) et de "Bacto-lipase reagent" (substrat lipidique à base d'huile de graine de coton).

II Tests biochimiques d'identification

Lorsque cela est possible, les milieux et les tests classiques sont utilisés; ils sont décrits dans de nombreux manuels: Skerman (63), Buttiaux et coll (64).

- > Réaction de gram
- Hydrolyse de l'amidon, de la caséine
- Liquéfaction de la gélatine
- Présence de la catalase et de l'uréase
- Production de l'indole, d'hydrogène sulfureux
- Recherche de la cytochrome oxydase: réaction de Gaby and Hardley (65)
- Mise en évidence de l'arginine dihydrolase par la méthode de Thornley 1960 (66)
- Fermentation ou production d'acide à partir de divers sucres d'après la méthode de Hugh and Leifson (67)

- Utilisation du citrate, vérifiée sur le milieu gélosé ou citrate de Simmons (Produit Difco)
- Hémolyse du sang : recherchée sur une gélose nutritive additionnée de 5% de sang de cheval défibriné et stérile. Milieu préparé par la compagnie Qualicum d'Ottawa (Canada)
- Bouillon au gluconate de potassium décrit par Collins (68). Son oxydation est testée par le réactif de Bénédicté
- Dégradation des graisses sur des milieux au "Spirit Blue" (62) ou aux tweens (13)
- Réaction vis à vis des antibiotiques

III Dosage de l'activité lipolytique

1) Titration directe des acides gras libérés (69)

Pour mesurer l'activité lipasique d'une préparation, on utilise le test quantitatif de titration des acides gras, libérés par l'enzyme au sein d'une émulsion de triglycérides. L'émulsion est obtenue en agitant dans un mixer la solution suivante:

- 5 ml de tributyrine, 5 g. de gomme d'arabique, 35 g. de glace pilée.

Le volume final est complété à 50 ml par l'addition d'eau distillée. 10 ml d'émulsion sont versés dans un bēcher placé dans un thermostat à 37°C. La solution est agitée doucement par un petit agitateur magnétique, ainsi que par l'arrivée d'un lent courant d'azote à sa surface. L'électrode d'un pH

mètre à lecture directe est plongée dans l'émulsion. Le pH est amené à 8,2 par l'addition de soude 0.1 N. Lorsque l'aiguille du pH mètre passe sur la graduation 8.0, un chronomètre est déclenché, on ajoute alors au moyen d'une micropipette suffisamment de soude (N/10) pour maintenir le pH à cette valeur. La quantité de soude ajoutée est notée en fonction du temps, ce qui permet de tracer la courbe d'équivalents d'acides libérés par la lipase en fonction du temps.

L'unité lipase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 10 μ équivalents d'acides pendant 1 minute dans les conditions opératoires décrites ci-dessus (69).

2) Dosage des acides gras libérés par colorimétrie:

méthode de Lippi (70) qui reprend avec quelques modifications la méthode originelle de Ducombe (71) 1 ml de substrat (huile d'olive purifiée) est ajouté à 28 ml d'une solution contenant, 0.242 g % de Tris (hydroxyméthyl aminométhane) 0.5 mg de sodium oléate, et 3 ml d'une solution NaCl (0.2 M) et $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (0.025 M). Cette préparation est portée sous une source d'ultra-sons pendant environ 2 minutes (Sonificator Bronson). Un ml d'ultrasonnat de pH 8.5 et 0.5 ml d'une solution enzymatique sont placés dans un tube à vis, incubé à la température désirée pendant 30 minutes. La réaction est interrompue par l'addition de 2 ml d'une solution de nitrate de cuivre (0.27 M de nitrate de cuivre dans 0.45 M de tampon triethanolamine pH 7.8). Après l'introduction de 10 ml de chloroforme, le tube est agité violemment pendant 2 minutes, afin d'extraire les acides gras libérés par l'enzyme. Le

contenu du tube est centrifugé et la couche superficielle aqueuse est enlevée au moyen d'une pompe à vide; 0.2 ml de la phase inférieure restante sont transférés dans un tube à essai contenant 3 ml de chloroforme et 0.3 ml de diethyldithiocarbamate (9 mM dans du butanol). Après une dizaine de minutes la lecture est faite à 440 nm avec un spectrophotomètre Beckman.

Le blanc, constitué de 1 ml de substrat et d'une quantité de tampon équivalente à la solution enzymatique de départ est traité simultanément. Enfin une courbe étalon d'acide stéarique (6 mequiv/ml) dans l'heptane est préparée suivant le même procédé.

L'unité lipase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère un équivalent d'acide gras/minute dans les conditions décrites ci-dessus.

3) Hydrolyse des esters du β naphthol

Méthode mise au point en 1949 par Nachias et Seligman (72) pour doser les activités lipasique et estérasique du sérum sanguin, puis adoptée par Hobson et Summers en 1966 (73) par Henderson (74) en 1969 pour mesurer ces mêmes activités chez les microorganismes. Les substrats (250 mg/100 cc d'acétone), naphtyl laurate pour l'activité lipasique, naphtyl acétate ou butyrate pour l'activité estérasique sont dispersés à raison de 5 ml respectivement dans 45 ml de tampon véronal pH 7.4. Deux ml et demi de cette préparation sont incubés à 37°C pendant 30 minutes en présence de l'échantillon enzymatique à étudier. Le β naphthol libéré par l'action de l'enzyme,

est transformé en un pigment pourpre, par l'addition de 0.5 ml d'une solution fraîche d'orthodianisidine tétrazotée plus communément appelée "fast blue". Les protéines de l'échantillon sont alors précipitées par 0.5 ml d'acide trichloroacétique à 40%, le pigment est extrait avec 5 ml d'éthyle acétate. Après centrifugation du tout, la densité optique de la phase supérieure est alors déterminée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre type Coleman Junior II.

Une gamme étalon est préparée avec différentes concentrations de β -naphтол dans les mêmes conditions expérimentales. L'activité est exprimée en μ moles de β naphтол rejeté par heure à 37°C.

IV Détermination de la teneur en protéines

Elle est effectuée par la technique de Lowry Rosebrough, Farr et Randall (74). La protéine de référence est l'albumine du sérum de bovin (produit Sigma). Les densités optiques sont mesurées à 550 nm avec un spectrophotomètre type Coleman Junior II.

V Préparation des colonnes pour la chromatographie sur sephadex

Les colonnes en verre sont soigneusement lavées à l'eau distillée. Le gel en poudre est placé dans le même type de tampon, que celui qui sera utilisé pour l'élution de la colonne, et ce pour une période de 4 à 5 jours à la température de la pièce pour les gels G₁₀₀ et G₂₀₀. Le gel tamponné est soigneusement dégazé avec une pompe à vide, puis versé

dans la colonne jusqu'au sommet, en une seule opération afin d'éviter toute discontinuité dans la répartition du gel. L'extrémité de la colonne est alors ouverte, pour permettre au tampon de s'écouler et au gel de sédimenter. Le tampon est ajouté graduellement pour éviter tout assèchement du gel et la stabilisation de la colonne, qui est obtenue en une douzaine d'heures.

La qualité de la colonne peut être vérifiée, par l'application à son sommet d'un colorant, le bleu dextrane à raison de 2 mg/ml.

Pour éviter toute croissance bactérienne, 0.02% d'azide de sodium sont ajoutés au gel au moment de sa préparation, de plus les colonnes sont faites et conservées à 4°C.

VI Electrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide:

(disc electrophoresis)

Pour une électrophorèse simple la technique de Davis (76) a été employée. Les essais ont été réalisés sur des gels de polyacrylamide à 7 et 5%, l'enzyme est déposée directement sur le sommet du gel. Les tampons employés sont ceux décrits par Lund en 1965 (77). Les électrophorèses sont faites à ampérage constant 3 mA par tube pendant 60 à 90 minutes.

Les protéines sont révélées par le noir amide qui est suivi d'un rinçage par l'acide acétique à 7%. La lipase est caractérisée par les esters de β naphthyl suivant la méthode de El Sharkawy (78).

L'électrophorèse avec un gel contenant du S.D.S. (sodium dodecyl sulfate) est conduite suivant la technique de Weber et Osborn (79).

VII Extraction et chromatographie sur couche mince dés lipides

Les lipides sont extraits par le méthanol et le chloroforme suivant le procédé de Bligh et Dyer 1959 (80). Ils sont ensuite séparés sur couche mince avec du silica gel comme absorbant et deux phases différentes de solvants (81).

Les phospholipides sont révélés par le colorant de Ditmer et Lester 1964 (82).

VIII Notes additionnelles sur les méthodes d'analyses

1. Les expériences décrites dans cette thèse ont été répétées au minimum deux fois.

2. En ce qui concerne l'extrait brut (surnageant), l'activité n'est pas exprimée en mg de protéines, mais en ml de surnageant ou en ml de cellules correspondant à 1 ml de culture bactérienne.

3. L'huile d'olive est composée essentiellement: d'acide oléique (65 à 86%), d'acide linoléique (5 à 15%), d'acide palmitique (7 à 20%).

Chapitre III

Etude d'Acinetobacter 0₁₆

I. Provenance et isolement

Cet organisme a été isolé à partir d'un échantillon de sédiment d'eau douce, prélevé en période froide (température de l'eau 6°C), à la confluence de la rivière Ottawa et du ruisseau de la brasserie (fig no. 1, station no. 7) à une profondeur d'environ 2.5 mètres. Seule la couche superficielle des sédiments a été collectée; cette couche est riche en débris organiques, notamment en débris végétaux partiellement décomposés. Le pH de ces sédiments est voisin de la neutralité (6,9).

Dix grammes d'échantillon sont utilisés pour une numération à 4°C des germes lipolytiques. Des suspensions diluées de sédiments (13) sont inoculées sur différents milieux, dont le "spirit blue" préalablement décrit. Les colonies manifestant une activité lipolytique qui se traduit sur ce milieu par un halo clair (photo no. 1), sont transférées sur le milieu semi-solide de conservation (83):

Les souches isolées sont observées et identifiées, leur activité lipolytique est également vérifiée sur différents milieux lipidiques. Parmi ces souches nous en avons sélectionné une : 0₁₆.

II. Morphologie et identification

La bactérie est examinée au microscope à contraste de phase (photo no. 2) au cours des différentes phases de la

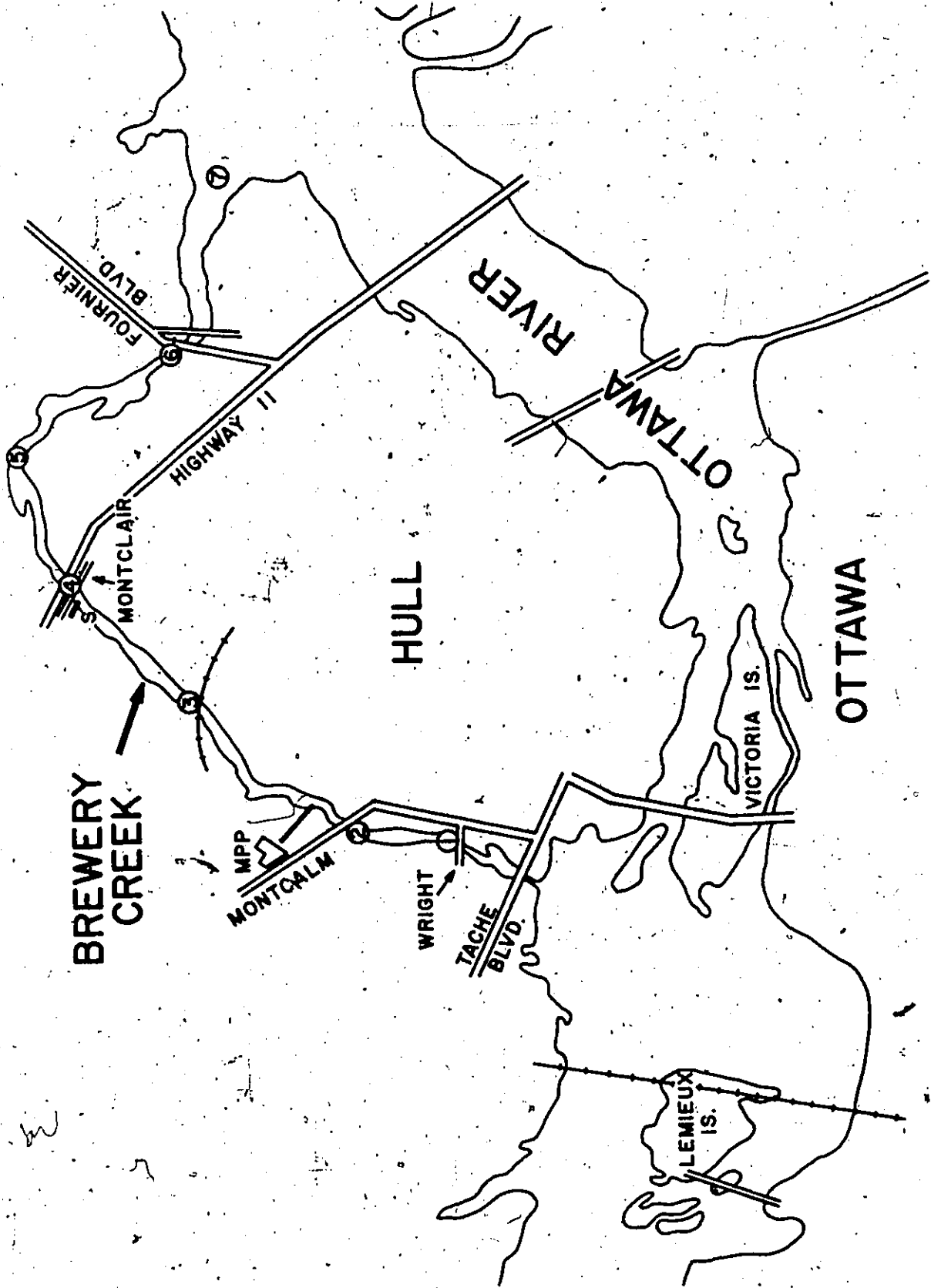


Fig. no. 0 - Plan de la zone de prélèvement de l'échantillon: 7

UNIVERSITY OF GUELPH

Photo no. 1 - Colonies montrant une zone de lyse sur
le milieu au "spirit blue".

Photo no. 2 - Acinetobacter 0₁₆ - après 60 heures d'incubation à 20°C dans un milieu liquide (peptone 2%, extrait de levure .15%). Montage vital, X1500

Photo no. 3 - Photographie au microscope électronique de cellules intactes d'Acinetobacter 0₁₆. Coloration négative au phosphotungstate.

Photo no. 2 - Acinetobacter 0₁₆ - après 60 heures d'incubation à 20°C dans un milieu liquide (peptone 2%, extrait de levure .15%). Montage vital, X1500

Photo no. 3 - Photographie au microscope électronique de cellules intactes d'Acinetobacter 0₁₆. Coloration négative ou phosphotungstate.

croissance dans un milieu liquide contenant 2% de peptone et 0.15% d'extrait de levure à pH 6.6. Elle est immobile; pendant la phase exponentielle les cellules isolées, par paires, ou en courtes chaînes, sont sous la forme de bâtonnets de 0.9 à 1.4 μ de diamètre et de 1.5 à 2.5 μ de long. Avec le ralentissement de la croissance et le début de la phase stationnaire, la plupart des bâtonnets deviennent coccoides de 0.6 à 1.5 μ de diamètre isolés ou par paires. On observe encore quelques diplobacilles très courts (photo no. 3).

Cette bactérie est caractérisée par un certain pléomorphisme.

La clé de détermination de Cowan et Steel de 1965 (85) a permis l'identification du genre Acinetobacter. Les caractéristiques de bases utilisées dans cette clé sont les mêmes que celles citées par Baumann (84) et Thorneley (86) dans leur essai de classification des différentes espèces de ce genre. Le tableau no. 3 résume les caractéristiques biochimiques de cette bactérie gram-négative. Elle ne fermente ni n'oxyde les sucres ou le gluconate, deux des critères qui permettent de la séparer du genre Pseudomonas. Sa résistance à la pénicilline et son absence de cytochrome-oxydase permettent de la différencier sans équivoque du genre voisin des Moraxella (87). Le tableau no. 3 montre la croissance d'Acinetobacter 0₁₆ sur quelques milieux classiquement utilisés en microbiologie. Parmi ces données, le fait saillant est la coloration bleue des colonies sur la gélose au bleu de méthylène et à l'éosine. Il semble que les Acinetobacter ont la possibilité d'incorporer ces deux colorants dans leur cellule. Ces

Tableau no. 3

Tests biochimiques et physiologiques effectués sur Acinetobacter 016

I Tests à caractères positifs

- recherche de:

Catalase

lipase sur Spirit Blue

" Tween 20

" 40

" 60

" 80

" Tributyrine

- Hémolyse du sang de cheval

- Utilisation du citrate

II Tests à caractères négatifs

- Fermentation ou oxydation de:

Glucose

Fructose

Galactose

Sucrose

Arabinose

Xylose

Lactose

Mannitol

Glycerol

- Hydrolyse de l'amidon

- Hydrolyse de la caséine

- Liquéfaction de la gélatine

- Production de H₂S sur "Triple sugar iron agar Difco"

- Coagulation avec le serum anti-Brucella

- Cytochrome oxydase

- Uréase

- Arginine dihydrolase

- Oxydation du gluconate

- Production d'indole

- "Litmus milk"

- Réaction aux antibiotiques:

Terramycine 10 mcg Sensible

Pénicilline 2 i.u Résistant

Tableau no. 3

Croissance d'Acinetobacter 0₁₆ sur quelques milieux
d'emploi courant en microbiologie

<u>Milieux</u>	<u>Croissance</u>	<u>Particularités</u>
Eau peptonée	+	
Gélose nutritive (Difco)	+	
Gélose à la fuchsine (Bacto-Endo agar Difco)	+	colonie rose
Gélose au bleu de méthylène et éosine (Lévine E.M.B. agar Difco)	+	colonie bleue
Gélose de MacConkey au rouge neutre et crystal violet Difco	+	
Milieu au cyanure de potassium (Moller 1955)	+	
Milieu gélosé S.S. (Difco)	+	
Milieu au gluconate de potassium	+	
Gélose nutritive à 7% de chlorure de sodium	-	
Milieu gélosé avec azide de sodium	-	

faits ont été rapportés par Taplin et al en 1963 (88) puis par Hugh et Reese en 1967 (89) enfin par Eller en 1969 (90).

III Problème taxonomique

Dans le passé, les espèces considérées à l'heure actuelle comme appartenant au genre Acinetobacter, étaient incluses dans le genre Achromobacter défini par Bergey en 1923 (91). La première révision des espèces réunies dans ce genre a été réalisée par Brisou et Prévot en 1954 (92), qui ont créé un genre nouveau pour tous les Achromobacter immobiles; celui d'Acinetobacter, défini d'après les auteurs comme: "Pseudo-monaceae incolores, immobiles, parfois capsulées. Les formes très courtes, coccoides sont fréquentes. Cultures faciles sur tous les milieux usuels. Certaines espèces sont souvent rencontrées en clinique humaine dans les pus d'uthérites, de sinusites, les urines. Autres caractères identiques aux Achromobacter".

Si la réalité de ce nouveau genre est maintenant chose admise, par suite de son inclusion dans la 8e édition de Bergey qui va paraître, il n'en est pas de même de la classification au niveau des espèces qui est très confuse. Ainsi Baumann et al en 1968 (84) étudient 106 Acinetobacter qu'ils divisent en 7 sous-groupes d'après leurs caractéristiques nutritionnelles et physiologiques. Dans une autre étude Thorneley en 1967 (86) classe 173 bactéries appartenant à ce genre et genres voisins, en 5 groupes (phenons) dont 3 seulement sont vraiment représentatifs des Acinetobacter. De même

Gilardi en 1969 (93) établit 3 groupes majeurs dans ce genre, basés sur des caractères biochimiques et physiologiques. Les critères choisis par ces auteurs ne sont pas identiques, ce qui crée un bon nombre de difficultés. L'absence de critères définis et reconnus par tous rend inutile un essai de classification de notre souche d'Acinetobacter au niveau de l'espèce, elle sera nommée "Acinetobacter 0₁₆"; 0₁₆ étant le numéro qui lui avait été attribué au moment de son isolement.

IV Exigences et particularités nutritionnelles

d'Acinetobacter 0₁₆

Les germes les plus intéressants sont ceux qui synthétisent des substances organiques complexes telles qu'acides aminés et vitamines à partir de substrats très simples. Pour déterminer les besoins nutritionnels, la méthode consiste à observer le développement des bactéries dans des milieux de complexité croissante, depuis le milieu minéral avec une seule source de carbone, jusqu'aux milieux contenant en outre des acides aminés et divers facteurs de croissance. Les bactéries sont alors réparties en groupes nutritionnels: méthode de Lochhead et Chase 1943 (94) redécrite par Gounot en 1967 (93).

Acinetobacter 0₁₆ peut croître sur un milieu minéral (milieu de base de Lochhead) avec du nitrate de potassium ou du sulfate d'ammonium comme source d'azote, et une source carbonée tel que l'acétate ou le pyruvate. Cette bactérie peut donc être classée dans le groupe des germes à faibles besoins nutritifs; puisque le milieu ne renferme ni acides

Tableau no. 4

Utilisation de divers composés comme seule source de carbone
et d'énergie par Acinetobacter 0₁₆

Hydrates de carbone	Acides aminés	Acides aliphatique non azoté	Divers
------------------------	---------------	------------------------------------	--------

A) Composés non utilisés

D Ribose	Glycine		
D Glucose	L Thréonine		
D Xylose	DL Isoleucine	DL Lactate	Glycérol
L Arabinose	DL Valine		Phénol
	L Lysine		
	L Cystéine		
	DL Méthionine		
	B Alanine		
	L Leucine		
	DL Phenylalanine		
	L Tryptophane		
	DL Norleucine		

B) Composés utilisés

DL Sérine	
DL Alanine	
L Ac. aspartique	Acétate
L Asparagine	Pyruvate
L Ac. glutamique	
L Glutamine	
L Histidine	
L Proline	
L Arginine	
Tyrosine	

aminés, ni vitamines, la bactérie est donc capable de les synthétiser à partir de la source azoté et de carbone. Cette absence d'exigence nutritionnelle particulière semble être une caractéristique d'un grand nombre de germes du genre Acinetobacter, selon Warskow en 1972 (95) et Baumann en 1968 (84).

Le tableau no. 4 montre l'utilisation de composés autre que l'acétate et le pyruvate, comme seule source de carbone et d'énergie.

Cette bactérie ne pousse pas à 37°C, mais elle peut croître à partir de 0°C (en 2 ou 3 semaines sur un milieu solide) jusqu'au delà de 30°C (courbe chapitre V), et peut être considérée pour cela comme psychrophile facultative. Le dernier trait saillant de ce microorganisme est son fort pouvoir de dégradation des graisses (tableau no. 3). Les systèmes responsables de cette activité seront étudiés dans les prochains chapitres.

En définitive Acinetobacter 0₁₆ est une bactérie gram-négative, psychrophile facultative, lipolytique, et à faibles besoins nutritifs.

Chapitre IV

Mise en évidence et localisation des activités lipasique et estérasique

I. Introduction

La recherche des activités lipasique et estérasique est passée dans la pratique courante. La méthodologie est riche, cependant très souvent la valeur des tests utilisés a été discutée dans le passé. Ces désaccords tenaient essentiellement au manque de précision de certaines définitions. Depuis les dispositions en 1965 de la Commission des Enzymes, les lipases sont considérées comme des enzymes spécialisées avant tout dans l'attaque des triglycérides en émulsions.

Actuellement, la plupart des méthodes décrites pour mesurer l'activité lipasique, sont basées sur la disparition des triglycérides ou sur la production des acides gras. Dans le premier cas, la méthode est surtout qualitative; une émulsion de triglycérides à 1% (très souvent de la tributyrine), est incorporée à une solution gélosée. La clarification de l'émulsion permet d'évaluer le taux d'hydrolyse des triglycérides. Lawrence et al en 1966 (96) en ont fait une méthode semi-quantitative; ils ont montré qu'il existait une relation entre la largeur des zones de clarification et la quantité d'enzyme appliquée. Dans le deuxième cas, c'est la production des acides gras qui est mesurée, soit par une titration continue avec NaOH à l'aide d'un pH mètre (69), soit par photométrie (70). La titration directe présente deux avantages

certains; il n'est pas nécessaire d'extraire les acides gras, et la période d'incubation est courte. L'inconvénient de cette méthode est, qu'elle n'est pas très sensible; ainsi avec Acinetobacter 0₁₆, il est impossible de mesurer directement l'activité dans le surnageant de la culture, il est nécessaire de concentrer la solution enzymatique au préalable; c'est pourquoi j'ai très peu utilisé cette méthode. La méthode photométrique est très récente et encore peu utilisée, sa grande sensibilité et sa fidélité permettent de suivre la production de l'enzyme au cours des différentes phases de croissance de la bactérie. Cette méthode est un peu plus laborieuse que la précédente, mais elle permet également l'emploi de substrats naturels (l'huile d'olive purifiée) ou des substrats chimiquement purs (tributyryne).

Enfin, la lipase possède en dehors de son action sur les triglycérides en émulsion, des activités additionnelles vis à vis d'un certain nombre de substrats synthétiques; les esters du β naphthol, en particulier les naphthyl laurate et oléate, en sont des exemples. La détermination de l'activité se fait dans ce cas par colorimétrie (72).

