

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ENRICHISSEMENT ET RECHERCHE DE CERTAINES ACTIVITÉS
ENZYMATIQUES PRODUITES PAR DES BACTÉRIES AÉROBIES
THERMOPHILES**

Par
Jean-François Hupé

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr. Rolf Morosoli
Examineur externe	Dr. Éric Émond Laboratoires Choisy Ltée.
Directeur de recherche	Dr. Réjean Beaudet
Co-directeur de recherche	Dr. Pierre Juteau

Résumé

Les enzymes thermophiles présentent plusieurs avantages par rapport aux enzymes mésophiles, notamment à cause de leur plus grande résistance à la dénaturation thermique et chimique. La demande en thermozyms pour des applications biotechnologiques est en forte croissance. Les lipases, les estérases, les amylases, les cellulases et les protéases sont les enzymes thermophiles les plus recherchées dans divers secteurs industriels.

La prémisse de ce projet était que les bactéries aérobies thermophiles ont la capacité de produire des enzymes thermostables originales d'intérêt industriel. Un premier objectif de ce projet était l'enrichissement de bactéries aérobies thermophiles en fonction de différentes sources de carbone. Neuf enrichissements différents ont été réalisés où les substrats utilisés comprenaient un extrait de viande, du son de blé, de la lignine, de la chitine, de la gélatine, un mélange d'huiles de canola et de palme et un mélange d'huile d'olive et de Tween 80. Ces divers enrichissements avaient comme objectif de stimuler l'implantation d'une biomasse spécialisée dans la dégradation de chaque substrat. Les microflores ont été enrichies dans des conditions aérobies thermophiles (50-70°C) et de pH alcalins (7,0-8,5). Le suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par PCR-DGGE du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a permis de constater que, globalement, les microflores résultantes des divers enrichissements sont différentes selon la source de carbone employée.

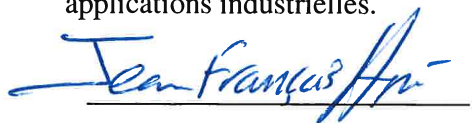
Pour le présent projet, une attention particulière a été portée sur la recherche d'activités lipolytiques, plus spécifiquement de type lipase. Les biomasses enrichies en présence de lipides ont servi à la recherche d'enzymes lipolytiques via une approche classique d'isolement de bactéries productrices d'enzymes, alors que les biomasses provenant des autres enrichissements ont été utilisées dans un autre projet visant la recherche de différentes thermozyms par une approche métagénomique.

Des microflores enrichies en présence de lipides, 34 souches bactériennes ont été isolées et caractérisées. Selon leur profil obtenu par PCR-DGGE de leur gène codant pour l'ARN

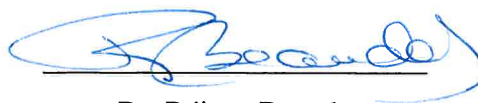
ribosomal 16S, les souches ont été réparties en dix groupes. Le séquençage de ce même gène a permis de faire l'affiliation la plus probable des souches avec des espèces connues. La grande majorité des souches sont affiliées à la famille des *Bacillaceae*, la plupart appartenant au genre *Geobacillus*. Deux souches originales, F12-THO-01 et F12-THO-02, ont été isolées du mini-fermenteur enrichi en présence d'huile d'olive et de Tween 80. Selon les analyses phylogénétiques, les espèces connues les plus rapprochées sont respectivement *Bacillus thermoamylovorans* (93-94% d'identité) et *Chelatococcus asaccharovorans* (95% d'identité) ce qui suggère qu'elles pourraient représenter deux nouvelles espèces bactériennes jamais décrites.

Le potentiel enzymatique des souches isolées a été évalué pour produire 19 activités différentes par des galeries API ZYM incubées à 60°C. La majorité des souches exprimaient des activités phosphatase alcaline, estérase (C4), estérase-lipase (C8) et α -glucosidase d'une bonne intensité. L'activité lipase (C14) était beaucoup moins détectée auprès des souches testées. Les souches ont ensuite été criblées pour une activité lipolytique sur milieux solides via la méthode de précipitation au calcium et la méthode à la Rhodamine B. L'utilisation de l'huile d'olive comme substrat dans la méthode à la Rhodamine B suggérait la détection d'activité lipolytique de type lipase pour la majorité des souches testées.