L'activité générale des estérases se résume à l'hydrolyse des esters d'alcools, de phénols et d'acides gras. Les substrats permettant la détection de ces enzymes sont multiples; les uns sont incolores, d'autres libèrent des radicaux colorés au cours de l'hydrolyse, dans un troisième groupe on peut situer ceux qui libèrent un produit terminal aisé à révéler par des réactions colorées. Il est donc possible de

se rendre compte de l'attaque enzymatique en suivant par colorimétrie la disparition du substrat, ou mieux encore l'apparition d'un des produits libéré par hydrolyse. Notre choix, c'est porté sur le troisième type de substrats, notamment sur les esters du β naphтол à courtes chaînes: Naphtyl acétate et naphtyl butyrate.

Donc la même méthode colorimétrique (Chapitre II) peut être utilisée pour doser les activités estérasique et lipasique, la seule variante étant le choix du substrat.

C'est au cours de leur développement sur des milieux complexes ou plus classiques, que les bactéries élaborent certaines de leurs enzymes. Les milieux liquides à base de peptone et d'extrait de levure ou d'extrait de boeuf se sont révélés l'un des meilleurs supports pour la production des enzymes lipolytiques (97). Après le développement de la culture, on utilise soit le surnageant, soit les bactéries non proliférantes fraîchement récoltées, ou encore des extraits acellulaires, suivant la localisation des enzymes.

Théoriquement, il est possible de diviser les enzymes bactériennes en deux groupes distincts; celui des exoenzymes où l'enzyme est libre car rejetée à l'extérieur de la cellule, celui des endoenzymes où l'enzyme est fixée à la structure cellulaire. Ce dernier groupe est lui-même subdivisé en deux, d'une part on considère les enzymes qui sont à l'intérieur de la cellule ce sont les endoenzymes vraies, d'autre part celles qui sont simplement liées à la surface cellulaire. Même si la classification apparaît relativement simple, il est néces-

saire d'apporter quelques précisions sur les exoenzymes; généralement, la définition en 3 points de Pollock (98) est adoptée:

- 1- L'enzyme ne doit pas être présente dans l'eau de lavage des cellules, ou dans les cellules broyées.
- 2- Le pourcentage de cellules lysées doit être négligeable au moment des essais.
- 3- L'enzyme dosée doit être trouvée dans le milieu, alors qu'une enzyme typiquement intracellulaire (ex: glucose 6 phosphate deshydrogénase) est encore totalement liée aux cellules.

Vu la grosseur des molécules lipidiques, il apparaît à priori que la majorité des lipases doivent être des exoenzymes. Effectivement, un bon nombre d'entre elles sont rejetées dans le milieu extérieur, c'est le cas de Pseudomonas fragi (35), Pseudomonas aeruginosa (38), Anaerovibrio lipolyticum (42). Par contre Achromobacter lipolyticum (99) semble être muni de deux enzymes, l'une exocellulaire, l'autre liée à la surface cellulaire, le pH optimum d'activité est différent chez ces deux enzymes. Il existe très peu d'exemples de lipases bactériennes intracellulaires, signalons le cas de Propionibacterium shermanii (39).

Contrairement aux lipases, les estérases semblent être associées préférentiellement aux cellules, c'est le cas de Bacillus subtilis (100), de Mycobacterium phèi (101) et de Pseudomonas aeruginosa (18).

II. Résultats

1) Croissance d'Acinetobacter 016

La bactérie est maintenue sur le milieu semi-solide de conservation (83), à 4°C. Le repiquage est effectué tous les mois. Cette culture est transférée, en cas d'utilisation, sur un milieu liquide contenant 2% de peptone et 0.15% d'extrait de levure à pH 7, pour une subculture de 48 heures à 20°C. Un ml de cette subculture est transféré dans 100 ml du même milieu réparti dans un erlenmeyer de 500 ml. La culture est alors incubée à 20°C sans agitation, au cours de la croissance le milieu qui était neutre devient légèrement alcalin: pH 7.7.

2) Mise en évidence des deux types d'enzymes

L'activité est testée dans tous les cas au cours des différentes phases de la croissance. Cette croissance est déterminée indirectement par l'évaluation de la densité optique des suspensions microbiennes (fig. I).

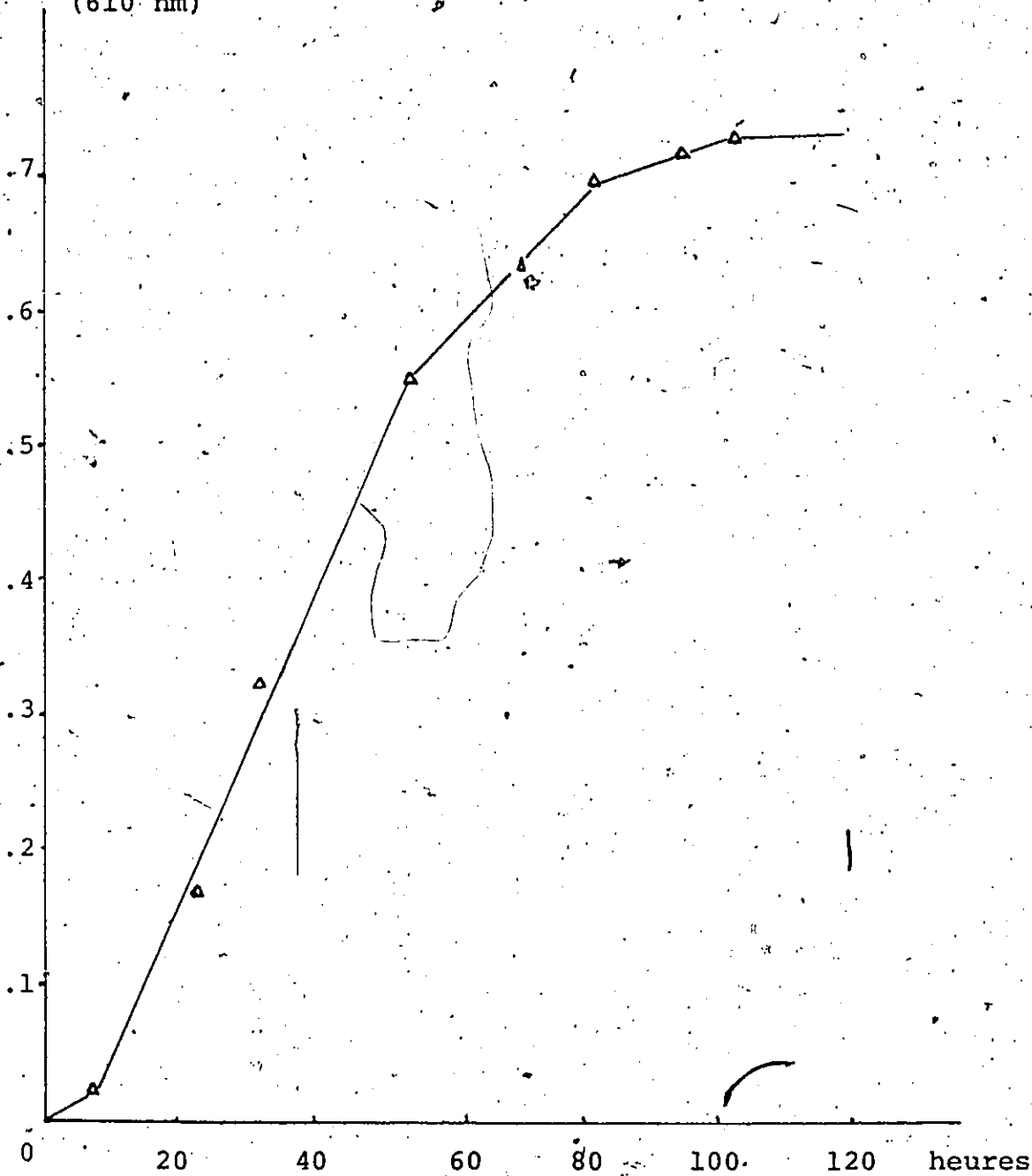
A chaque densité optique choisie, 10 ml de culture sont prélevés et centrifugés à 20,000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est récupéré, et le culot de cellules est dispersé dans 5 ml d'une solution de chlorure de sodium à 0.9% afin de laver les cellules. Cette suspension est centrifugée comme précédemment; la solution de lavage est prélevée et conservée, le culot cellulaire est redispersé dans le tampon désiré.

L'activité est recherchée simultanément dans le surnageant de la culture, dans l'eau de lavage, et dans les cellules

Fig. no. 1 - Courbe de croissance d'Acinetobacter 0₁₆

(milieu: peptone 2%, extrait de levure 0,15%;
pH : 7, température de croissance 20°C;
sans agitation).

Densité
bactérienne
(610 nm)

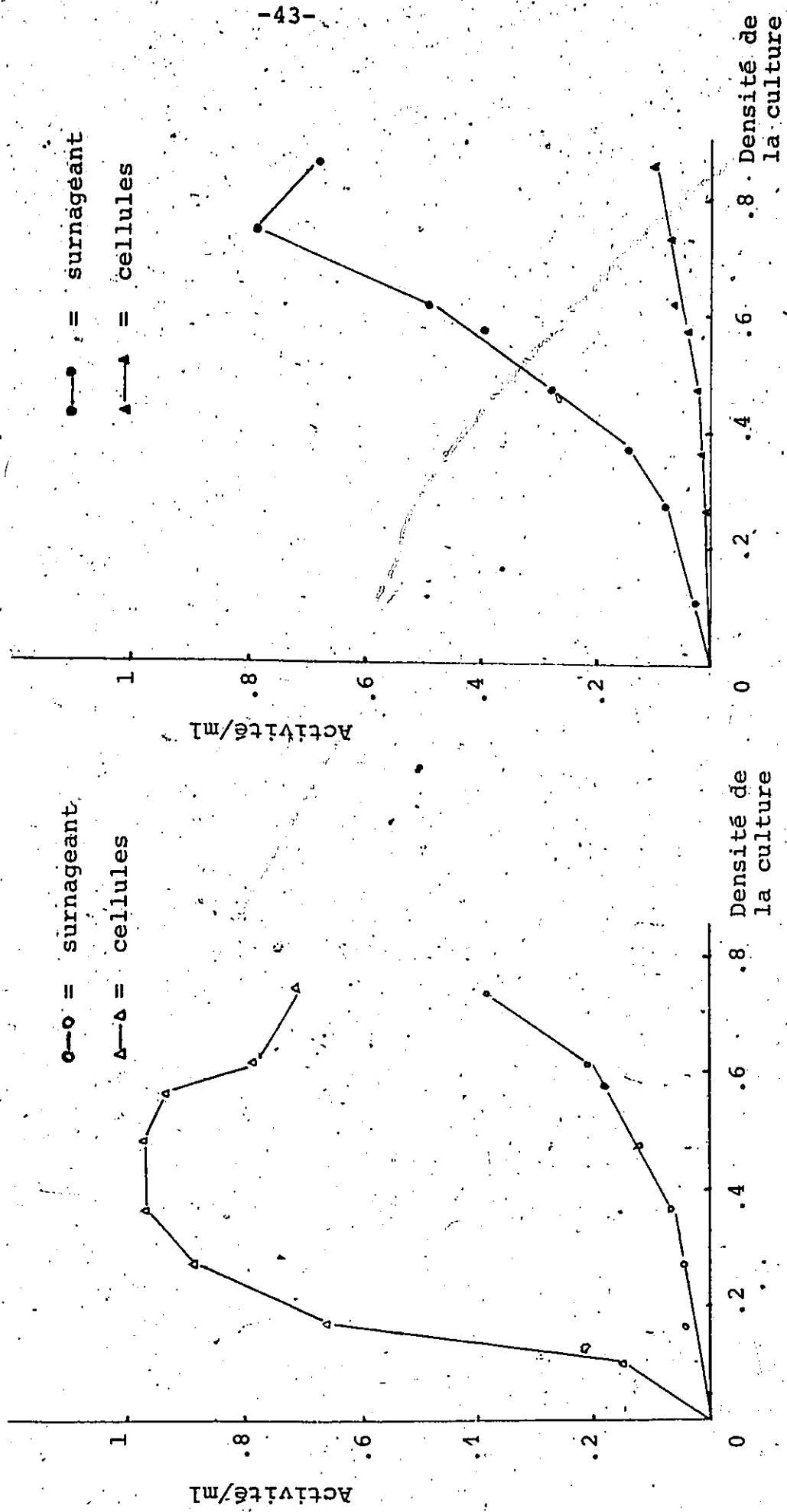


entières resuspendues dans un tampon véronal pH 7.4 contenant 0.02% de sulfide de sodium. Ces divers échantillons sont incubés 30 minutes à 37°C, en présence de naphtyl laurate ou de naphtyl acétate, pour mesurer respectivement les activités lipasique et estérasique. L'activité est exprimée en μ moles de β naphtol rejeté par heure à 37°C, et ce, par ml de surnageant ou par ml de cellules. Les résultats sont représentés figure no. 2. L'activité de la solution de lavage est pratiquement nulle dans les deux cas, par conséquent, la courbe d'activité n'est pas tracée sur les graphiques.

Lorsque le naphtyl laurate est utilisé comme substrat lipasique (fig. 2), on constate que l'enzyme apparaît très vite dans le surnageant, dès le début de la phase exponentielle de croissance; cette activité croît tout au long de cette phase, et atteint son optimum avec la fin de la phase exponentielle. Dès le ralentissement de la croissance et avec le début de la phase stationnaire, l'activité décroît. Par contre l'activité cellulaire est très faible dans les premières phases de la croissance, elle augmente sensiblement vers la fin de la phase exponentielle.

L'activité estérasique observée vis à vis du naphtyl acétate (fig. no. 2) est l'inverse du cas précédent, c'est à dire, que l'activité cellulaire est plus importante que celle du surnageant. L'activité cellulaire est à son optimum à la fin de la phase logarithmique de la croissance, après quoi cette activité commence à décroître. L'activité du surnageant est très faible au début des premières phases de la croissance,

Fig. no. 2 - Activités lipasique et estérasique dans le surnageant et dans les cellules entières lavées, au cours de la croissance d'Acinetobacter 0₁₆



Courbe I: Activité estérasique vis-à-vis du naphtyl acétate.

Courbe 2: Activité lipasique vis-à-vis du naphtyl laurate.

elle augmente de façon notoire au moment où celle des cellules diminue. Les mêmes résultats sont obtenus vis-à-vis du naphthyl butyrate (fig. 3).

Ces premiers résultats indiquent très clairement l'existence de deux types d'enzymes différentes:

- Une présente dans le surnageant, surtout active vis-à-vis du naphthyl laurate: la lipase.

- L'autre avant tout cellulaire, active vis à vis du naphthyl acétate et butyrate: l'estérase.

Ces premières données sont confirmées par une deuxième série d'expériences, le surnageant est incubé en présence de différentes émulsions de triglycérides. La tributyrine est choisie pour le dosage titrimétrique (fig. no. 4), et l'huile d'olive pour le dosage photométrique (fig. no. 5). Dans les deux cas, l'activité est exprimée en μ moles d'acides gras libérés par minutes à 37°C par ml de surnageant. Là encore, la forme des courbes d'activité est semblable à celle obtenue avec le naphthyl laurate. L'activité optimale correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance, elle est suivi d'un déclin avec le ralentissement de la croissance microbienne. Or seule la lipase est capable d'hydrolyser les émulsions de triglycérides.

Qu'en est-il au niveau cellulaire? Pour permettre un meilleur contact entre l'émulsion et l'enzyme, les cellules sont broyées à la presse, et la purée cellulaire obtenue est incubée avec le substrat qui est l'huile d'olive émulsifiée. Les essais ont été effectués à deux densités optiques diffé-

Fig. no. 3 - Activité estérasique du surnageant et des cellules entières vis-à-vis du naphtyl butyrate, en fonction de l'âge de la culture

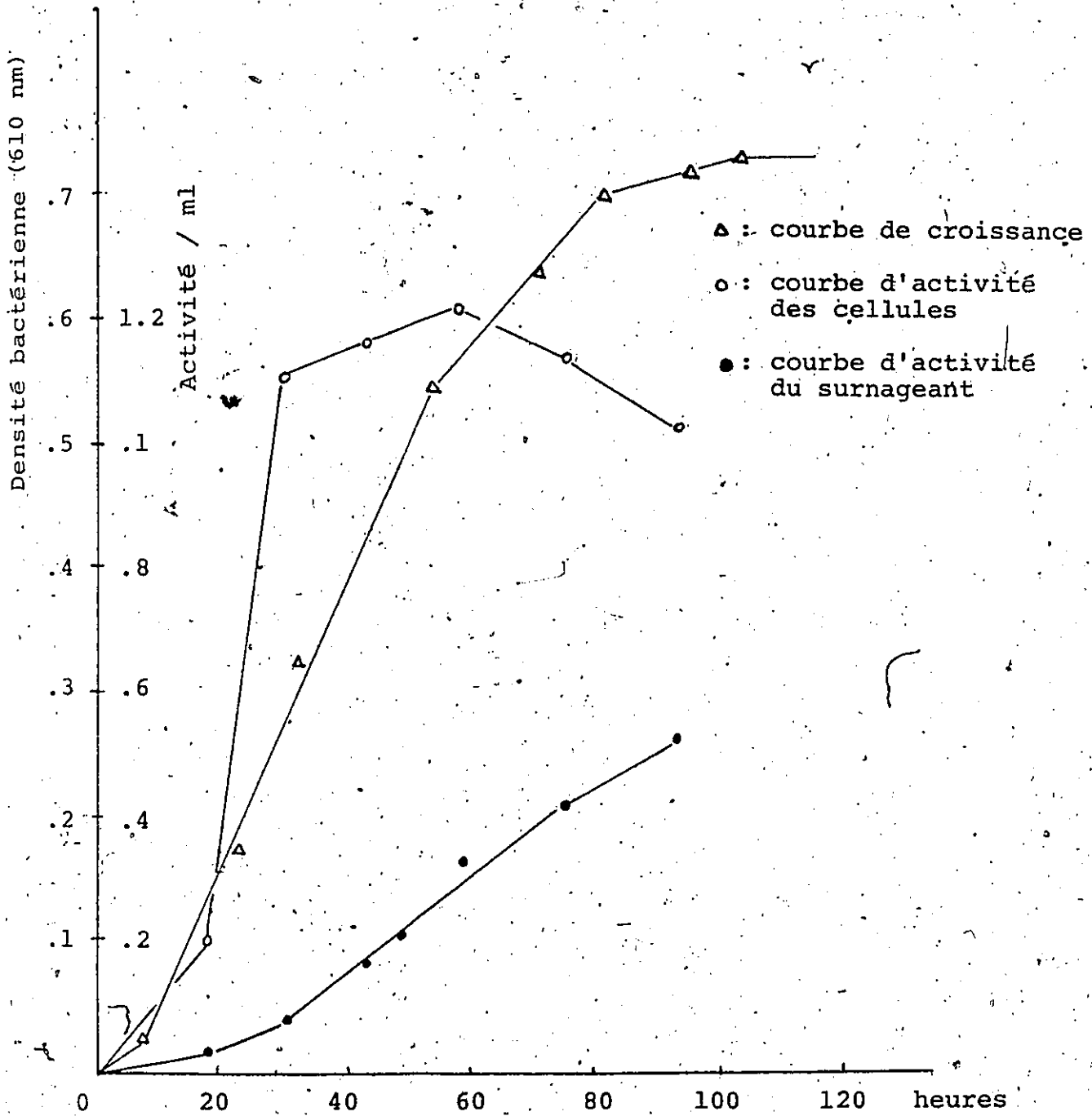
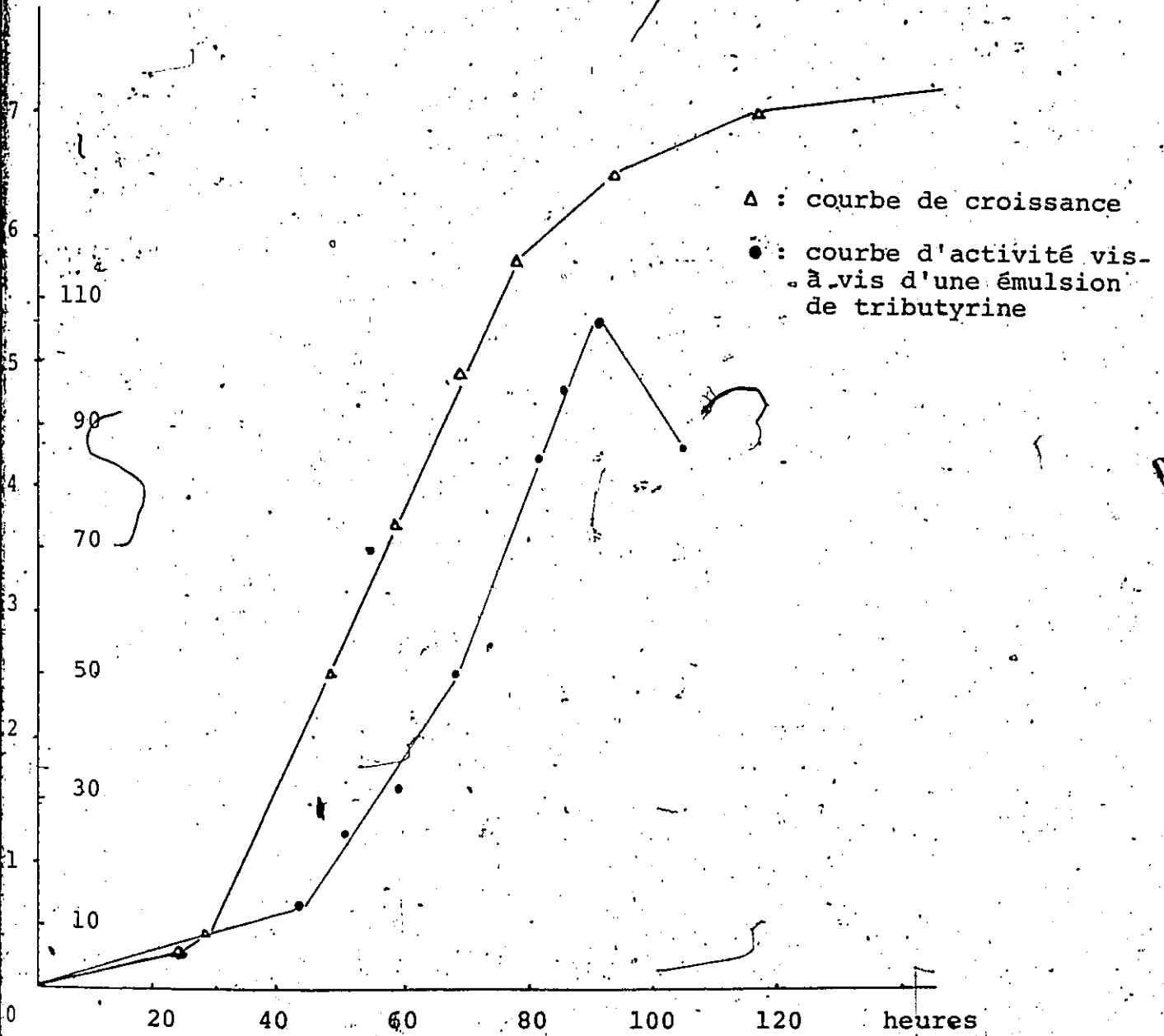
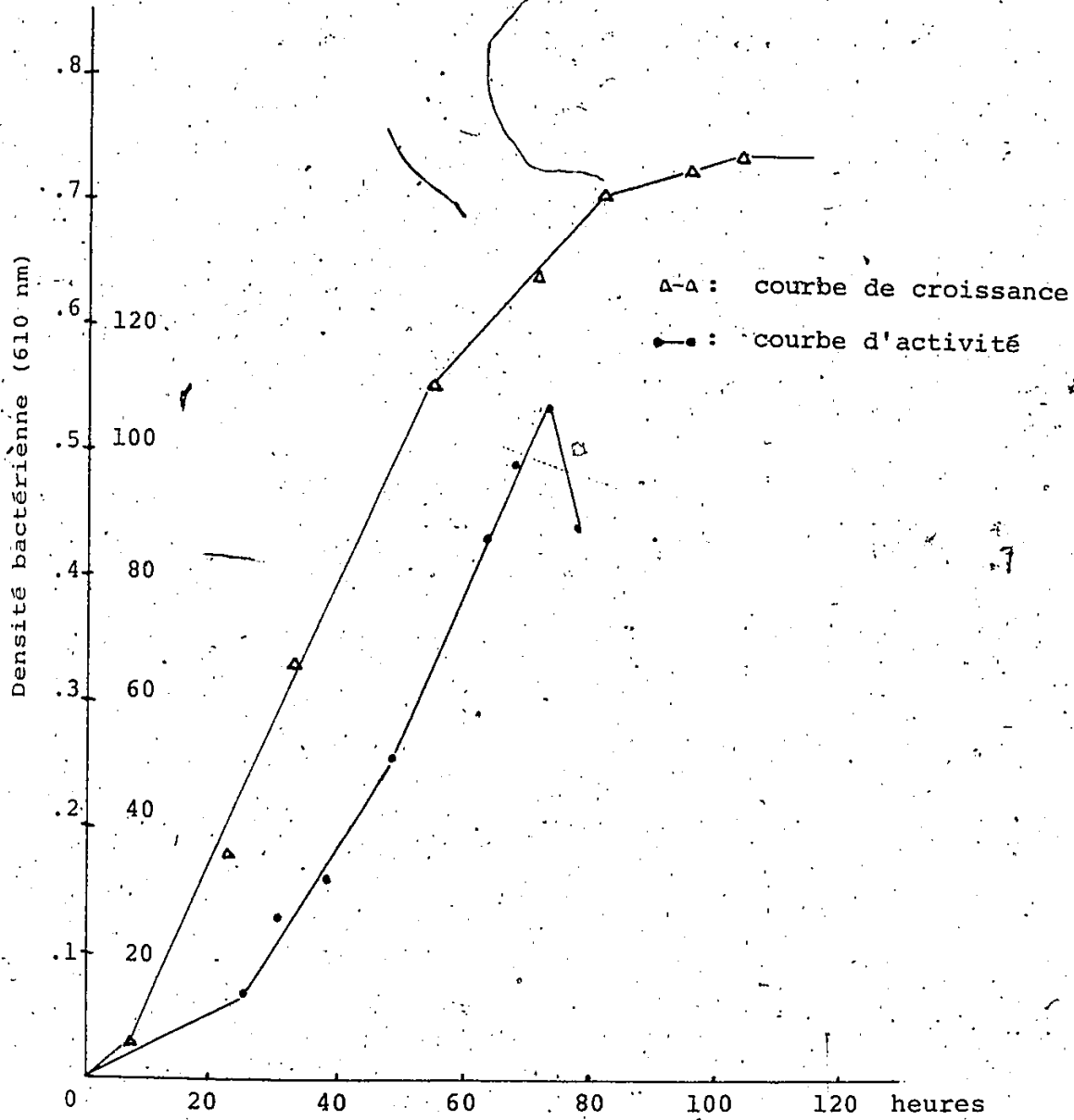


Fig. no. 4. - Activité lipasique du surnageant en fonction de l'âge de la culture d'Acinetobacter 0₁₆ (dosage titrimétrique)



Activité exprimée en micro-équivalents d'acides gras rejetés par mL, par minute à 37°C.