La caractérisation préliminaire des activités lipolytiques des souches F12-THO-01 et F12-RT-091 à partir de surnageants de culture a permis d'identifier des activités de type estérase plutôt que lipase. Dans les deux cas, l'activité estérase était thermophile (55-60°C), alcaline (supérieure à pH 8,5 qu'à 7,5) et sensible à la présence de Triton X-100 où on observait respectivement des pertes de 50% et 35% d'activité en présence de 0,5% de Triton. La caractérisation des autres souches isolées pourrait éventuellement révéler la présence de nouvelles thermozymes ayant des activités lipolytiques intéressantes pour des applications industrielles.



Jean-François Hupé



Dr. Réjean Beudet

Remerciements

Dans un premier temps, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Réjean Beaudet, ainsi que mon co-directeur, le Dr. Pierre Juteau, pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et de m'avoir impliqué dans un projet aussi intéressant. Un remerciement aussi pour Rita Alary avec qui j'ai eu beaucoup de bonheur à travailler et à parler des plaisirs de la vie.

Je voudrais davantage faire part de ma grande gratitude envers Pierre et Réjean. J'aurais énormément apprécié que notre collaboration se poursuive pour quelques temps encore, mais grâce à vous et votre professionnalisme, j'ai aujourd'hui l'opportunité d'entamer ma carrière comme assistant de recherche dans une compagnie florissante et dynamique. Merci.

Je ne peux passer sous silence le plaisir que j'ai eu de faire partie du Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement. J'y ai côtoyé des étudiants qui ont fait en sorte que ma maîtrise fut très agréable, autant à l'Institut qu'en dehors des laboratoires. Je voudrais remercier spécialement le Dr. Éric Déziel et le Dr. Richard Villemur pour leur aide et leurs judicieux conseils qu'ils m'ont fourni tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais remercier mes parents, Michel et Gisèle, et ma copine Isabelle qui m'ont soutenu, écouté et encouragé pendant mes études. Je vous suis très reconnaissant.

Finalement, j'aimerais remercier la Fondation Armand-Frappier et l'INRS-Institut Armand-Frappier pour le soutien financier qu'ils m'ont octroyé pendant mes travaux.

Table des matières

Résumé	iii
Remerciements	v
Table des matières	vi
Table des illustrations	x
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Introduction	1
Chapitre 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.1. Les enzymes et l'industrie	4
1.1.1. Généralités	4
1.1.2. Applications industrielles.....	5
1.1.2.1. Les protéases.....	5
1.1.2.2. Les carbohydrases.....	5
1.1.2.3. Les lipases.....	6
1.1.2.4. Les oxydases	6
1.1.3. Les thermozymes	6
1.1.3.1. Intérêt pour les enzymes thermostables	6
1.1.3.2. Sources et applications des thermozymes.....	7
1.1.3.3. Mécanismes stabilisateurs des thermozymes.....	9
1.2. Les bactéries thermophiles.....	11
1.2.1. Généralités	11
1.2.2. Besoins nutritifs des bactéries thermophiles.....	12
1.2.3. Les <i>Bacillaceae</i>	13
1.3. Les lipases et les estérases	14
1.3.1. Généralités sur les enzymes lipolytiques	14
1.3.2. Généralité sur les lipases et les estérases	15
1.3.3. Description structurale et mécanisme d'action des lipases.....	18
1.3.4. Propriétés physicochimiques des lipases	20
1.3.5. Spécificité du substrat	21
1.3.6. Conditions de production des lipases.....	22
1.3.7. Méthodes de détection et de dosage des lipases	24
1.3.7.1. Détection et criblage de bactéries lipolytiques	24
1.3.7.2. Dosage de l'activité lipase	26
1.3.8. Potentiel biotechnologique (industriel) des lipases/estérases	29
1.3.9. Sources de lipases	30
1.4. Deux approches de recherche d'enzymes	32
1.4.1. L'approche métagénomique.....	33
1.4.2. L'approche classique	34
1.4.3. Étape d'enrichissement	35