Fig. no. 5 - Activité lipasique du surnageant en fonction de l'âge de la culture d'Acinetobacter 0₁₆, vis-à-vis d'une émulsion d'huile d'olive



Activité exprimée en micro-équivalents d'acides gras rejetés par ml, par minute à 37°C

rentes (tableau no. 5). L'activité lipasique est très faible au niveau cellulaire. Finalement que les cellules soient entières ou broyées, leur activité ne représente que 7 à 10% de l'activité globale, et ce, aussi bien vis à vis du naphtyl laurate que des émulsions de triglycérides. La lipase est donc en grande partie présente dans le milieu externe.

3) Localisation des deux enzymes

Dans le paragraphe précédent, il a été déjà clairement établi que la plus grande partie de l'activité lipasique, soit 90%, se trouve rejetée dans le milieu au cours de la phase exponentielle de la croissance; quant à l'activité estérasique, elle se trouve associée principalement aux cellules.

Le broyage des cellules à la presse, suivi d'une centrifugation différentielle (fig. no. 6) est une autre modalité utilisée pour localiser les enzymes. L'activité est déterminée dans les diverses fractions par la méthode colorimétrique de Nachlas et Seligman (72), pour deux densités optiques du milieu de culture (tableau no. 6). Ces données confirment nos premiers résultats l'activité lipasique est exocellulaire; effectivement 80% de l'activité restent dans la phase liquide après une centrifugation de 60 minutes à 240 000 g, 5% sont liés aux fragments membranaires sédimentés au cours de la centrifugation, le reste soit 13% se partage équitablement entre l'activité associée aux cellules (7%) et celle perdue pendant les différentes phases de la manipulation.

TABLEAU no. 5

Activité lipasique vis-à-vis d'une émulsion d'huile d'olive
(méthode de Lippi)

Densité bactérienne à 610 nm	Activité lipasique: micro-équivalents d'acides gras rejetés par ml par minute à 37°C	
	Surnageant	Cellules broyées
.490	50	0.66
.635	90	6.6

Figure no. 6

Procédé suivit pour localiser l'estérase et la lipase

chez *Acinetobacter* 016

Culture liquide (200 ml)

centr., 20', 20000 g,

→ surnageant (I) ← culot cellulaire

centr., 60', 246000 g

→ surnageant (II) ← culot (2)

resuspendu dans 0.9% NaCl

centr., 20', 20000 g,

→ surnageant (III) ← culot cellulaire (1)

resuspendu dans eau
distillée

→ broyage des cellules
à la presse

centr., 30', 30000 g

→ surnageant (IV) ← culot (3)

centr., 60', 240000 g,

→ surnageant (V) ← culot (4)

Centr. = centrifugation

Tableau no. 6

Localisation de l'estérase et de la lipase: Activité au niveau des diverses fractions vis-à-vis du naphthyl acétate (estérase) et du naphthyl laurate (lipase)

Fractions	Activité de l'estérase par ml/heure à 37°C	DO = .480	DO = .650	DO = .450	DO = .650	Activité de la lipase par ml/heure à 37°C
Surnageant I	0.116		0.221	0.238		0.667
Surnageant II			0.177	0.180		0.532
Culot 1			0.019	0.006		0.030
Surnageant III	0.008		0.016	0.010		0.002
Culot 2	0.627		0.471	0.042		0.033
Surnageant IV	0.442		0.305	0.029		0.029
Culot 3	0.037		0.025	0.011		0.0099
Surnageant V	0.322		0.194	0.030		0.024
Culot 4	0.068		0.026	0.005		0.003

L'activité estérasique est surtout liée aux cellules (fig. no. 2) soit 85%, seulement 15% est localisée dans le milieu. Dans quelle fraction cellulaire ces 85% sont-ils répartis? dans le cytoplasme? dans la paroi ou les membranes cellulaires?

Après le broyage des cellules à la presse et la centrifugation différentielle (fig. no. 6), il est apparu que 50% de l'activité se trouve dans la fraction soluble du cytoplasme (tableau no. 6), 15% dans les débris cellulaires sédimentés (paroi, membranes) par une centrifugation de 60 minutes à 240 000 g et 20% sont perdus.

Dans ces dernières expériences, la rupture des cellules a été obtenue par pression, le procédé est brutal, il ne permettrait pas de localiser les enzymes présentés à la surface du cytoplasme, c'est à dire au niveau de la membrane cytoplasmique. Pour vérifier cette éventualité, les cellules sont soumises à un choc osmotique suivant la technique de Leu (102). Un tel traitement permet la libération des enzymes périplasmiques et non de celles qui sont à l'intérieur de la cellule (102). Or ni la lipase ni l'estérase ne sont libérées, lorsque les cellules sont soumises à un tel choc (tableau no.7).

III. Conclusions

L'emploi de substrats différents, d'une part les émulsions de triglycérides, d'autre part les substrats synthétiques tels que les esters du β naphthol, ont permis de différencier

Tableau no. 7

Activités estérasique et lipasique des cellules
avant et après un choc osmotique

Fractions	Activité estérasique/ ml/heure à 37°C	Activité lipasique/ ml/heure à 37°C
Cellules entières non traité	0.563	0.087
Cellules entières après le choc osmotique	0.553	0.086
Solution provenant du traitement des cellules	0.021	0.008

Dosage de l'activité par la méthode colorimétrique de
Nachlas et Seligman (72).

sans équivoque, l'existence de deux systèmes enzymatiques:

- l'un, capable d'hydrolyser les émulsions de tributyrine et d'huile d'olive, et en plus le naphtyl laurate, peut être défini comme lipasique.

- l'autre, sans action vis-à-vis des émulsions de triglycérides, mais hydrolysant le naphtyl acétate de même que le naphtyl butyrate (fig. no. 2 et 3), peut être défini comme estérasique.

Ces deux activités sont réparties différemment:

1) La lipase est avant tout rejetée dans le milieu. Les courbes d'activité lipasique obtenues sont semblables que les substrats soient naturels (huile d'olive) ou synthétiques (naphtyl laurate). La production de lipase croît tout au long de la phase exponentielle. De plus dans le surnageant, l'activité est proportionnelle au volume d'enzyme, et elle est linéaire avec le temps (chapitre VI).

Il est probable que la lipase est une exoenzyme; en effet, l'activité dosée dans les cellules entières ou broyées est faible, elle ne représente jamais plus de 10%. L'enzyme est rejetée dans le milieu, très tôt au cours de la phase de croissance de la bactérie, alors que la lyse des cellules est encore négligeable. Mencher et Alford ont démontré que la lipase de Pseudomonas fragi était totalement extracellulaire, car ils ont vérifié les trois critères de la définition de Pollock (98). Avec Acinetobacter 0₁₆, les deux premiers critères sont remplis:

a) il n'y a pas, ou pratiquement pas de lipase, associée aux cellules;

b) la lipase apparaît très tôt dans le milieu, alors que la lyse cellulaire est pratiquement négligeable;

le troisième critère n'a pas été vérifié.

2) Au contraire, l'estérase est associée aux cellules, elle est avant tout intracellulaire. Cette endoenzyme est en grande partie localisée dans le cytoplasme de la cellule. La production de l'enzyme croît tant que les cellules se divisent à taux de croissance constant et maximum et que le taux de mortalité est nul. Dès que ces conditions ne sont plus remplies, la production de l'enzyme se stabilise, puis décroît; corrélativement l'activité dans le surnageant augmente, cette augmentation est probablement une conséquence de la lyse cellulaire.

Chapitre V

Facteurs affectant la production des enzymes lipolytiques, et plus particulièrement la lipase d'Acinetobacter 0₁₆.

I. Introduction

Des études quantitatives sur la production de la lipase, et les facteurs modifiant la libération de l'enzyme dans le milieu de croissance ont été décrits chez de nombreux microorganismes.

L'influence de la composition du milieu sur la production de quelques lipases est bien connue. Dans la majorité des cas, les milieux complexes comme le bouillon nutritif, les bouillons peptoné ou à l'hydrolysât de caséine additionnés d'extrait de levure, se sont révélés d'excellents supports pour la croissance et la production de la lipase chez de nombreux microorganismes: Candida lipolytica (103), Pseudomonas fragi (97), Pseudomonas fluorescens (8), Pseudomonas aeruginosa (104), Anaerovibrio lipolytica (74), Micrococcus freudenreichii (20). Parfois l'addition d'une petite quantité de glucose (0.05%) semble nécessaire, notamment chez Candida lipolytica (103); par contre, ce même composé à concentration trop élevée devient inhibiteur (103) pour la production de l'enzyme; cet effet a été également observé chez Geotrichum candidum (105) et chez Pseudomonas fluorescens (106).

Nashif et Nelson (97) ont utilisé des milieux synthétiques de composition plus simple, bien qu'ils permettent la croissance de Pseudomonas fragi, la production de la lipase

est insatisfaisante. De même, Alford et Pierce (106) ont tenté la même étude sur 41 types de milieux synthétiques vis à vis de Pseudomonas fragi et de Pseudomonas fluorescens. Finalement, le milieu peptoné peut être remplacé par un milieu glucosé, tamponné au sulfate d'ammonium, enrichi d'arginine, de lysine, d'acide aspartique, et d'acide glutamique, pour Pseudomonas fragi (97) sans diminution de la croissance ou de la production de l'enzyme. Le glucose peut être omis de ce milieu, de même les acides aminés cités peuvent être remplacés par d'autres comme l'isoleucine, la leucine, et la valine, sans que la croissance ne soit modifiée; cependant, la production de la lipase est grandement réduite. Peters et Nelson (107) mettent en évidence la nécessité d'ajouter des vitamines, en particulier de la thiamine, au milieu minéral glucosé à 1%, pour obtenir une bonne production de lipase avec Candida lipolytica. Cutchins et al (108) montrent que l'addition de vitamines B, à un milieu à base de sulfate d'ammonium et d'huile d'olive permet d'obtenir chez Pseudomonas fluorescens, une croissance semblable à celle obtenue sur les milieux complexes, néanmoins, la production d'enzyme est pratiquement nulle; en conclusion, chez cette bactérie, les milieux synthétiques, des plus simples aux plus complexes, sont de mauvais supports pour la production de la lipase.

La lipase peut donc être produite dans des milieux dépourvus de graisses. Il reste à se demander, si l'addition de divers substrats lipidiques aux milieux de croissance des microorganismes, permettrait l'induction d'une plus forte

quantité d'enzyme. Nashif et Nelson (97) signalent l'effet légèrement stimulateur de la tricapyryline et de l'acide caprylique sur la production de la lipase de Pseudomonas fragi. Le même effet est observé si Achromobacter lipolyticum (33) croît sur un milieu contenant 1% d'huile d'olive ou des graisses du lait. Sierra (109) montre l'effet stimulateur du tween 80 sur la production de la lipase de Pseudomonas aeruginosa. Ces divers composés (huile d'olive, tricapyryline, tween 80 ...) sont désignés comme des inducteurs "non gratuits", puisqu'ils sont tous métabolisés et utilisés pour la croissance des microorganismes. Cependant, le tween 80 qui stimule la production de la lipase chez Candida lipolytica (110), mais qui n'est pas utilisé pour la croissance de la levure, peut être considéré comme un exemple d'inducteur typique ou gratuit.

Nashif et Nelson (97) ont observé, par contre, une moins forte production de lipase par Pseudomonas fragi, lorsqu'ils ajoutaient des graisses du beurre ou des triglycérides à longues chaînes d'acides gras aux milieux de croissance. En réalité, il semble d'après les travaux de Smith et Alford (111) que cette inhibition partielle soit due à l'accumulation dans le milieu des acides gras libérés par la lipase.

En dehors des besoins nutritionnels, d'autres facteurs sont susceptibles d'influencer la production de la lipase; il s'agit essentiellement de la température, du pH, et de l'agitation du milieu où se développe la bactérie.

Nashif et Nelson (97) obtiennent une plus grande quantité

d'enzyme, si Pseudomonas fragi est cultivé dans un milieu liquide de faible profondeur, sans agitation. A l'inverse Alford et Smith (112), recommandent une bonne agitation qui facilite la diffusion de l'oxygène, pour une meilleure croissance et production de lipase chez Staphylococcus aureus. De même, Lawrence et al (20) avec Micrococcus freudenreichii et Nadkarni (104) avec Pseudomonas aeruginosa, notent un effet semblable.

Un bon nombre de bactéries lipolytiques produisent une plus forte quantité d'enzyme si les bactéries poussent à des températures avoisinant 20°C, et cela même si leur température optimale de croissance est plus élevée. Ces faits ont été constatés pour le genre Pseudomonas (97) (8) (40), les températures les plus favorables pour la production de l'enzyme se situent entre 15 et 21°C; à l'exception, toutefois, de Pseudomonas aeruginosa qui donne une plus grande quantité de lipase à 30°C (104). Par contre, chez Micrococcus freudenreichii (20), la production de lipase n'est pas affectée que la bactérie se développe à 20°C ou à 30°C. Il n'en est pas de même pour Achromobacter lipolyticum (33) et pour Anaerovibrio lipolyticum (74) qui donnent de meilleurs résultats, si les bactéries poussent à 30°C et à 38°C respectivement.

Le pH du milieu de croissance, joue un rôle non négligeable sur la production de la lipase. Lawrence et al (20) ont montré que la quantité d'enzyme, lorsque Pseudomonas fragi pousse sur un milieu à pH 6, est 3 à 4 fois plus importante,

que si le milieu est à pH 8. De même, Wouters (113) a montré que la production de lipase chez Geotrichum candidum, est très sensible aux variations du pH.

II. Résultats

1) Influence des facteurs nutritionnels

Cette étude a été effectuée à partir de deux types de milieux incubés à 20°C sans agitation.

a) milieux complexes ou empiriques (tableau no. 8) constitués à partir de matériaux dont la composition n'est pas complètement élucidée.

b) milieux synthétiques (tableau no. 9) où la quantité et la qualité des substances chimiques pures sont définies. Le principe expérimental est le suivant. La souche conservée sur un milieu semi-solide (83) est transférée dans le milieu à étudier, réparti en tube (10 cc) pour une subculture de 48 heures à 20°C. Après quoi, 100 ml de ce même milieu placés dans un erlenmeyer de 500 ml, sontensemencés avec 1 ml de la subculture. Des prélèvements effectués à différentes densités optiques, sont testés suivant la méthode colorimétrique de Nachlas et Seligman, pour évaluer leur activité lipasique et estérasique.

Le milieu complexe utilisé est le milieu peptoné, additionné éventuellement d'extrait de levure, à pH 7. Seules, les proportions des deux constituants varient (tableau no. 8). La production de lipase, tout comme la croissance, sont meilleures dans le milieu peptoné à 2% contenant en plus 0.15%

Tableau no. 8 - Influence de la composition du milieu (milieu complexe) sur la production de la lipase.

Composition du milieu	Temps d'incubation heures	Croissance (DO à 610 nm)	pH	nombre de microorganismes par ml de culture	Activité lipasique extracellulaire intracellulaire
Peptone 2%	0		7		
	46	.250	7.3	9×10^7	0.092 0.010
	72	.480	7.45	8×10^8	0.365 0.024
	96	.570	7.55		0.393 0.067
Peptone 2%	0		7		
+	40	.430			0.376 0.035
	72	.625			0.485 0.068
Extrait de levure .075%	96	.660	7.5		0.441 0.075
Peptone 2%	0		7		
+	48	.470	7.3	7.8×10^8	0.280 0.024
	70	.610	7.4	3.3×10^9	0.490 0.068
Extrait de levure .15%	80	.720	7.6		0.791 0.072
Peptone 1%	0		7		
+	48	.390			0.108 0.067
	72	.510			0.467 0.342
Extrait de levure .15%	96	.525	7.45		

d'extrait de levure, après 96 heures d'incubation à 20°C. Lorsque la quantité d'extrait de levure est diminuée de moitié, ou lorsqu'elle est nulle, la croissance tout comme la production d'enzyme sont affectées. Il en est de même si la quantité de peptone est réduite de moitié. La production de l'enzyme, décroît de 40 à 50%.

L'activité estérasique est également plus importante dans le milieu peptoné à 2% et contenant 0.15% d'extrait de levure (tableau no. 9), après 48 heures d'incubation à 20°C, sans agitation. L'absence, ou une quantité moindre d'extrait de levure (tableau no. 9), sont beaucoup moins dépressives sur la production de l'estérase (perte de 20 à 25% de l'activité) que sur celle de la lipase.

Les milieux synthétiques (tableau no. 10 et 11) ont pour base minérale le milieu minéral de Lochhead (94), dans lequel seule la source d'azote a été légèrement modifiée, et contient en plus du nitrate de potassium à 0.02% du sulfate d'ammonium dans les proportions de 0.03%. Les 10 acides aminés ajoutés sont ceux utilisés par Acinetobacter 0.16 comme seule source carbonée (chapitre III). Que le milieu minéral (tableau 10 et 11) soit enrichi: d'acides aminés seuls (a), d'acides aminés et d'acétate de sodium (b), d'acides aminés et de vitamines I (c), d'acides aminés de vitamines (I et additionnelles) et d'éléments à l'état de trace (d), la production de lipase est pratiquement nulle dans tous les cas, et ce, aussi bien au niveau cellulaire que dans le surnageant. Même lorsque la composition du milieu (milieu d)

Tableau no. 9 - Influence de la composition du milieu (milieu complexe) sur la production de l'estérase

Composition du milieu	Temps d'incubation	Croissance DO à 610 nm	pH	Nombre de microorganismes	Activité estérasiqe extracellulaire (surnageant)	Activité estérasiqe intracellulaire (cellules)
Peptone 2% +	0		7			
	48	.470	7.3	7.8×10^8	0.116	0.971
Extrait de levure 0.15%	70	.610	7.4	3.3×10^9	0.212	0.788
	96	.730	7.6		0.568	0.719
Peptone 2%	0		7			
	46	.250	7.3	9×10^7	0.065	0.667
	76	.510	7.50	1.3×10^9	0.180	0.754
	100	.615	7.6		0.194	0.641
Peptone 2% +	0		7			
	40	.430			0.167	0.550
Extrait de levure 0.75%	50	.510			0.221	0.762
	72	.625	7.4		0.190	0.572

Tableau no. 10. - Composition détaillée des milieux synthétiques

I Base minérale / 1

KNO ₃	0.2 g
NH ₄ SO ₄	0.3 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
NaCl	0.05g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.1 g
FeCl ₃ , 6H ₂ O	0.01g

II Les 10 acides aminés

- DL Sérine
- DL Alanine
- L acide aspartique
- L Asparagine
- L acide glutamique
- L Glutamine
- L Histidine
- L Proline
- L Arginine
- L Tyrosine

III Solution de vitamines I / 200cc d'eau distillée

D calcium panthothenate ...	80 mg	
Thiamine HCl	80 mg	
Pyridoxine	80 mg	
L inositol	80 mg	
Acide nicotinique	20 mg	
Biotine	6 ml	(50 mg/100 ml H ₂ O distillée)

IV Vitamines additionnelles / 1

Riboflavine	20 µg
Acide p aminobenzoïque ...	20 µg
Acide folique	2 µg

V Elements à l'état de trace / 100 ml

Acide borique	5 mg
Sulfate de cuivre	0.4 mg
Iodine de potassium	1 mg
Chlorure ferrique	2 mg
Sulfate de manganèse	4 mg
Molybdate de sodium	2 mg
Sulfate de zinc	4 mg

Tableau no. 11 - Rôle de la composition du milieu synthétique sur la production de la lipase

Composition du milieu	Temps d'incubation (OD à 610 nm)	pH	Croissance (OD à 610 nm)	Activité lipasique Extracellulaire (Surnageant)	Activité lipasique Intracellulaire (Cellules)
(a) base minérale	0	7			
+ casamino acide	40		.320	0	0.010
	78	7.4	.500	0	0.026
vitamine free (10 g/l)	98		.590	0.008	0.024
(b) base minérale	0	7			
+ 10 ac. aminés (1 gr de chaque/l)	44		.450	0	0.009
+ acétate de sodium 1 gr/l	72	7.5	.620	0	0.020
	96		.715	0.003	0.019
(c) base minérale	0	7			
+ 10 ac. aminés (.5 gr de chaque/l)	60		.305	0	0.010
+ vitamines I 5 cc/l	96	7.4	.470	0	0.010
	120		.580	0	0.013
(d) base minérale	0	7			
+ éléments à l'état de trace 1ml/l	30		.330	0	0.007
+ 10 ac. aminés (1 gr de chaque/l)	50	7.5	.620	0	0.020
+ vitamines I (5 cc/l)	90		1.000	0.008	0.042

est très proche de ce qui est connu de la composition chimique de la peptone et de l'extrait de levure (Difco Manual, 9ième édition), la quantité d'enzyme obtenue est insignifiante bien que la croissance soit très importante ($DO = 1.0$).

Quant à l'activité estérasique (tableau no. 12), elle n'est jamais nulle, quel que soit le milieu synthétique utilisé. Cependant la production de l'enzyme est moindre que dans le milieu complexe, elle est diminuée de 30 à 50%, même si la croissance est très forte ($DO = 1.0$, milieu d).

Finalement, il est apparu intéressant de déterminer le rôle de quelques substrats lipidiques sur la production des enzymes. Les essais tentés sont modestes, puisque réalisés seulement avec de la tributyrine ajoutée à la concentration de 0.1%, et avec du tween 80 à la concentration de 1% (tableau no. 13).

L'activité lipasique semble légèrement stimulée par la présence de la tributyrine. L'activité qui est de 0.934 pour une densité optique de 0.550 nm en présence de ce composé, est seulement de 0.400 pour la même densité optique dans un milieu dépourvu de tributyrine. Parallèlement, il est à noter que l'évolution du pH du milieu est différente; en présence de tributyrine le pH reste assez stable (de 7 à 7.25), alors qu'en l'absence de ce composé le pH devient plus alcalin (7.6). Par contre, l'addition du tween 80 a un effet inhibiteur sur la production de l'enzyme, qui baisse de 80%, alors que le pH varie très peu (de 7 à 7.2).

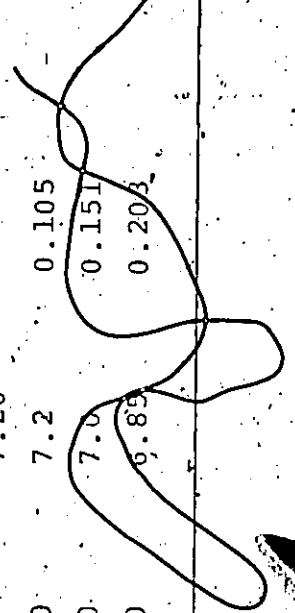
L'activité estérasique est plus affectée par la présence

Tableau no. 12 - Influence du milieu synthétique sur la production de l'estérase

Composition du milieu	Temps d'incubation	Croissance (DQ à 610 nm)	pH	Activité estérasiqe extracellulaire (surnageant)	Activité estérasiqe intracellulaire (cellules)
base minérale	0		7		
+ casamino acide	30	.225		0.009	0.520
	40	.320		0.012	0.580
vitamine - free (10 gr./l)	78	.50Q	7.4	0.030	0.390
base minérale	0		7		
+ 10 ac. aminés	44	.450		0.036	0.372
	72	.620	7.5	0.049	0.424
+ acétate de sodium (gr./l)	96	.715		0.049	0.407
base minérale	0		7		
+ 10 ac. aminés (.5 gr. de chaque/l)	60	.305		0.016	0.554
+ vitamines I (5 cc/l)	96	.470	7.4	0.023	0.398
	120	.530		0.020	0.294
base minérale	0		7		
+ Éléments à l'état de trace 1ml/l	36	.410		0.034	0.468
+ 10 ac. aminés (1 gr de chaque/l)	50	.620	7.5	0.044	0.364
+ Vitamines I (5 cc/l)	90	1.000		0.066	0.650
+ vitamines additionnelles					

Tableau no. 13 - RÔLE de la tributyrine (.1%) et du Tween 80 (1%) ajoutés respectivement au milieu complexe, sur la production des enzymes

Enzymes	Composition du milieu	Temps d'incubation	Croissance (DO à 610 nm)	pH	Activité extracellulaire intracellulaire (surnageant) (cellules)
Lipase	Peptone 2%	0	7.05		
	+ Extrait de levure .15%	32	.395	7.05	0.925 0.154
	+ Tributyrine (.1%)	50	.550	7.25	0.934 0.150
		80	.720	7.18	0.813 0.164
Lipase	Peptone 2%	0	7.20		
	+ Extrait de levure .15%	44	.330	7.2	0.024 0.004
	+ Tween 80 (1%)	66	.540	7	0.058 0.025
		100	.780	6.85	0.131 0.023
Estérase	Peptone 2%	0	7.05		
	+ Extrait de levure .15%	30	.395	7.05	0.294 0.615
	+ Tributyrine (.1%)	60	.615	7.20	0.312 0.710
		80	.720	7.08	0.263 0.641
Estérase	Peptone 2%	0	7.20		
	+ Extrait de levure .15%	44	.330	7.2	0.105 0.676
	+ Tween 80 (1%)	66	.540	7.0	0.151 0.767
		100	.780	6.85	0.203 0.875



de la tributyrine que par la présence de tween 80. La production de l'enzyme décroît de 30% dans le premier cas et seulement de 10% dans le deuxième (tableau no. 13).

2) Influence de quelques autres facteurs:

a) La température d'incubation.

Le milieu utilisé est le milieu peptoné à 2% additionné de 0.15% d'extrait de levure. Les cultures sont incubées à 15, 20 et 30°C, sans agitation. Les subcultures ont été, elles aussi, incubées respectivement à 15, 20 et 30°C.

Les courbes de croissance (fig. 7) montrent, qu'entre 20 et 30°C les différences sont insignifiantes. Effectivement, une numération vitale (chap. II) effectuée pour une densité bactérienne de 650 nm, montre un nombre de cellules ($\approx 3 \times 10^9$ par ml de culture) semblable dans les 2 cas. Par contre à 15°C la densité bactérienne est un peu plus faible. La production de lipase (fig. 8) est plus élevée à 20°C; cependant à 15°C, cette production est encore très importante 80%. A 30°C, par contre, la quantité d'enzyme produite est beaucoup plus faible (40 à 50%).

L'activité estérasique (fig. 9) montre peu de variation que les cultures soient incubées à 20 ou à 30°C, elle apparaît même légèrement supérieure à 30°C. A 15°C la quantité d'enzyme est la moitié de celle produite à 30°C.

Par contre chez une souche d'Acinetobacter lipolytique mésophile (qui croît à 37°C) isolée du même échantillon de sédiment qu'Acinetobacter 0₁₆, la production de lipase dans

Fig. no. 7 - Courbe de croissance d'Acinetobacter 0₁₆ à différentes températures d'incubation, sans agitation.

(milieu: peptone 2%, extrait de levure 0,15%, pH 7.)

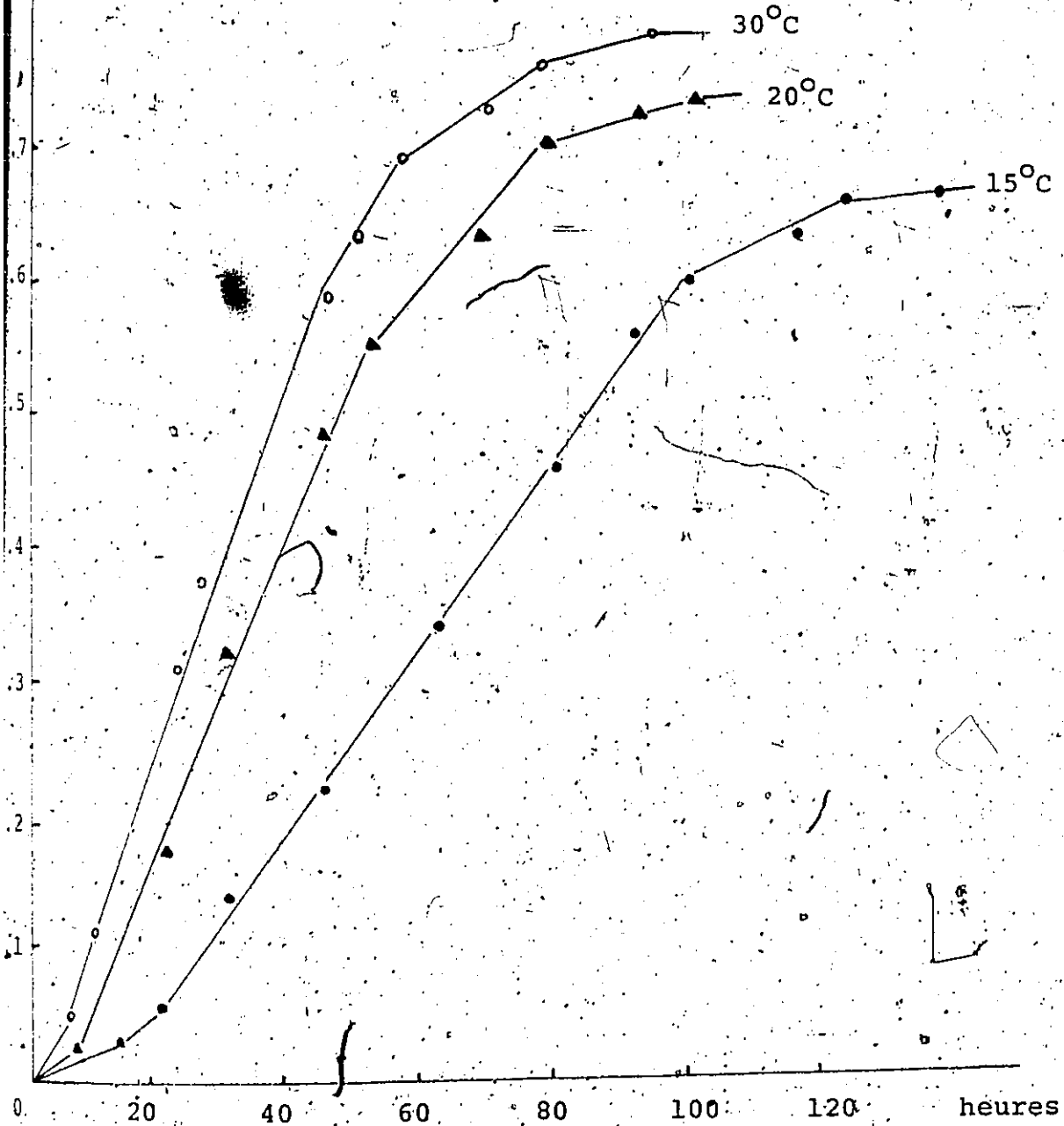
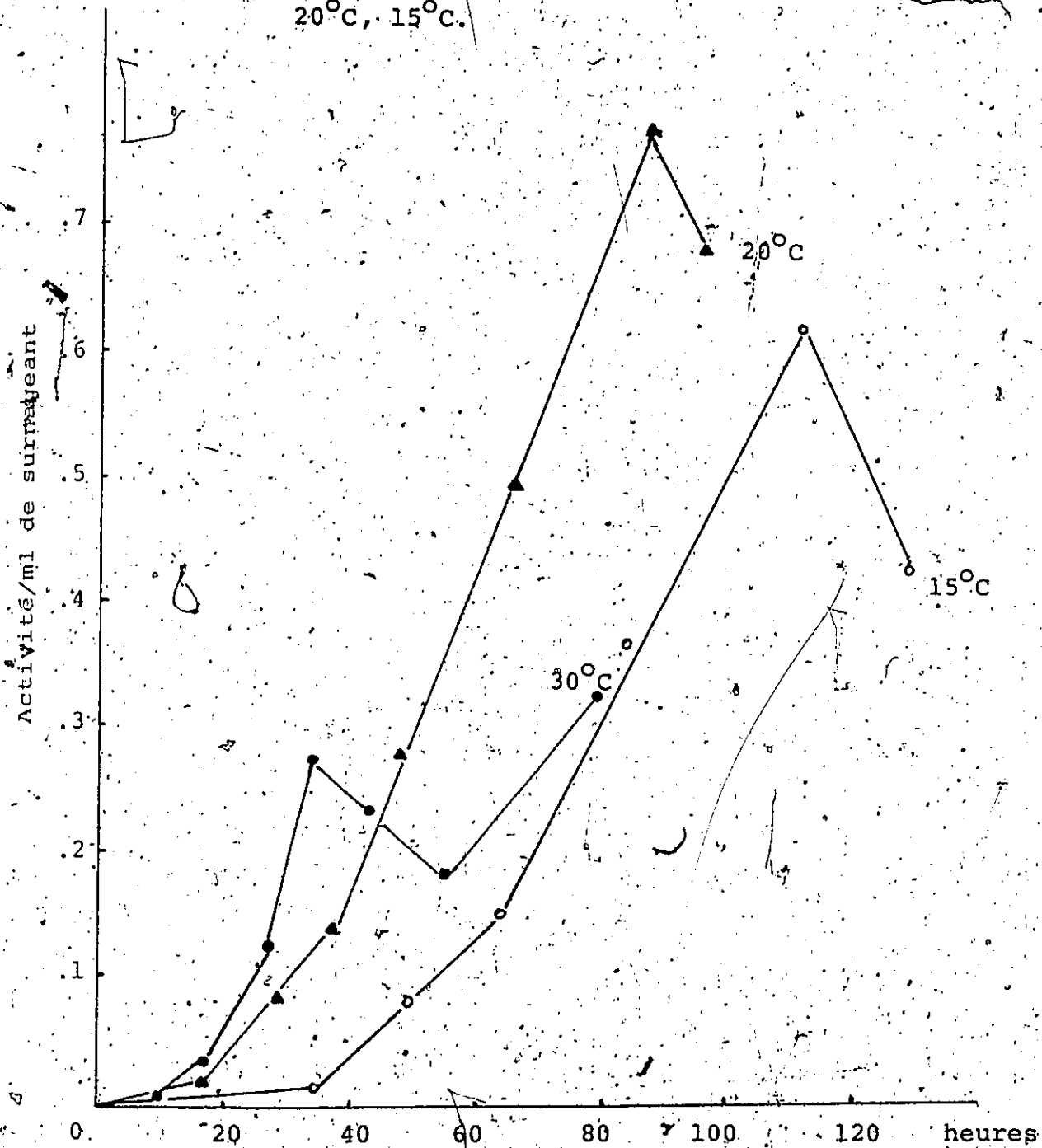
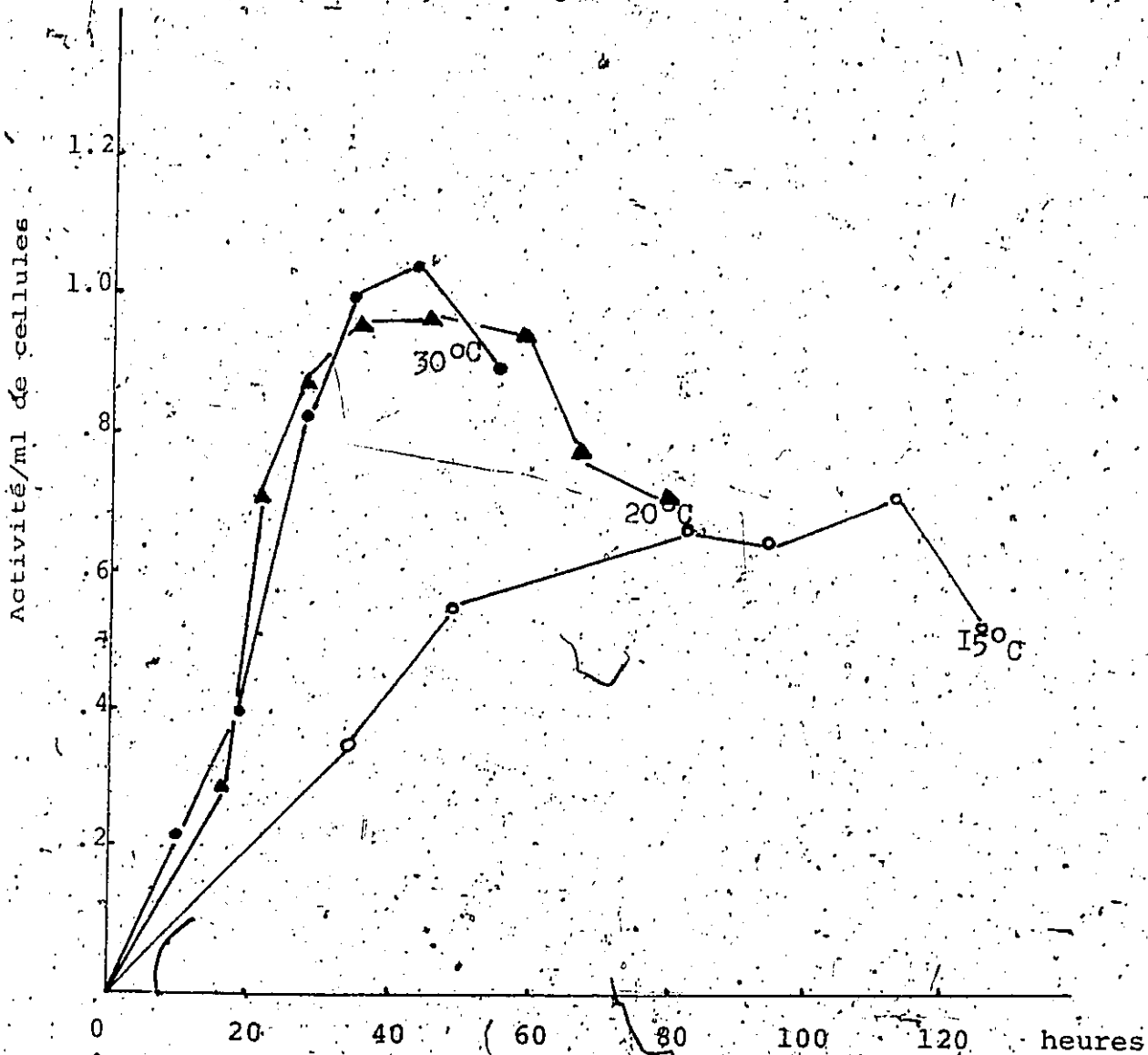


Fig. no. 8 - Courbes d'activité lipasique du surnageant de cultures d'Acinetobacter 0₁₆ incubées à 30°C, 20°C, 15°C.



Activité exprimée en micro-moles de β naphtol rejeté par ml de surnageant par heure à 37°C.

Fig. no. 9 - Courbes d'activité estérasique des cellules entières, de cultures d'Acinetobacter 016 incubées à 30°C, 20°C, 15°C.



Activité exprimée en micro-moles de β -naphthol rejeté par ml de cellules, par heure à 37°C.

le surnageant est semblable que la culture soit incubée à 30°C ou à 20°C sans agitation, dans le milieu peptone (2%) plus extrait de levure (0.15%) à pH 6.6. Ainsi pour une densité optique de 0.680 nm, l'activité lipasique est de 0.763 (μ moles de β naphthol rejeté par ml de surnageant à 37°C et par heure) pour la culture placée à 20°C, et de 0.765 pour la culture placée à 30°C. La souche mésophile n'est pas affectée comme la psychrophile facultative par les températures élevées pour la production de sa lipase.

Quant à la production de l'estérase, chez la mésophile tout comme chez la psychrophile facultative l'activité est semblable que les cultures soient placées à 20 ou à 30°C.

b) Le pH du milieu de culture

Le pH du milieu à base de peptone (2%) et d'extrait de levure (0.15%) est amené à 7, 6.6 et 6, par l'addition de l'acide chlorhydrique. Les cultures sont incubées à 20°C sans agitation.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 14. Dans les 3 cas, le pH du milieu de culture, devient légèrement alcalin en fin de croissance. Il l'est d'autant plus (7.6), que le pH du milieu initial est plus élevé (7).

La meilleure production de lipase (tableau 14) est obtenue lorsque le pH initial du milieu est de 6.6. Quant à l'estérase, c'est lorsque le milieu initial est neutre (7).

c) Agitation ou aération du milieu

Les cultures sur milieu peptoné (2%) à l'extrait de levure (0.15%) à pH 7, sont incubées à 20°C sur un agitateur rotatif, ce qui facilite la diffusion de l'oxygène dans le milieu.

Tableau no. 14 - Influence du pH du milieu de culture, sur la production des enzymes lipolytiques

PH du milieu initial (610 nm)	DO de la culture (610 nm)	Temps d'incubation (heures)	pH de la culture	Activité lipasique surnaissant cellules	Activité estérasique surnaissant cellules
7	0	0	7		
	.470	48	7.3	0.290	0.116
	.610	70	7.4	0.496	0.212
	.720	80	7.6	0.780	0.568
<hr/>					
6.6	0	0	6.6		
	.320	54	6.95	0.467	0.180
	.530	72	7.08	1.068	0.353
	.650	90	7.3	1.137	0.409
<hr/>					
6	0	0	6		
	.340	52	6.9	0.233	0.052
	.460	64	7.1	0.289	0.77
	.630	88	7.25	0.283	0.676
	.680	110	7.4	0.554	

La croissance bactérienne est très rapide, la phase stationnaire est atteinte en 48 heures, alors que sans agitation ce stade n'est atteint qu'après 96 heures d'incubation. Par contre, la production de lipase est beaucoup plus faible; ainsi pour une densité bactérienne de .700 nm, l'activité est de .450 par ml de surnageant, alors qu'elle est de 0.766 par ml de surnageant, à la même densité optique lorsque le milieu de culture n'est pas agité.

III. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude; montrent très clairement, que la production des enzymes lipolytiques par le même microorganisme est très variable, et qu'elle dépend largement de la composition du milieu initial de culture. L'absence d'activité lipasique d'Acinetobacter 0₁₆ sur un milieu synthétique (tableau no. 11), n'est pas un caractère exclusif à cette bactérie, Alford et Pierce (106) ont montré que le même phénomène avec Pseudomonas fluorescens. Ces faits renforcent l'idée, qu'il est aléatoire de rechercher l'activité lipolytique des microorganismes sur un seul milieu; cette recherche doit être faite sur plusieurs types de milieux, et ceci d'autant plus, que l'on désire établir des différences dans le degré d'hydrolyse des graisses par divers microorganismes. La production pratiquement nulle de lipase par Acinetobacter 0₁₆, en présence d'acides aminés et de vitamines, laisse penser, que peut-être certains di ou poly-peptides sont nécessaires pour la synthèse de l'enzyme. Cette nécessité a été mise en évidence pour la synthèse de certaines enzymes. Ainsi pour la synthèse de son invertase, Saccharomyces fra-

gillis a besoin d'un dipeptide cyclique (114). De même, Jayko et Lichstein (115) ont montré que chez Clostridium perfringens la synthèse de la lécithinase est augmentée par le glycyL-L-asparagine. La présence dans le milieu de croissance de substrat spécifique stimule très souvent la production de l'enzyme qui attaque ces substrats. Cutchins et al (108) pensent que les lipases bactériennes sont adaptatives, et que leur production est stimulée par la présence de lipides comme source de carbone dans le milieu de croissance. La lipase d'Acinetobacter n'apparaît pas être réellement une enzyme adaptative, puisqu'elle peut être produite en quantité très importante dans un milieu dépourvu de ces composés (milieu peptoné à l'extrait de levure). Cependant, Sierra (109) reprend l'hypothèse émise par Beebe et Buxton en 1905, selon laquelle Pseudomonas aeruginosa produirait une forte quantité de lipides dans un milieu dépourvu de sucre et de graisse, mais contenant des protéines comme le milieu peptoné ou le bouillon nutritif. Cet auteur pense que des lipides sont élaborés au début de la phase de croissance, qu'ils sont rejetés dans le milieu et ils pourraient induire la production de la lipase au cours de la croissance. Cette hypothèse pourrait être également valable pour Acinetobacter 0₁₆, car on trouve des lipides plus ou moins fortement liés à la lipase (Chapitre VI).

De plus, la présence de tributyrine à 0.1% dans le milieu de croissance (tableau 13) stimule légèrement la production de la lipase d'Acinetobacter 0₁₆, mais corrélativement, la dégradation de ce substrat en acides gras joue un rôle sur la stabilisation du pH, puisque le pH influence aussi la

production de l'enzyme (tableau no. 14), il est très difficile de définir le rôle exact joué par la tributyrine.

Finalement, la production optimale de lipase chez Acinetobacter 0₁₆ est obtenue après 3 jours d'incubation à 20°C, sans agitation, dans un milieu peptoné à 2% additionné d'extrait de levure (0.15%) ayant un pH initial de 6.6.

Chapitre VI

Isolément, purification et quelques propriétés de la lipase d'Acinetobacter 016

I. Introduction

De nombreux arguments plaident en faveur de la nature protéidique de toutes les enzymes. Les méthodes de préparation et de purification des enzymes sont donc calquées sur celles des protéines; lorsqu'elles sont solubles, on applique les techniques de précipitations fractionnées par les sels ou les solvants organiques, d'électrophorèse, d'absorption, et de chromatographie.

La plupart des lipases microbiennes sont exocellulaires; donc après la croissance du microorganisme dans des conditions qui favorisent la production de sa lipase, une centrifugation permettra l'élimination des cellules; il convient alors de réduire le volume du surnageant, c'est à dire de concentrer l'enzyme; plusieurs procédés peuvent être utilisés:

1- L'ultrafiltration au travers d'une membrane de collodion, sous pression négative (vide) ou sous pression positive (courant d'azote). Si le liquide est filtré très rapidement les pertes d'activité sont minimisées (74); mais le plus souvent le liquide concentré devient très sirupeux, et la perte d'activité peut être grande (74). Ce procédé a été utilisé par Henderson (74) et par Mencher et Alford (35).

2- La précipitation par le sulfate d'ammonium, en utilisant le monogramme de Dixon (116). Les concentrations employées varient suivant l'enzyme étudiée, Hassing (37) avec Corynebacterium aures et Lu (40) avec Pseudomonas fragi utilisent une saturation à 60%; alors qu'une saturation à 40% est suffisante pour la précipitation de la lipase de Pseudomonas mephitica (32), et pour celle du Mucor (44), quant à Khan (33) il sature à 50% le surnageant d'Achromobacter lipolyticum.

3- La précipitation par les solvants organiques. Laboureur et Labrousse (117) précipitent la lipase de Rhizopus arrhizus par l'acétone. Le même solvant est utilisé par Kosugi (32) pour l'enzyme de Pseudomonas mephitica. Chorvath (34) préfère utiliser l'éthanol pour concentrer la lipase de Leptospira.

4- La lyophilisation, ce procédé qui consiste en une dessiccation sous vide à l'état congelé, par sublimation de l'eau, a été employée par Peters et Nelson pour la lipase de Mycotorula lipolytica (118) et par Finkelstein et al pour Pseudomonas aeruginosa (38). Très souvent, cette technique n'est utilisée que secondairement, c'est à dire, après une première réduction du volume par les méthodes décrites ci-dessus (Alford et Mencher 35).

Il est à noter que certains des procédés préalablement décrits, tout en permettant la concentration de l'enzyme, sont déjà une étape de purification partielle, c'est notamment le cas des précipitations fractionnées par les sels ou

par les solvants, puisqu'une partie des protéines (dont l'enzyme étudiée), et non toutes les protéines sont précipitées. Toutefois, ces techniques ne sont pas suffisantes, elles doivent être suivies d'autres étapes de purification. La purification est poursuivie par la filtration sur gel, ou par une chromatographie sur résines ou sur celluloses substituées échangeuses d'ions, qui permettent d'absorber des mélanges qu'un solvant convenable élue. Elles permettent de scinder le mélange en ses différents constituants recueillis séparément, à l'aide d'un collecteur de fractions automatique, dans des tubes à essai successifs automatiquement déplacés.

L'apparition en 1959 d'un dextrane modifié: le sephadex, a permis de vulgariser la filtration sur gel, et d'en faire un procédé couramment utilisé au laboratoire, pour fractionner et séparer les molécules suivant leur taille moléculaire. Le gel de ce polysaccharide se présente comme un assemblage tridimensionnel dont la porosité est conditionnée par le nombre de liaisons croisées que l'on introduit artificiellement dans la molécule. Un degré élevé de liaisons croisées donne une structure compacte avec une faible porosité (exemple: sephadex G₂₅, adapté aux tailles moléculaires de l'ordre de 2000 à 5000). Un faible degré de liaisons croisées conduit à une structure hautement poreuse (exemple: sephadex G₂₀₀ pour des poids moléculaires de 50000 à 200000). Sur ces gels, les molécules traversent la colonne verticale à des vitesses différentes, les plus grosses molécules migrent rapidement et

sont exclues les premières. Lorsque toutes les molécules de l'échantillon ont été éluées de la colonne, celle-ci peut être utilisée à nouveau pour une autre expérience, grâce à la régénération automatique du gel.

Lawrence, Fryer et Reiter (20) ont utilisé successivement, les gels de sephadex G₁₀₀ et G₂₀₀ pour purifier les lipases de Pseudomonas fragi, et de Micrococcus freudenreichii. Henderson (42) obtient la lipase d'Anaerovibrio lipolytica, grandement purifiée après un passage sur sephadex G₁₀₀.

La chromatographie par échange d'ions consiste à équilibrer un solide ionisé avec l'ion contraire, lequel sera échangé plus ou moins bien ou plus ou moins vite avec les molécules ionisées que l'on se propose de chromatographier. On peut s'adresser à des échangeurs d'anions ou de cations, modifier le pH et la force ionique du tampon d'éluion. De bons résultats ont été obtenus avec certains dérivés ioniques de la cellulose et du sephadex. Un fractionnement assez sélectif peut être obtenu sur D.E.A.E. cellulose ou diéthylamino-éthyl-cellulose, à pouvoir d'échange anionique. Cette méthode a été utilisée avec succès pour la purification de certaines lipases pancréatiques (121), mais le plus souvent elle se trouve associée avec un autre procédé de purification comme sephadex G₁₀₀ ou G₂₀₀. C'est ainsi qu'ont été purifiées les lipases de Pseudomonas fragi (40) et de Staphylococcus aureus (119). Mencher et Alford (35) ont préféré à ce support, un échangeur d'anions plus faible comme D.E.A.E. se-

phadex, pour purifier la lipase de Pseudomonas fragi.