Chapitre 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	37
2.1. Enrichissement de microflores bactériennes aérobies thermophiles	37
2.1.1. Milieu de culture	37
2.1.2. Sources de carbone	38
2.1.2.1. Préparation des substrats	39
2.1.2.1.1. Extrait de viande (F1)	39
2.1.2.1.2. Son de blé (F2)	40
2.1.2.1.3. Lignine (F3)	40
2.1.2.1.4. Chitine (F4)	40
2.1.2.1.5. Gélatine (F5)	41
2.1.2.1.6. Mélange de lipides (F6, F8 et F2(2))	41
2.1.2.1.7. Huile d'olive et Tween 80 (F1(2))	41
2.1.2.1.8. Protéose peptone	42
2.1.2.2. Conservation des substrats	42
2.1.3. Inoculum de départ	43
2.1.4. Mini-fermenteurs	45
2.1.5. Conditions d'enrichissement	51
2.2. Suivi de la flore bactérienne aérobie thermophile des enrichissements	52
2.2.1. Prélèvement et conservation d'échantillons des mini-fermenteurs	52
2.2.1.1. Échantillonnage des mini-fermenteurs pour le suivi de la diversité	52
2.2.1.2. Échantillonnage de sécurité des mini-fermenteurs	53
2.2.2. Suivi de l'évolution de la flore bactérienne par DGGE	53
2.2.2.1. Élaboration d'un marqueur de référence pour le DGGE	53
2.2.2.1.1. Culture des souches pures	53
2.2.2.1.2. Extraction de l'ADN génomique	54
2.2.2.1.3. Estimation de la concentration d'ADN génomique sur gels	54
2.2.2.1.4. Amplification par PCR d'un fragment de l'ADN ribosomal 16S	55
2.2.2.1.5. Estimation de la concentration des produits PCR sur gels	57
2.2.2.1.6. Obtention du marqueur de référence pour DGGE	58
2.2.2.2. Traitement des échantillons provenant des enrichissements par PCR-DGGE	58
2.2.2.2.1. Extraction de l'ADN génomique total	58
2.2.2.2.2. Amplification par PCR de fragments d'ADN génomique	59
2.2.2.2.3. Migration des échantillons sur DGGE	59
2.2.3. Évaluation sommaire du potentiel enzymatique des microflores enrichies par des galeries API ZYM.	61
2.3. Isolement et caractérisation de bactéries ayant des activités lipases/estérases	62
2.3.1. Isolement de bactéries	62
2.3.1.1. Milieux de culture	63
2.3.1.1.1. Milieu BSM additionné de protéose peptone et de Tween 80 (BT) ..	63