D'autres types d'échangeurs d'ions ont été essayés en particulier avec les lipases fongiques. Les lipases de Rhizopus arrhizus (117) sont chromatographiées sur une résine de XE₆₄, celles de Mucor javanicus (120) sont absorbées sur carboxy-méthyl cellulose.

Il arrive fréquemment, que les méthodes de purification entraînent une diminution de l'activité de l'enzyme, l'enzyme est d'autant plus fragile, qu'elle est plus pure. Avec Pseudomonas fragi, Mencher et Alford (35) retrouve 18% de l'activité, l'activité spécifique est de 925 unité/mg de protéine (1 unité lipase est la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole d'acide gras d'une suspension de lard à 20% en 1 minute à 35°C), ce qui représente une enzyme purifiée 100 fois par rapport à l'échantillon initial. La lipase d'Anaerovibrio lipolytica (74) en dépit d'une perte importante d'activité (95%), est purifiée une trentaine de fois. Quant à Sarda et coll (121), ils ont purifié la lipase pancréatique de porc 135 fois, ils ont obtenu une activité spécifique de 7000 unités lipase (l'unité lipase est exprimée en μ équiv/min et par mg de protéine), et récupéré 35% de l'activité initiale.

Enfin, l'activité d'une enzyme est augmentée ou diminuée par de nombreux effecteurs; les fractionnements et les diverses chromatographies peuvent donc modifier l'activité en éliminant les effecteurs qui accompagnaient l'enzyme. Wills (122) a montré que la présence d'ions calcium ou magnésium, peut avoir un rôle stabilisateur sur la lipase pancréatique,

si bien que Lawrence, Fryer et Reiter (20), de même que Sarda et coll. (121) ajoutent du chlorure de calcium ou du chlorure de magnésium dans leur préparation bactérienne ou pancréatique.

II. Isolément et purification de la lipase d'Acinetobacter 0₁₆

La bactérie est incubée à 20°C sans agitation, dans un milieu peptoné à 2% additionné de 0.5% d'extrait de levure à pH 6.6. Après 80 à 90 heures d'incubation, les cellules sont éliminées du surnageant par une centrifugation à 22000 g pendant 20 minutes à 4°C. L'enzyme est alors concentrée. Toutes les étapes ultérieures de concentration et de purification seront conduites à 4°C. L'activité sera dosée dans la plupart des cas par la méthode colorimétrique de Nachlas et Seligman (chap. II), et elle sera évaluée par heure à 35°C.

1) Concentration de l'enzyme

Un premier essai par ultrafiltration au travers d'une membrane de collodion sous une pression positive d'azote, s'est révélé peu satisfaisant. En effet, le liquide concentré est sirupeux, l'activité décroît, de plus la lenteur du procédé pour des quantités importantes de liquide nous ont amené à abandonner cette technique, et à opter pour la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium.

Afin de déterminer quelle concentration de sulfate d'ammonium est la plus favorable à la précipitation de l'enzyme, différents pourcentages de ce composé sont ajoutés à diverses

fractions ayant le même volume, et provenant du même surnageant. Toutes ces solutions sont agitées très doucement avec un agitateur magnétique pendant une nuit. Chaque solution est alors centrifugée à 22000 g pendant 30 minutes. Après une dialyse d'une nuit, l'activité est alors dosée, soit dans le surnageant soit dans le culot, ou dans les deux à la fois.

Les essais (tableau no. 15) réalisés avec $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ saturé à 30, 40, 50, 60% montrent que toute l'activité du surnageant n'est pas précipitée à 30 et à 40% de saturation, par contre ce résultat est pratiquement acquis avec une saturation à 50 ou à 60%. Pour trancher entre ces deux concentrations, et établir quel pourcentage de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ est le plus favorable à l'enzyme, il suffit de regarder ce qu'il advient de l'activité au niveau des précipités (tableau no. 16). Dans les deux cas l'activité perdue est relativement élevée, soit 70% pour la précipitation à 50% de saturation, et 85% pour celle à 60% de saturation. Henderson (74) obtient des chiffres comparables avec Anaerovibrio lipolytica. La perte étant plus faible pour une précipitation avec $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ saturé à 50%, cette proportion sera utilisée pour concentrer la lipase d'Acinetobacter 0₁₆ dans les prochaines expériences.

Notons que dans certaines expériences, notamment en présence d'un volume important de surnageant, il a été nécessaire de reprécipiter dans les mêmes conditions, l'enzyme obtenue après une première précipitation par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, afin

Tableau no. 15 - Essais de précipitation de la lipase par le sulfate d'ammonium en utilisant le monogramme de Dixon (116)

Traitement du surnageant	Volume utilisé ml	Activité totale de l'échantillon	Activité du surnageant après la précipitation.	Activité restante
(NH ₄) ₂ SO ₄ à 30% de saturation	60	40	17	40%
(NH ₄) ₂ SO ₄ à 40% de saturation	60	40	5.2	13%
(NH ₄) ₂ SO ₄ à 50% de saturation	60	40	0.52	1.3%
(NH ₄) ₂ SO ₄ à 60% de saturation	60	40	0.13	0.3%

Activité dosée par la méthode colorimétrique de Nachlas et Seligman (Chapitre II), exprimée en μ moles de β naphthol rejeté par ml et par heure à 35°C.

Tableau no. 16 - Précipitation de la lipase par le sulfate d'ammonium (activité du culot redissout et dialysé).

Traitement du surnageant	Volume du surnageant ml	Activité par ml de surnageant	Activité totale du surnageant /mg de protéine	Protéines précipité (mg)	Activité du précipité par ml	Activité totale du précipité /mg de protéines	% de l'activité récupérée
(NH ₄) ₂ SO ₄ à 50% de saturation	100	0.36	4.6	4	1.41	1.41	30%
(NH ₄) ₂ SO ₄ à 60% de saturation.	100	0.36	4.6	14	1.94	0.55	15%

de réduire le plus possible le volume (tableau no. 17). Il est a constaté cependant que cette deuxième précipitation entraîne une nouvelle perte d'activité, de l'ordre de 10 à 12%; perte qui se répercute sur l'activité spécifique et sur le degré de purification obtenues dans les étapes suivantes. Après cette constatation, dans la mesure du possible, la concentration de l'enzyme sera réalisée par une seule précipitation par le sulfate d'ammonium saturé à 50%.

2) Purification de la lipase

a) Sur sephadex G₂₀₀ ou G₁₀₀

Le culot provenant de la précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (une ou deux fois), après avoir été redissout dans le plus petit volume possible d'une solution contenant 0.2 M de NaCl et 0.025 M de MgCl_2 à pH \approx 7, est dialysé une nuit dans de l'eau distillée à 4°C. L'échantillon est alors appliqué sur la colonne sephadex (le mode de préparation des colonnes a été décrit dans le chap. II). Pour une colonne de 2.8 cm de diamètre et de 40 cm de longueur, la quantité d'échantillon appliqué est de 4 à 6 ml, ayant une teneur protéique de 25 à 50 mg. L'élution, par une solution de NaCl (0.2 M) et de MgCl_2 (0.025 M) à pH 6.8, se fait à vitesse constante soit 20 à 25 ml par heure, les fractions récoltées ont un volume de 5.2 ml. Dès leur récupération, les fractions d'éluat sont testées pour leur activité lipasique et leur teneur protéique (fig. no. 10 dans ce cas il y a eu deux précipitations successives (voire le tableau no. 17).

Sur sephadex G₂₀₀, le diagramme (fig. no. 10) montre que

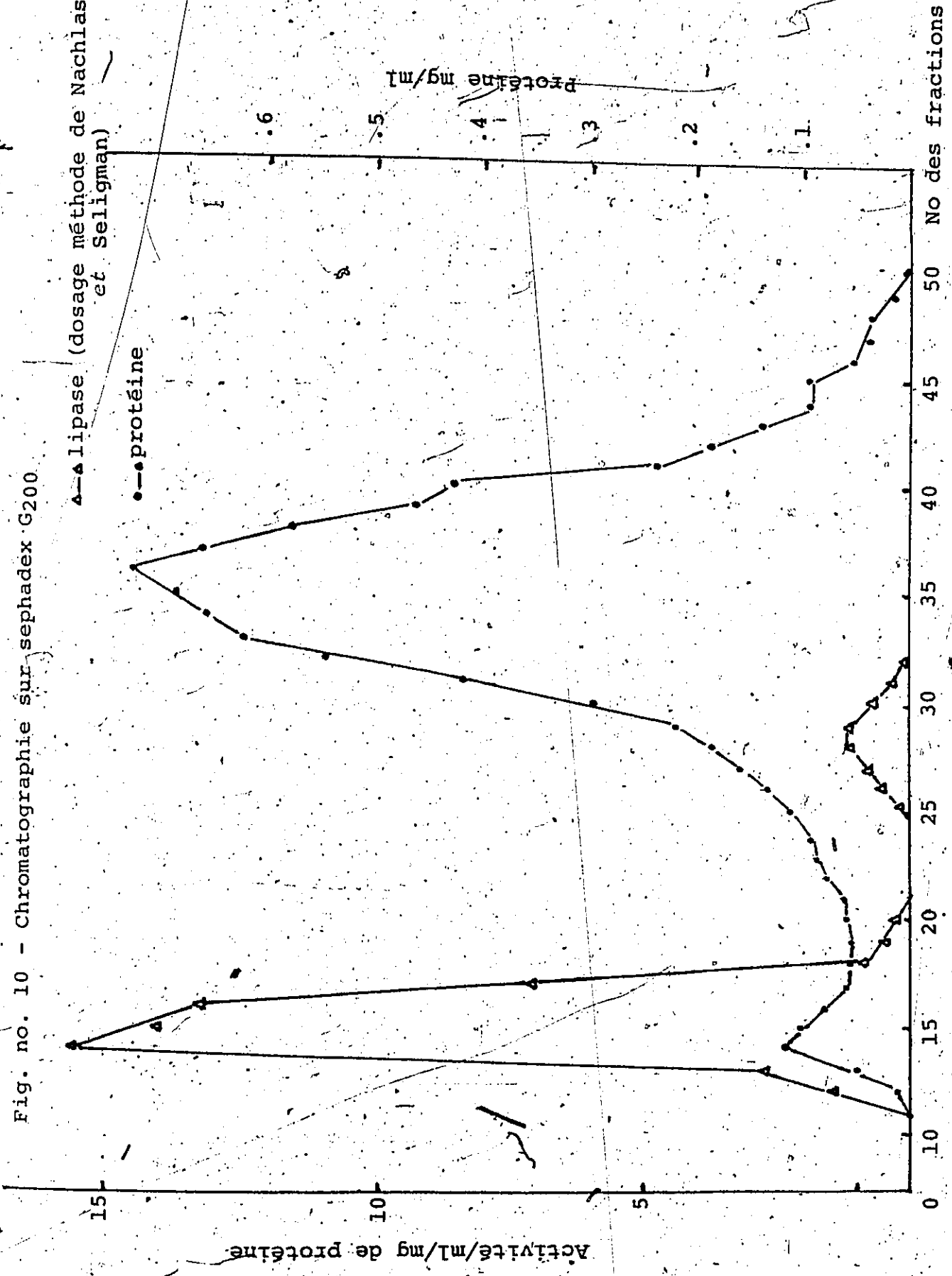
Tableau no. 17 - Comparaison de la purification de la lipase par une ou par deux précipitations par le sulfate d'ammonium saturé à 50%

Fractions	Volume ml	Protéines mg/ml	Activité /ml	Activité totale	Protéines totales	Activité spécifique	Purification
Surnageant de la culture	630	6.81	0.610	384.3	4290	0,089	1
Lipase précipitée par $(NH_4)_2SO_4$ à 50% sat. et dialysée	5.5	11	5.600	30.8	60.5	0.509	6
Activité des fractions après sephadex G200	21	0.158	2.990	62.79	3.318	18.7	210
Surnageant de la culture	5000	6.4	0.720	3600	32000	0.112	1
1ère précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ à 50% sat.	86	3.06	1.664	143	263.16	0.543	5
2ième précipitation à 50% $(NH_4)_2SO_4$ et dialysée	43	7.4	1.977	85	318.2	0.267	2.3
Fractions de sephadex G200	120	0.097	1.429	171.48	11.64	14.7	130

Fig. no. 10 - Chromatographie sur sephadex G200

▲-▲ lipase (dosage méthode de Nachlas et Seligman)

●-● protéine



la lipase est exclue suivant deux pics. Le premier étant beaucoup plus actif que le second. La lipase se comporte donc comme une substance de très haut poids moléculaire, elle est exclue principalement dans le premier volume mort de la colonne. Ce volume de 70 ml a été évalué avec le bleu dextrane, polysaccharide de haut poids moléculaire. Le deuxième pic de moindre importance correspond au deuxième volume mort de la colonne Lawrence, Fryer et Reiter (20) obtiennent également deux pics au cours des purifications des lipases de Pseudomonas fragi et de Micrococcus freudenreichii sur sephadex G₂₀₀.

Avec sephadex G₁₀₀, tout comme avec G₂₀₀, l'activité récupérée après le passage sur la colonne est le double de l'activité appliquée (tableau no. 18); cependant, le degré de purification est deux fois moindre sur G₁₀₀. Là encore, la lipase est élue en grande partie dans le premier volume mort de la colonne.

b) Sur diéthyl-amino-éthyl-cellulose = D.E.A.E. cellulose (produit Sigma)

Les fractions les plus actives provenant du premier pic de sephadex G₂₀₀ sont concentrées et dialysées contre le tampon tris (5×10^{-3} M) et MgCl₂ (3×10^{-3} M) à pH 7.5, qui sert également à l'équilibration de la colonne de D.E.A.E. cellulose. Ces deux opérations de concentration et de dialyse provoquent une perte importante d'activité. Pour 20 ml de solution lipasique provenant de sephadex G₂₀₀ concentrée 6 fois, l'activité passe de 60 à 17.5, soit une perte de 70%.

Tableau no. 18 - Comparaison de la purification de la lipase sur sephadex G₁₀₀ et G₂₀₀

Procédé	Activité /ml	Protéines mg/ml	Volumes ml	Activité totale	Protéines totales	Activité spécifique	Purification
Surnageant de la culture	0.50	5.4	600	301.8	3.240	0.09	1
Lipase précipitée par (NH ₄) ₂ SO ₄ à 50% et dialysée	4.62	5.5	4	18.5	22	0.84	9
Activité des fractions après sephadex G ₁₀₀	1.24	0.18	30	37.32	5.5	6.78	73
Surnageant de la culture	0.61	6.81	630	384.3	4290	0.081	1
Lipase précipitée par (NH ₄) ₂ SO ₄ à 50% et dialysée	5.60	11	5.5	30.8	60.5	0.50	6
Activité des fractions après sephadex G ₂₀₀	2.99	0.151	21	62.79	3.3	18.7	210

Un échantillon de 5 ml, traité comme décrit ci-dessus, possédant une activité totale de 29 (μ moles de β naphthol rejeté par heure à 35°C) est appliqué sur une colonne de D.E.A.E. cellulose de 0.9 cm de diamètre et de 15 cm. de longueur. L'élution par différentes concentrations de chlorure de sodium (de 0.05 M à 1 M) réparties dans le tampon tris $MgCl_2$, n'exclue aucune fraction lipasique de la colonne. L'enzyme n'est cependant pas détruite, puisque le contenu de la colonne incubé en présence de naphthyl laurate révèle une très forte activité.

Diverses investigations ont été poursuivies au niveau du gel et de l'enzyme. Dans le premier cas, l'absence ou le traitement de l'échangeur anionique (123) par l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de soude, l'augmentation ou l'abaissement du pH du tampon tris $MgCl_2$ à 8 et 7 respectivement, ne modifient en rien les résultats précédemment obtenus; l'enzyme reste absorbée sur le diéthyl-amino-éthyl-cellulose.

Dans une deuxième série d'essais, l'échantillon enzymatique est traité avec un détergent le triton X_{100} (ou alkylaryl polyether alcohol), composé utilisé très souvent pour solubiliser les membranes. Les résultats (tableau no. 19) montrent une augmentation de l'activité de la solution enzymatique en présence de triton X_{100} . A priori ce détergent peut agir à deux niveaux différents, soit au niveau de l'enzyme en la libérant des molécules étrangères qui sont liées ou associées à elle, soit au niveau du substrat en favorisant

Tableau no. 19 - Action du triton X₁₀₀ sur la lipase
partiellement purifiée (sephadex G₂₀₀)

Solution enzymatique + Triton X ₁₀₀ (%tage du triton)	temps d'incubation en minute à 0°C	Activité/ml à 37°C par heure (Naphtyl laurate)
Echantillon seul	40	0.84
	80	0.84
Ech + Triton X ₁₀₀ = 0.5%	40	1.69
	80	2.10
= 1%	40	2.33
	80	2.33
= 2.5%	40	1.94
	80	2.05
= 5%	40	1.33
	80	1.49

Activité dosée suivant la méthode de Nachlas et Seligman
(Chap. II).

Ech. = échantillon

sa solubilité.

Un échantillon enzymatique de 4 ml, est traité avec du triton X₁₀₀, puis appliqué à une colonne de D.E.A.E. cellulose équilibrée avec le tampon Tris (5×10^{-3} M) et MgCl₂ (3×10^{-3} M) à pH 7.5. L'éluion par différentes concentrations de chlorure de sodium réparti dans le tampon tris MgCl₂, permet d'obtenir un pic lipasique qui est exclu avec le tampon sans chlorure de sodium, ainsi la solution enzymatique traitée par le triton X₁₀₀ n'est pas absorbée sur l'échangeur anionique. Par contre, d'autres protéines sont retenues, et elles ne sortent que pour des molarités de chlorure de sodium de .1 ou de .3. La purification est améliorée (tableau no. 20), et 50% à 60% de l'activité appliquée sont exclus de la colonne, ce qui indique qu'une partie de l'enzyme reste attachée à l'échangeur d'ions, même après une éluion avec 1 M de NaCl. Si l'échangeur anionique est incubé avec le naphtyl laurate, une activité est détectée. L'introduction d'une molécule étrangère; le triton X₁₀₀, auprès de la lipase rend l'étude de cette dernière possible, mais complique la purification.

c) Sur diéthyl-amino-éthyl-sephadex = D.E.A.E. sephadex (produit Sigma)

L'échangeur anionique est équilibré avec le tampon tris (5×10^{-3} M) et MgCl₂ (3×10^{-3}) à pH 7.5. Un échantillon de 5 ml contenant 2.375 mg de protéines, provenant d'une première purification sur G₂₀₀ (tableau no. 21), est appliqué sur une colonne de D.E.A.E. sephadex de 0.9 cm de diamètre

Tableau no. 20 - Purification des fractions lipasiques provenant du premier pic de sephadex G₂₀₀ sur Diéthyl-amino-ethyl-cellulose

Fractions	Activité/ml	Protéine mg/ml	Activité totale	Activité spécifique (μ moles de β nâphtol rejeté par heure à 35°C par mg protéine)	Purification
sephadex G ₂₀₀	1,47				
sephadex G ₂₀₀ , concentré, dialysé	2,28	0,59	3,4	3,8	1,1
+ Triton X100.1%					
Fractions de D.E.A.E. cellulose	0,82	0,08	1,64	10,2	2,6

Activité dosée par la méthode colorimétrique de Nachlas et Seligman (Chap. II).

Tableau no. 21 - Procédé de purification de la lipase d'Acinetobacter 0₁₆

Procédé	Volume ml	Activité /ml	Protéine mg/ml	Activité totale	Protéines totale mg	Activité spécifique	Purification
Surnageant de la culture	630	a) 0.610	6.81	384.3	4290	a) 0.089	1
		b) 86.6				b) 12.4	
Lipase précipitée par (NH ₄) ₂ SO ₄ à 50% et dialysée	5.5	a) 5.60	11	30.8	60.5	a) 0.511	5.7
		b) 806.6				b) 73.3	5.8
Fractions de sephadex G ₂₀₀	21	a) 2.99	0.158	62.79	3.31	a) 18.7	210
		b) 1179				b) 2482	200
Fractions de sephadex G ₂₀₀ concentrées et dialysées	5	a) 5.346	0.475	26.7	2.37	a) 11.24	127
		b) 673.3				b) 1417	114
Fractions de D.E.A.E. sephadex 2ième pic	4	a) 2.22	0.102	8.88	0.40	a) 22.12	250

a) activité dosée par la méthode colorimétrique de Nachlas et Seligman (chap. II)

b) activité dosée par la méthode photométrique de Lippi (substrat huile d'olive) (chap. II)

par 15 cm de longueur. L'élution se fait d'une façon discontinue en employant le même tampon que pour l'équilibration de la colonne, auquel on ajoute du chlorure de sodium à molarité croissante. Un premier pic de très faible activité (0.42) est exclu à une molarité de NaCl de 0.3. Le deuxième pic possède une forte activité lipasique (8.8), il est libéré par 0.4 M de NaCl. L'activité spécifique et le degré de purification obtenu dans ce dernier cas sont donnés dans le tableau no. 21. L'activité libérée de la colonne est voisine de 45%.

Enfin dans une dernière série d'essais, les activités lipasique et estérasique ont été recherchées simultanément aussi bien dans l'échantillon placé sur la colonne de D.E.A.E. sephadex que dans les pics élués de cette dernière. Les résultats (tableau no. 22) mettent en évidence l'existence de 3 pics doués d'une activité estérasique plus ou moins intense. Le premier pic exclu avec 0.3 M de NaCl, possède l'activité estérasique la plus forte, ce même pic possède une très légère activité lipasique. Inversement le deuxième pic est doué d'une forte activité lipasique, et son activité estérasique est très faible. Enfin le troisième pic élué par 0.5 M de NaCl ne possède que l'activité estérasique.

d) Essais de vérification de l'état de pureté des échantillons provenant de sephadex G₂₀₀ et de D.E.A.E. sephadex. Le plus souvent on utilise deux méthodes: l'ultracentrifugation et l'électrophorèse.

Dans le cas de l'ultracentrifugation deux essais ont été

Tableau no. 22 - Dosage des activités estérasique et lipasique au cours de la purification sur D.E.A.E. sephadex

Fractions	Activité lipasique		Activité estérasique	
	Activité/ml totale	Activité spécifique	Activité/ml totale	Activité spécifique
Surnageant de la culture	0.72	0.11	0.30	0.04
Fractions de sephadex G200 concentrées et dialysées	7.8	3.76	1.76	0.85
Fractions de D.E.A.E. sephadex				
1er pic (.3M)	0.03	0.16	0.12	2.23
2ième pic (.4M)	0.63	3.3	0.01	0.27
3ième pic (.5M)	0.0	0	0.03	0.81

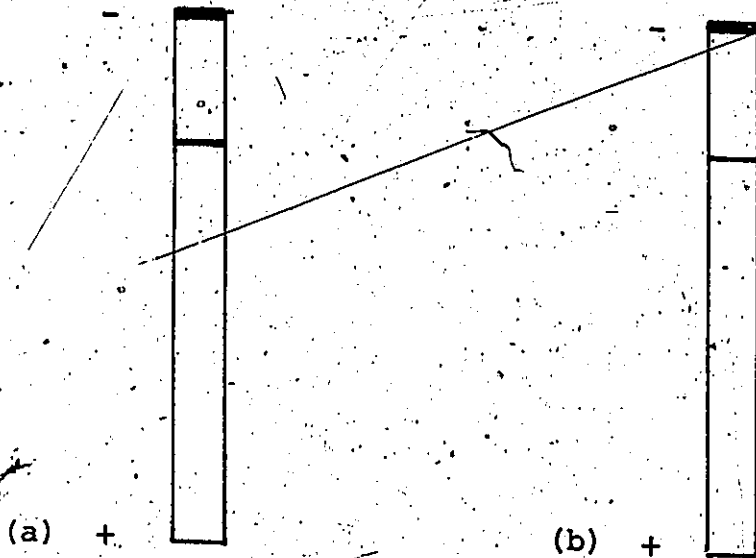
Activité dosée à 35°C suivant la méthode colorimétrique de Nachlas et Seligman (Chap. II).

effectués avec les fractions provenant de sephadex G₂₀₀. Les fractions sont concentrées (2 mg. de protéines par ml de solution de NaCl 0.2 M et MgCl₂ 0.025 M) et elles sont centrifugées à 58000 R.P.M. à 20°C dans une ultracentrifugeuse Beckman modèle E. Lorsque la vitesse maximum a été atteinte, des photographies sont prises toutes les 8 minutes; ces photographies ont révélé l'existence de 3 ondes, dont 2 migrent très rapidement, alors que la troisième est beaucoup plus lente. Ces faits ont démontré l'hétérogénéité de l'échantillon provenant de sephadex G₂₀₀, ce qui n'avait pas pu être démontré par une électrophorèse ordinaire.

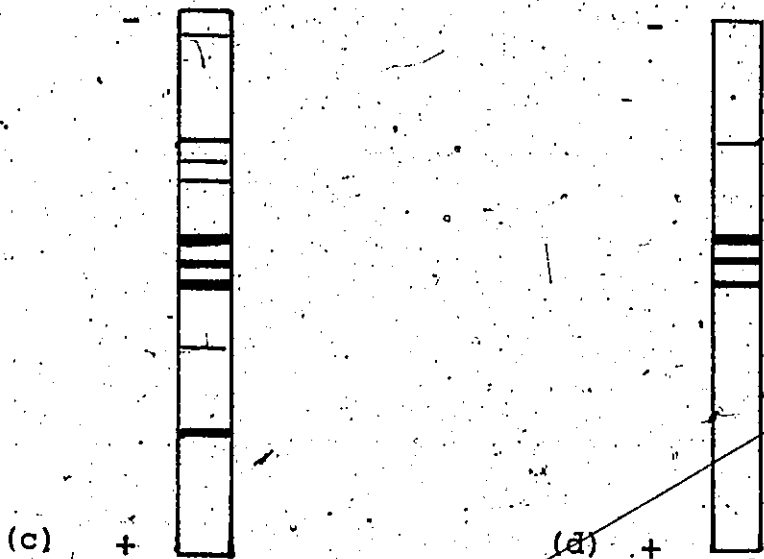
Les gels de polyacrylamide transparents sont d'excellents supports électrophorétiques et permettent d'obtenir une résolution très fine.

— L'électrophorèse simple (chap. II) après la coloration des protéines par le noir amide, révèle la présence d'une seule bande qui migre très lentement; cependant une partie importante des protéines (0.100 mg par gel) appliquées au sommet du gel ne pénètre pas dans le gel, et reste à la surface de ce dernier (fig. no. 11). Les mêmes observations sont faites (fig. no. 11) lorsque les gels sont incubés en présence de naphtyl laurate pour la détection de la lipase (chap. II). Que la concentration du gel soit abaissée de 7 à 5.5%, que le tampon borate (acide borique 7.2 g/l + borate de sodium 15.75 g/l) soit remplacé par un tampon glycine ou un tampon au phosphate de sodium, ne modifie en rien les résultats obtenus. Il est probable que cette absence de mobi-

Fig. no. 11 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ordinaire (a) et (b), en présence de S.D.S (c) et (d).



Echantillon provenant de sephadex G200. Quantité de protéines appliquées 0,100 mg par gel. Mise en évidence des protéines (a), mise en évidence de l'activité (b). Migration de haut vers le bas.



Echantillon provenant de sephadex G₂₀₀; quantité de protéines 0,080 mg par gel.

Echantillon provenant de D.E.A.E. sephadex. Quantité de protéines 0,050 mg par gel.

lité provient de la présence des molécules non protéiques associées aux molécules protéiques. Hassing en 1971 (37) a rencontré les mêmes difficultés avec la lipase de Corynebacterium acnes purifiée sur sephadex G₁₀₀.

Le traitement de l'échantillon à analyser par du S.D.S. (Sodium Dodecyl sulfate) et son électrophorèse sur un gel de polyacrylamide contenant ce composé (méthode décrite par Weber et Osborn (79)) permettent d'observer la mobilité des protéines, malheureusement l'activité lipasique est détruite après un tel traitement. L'électrophorèse, dans les conditions décrites ci-dessus, du matériel provenant de sephadex G₂₀₀ montre l'existence de plusieurs bandes dont 4, plus importantes que les autres (fig. no. 11). Le même traitement effectué sur le pic lipasique majeur exclu de D.E.A.E. sephadex permet de détecter la présence de 3 bandes. L'électrophorèse simultanée des échantillons et de protéines standard de poids moléculaire connu, a permis de déterminer approximativement le poids moléculaire des 3 bandes soit 34 à 35000, 42 à 43000, et 49 à 50000. Il apparaît donc que même après purification sur sephadex G₂₀₀ et sur D.E.A.E. sephadex, l'échantillon lipasique n'est pas homogène.

3) Discussion

Les méthodes de purification entraînent très souvent une diminution de l'activité enzymatique; ainsi la première étape de concentration et de purification partielle de la lipase d'Acinetobacter 0₁₆ par le sulfate d'ammonium, est accompagnée d'une perte importante de l'activité initiale

soit 70%. Cependant, l'enzyme représentée par l'activité des 30% restants, est totalement précipitée par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturé à 50%. Les pertes sont probablement dues à la technique utilisée, et non pas à la présence d'une autre enzyme la protéinase; comme l'ont démontré Mencher et Alford (35) et Lawrence, Fryer et Reiter (20) la protéinase présente dans l'extrait de la lipase de Pseudomonas fragi est responsable d'une partie des pertes de l'activité.

Acinetobacter 0₁₆ cultivé sur un milieu gelosé au lait, se développe très lentement et ne provoque pas l'hydrolyse du lait, donc la bactérie semble dépourvue de protéinase.

Sur les colonnes de sephadex G₁₀₀ et G₂₀₀, le degré de purification augmente très fortement, et dans les deux cas l'activité récupérée à la sortie de la colonne est supérieure à l'activité appliquée au sommet de cette colonne (tableau no. 18). Cette augmentation de l'activité pourrait s'expliquer par la rétention de contaminants de faible poids moléculaire qui pourraient inhiber ou détruire l'enzyme.

La lipase précipitée par le sulfate d'ammonium est éluée de la colonne sephadex G₂₀₀ suivant deux pics. Le premier pic contenant la majeure partie de l'activité se comporte comme un composé de très haut poids moléculaire. Toutefois une migration aussi rapide de cette fraction lipasique sur sephadex G₂₀₀ semble manifestement anormale. On peut donc émettre les hypothèses que la lipase après sa précipitation par le sulfate d'ammonium est polymérisée, ou mieux encore, qu'elle a contracté une association plus ou moins stable,

avec d'autres molécules. Lawrence et al (20) avec Pseudo-
monas fragi et Micrococcus freudenreichii, émettent également
ces deux hypothèses pour expliquer la présence des deux pics
rencontrés dans chaque cas; ces pics correspondent à des
composés de poids moléculaire de 250000 pour le premier et
de 25000 pour le second. Quant à Sarda et coll (121) ils
ont obtenu avec la lipase pancréatique de porc après un pas-
sage sur sephadex G₂₀₀, une lipase "rapide" de haut poids
moléculaire qui peut être convertie en une forme lente par
un traitement réputé pour scinder les lipoprotéines (121).

Cette deuxième hypothèse d'une association de la lipase
avec d'autres molécules est séduisante, elle nous est apparue
comme la plus probable par suite des difficultés rencontrées,
notamment avec la chromatographie sur D.E.A.E. cellulose,
et la nécessité de traiter l'échantillon avec un détergent
afin d'obtenir son élution, et également par suite de l'im-
possibilité d'obtenir une bonne électrophorèse sur gel de
polyacrylamide ordinaire, c'est à dire sans le traitement
par le S.D.S.⁹ De plus les derniers travaux de Henderson (43)
ont démontré très clairement que la lipase d'Anaerovibrio
lipolytica qui se comporte sur sephadex G₁₀₀ comme un composé
de poids moléculaire supérieur à 100000, est associée à des
phospholipides. Donc, il reste à démontrer la validité de
l'hypothèse d'une association de molécules lipidiques à la
lipase d'Acinetobacter O₁₆. Les fractions concentrées pro-
venant de sephadex G₂₀₀ ont donc été soumises à une extraction
lipidique suivant la méthode Bligh et Dyer (80). L'échantillon

lipidique récupéré est identifié par chromatographie sur couche mince de silica gel. Une fraction des lipides extraits sont des lipides neutres, l'autre fraction correspond à des phospholipides. Parmi ces derniers, deux taches ont été obtenues, dont le phosphatidyl glycérol. Cette détermination bien qu'uniquement qualitative, permet de confirmer l'hypothèse émise, et d'expliquer les échecs rencontrés avec l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ordinaire, et avec la chromatographie sur D.E.A.E. cellulose, qu'on ne peut réaliser qu'avec un échantillon dépourvu de lipides (124).

Le traitement de l'échantillon lipasique, avant ou après son passage sur sephadex G₂₀₀, par l'acétone n'a pas permis d'améliorer la purification. L'utilisation combinée de deux solvants comme l'éther et l'éthanol, provoque une perte d'activité de l'ordre de 75%. Par suite, il a été impossible de démontrer que la lipase, débarrassée du matériel lipidique qui lui est plus ou moins fortement associé, est éluée dans le deuxième volume mort de la colonne de sephadex G₂₀₀, et qu'elle correspond au deuxième pic d'activité élué de cette colonne.

La purification sur D.E.A.E. sephadex n'apparaît pas pleinement satisfaisante. Il est probable que le matériel lipasique est toujours plus ou moins associé à des lipides, par suite de l'impossibilité d'obtenir une migration électrophorétique des protéines issues du pic lipasique majeur. Sur D.E.A.E. sephadex, sur un gel de polyacrylamide ordinaire,

De plus, contrairement au gel sephadex G₂₀₀, l'activité appliquée au sommet de la colonne D.E.A.E. sephadex n'est pas intégralement récupérée à la sortie de la colonne. Les pertes sont élevées car voisines de 55 à 60%.

Enfin, au fur et à mesure que le degré de purification de la solution lipasique croît, l'activité estérasique qui lui est associée décroît; malheureusement comme l'échantillon lipasique est constitué de plusieurs protéines même après D.E.A.E. sephadex, il est impossible d'affirmer avec certitude que la lipase possède une légère activité estérasique.

III. Etude de quelques propriétés de la lipase d'Acinetobacter 0₁₆

Au cours de l'étude des caractéristiques d'une enzyme, certaines propriétés sont préférentiellement étudiées. Parmi celles-ci, citons: les courbes d'activité en fonction du temps et de la concentration de l'enzyme, le rôle du pH et de la température sur l'activité et sur la stabilité de l'enzyme. Ces propriétés peuvent être étudiées, soit sur la solution enzymatique à l'état brut, c'est à dire sur une solution non purifiée, soit sur un échantillon enzymatique plus ou moins pur.

Avant de décrire les résultats obtenus avec Acinetobacter 0₁₆, rappelons que dans l'introduction nous avons décrit quelques propriétés d'autres lipases bactériennes et par conséquent ce sujet ne sera pas redécrit ici. L'activité sera dosée suivant les cas, d'après la méthode colorimétrique de

Nachlas et Seligman ou d'après la méthode photométrique de Lippi (chap. II). La solution enzymatique à l'état brut correspond au surnageant d'une culture d'Acinetobacter O₁₆ qui s'est développée dans le milieu peptone 2% additionné de 15% d'extrait de levure à pH 6.6 et qui a été incubé à 20°C sans agitation. La solution enzymatique partiellement purifiée provient du pic lipasique majeur recueilli après le passage sur D.E.A.E. sephadex qui est lui même précédé par un passage sur sephadex G₂₀₀ (tableau no. 22).

1) Activité lipasique de l'extrait brut (surnageant) en fonction de la concentration de la solution enzymatique ou du temps.

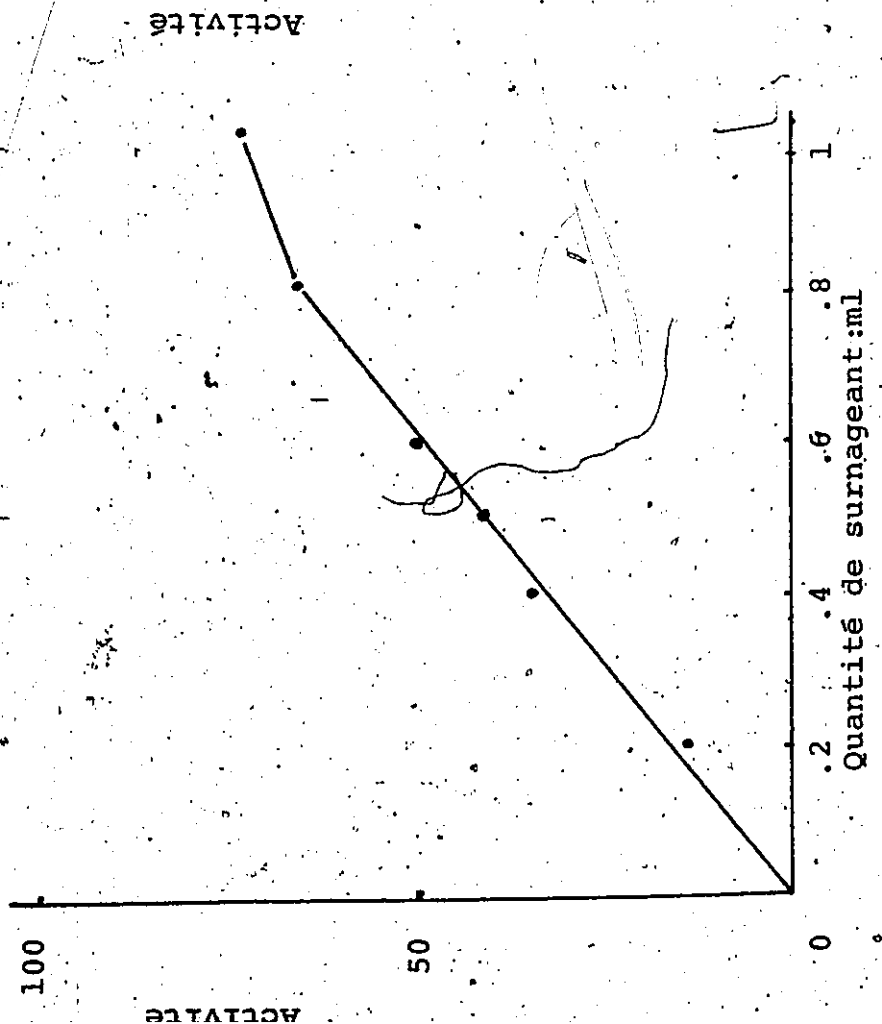
L'examen de la figure no. 12 (courbe d'activité en fonction de la concentration) suggère les quelques remarques suivantes.

Aux erreurs d'expériences près, les points obtenus pendant cette série de mesures sont en ligne droite. La droite s'infléchit légèrement dans le cas du dosage par la méthode de Lippi, et ce, pour une quantité de 1 ml de surnageant, ce qui n'est pas observé avec la méthode de Nachlas et Seligman. Dans les conditions de l'expérience, l'activité est proportionnelle à la quantité d'enzyme en jeu, alors que les quantités utilisées varient près de 5 fois.

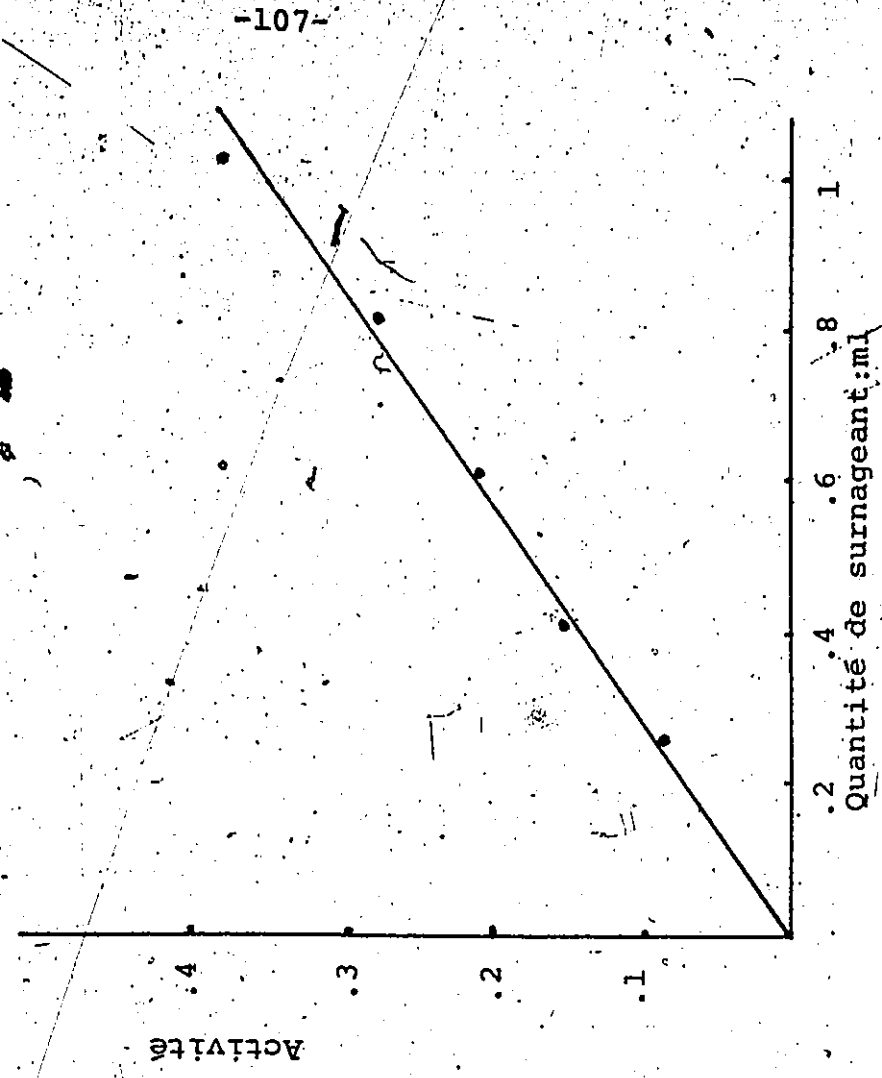
La figure ~~no~~ 13 montre les courbes d'activité obtenues en fonction du temps à 35°C. Pour une période d'incubation comprise entre 10 et 60 minutes, tous les points s'inscrivent sur une ligne droite, et ce, avec les deux méthodes de dosage.

Fig. no. 12 - Activité lipasique en fonction de la concentration de la solution enzymatique (surnageant)

a) Méthode de Lippi



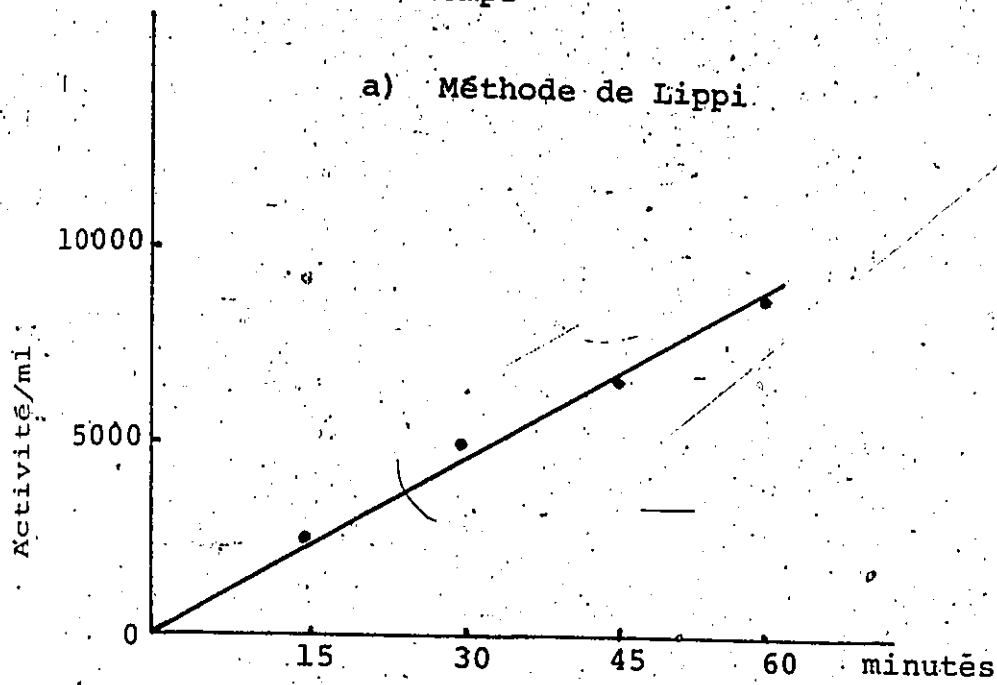
b) Méthode de Nachlas et Seligman



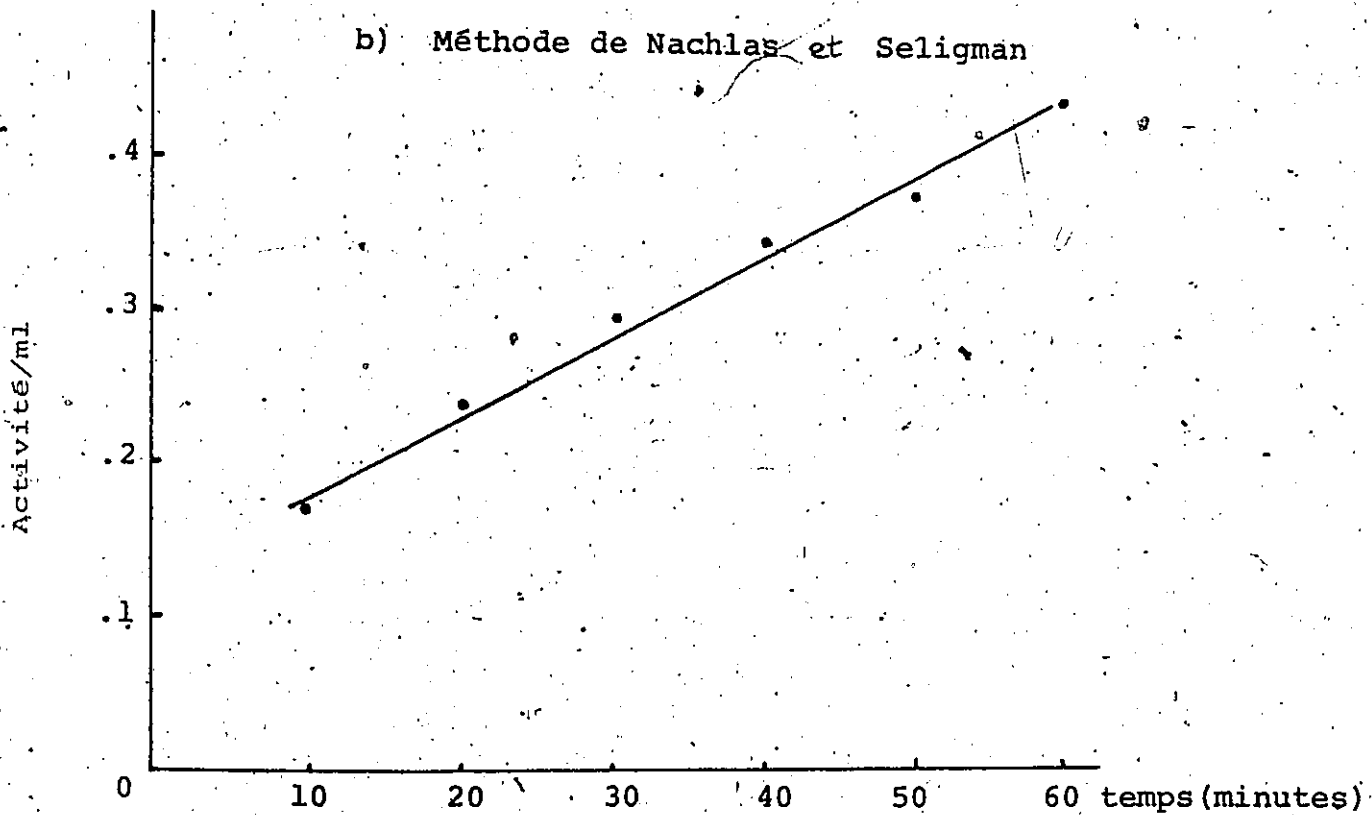
a) Activité = μ moles d'acides gras rejetés / minute à 35°C

b) Activité = μ moles de β naphтол rejeté / heure à 35°C

Fig. no. 13 - Activité lipasique du surnageant en fonction du temps



a) Activité = μ moles d'acides gras par ml à 35°C



b) Activité = μ moles de β naphthol rejeté par ml

Tout au long de notre étude, la période d'incubation choisie a été de 30 minutes pour les deux types de dosage, la quantité d'enzyme a l'état brut de 0.25 à 0.5 ml suivant l'intensité de l'activité.

2) Action du pH sur l'activité lipasique (dosage par la méthode de Lippi)

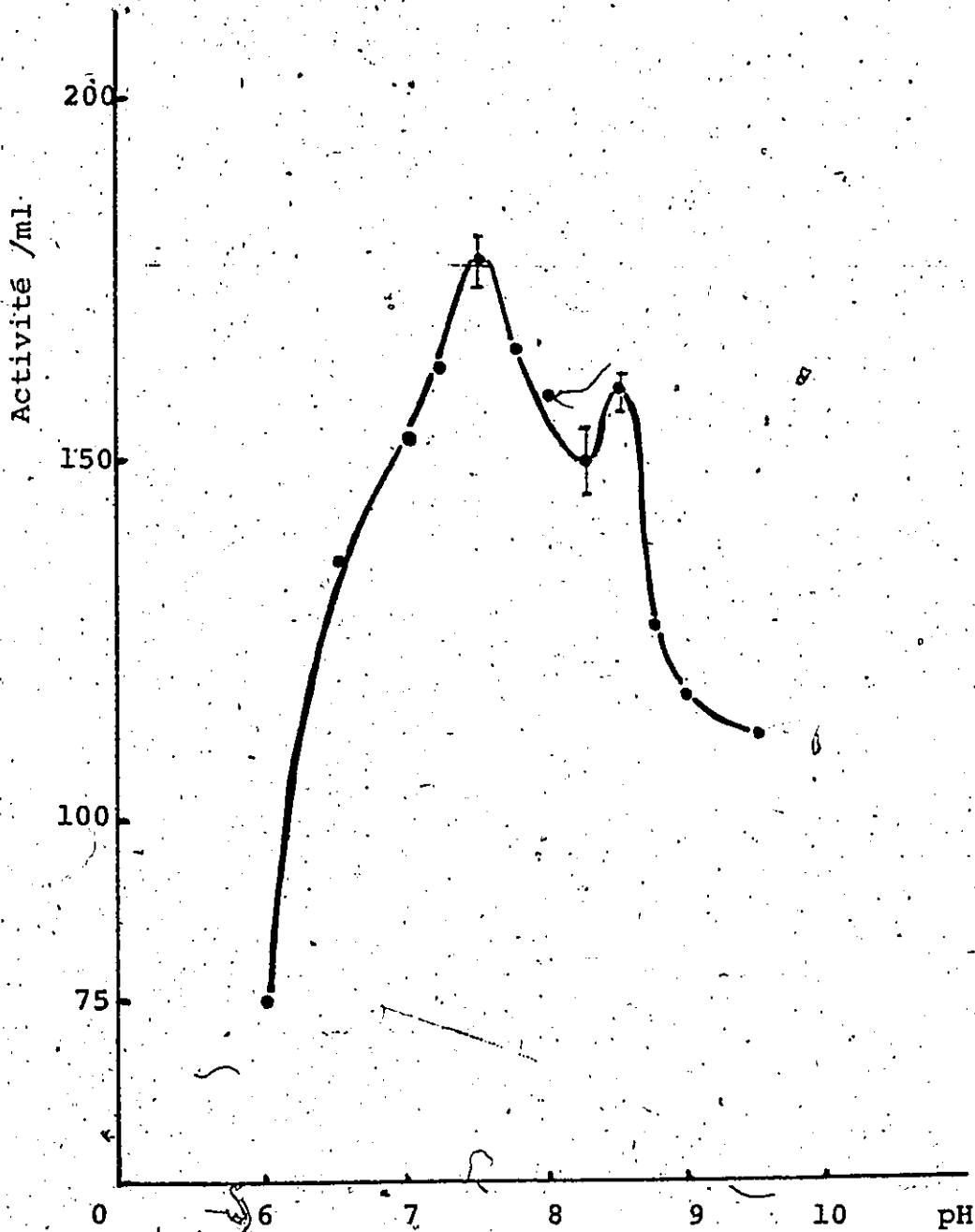
a) La courbe d'activité du surnageant (fig. no. 14), en fonction du pH montre que l'activité, faible à pH 6, passe par un premier optimum à pH 7.5, un minimum à pH 8.25 et un deuxième optimum à pH 8.5. L'activité se poursuit au delà de pH 9. L'activité du premier optimum (pH 7.5) est supérieure à celle du second. Le calcul de l'intervalle de confiance pour chacune de ces trois valeurs montre que ces 3 valeurs sont significativement différentes (fig. no. 14).

b) La courbe d'activité de l'enzyme (35 µg de protéines/ml) partiellement purifiée (sur sephadex G₂₀₀ et D.E.A.E. sephadex) en fonction du pH (fig. no. 15), présente un seul optimum compris entre pH 8.25 et 8.5. L'activité est encore très nette à pH 9.