2.3.1.1.2. Milieu BSM additionné de protéose peptone et d'huile d'olive (BHO)	64
2.3.1.1.3. Milieu BSM additionné de protéose peptone et des huiles de canola et de palme (BHCP)	64
2.3.1.1.4. Milieu R2A additionné de Tween 80 (RT)	65
2.3.1.1.5. Milieu NB/YE additionné de Tween 80 (NYT)	65
2.3.1.1.6. Milieu TSB-agar additionné de Tween 80 (TT)	65
2.3.1.1.7. Milieu TSB-agar additionné d'huile d'olive (THO)	66
2.3.1.2. Conservation des souches	66
2.3.2. Caractérisation moléculaire des souches isolées	66
2.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique des souches pures	67
2.3.2.2. Amplification par PCR du gène codant l'ARN ribosomal 16S	67
2.3.2.3. Profil de migration sur DGGE des souches pures	68
2.3.2.4. Séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S des souches pures	68
2.3.2.5. Étude phylogénique des souches isolées	69
2.3.3. Évaluation du potentiel enzymatique des souches isolées	69
2.3.3.1. Galeries API ZYM des souches pures	69
2.3.3.2. Criblage pour une activité lipolytique sur milieux solides	70
2.4. Caractérisation préliminaire des activités lipolytiques de bactéries sélectionnées	71
2.4.1. Culture en fioles pour obtenir du surnageant actif	71
2.4.1.1. Milieux de culture et inducteurs	71
2.4.1.2. Remise en culture des souches et préparation des inoculums	72
2.4.1.3. Conditions de cultures et échantillonnages	72
2.4.2. Tests d'activités lipolytiques à partir des surnageants de cultures	73
2.4.2.1. Méthode à la Rhodamine B en présence d'huile d'olive	73
2.4.2.2. Méthode par spectrophotométrie	74
2.4.2.2.1. Détermination du maximum d'absorption du pNP	74
2.4.2.2.2. Courbes d'étalonnage du pNP	75
2.4.2.2.3. Tests d'activité enzymatique	75
Chapitre 3. RÉSULTATS	77
3.1. Enrichissement de neuf microflores bactériennes aérobies thermophiles	77
3.1.1. Sources de carbone	77
3.1.2. Conditions d'enrichissement	79
3.2. Suivi de la flore bactérienne aérobie thermophile des enrichissements	82
3.2.1. Élaboration du marqueur de référence pour le DGGE	82
3.2.2. Suivi de l'évolution de la flore bactérienne des mini-fermenteurs par DGGE83	
3.2.3. Évaluation sommaire du potentiel enzymatique des microflores enrichies par des galeries API ZYM.	98
3.3. Isolement et caractérisation de bactéries ayant des activités lipases/estérases	99
3.3.1. Isolement de bactéries	99

3.3.2. Caractérisation moléculaire des souches isolées.....	102
3.3.2.1. Profil de migration par DGGE des souches pures	102
3.3.2.2. Analyse phylogénique du gène codant pour l'ARNr 16S des souches isolées.....	103
3.3.3. Évaluation du potentiel enzymatique des souches isolées	107
3.3.3.1. Galeries API ZYM de 15 souches	107
3.3.3.2. Criblage pour une activité lipolytique sur milieux solides	109
3.4. Caractérisation préliminaire des activités lipolytiques de bactéries sélectionnées	111
3.4.1. Cultures en fioles pour obtenir du surnageant actif	111
3.4.2. Tests d'activités lipolytiques à partir des surnageants de cultures	112
3.4.2.1. Méthode à la Rhodamine B en présence d'huile d'olive	112
3.4.2.2. Méthode par spectrophotométrie	114
3.4.2.2.1. Détermination du maximum d'absorption du pNP.....	114
3.4.2.2.2. Courbes d'étalonnage du pNP	115
3.4.2.2.3. Activité enzymatique de la souche F12-THO-01	115
3.4.2.2.4. Activité enzymatique de la souche F12-RT-091	119
Chapitre 4. DISCUSSION.....	121
4.1. Enrichissement et suivi de neuf microflores bactériennes aérobies thermophiles.....	121
4.1.1. Impact de la source de carbone sur la diversité bactérienne des enrichissements	121
4.1.2. Enrichissements en fonction des lipides	122
4.1.3. Conditions d'enrichissement des microflores bactériennes.....	125
4.2. Isolement et caractérisation de bactéries ayant des activités lipolytiques	127
4.2.1. Isolement de bactéries.....	127
4.2.2. Affiliation des souches isolées.....	129
4.2.3. Potentiel enzymatique des souches isolées	133
4.3. Caractérisation préliminaire des activités lipolytiques de deux souches	134
4.3.1. Activité lipolytique de la souche F12-THO-01	134
4.3.2. Activité lipolytique de la souche F12-RT-091.....	135
Conclusion	138
Appendice A	140
Appendice B.....	147
Références.....	149