3) Action de la température sur l'activité (dosage suivant la méthode de Lippi)

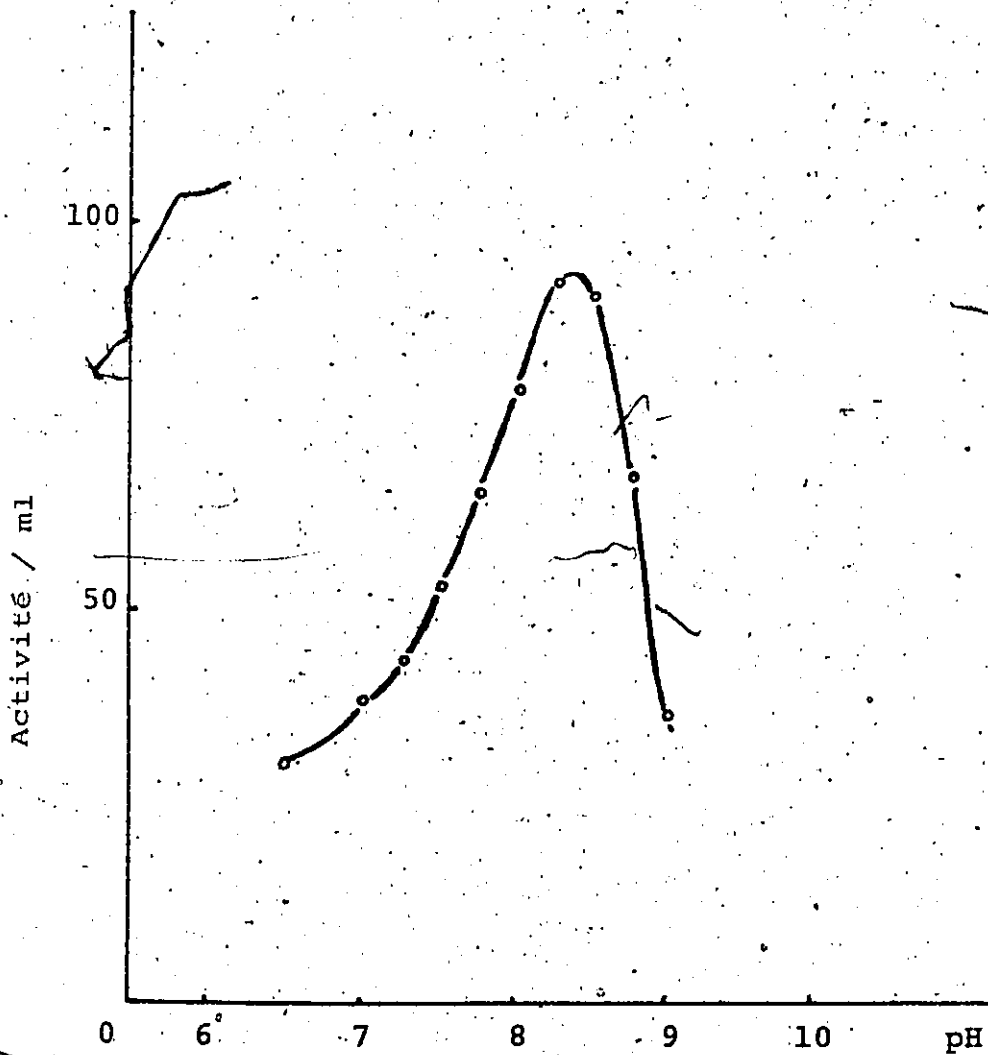
a) Activité du surnageant en fonction de la température d'incubation du substrat et de l'enzyme (fig. no. 16). L'activité est déjà importante à 15°C, elle se poursuit au delà de 40°C, avec un optimum à 35°C. Le même type d'expérience a été réalisée avec une souche d'Acinetobacter lipolytique mésophile qui peut croître à 37°C, et qui a été isolée

Fig. no. 14 - Action du pH sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase du surnageant de la culture d'Acinetobacter 0₁₆



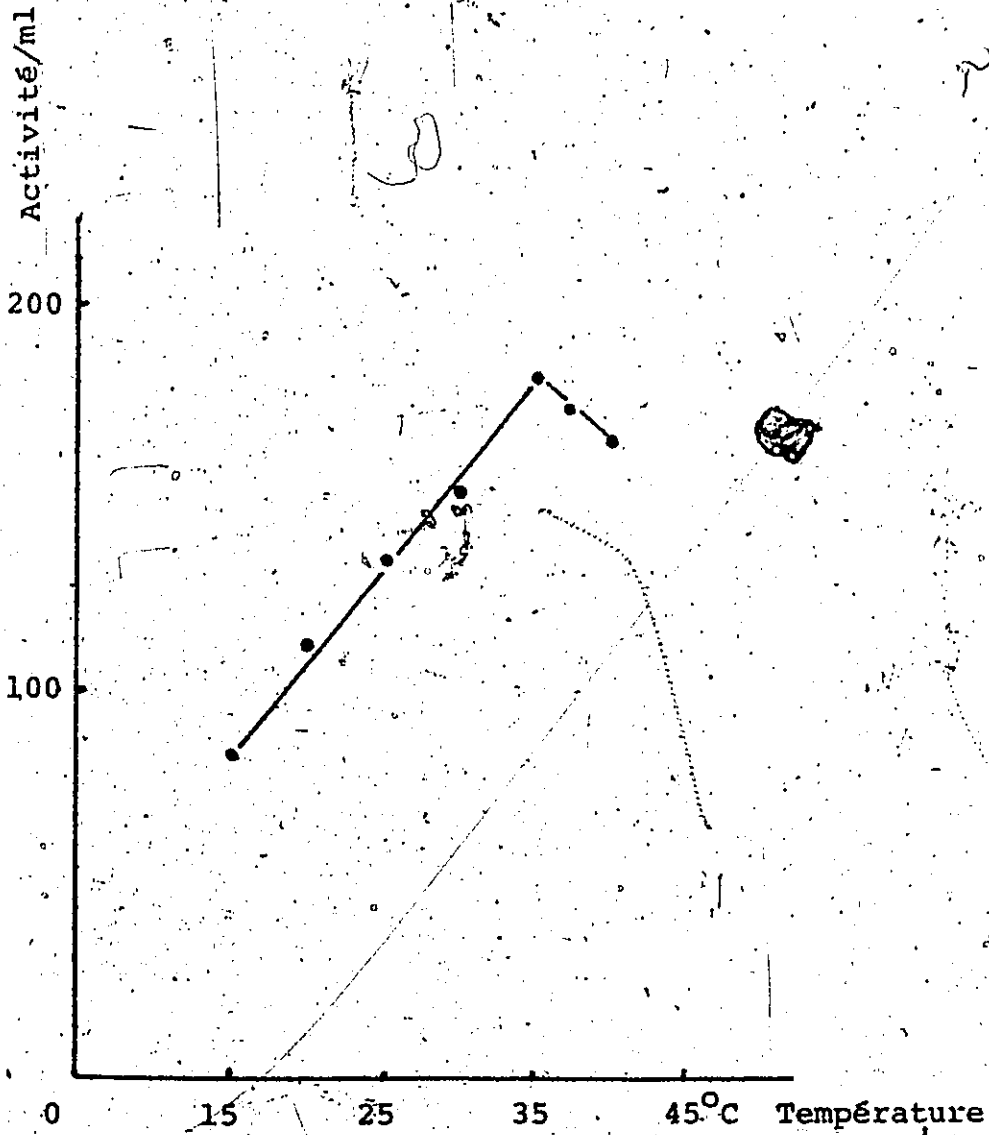
Activité exprimée en μ moles d'acides gras rejetés par ml de surnageant et par minute

Fig. no. 15 - Action du pH sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase partiellement purifiée



Activité exprimée en μ molés d'acides gras rejetés par ml d'enzyme et par minute.

Fig. no. 16 - Action de la température sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase du surnageant.



Activité exprimée en μ moles d'acides gras rejetés par ml et par minute.

du même échantillon de sédiment qu'Acinetobacter 0₁₆. Dans ce cas là l'optimum est à 37.5°C (tableau no. 23), cependant à 35 et à 40°C l'activité est très voisine de l'optimum. L'optimum d'activité entre une souche psychrophile facultative et une souche mésophile est peu différent. La majorité des lipases microbiennes ont un optimum de température compris entre 35°C et 40°C.

b) L'activité de l'enzyme (40 µg de protéines par ml) provenant de D.E.A.E. sephadex en fonction de la température (fig. no. 17), montre un optimum entre 30 et 33°C. L'optimum est peu différent entre l'extrait brut et l'enzyme partiellement purifiée; par contre l'activité décroît beaucoup plus rapidement entre 35°C et 40°C avec l'échantillon de lipase partiellement purifié.

4) Rôle de la température sur la stabilité de la lipase (dosage par la méthode de Lippi)

Les échantillons de 1 ml de surnageant ou de 1 ml d'enzyme partiellement purifiée (40 µg de protéines par ml), sont placés dans des tubes à essais, ces tubes sont incubés à la température désirée. Après différents temps d'incubation les tubes sont retirés et plongés dans la glace. L'activité est dosée suivant la méthode de Lippi à 35°C pour le surnageant et à 32.5°C pour l'enzyme partiellement purifiée.

a) Stabilité de l'extrait brut (fig. no. 18)

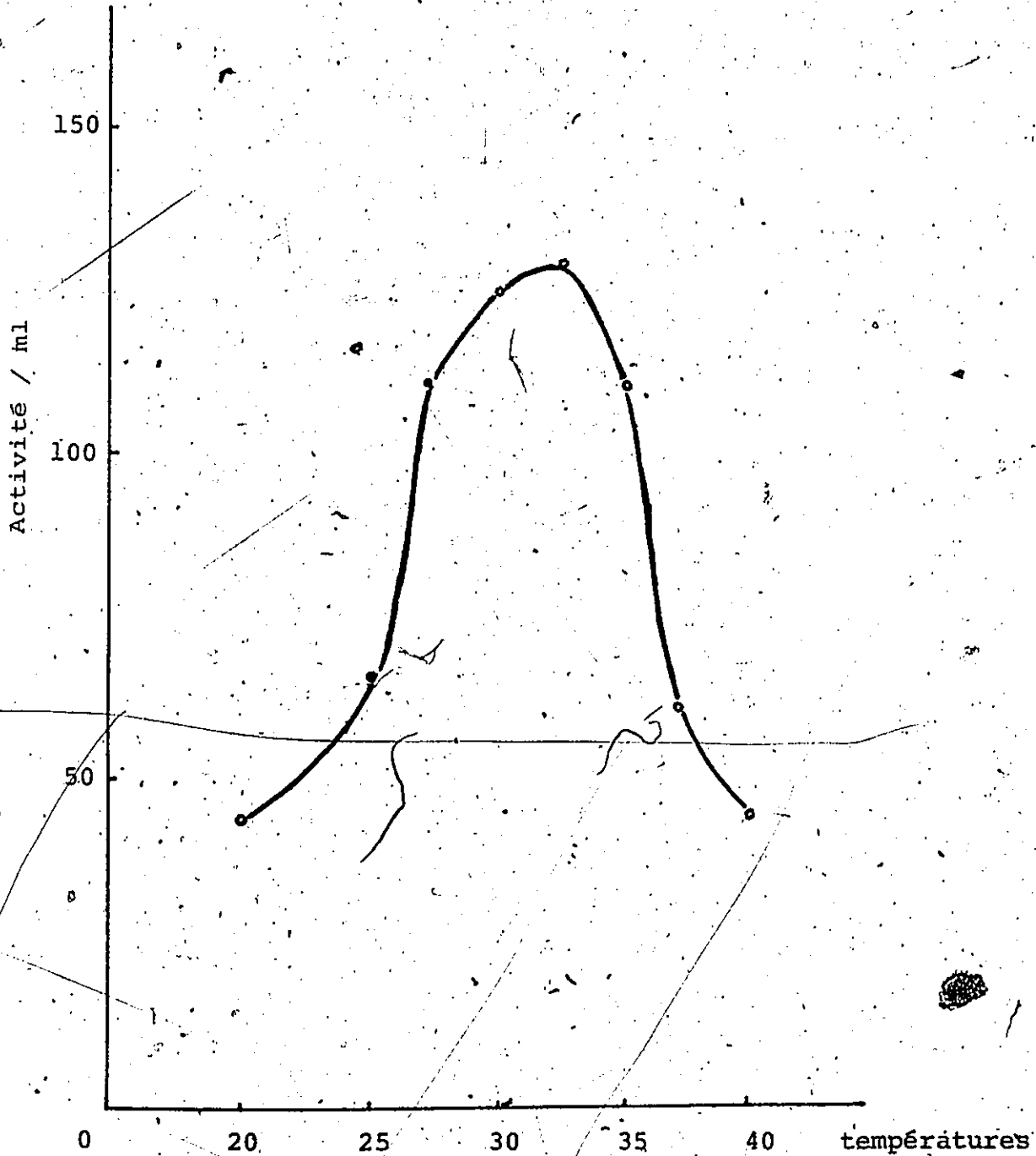
L'enzyme est relativement stable à 25°C et même à 35°C. Ainsi la perte d'activité, après une incubation de 30 minutes à 35°C, est seulement de 15%. C'est seulement à 50°C que

Tableau no: 23 - Action de la température sur l'hydrolyse
de l'huile d'olive en émulsion par la lipase d'un
Acinetobacter mésophile

Température d'incubation	Activité / ml de surnageant par minute
30°C	33
35°C	50
37,5°C	53,3
40°C	50
42,5°C	40

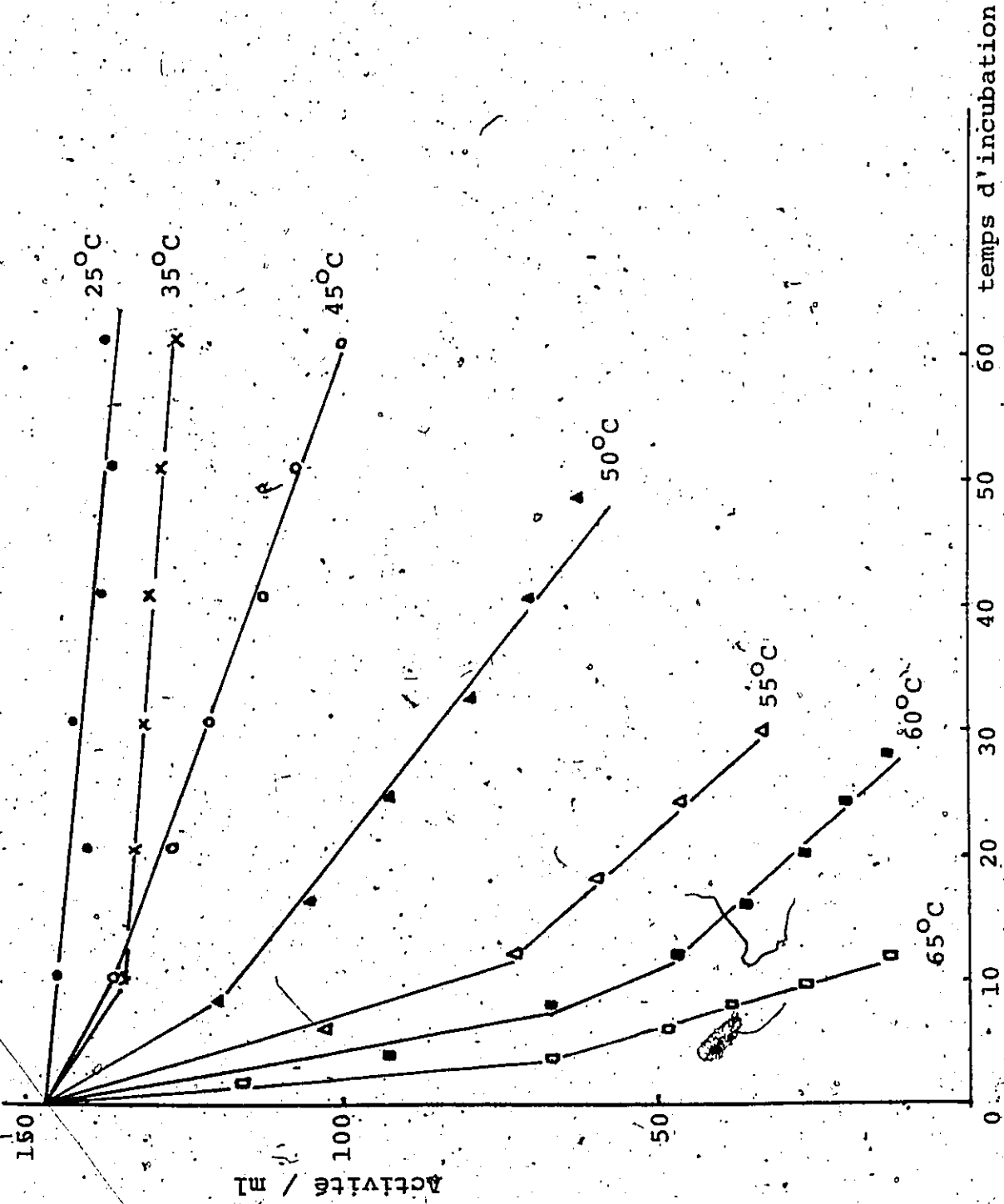
Culture développée dans un milieu peptone 2% plus extrait
de levure 0,15% à pH 6,6, incubation à 20°C.

Fig. no. 17 - Action de la température sur l'hydrolyse de l'huile d'olive en émulsion par la lipase partiellement purifiée.



Activité exprimée en μ moles d'acides gras rejetés par ml et par minute.

Fig. no. 18 - Thermostabilité de la lipase du surnageant



Activité exprimée en μ moles d'acides gras rejetés par ml et par minute à 35°C.

L'inactivation devient plus importante, elle est de 50% après 20 minutes d'incubation. A 60°C la perte d'activité est de 65% après 5 minutes d'incubation, elle est de 80% pour la même période d'incubation à 65°C.

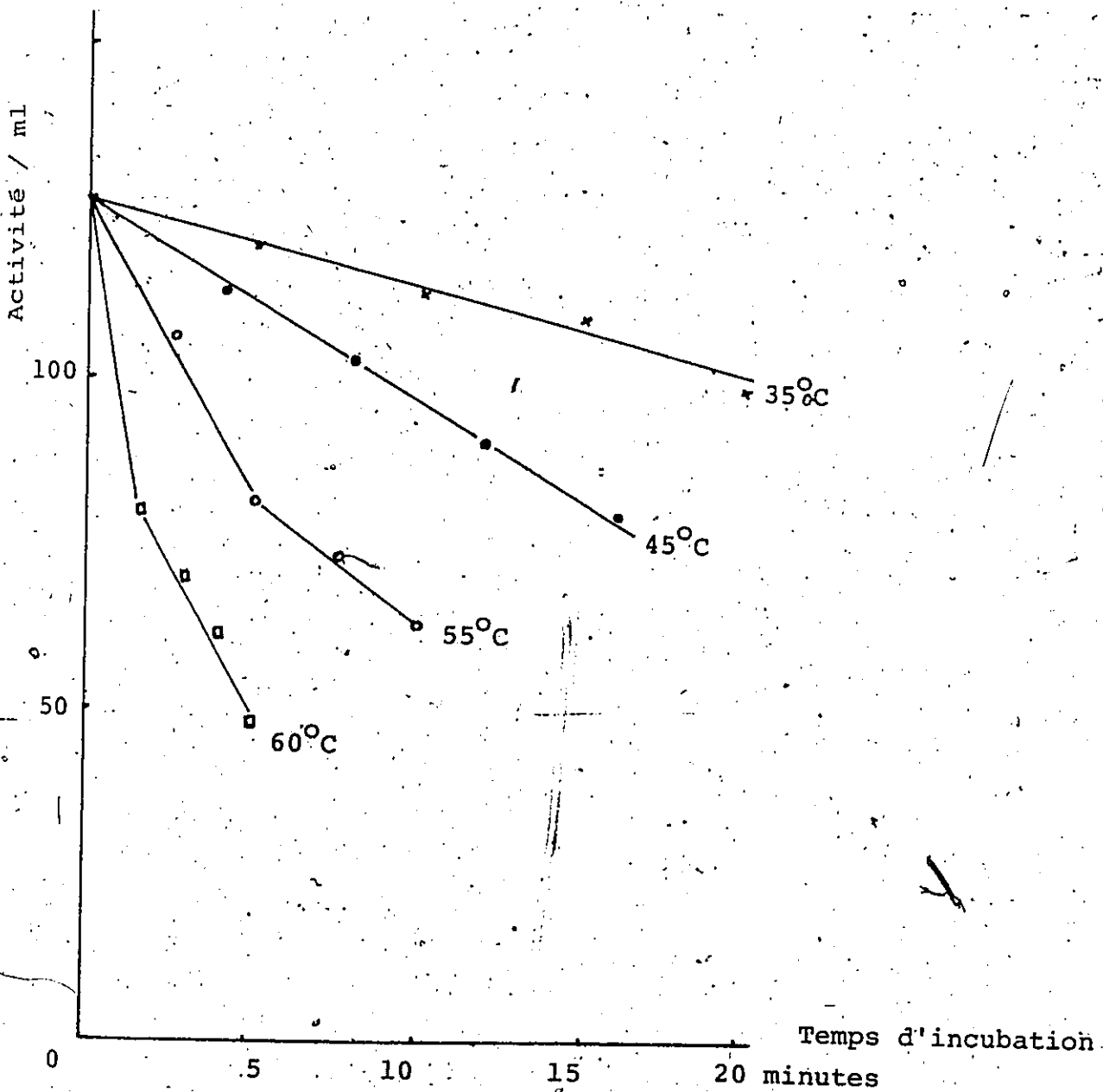
b) Stabilité de l'extrait partiellement purifié provenant de D.E.A.E. sephadex (fig. no. 19).

Dans ce cas les effets de la température sont peu différents de ceux produits sur l'extrait brut. Ainsi après 10 minutes d'incubation à 55°C la perte d'activité est de 50%, à 60°C pour la même période d'incubation la perte est de 70%.

5) Discussion

Une des caractéristiques de la lipase d'Acinetobacter 0₁₆ à l'état brut est d'avoir deux pH optimum d'activité. Cette propriété peut être considérée comme surprenante car la plupart des lipases bactériennes sont munies d'un seul pH optimum à l'état brut ou plus ou moins purifié. On serait en droit de se demander s'il ne s'agit pas en réalité d'un mélange de deux enzymes ou d'un mélange de deux formes d'une même enzyme. Or l'enzyme partiellement purifiée (provenant de D.E.A.E. sephadex) ne présente qu'un seul optimum à un pH compris entre 8.3 et 8.5, et il correspond au deuxième optimum du surnageant. Il est fort possible que le premier pH optimum du surnageant corresponde à la 2ème lipase élue de D.E.A.E. sephadex et non étudié par suite de sa faible teneur; ou mieux encore nous avons vu que la lipase est plus ou moins

Fig. no. 19 - Thermostabilité de la lipase partiellement purifiée sur D.E.A.E. sephadex



Activité exprimée en μ moles d'acides gras rejetés par ml et par minute à 32.5 °C.

fortement liée à des lipides, ainsi le premier optimum pourrait correspondre à la lipase associée à des lipides, et le deuxième à la lipase libre (2ème pic élué de séphadex G₂₀₀); ou vis et versa, ceci n'est évidemment qu'une hypothèse, qu'il reste à confirmer. Les pH optimum chez les bactéries varient de 7 à 8.7 suivant l'organisme étudié.

La lipase du surnageant d'une culture d'Acinetobacter 0₁₆ apparaît moins thermostable que celle de Micrococcus freudenreichii (20) qui perd seulement 20% de son activité après une ébullition de 5 minutes. Dans ce dernier cas, la peptone aurait un rôle protecteur particulier. Avec Acinetobacter 0₁₆ l'inactivation par la température de l'enzyme à l'état brut (surnageant) est peu différente de celle obtenue avec l'enzyme partiellement purifiée. Cependant la lipase partiellement purifiée d'Acinetobacter 0₁₆ apparaît beaucoup plus stable que celle de Pseudomonas fragi (35) qui est détruite complètement après une incubation de 10 minutes à 40°C. Il est vrai que la lipase d'Acinetobacter 0₁₆ est peut-être dans un état de pureté inférieur à celle de Pseudomonas fragi. Par contre, l'optimum d'activité en fonction de la température est approximativement le même chez ces deux organismes, soit 30 à 33°C pour Acinetobacter 0₁₆ et 33 à 35°C pour Pseudomonas fragi. Dans les deux cas, un dosage de l'activité à des températures plus élevées (40°C) entraîne une diminution importante de l'activité.

Chapitre VII

Discussion générale

Les buts et les résultats des expériences décrites dans cette thèse, ont été commentés et résumés à la fin de chaque chapitre. Aussi nous tenterons ici, seulement de tirer quelques idées générales de ce travail, et nous suggérerons à partir de ces premiers résultats quelques voies de recherches possibles soit pour compléter ou faire progresser le problème étudié.

La bactérie étudiée a été isolée sur un milieu en "Spirit, bleu" ayant comme base lipidique de l'huile de graine de coton. La préparation d'un tel substrat était difficile à réaliser en laboratoire, par conséquent l'activité lipolytique a été recherchée vis-à-vis d'autres substrats: substrats naturels (huile d'olive purifiée), ou chimiquement purs (tributyryne), ou synthétiques (esters du β naphthol). Ces derniers composés ont permis de mettre en évidence deux systèmes enzymatiques: la lipase rejetée avant tout dans le milieu externe, et l'estérase associée aux cellules - Pour plus de clarté le thème de recherche a été divisé en quatre sections:

- 1- Présentation de l'organisme étudié
- 2- Mise en évidence et localisation des systèmes lipolytiques existants
- 3- Facteurs qui affectent la production des deux systèmes enzymatiques et plus particulièrement la lipase.
- 4- Essais d'isolement, de purification et quelques pro-

priétés de la lipase.

Certains de ces aspects ont été traités simultanément ou avant l'ordre indiqué dans le texte. Ainsi les propriétés (température, pH) de la lipase à l'état brut ont été traitées avant la purification de l'enzyme, ce qui explique que les dosages de l'activité sont effectués à 35°C au cours de la purification, et non à 37°C, comme il était indiqué dans les méthodes (chap. II).

Les travaux concernant les propriétés de la lipase sont modestes, ils ont été retardés par les difficultés rencontrées au cours de la purification de l'enzyme.

La méthode de purification choisie: précipitation par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ et passage sur une colonne de sephadex G₁₀₀ ou G₂₀₀ ou sur D.E.A.E. sephadex, est la méthode la plus communément utilisée pour les lipases microbiennes.

Lorsqu'on filtre à travers une colonne sephadex G₂₀₀, le surnageant d'une culture d'Acinetobacter 0₁₆ préalablement précipité par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, on constate que la majeure partie de l'activité lipasique émerge de la colonne avec le volume de rétention. La lipase se comporte donc comme si son poids moléculaire était bien supérieur à sa valeur réelle. Ce comportement provient de l'existence, au sein des extraits d'une association entre la lipase et certains lipides notamment des phospholipides. Ce comportement particulier sur sephadex G₁₀₀ ou G₂₀₀ a été signalé pour d'autres lipases microbiennes, par Henderson (42), Lawrence et al (20) et Hassing (37). Cependant, seul Henderson (43) a démontré

l'association de la lipase à des phospholipides. Ce phénomène a été décrit pour la première fois chez la lipase pancréatique par Sarda et coll. (121).

Notre méthode actuelle de purification ne permet pas l'obtention d'une lipase pure débarrassée des lipides. Il est donc nécessaire de mettre au point une nouvelle méthode de purification, afin de disposer de quantité relativement importante d'enzyme pure. La difficulté majeure reste la dissociation de l'association lipase-lipides. Cette première difficulté surmontée, il sera alors possible de déterminer quel est le rôle exact des lipides dans cette association. Sont-ils nécessaires ou diminuent-ils l'activité de la lipase?

De plus, il est bon de se souvenir que ces lipides pourraient éventuellement jouer un rôle dans l'induction de la lipase (chapitre V). Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'a pas été possible de préciser ce dernier point. En conclusion, nous pouvons dire que l'isolement d'une lipase microbienne dans un état homogène présente un grand intérêt, étant donné son rôle déterminant dans le phénomène général de la dégradation des graisses. En outre, la lipase possède une propriété originale, celle de catalyser une réaction se déroulant dans un milieu hétérogène.

Bibliographie

- 1- Sumner, J.B., and Somers, G.F., 1953. Chemistry and methods of enzymes, p. 80, Academic Press, New York.
- 2- Muntz, M.A. 1871. Ann. Chem. Liebigz, 22, 472.
- 3- Eijkman, C. 1907. Uber enzyme von bacterien und schimmel pilzen. Abterlung lipasen. Zbl. Bakt. I.O. 29: 487.
- 4- Wills, E.D. 1965. Lipases. Advances in lipid research. 3: 197-240.
- 5- Jensen, L.B., Grettie, D.P. 1937. Action of micro-organisms on fats. Food research, 2: 97-120.
- 6- Mukherjee, S. 1951. Studies on degradation of fats by microorganisms. I. Preliminary investigations on enzyme systems involved in the spoilage of fats. Arch. of Bioch. and Bioph., 33: 364-376.
- 7- Witter, E.D. 1961. Psychrophilic bacteria. A review. Dairy Sci. Abstr. 44: 983-1015.
- 8- Nashif, S.A., and Nelson, F.E. 1953. The extracellular lipases of some gram-negative non sporeforming rod-shaped bacteria. J. Dairy Sci. 36: 698-706.
- 9- Fryer, T.F., Lawrence, R.C., and Reiter, B. 1967. Methods for isolation and enumeration of lipolytic organisms. J. Dairy Sci., 50: 477-484.
- 10- Fryer, T.F., Reiter, B., and Lawrence, R.C. 1967. Lipolytic activity of lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 50: 388-389.

- 11- Blaisé, C. 1973. Degréadative microorganisms in the Ottawa River. Thesis Master of Science, p. 67.
- 12- Blaise, C. and Armstrong, J.B. 1973. Lipolytic bacteria in the Ottawa river. Appl. Microbiol., 26: 733-740.
- 13- Breuil, C. et Gounot, A.M. 1972. Recherches préliminaires sur les bactéries lipolytiques psychrophiles des sols et des eaux. Can. J. Microbiol., 18: 1445-1451.
- 14- Tysset, C., Brisou, J., et Cudennec, A. 1969. De l'activité lipolytique chez quelques bactéries à gram négatif isolées du milieu marin. Rapp. Com. Int. Mer Médi., 19: 893-894.
- 15- Baird-Parker, A.C. 1965. The classification of Staphylococci and Micrococci from world wide sources. J. Gen. Microb. 38: 363-387.
- 16- Lenetsner, A.A., Toom, M.A., Tammarou, K.I. 1967. En russe. Détermination de l'activité lipolytique des microorganismes. Lab. Delo. S.S.S.R., 11: 688-691.
- 17- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytique activity of microorganisms and some observations in the influence of the contact between cells and fatty substrates. Ant. van Leeuwenhoek, 23: 15-22.
- 18- Sierra, G. 1957. Studies on bacterial esterases: I. Differentiation of a lipase and two ali-esterases during the growth of Pseudomonas aeruginosa and some observations on growth and esterase inhibition. Ant. van Leeuwenhoek, 23: 241-265.

- 19- Desnuelle, P. 1961. Pancreatic lipase. *Advances in Enzymology*, 23: 129-161.
- 20- Lawrence, R.C., Fryer, T.F., and Reiter, B. 1967. The production and the characterization of lipases from a Micrococcus and a Pseudomonas. *J. Gen. Microbiol.*, 48: 401-418.
- 21- Desnuelle, P. 1971. La lipase pancréatique. *Biochimie*, 53: 841-852.
- 22- Brockerhoff, H. 1969. Action of pancreatic lipase on emulsions of water soluble esters. *Arch. of Biochem. and Bioph.*, 134: 366-371.
- 23- Shah, D.B., and Wilson, J.B. 1963. Egg yolk factor of Staphylococcus aureus. I. Nature of the substrate and enzyme involved in the egg yolk opacity reaction. *J. Bacteriol.*, 85: 516-521.
- 24- Arima, K., Narasaki, T., Nakamura, Y., and Tamura, G. 1966. Production of lipoprotein lipase by microorganisms. *Agr. bioch. Chem.*, 30: 515-516.
- 25- Kates, M. 1960. *Lipid Metabolism*, p. 165. Ed: Bloch, K., John Wiley and Sons. New York.
- 26- Ansell, G.B., Hawthorne, J.N. 1964. *Phospholipids*. Elsevier Pub., Co., Amsterdam. 439 p.
- 27- Brisou, J. 1971. *Technique d'enzymologie bactérienne*. Ed.: Masson et Cie. Paris VI, 286 p.
- 28- Proulx, P., et Van Deenen, L.L.M. 1967. Phospholipase activities of Escherichia coli. *Bioch. Bioph. Acta* 144: 171-174.

- 29- Douce, R., Faure, M., et Marechal, J. 1966. Le phosphatidylméthanol, un phospholipide isolé d'une souche de crown-gall de vigne. C.R. Acad. Sc. Paris, 262: 1549-1552.
- 30- Derbesy, M., et Naudet, M. 1972. Influence de la structure de l'alcool sur la réactivité des esters d'acides gras vis à vis de la lipase pancréatique. Rev. française des corps gras, 4: 225-232.
- 31- Nashif, S.A., and Nelson, F.E. 1953. The lipase of Pseudomonas fragi. I. Characterization of the enzyme. J. Dairy Sci., 36: 459-470.
- 32- Kosugi, Y., and Kamibayashi, A. 1971. Thermostable lipase from Pseudomonas sp. cultural conditions and properties of the crude enzyme. J. Ferment. Technol., 49: 968-980.
- 33- Khan, M., Dill, C.W., Chandan, R.C. and Shahani, K.M. 1966. Production and properties of the extracellular lipase of Achromobacter lipolyticum. Biochim. Bioph. Acta, 132: 68-77.
- 34- Chorvath, B., and Benzonana, G. 1970. On the titration and some properties of a Leptospiral lipase. Biochem. Bioph. Acta, 231: 277-282.
- 35- Mencher, J.R., and Alford, J.A. 1967. Purification and characterization of the lipase of Pseudomonas fragi. J. Gen. Microbiol., 48: 317-328.
- 36- Nadkarni, S.R. 1970. Studies on bacterial lipase. Part II. Study of the characteristics of partially purified lipase from Pseudomonas aeruginosa. Enzymologia, 40: 302-313.

- 37- Hassing, G. 1971. Partial purification and some properties of a lipase from Corynebacterium acnes. Biochem. Bioph. Acta, 242: 381-394.
- 38- Finkelstein, A.E., Strawich, E.S., and Sonnino, S. 1970. Characterization and partial purification of a lipase from Pseudomonas aeruginosa. Biochem. Bioph. Acta, 206: 380-391.
- 39- Oterholm, A., Ordal, Z.J., and Witter, L.D. 1970. Purification and properties of a glycerol ester hydrolase (lipase) from Propionibacterium shermanii. Appl. Microbiol., 20: 16-22.
- 40- Lu, J.Y., and Liska, B.J. 1969. Lipase from Pseudomonas fragi. I. Purification of the enzyme. Appl. Microbiol., 18: 104-107.
- 41- Lu, J.Y., and Liska, B.J. 1969. Lipase from Pseudomonas fragi. II. Properties of the enzyme. Appl. Microbiol., 18: 108-113.
- 42- Henderson, C. 1971. A study of the lipase produced by Anaerovibrio lipolytica, a rumen bacterium. J. Gen. Microbiol., 65: 81-89.
- 43- Henderson, C., and Hodgkiss, W. 1973. An electron microscopic study of Anaerovibrio lipolytica (Strain 55) and its lipolytic enzyme. J. Gen. Microbiol., 76: 389-393.
- 44- Nagaoka, K., and Yamada, Y. 1969. Studies on Mucor lipases. Part II. Separation and characterization of three lipolytic enzymes. Agr. Biol. Chem., 33: 986-993.

- 45- Semeriva, M., and Dufour, C. 1971. Further studies on the exocellular lipase of Rhizopus Arrhizus. Biochem. Bioph. Acta, 260: 393-400.
- 46- Semeriva, M., Benzonana, G., and Desnuelle, P. 1969. Some properties of a lipase from Rhizopus Arrhizus. Separation of a glycopeptide bound to the enzyme. Biochem. Bioph. Acta, 191: 598-610.
- 47- Senez, J. 1969. Microbiologie générale. Ed: Doin Deren and Cie. Paris VI, 592 p.
- 48- Stanier, R.Y., Doudoroff, M., Adelberg, Ed. A. 1966. Microbiologie générale. Ed.: Masson et Cie, Paris VI, 638 p.
- 49- Evison, L.M., and Rose, A.H. 1965. A comparative study on the biochemical basis of the maximum temperature for growth of three psychrophilic microorganisms. J. Gen. Microbiol., 40: 349-364.
- 50- Stockes, J.L. 1963. General biology and nomenclature for psychrophilic microorganisms. Recent Prog. Microbiol., 8: 193-200.
- 51- Koegh, B.P. 1968. Croissance des microorganismes psychrotrophes et incidence sur la crème, le beurre et les crèmes glacées. Bull. Fed. Int. Laiterie.
- 52- Baxter, R.M., and Gibbons, N.E. 1962. Observation on the physiology of psychrophilism in a yeast. Can. J. Microbiol., 8: 511-517.
- 53- Rose, A.H. 1962. Temperature relationship among microorganisms. Wallerstein lab. Comm., 25: 5-18.

- 54- Dempster, J.F. 1968. Distribution of Psychrophilic microorganisms in different dairy environments. J. Appl. Bact., 31: 290-301.
- 55- Druce, R.G., and Thomas, S.B. 1970. An ecological study of the psychrotrophic bacteria of soil, water, grass and hay. J. Appl. Bact., 33: 420-435.
- 56- Hagen, P.O., Kushner, D.J., and Gibbons, N.E. 1964. Temperature induced death and lysis in a psychrophilic bacterium. Can. J. Microbiol., 27: 89-99.
- 57- Sinclair, N.A., and Stockes, J.L. 1965. Obligately psychrophilic yeast from the polar region. Can. J. Microbiol., 11: 259-269.
- 58- Morita, R.Y., and Burton, S.D. 1963. Influence of moderate temperature on growth and malic dehydrogenase activity of a marine psychrophile. J. Bacteriol., 86: 1025-1029.
- 59- Hagen, P.O., and Rose, R.Y. 1966. Studies on the biochemical basis of the low maximum temperature in a psychrophilic Cryptococcus. J. Gen. Microbiol., 27: 89-99.
- 60- Purohit, K., and Stockes, J.L. 1967. Heat labile enzymes in a psychrophilic bacterium. J. Bacteriol., 93: 199-206.
- 61- Bergogne, E., Zechovsky, N., Piechaud, M., Vieu, J.F., et Bordini, A. 1971. Sensibilité aux antibiotiques de 240 souches de "Moraxella" oxydase-negative (Acinetobacter) isolées d'infections hospitalières. Evolution sur 3 ans. Path. Biol., 19: 981-990.

- 62- Starr, M.P. 1941. Spirit blue agar: a medium for the detection of lipolytic microorganisms. *Science*, 93: 333-334.
- 63- Skerman, V.B.D. 1959. A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 217 p.
- 64- Buttiaux, R., Beerens, H., Taquet, A. 1963. Manuel de techniques bactériologiques. Flammarion. Paris. 505 p.
- 65- Gaby, W.L., and Haley, C. 1957. Practical laboratory test for the identification of Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.*, 74: 356-358.
- 66- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other gram negative bacteria on the basis of Arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 37-52.
- 67- Hugh, R., and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66: 24-26.
- 68- Collins, C.H. 1967. Microbiological methods. Second edition Butterworths, p. 112 and 202.
- 69- Desnuelle, P., Constantin, M.J., et Baldy, J. 1955. Technique potentiométrique pour la mesure de l'activité de la lipase pancréatique. *Bull. Ste. Chim. Biol.*, 37: 285-290.
- 70- Lippi, U., Stevanato, G., Guidi, G. 1972. A rapid photometric micromethod for serum lipase determination. *Clin. Chim. Acta*, 37: 199-202.

- 71- Ducombe, W.G. 1963. The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids. *Biochim. J.*, 88: 7-10.
- 72- Seligman, A.M., and Nachlas, M. 1950. The colorimetric determination of lipase and esterase in human serum. *J. Clin. Invest.*, 29: 31-36.
- 73- Hobson, P.N., and Summers, R. 1966. Effects of growth rate on the lipase activity of a rumen bacterium. *Nature*, 209: 736-737.
- 74- Henderson, C. 1968. A study of the lipase of Anaerovibrio lipolytica, Ph.D. Thesis. University of Aberdeen. 103 p.
- 75- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Parr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- 76- Davis Baruch, J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Academy of Sciences*, 121: 404-427.
- 77- Lunds Barbara, M. 1965. A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D Streptococci. *J. Gen. Microbiol.*, 40: 413-419.
- 78- El-Sharkawy, T.A., and Huisinoh, D. 1971. Electrophoretic analysis of esterase and other soluble proteins from representatives of Phytopathogenic bacterial genera. *J. Gen. Microbiol.*, 68: 149-154.
- 79- Weber, K., and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.

- 80- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- 81- De La Roche, I.A., Andrews, C.J. 1973. Changes in phospholipid composition of a winter wheat cultivar during germination at 2°C and 24°C. *Plants Phys.*, 51: 468-473.
- 82- Ditmer, C.J., and Lester, R.L. 1964. A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin layer chromatograms. *J. Lipids Research*, 5: 126-127.
- 83- Gounot, A.M. 1967. La microflore des limons argileux, souterrains: son activité productrice dans la biocoenose cavernicole. *Ann. Spéléol.*, 22: 23-146.
- 84- Baumann, P., Doudoroff, M., and Stanier, R.Y. 1968. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). *J. Bacteriol.*, 95: 1520-1541.
- 85- Cowan, S.T., and Steel, K.J. 1965. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. 217 p.
- 86- Thorneley, M.J. 1967. A taxonomic study of Acinetobacter and related genera. *J. Gen. Microbiol.*, 49: 211-257.
- 87- Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R.Y. 1968. Study of the Moraxella group. I. Genus Moraxella and Neisseria catarrhalis group. *J. Bact.*, 95: 58-73.
- 88- Taplin, D., Rebell, G., Zaias, N. 1963. The human skin as a source of Mima-Herellea infections. *J. Amer. Med. Ass.*, 186: 952-955.

- 89- Hugh, R., and Reese, R. 1967. Designation of the type strain for Bacterium anitratum Schaub and Hauber, 1948. Inter. J. Syst. Bacteriol., 17: 245-254.
- 90- Eller, C. 1969. Herellea (Acinetobacter) and Pseudomonas ovalis (P. putida) from frozen foods. Appl. Microbiol., 17: 26-30.
- 91- Bergey, D.H. 1957. Manual of determinative Bacteriology. 7ième ed. Ed. by Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1094 p.
- 92- Brisou, J., and Prevot, A.R. 1954. Etudes de systématique bactérienne. X. Revision des espèces réunies dans le genre Achromobacter. Ann. de l'Inst. Pasteur, 86: 722-728.
- 93- Gildardi, G.L. 1969. Characterization of the oxidase-negative cocco-bacilli (the Achromobacter-Acinetobacter group). Ant. van Leeuwenhoek, 35: 421-429.
- 94- Lochhead, A.G., and Chase, F.E. 1943. Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacteria flora. Soil Sci., 55: 185-195.
- 95- Warskow, A.L., Juni, E. 1972. Nutritional requirements of Acinetobacter strains isolated from soil, water and sewage. J. Bacteriol., 112: 1014-1016.
- 96- Lawrence, R.C., Fryer, T.F., Reiter, B. 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. Nature, 25: 1264-1265.

- 97- Nashif, S.A., and Nelson, F.E. 1953. The lipase of Pseudomonas fragi. II. Factors affecting lipase production. J. Dairy Sci., 36: 471-480.
- 98- Pollock, M.R. 1962. Exoenzymes - chap. IV. The Bacteria. Vol. IV. The Physiology of growth, 121-178 p. Aca. Press, New York.
- 99- Shahani, K.M., Sarda, L., Desnuelle, P., Azoulay, E. 1964. Partial purification and standardization of the technique for assay of the intracellular lipase of Achromobacter lipolyticum. J. Dairy Sci., 47: 675.
- 100- Higerd, T.B., and Spizizen, J. 1973. Isolation of two acetyl esterases from extracts of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 114: 1184-1192.
- 101- Prochazka, P., Nohynek, M., Sroglova, A., and Rokos, J. 1972. I. Carboxylic ester hydrolases in a submerged culture of Mycobacterium phlei. Folia Microbiol., 17: 17-27.
- 102- Neu, H.C., and Heppel, L.A. 1965. The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J. Biol. Chem., 240: 3685-3692.
- 103- Peters, I., and Nelson, F.E. 1948. Factors influencing the production of lipase by Mycotorula lipolytica. J. Bacteriol., 55: 581-591.
- 104- Nadkarni, S.R. 1970. Studies on bacterial lipase. Part I. Nutritional requirements of Pseudomonas aeruginosa for production of lipase. Enzymologia, 4: 286-301.

- 105- Nelson, W.O. 1951. Lipase production by Geotrichum candidum. Bact. Proc. 65-66.
- 106- Alford, J.A., and Pierce, D.A. 1963. Production of lipase by Pseudomonas fragi in a synthetic medium. J. Bacteriol., 86: 24-29.
- 107- Peters, I., and Nelson, F.E. 1951. Vitamin requirements for lipase production by Candida lipolytica. J. Bacteriol., 61: 581-593.
- 108- Cutchins, E.C., Doetsch, R.N., Pelczar, M.J. 1952. The influence of medium composition of the production of bacterial lipase. J. Bacteriol., 63: 269-272.
- 109- Sierra, G. 1957. Studies on bacterial esterases. Part III. Influence of the composition of the culture media on the production of Ali-esterase and lipase of Pseudomonas aeruginosa. Ant. van Leeuwenhock, 33: 278-288.
- 110- Kalle, G.P., Gadkari, S.V., Deshpande, S.Y. 1972. Inducibility of lipase in Candida lipolytica. Indian J. Biochem. Bioph., 9: 171-175.
- 111- Smith, J.L., and Alford, J.A. 1966. Inhibition of microbial lipases by fatty acids. Appl. Microbiol., 14: 699-705.
- 112- Alford, J.A., and Smith, J.L. 1965. Production of microbial lipases for the study of triglycerides structure. J. Am. Oil Chemists Soc., 42: 1038-1040.
- 113- Wounters, J.T.M. 1967. The effect of tweens on the lipolytic activity of Geotrichum candidum. Ant. van Leeuwenhock, 33: 365-380.

- 114- Davies, R. 1962. Stimulation of invertase formation in Saccharomyces fragilis by a cyclic dipeptide. Inter. Congr. Microbiol., 8th, Montreal, Abstr., p. 20.
- 115- Jayko, L.G., and Lichstein, H.C. 1959. Nutritional factors concerned with growth and lecithinase production by Clostridium perfringens. J. Infect. Diseases, 104: 142-151.
- 116- Dixon, M. 1953. A nomogram for ammonium sulphate solutions. Biochem. J., 54: 457-458.
- 117- Laboureur, P., and Labrousse, M. 1966. Lipase de Rhizopus arrhizus. Obtention, purification et propriétés de la lipase de Rhizopus arrhizus var. Delemar. Bull. Soc. Chim. Biol., 48: 747-770.
- 118- Peters, I., and Nelson, F.E. 1948. Preliminary characterization of the lipase of Mycotorula lipolytica. J. Bacteriol., 55: 593-600.
- 119- O'Leary, W.M., and Weld, J.T. 1964. Lipolytic activities of Staphylococcus aureus. I. Nature of the enzyme producing free fatty acid from plasma lipids. J. Bacteriol., 88: 1356-1363.
- 120- Ogiso, T., and Sugiura, M. 1969. Studies on bile-sensitive lipase. V. Purification and properties of lipase from Mucor Javanicus. Chem. Pharm. Bull., 17: 1025-1033.
- 121- Sarda, L., Maylie, M.F., Roger, J., Desnuelle, P. 1964. Comportement de la lipase pancréatique sur sephadex. Application à la purification et à la détermination du poids moléculaire de cet enzyme. Biochim. Biophys. Acta, 89: 183-185.

- 122- Wills, E.D. 1961. "The Enzymes of Lipid Metabolism", p. 13, Ed. Desnuelle, P., Pergamon Press, New York.
- 123- Debduitta, R., and Konigsberg, W. 1972. Chromatography of proteins and peptides on diethylamino-ethyl cellulose. Methods in Enzymology. Vol. XXV. Ed. by C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff.
- 124- DeHaas, G.H., Postema, N.M., Nieuwenhuizen, W., and Van Deenen, L.L.M. 1968. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. Biochim. Biophys. Acta, 159: 103-107.