Table des illustrations

Figure 1. Réaction enzymatique d'une lipase catalysant l'hydrolyse complète ou la synthèse d'un substrat triacylglycérol.	16
Figure 2. Schéma de la structure secondaire générale du repliement « canonique » α/β -hydrolase.	19
Figure 3. Photo du réfrigérateur où étaient conservés certains substrats ainsi que le milieu de culture pour l'alimentation des mini-fermenteurs.	43
Figure 4. Mini-fermenteur à agitation par circulation d'air. A) Schéma général; B) Exemple de mini-fermenteur assemblé : photo du F1 (extrait de viande).	46
Figure 5. Mini-fermenteur à agitation mécanique. A) Schéma général; B) Exemple de mini-fermenteur assemblé : photo du F2 (son de blé).	46
Figure 6. Console de contrôle des mini-fermenteurs. A) Schéma général; B) Photo de la console (au centre).	49
Figure 7. Vision globale du montage. A) Schéma général; B) Photo du montage.	50
Figure 8. Exemple de contrôle de la température (A) et du pH (B) des mini-fermenteurs.	80
Figure 9. Marqueur de référence utilisée pour le DGGE.	83
Figure 10. Coloration de Gram d'un échantillon de biomasse du F8 au cycle 9.	84
Figure 11. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement effectué avec de l'extrait de viande (F1).	85
Figure 12. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du son de blé (F2).	86
Figure 13. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en présence de la lignine (F3).	87
Figure 14. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction de la chitine (F4).	88
Figure 15. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction de la gélatine (F5).	89
Figure 16. DGGE d'échantillons de quelques cycles de fermentation du F6, enrichissement en fonction d'un mélange d'huiles de canola et de palme.	90
Figure 17. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du mélange d'huiles de canola et de palme dans un milieu de culture supplémenté avec du protéose peptone (F8).	91
Figure 18. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du mélange d'huile d'olive et de Tween 80 dans un milieu de culture supplémenté en protéose peptone [F1(2)].	93
Figure 19. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du mélange d'huiles de canola et de palme dans un milieu de culture supplémenté en protéose peptone [F2(2)].	94
Figure 20. Profils de migration des biomasses finales (A) des F1 (extrait de viande), F2 (son de blé), F3 (lignine), F4 (chitine) et F5 (gélatine) et (B) des F8 (huiles de canola et de palme), F1(2) (huile d'olive et Tween 80) et F2(2) (huiles de canola et de palme).	95

Figure 21. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps à l'intérieur d'un même cycle (t0 à t72) pour l'enrichissement des F1 (A), F2 (B), F3 (C), F4 (D) et F5 (E).	97
Figure 22. (A) Profil de migration par DGGE d'un représentant de chacun des groupes de souches isolées ainsi que de l'échantillon à partir duquel la majorité des souches F12 ont été isolées (« F1(2) 05-10-2006 cyc.17 »). (B) Profil de migration de deux souches provenant du F8 ainsi que des échantillons à partir desquels elles ont été isolées.	103
Figure 23. Arbre phylogénique des souches isolées des mini-fermenteurs F1(2) et F8 et des espèces affiliées les plus probables.	106
Figure 24. Arbre phylogénique de la souche F12-RT-051 isolée du mini-fermenteur F1(2) et des espèces affiliées les plus probables.	107
Figure 25. Photo (UV, $\lambda = 365$ nm) des souches F12-THO-01, F12-TT-02 et F12-RT-101.	110
Figure 26. Photos (UV, $\lambda = 365$ nm) des surnageants de culture de la souche F12-THO-01 déposés dans des trous percés dans des géloses Rhodamine B Lipase Agar. .	113
Figure 27. Absorbance du p-nitrophénol en fonction de la longueur d'onde.	114
Figure 28. Activité enzymatique vis-à-vis du pNPP de la LIPEX avec ou sans surnageant de culture de la souche F12-THO-01.	116
Figure 29. Activité enzymatique vis-à-vis de pNPB du surnageant de culture de la souche F12-THO-01.	117

Liste des tableaux

Tableau I. Exemples de bactéries et des propriétés de leurs lipases thermostables.	32
Tableau II. Taille (pb) et masse approximative (ng) des fragments d'ADN du phage lambda digéré par Hind III.	55
Tableau III. Amorces utilisées pour les PCR-DGGE.....	56
Tableau IV. Taille (pb) et masse approximative (ng) des fragments d'ADN du marqueur de poids moléculaires GeneRuler™ 100bp DNA Ladder.	58
Tableau V. Liste des substrats associés aux 20 cupules des galeries API ZYM et leurs enzymes correspondantes testées.	62
Tableau VI. Amorces utilisées pour le PCR pré-séquençage.....	67
Tableau VII. Taille (pb) et masse approximative (ng) des fragments d'ADN du marqueur de poids moléculaires 1kb DNA Ladder.	68
Tableau VIII. Résultats des galeries API ZYM de la biomasse des mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5.	98
Tableau IX. Liste des 34 souches isolées, leur regroupement ainsi que leur affiliation.	101
Tableau X. Résultats des galeries API ZYM de 15 souches isolées des mini-fermenteurs F1(2) et F8.	108
Tableau XI. Résultats du criblage pour une activité lipolytique chez 15 des souches isolées.	110
Tableau XII. Coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol pour chacune des conditions expérimentales utilisées.	115
Tableau XIII. Suivi des cultures en fioles de la souche F12-THO-01 dans le temps. .	118
Tableau XIV. Effet du Triton X-100 sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-THO-01.	118
Tableau XV. Effet du pH sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-THO-01.	118
Tableau XVI. Suivi des cultures en fioles de la souche F12-RT-091 dans le temps. ...	119
Tableau XVII. Effet du Triton X-100 sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-RT-091.	120
Tableau XVIII. Effet du pH sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-RT-091.	120
Tableau XIX. Effet de la température sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-RT-091.	120

Liste des abréviations

°C : degré Celcius

ϵ : epsilon, coefficient d'extinction molaire

μL : microlitre

μmol : micromole

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

DGGE : *denaturing gradient gel electrophoresis*

DO : densité optique

EDTA : *ethylenediamine tetraacetic acid*

FDA : *Food and Drug Administration*

g : gramme

GC : *gas chromatography*

GRAS : *generally regarded as safe*

h : heure

HPLC : *high performance liquid chromatography*

Kb : kilobases

kDa : kilo-Dalton

L : litre

M : molaire

min : minute

mL : millilitre

mm : millimètre

mM : millimolaire

(m/V) : masse/volume

N : normale

ng : nanogramme

nm : nanomètre

pb : paires de base

PCR : *polymerase chain reaction*

p.ex. : par exemple

pmol : picomole

pNP : p-nitrophényl ou p-nitrophénol(ate)

pNPB : p-nitrophényl butyrate

pNPL : p-nitrophényl laurate

pNPP : p-nitrophényl palmitate

pNPS : p-nitrophényl stéarate

psi : *pounds per scare inch*

rpm : révolutions par minute

SDS : *sodium dodécyl sulfate*

sp. : espèce

TLC : *thin layer chromatography*

TSB : *Tryptic Soy Broth*

UV : ultra-violet

V : volts

(V/V) : volume/volume

Introduction

À la fin des années 1980, des chercheurs de l'INRS-Institut Armand-Frappier se sont penchés sur la problématique des rejets de l'industrie porcine. En effet, du succès grandissant de cette industrie a découlé la production d'énormes volumes de lisier de porc. L'épandage du lisier sur les terres agricoles est la méthode préconisée par les éleveurs pour se départir du lisier. Toutefois, cette méthode a ses limites et inconvénients (surface insuffisante pour l'épandage, surcharge de phosphate dans l'environnement, mauvaises odeurs, etc.). Dans ce contexte, le Dr. Réjean Beaudet et ses collaborateurs ont développé un traitement aérobic thermophile pour traiter le lisier de porc (Beaudet et al., 1990). À la fin des années 1990, le Dr. Pierre Juteau a poursuivi en développant un bioprocédé thermophile, auto-chauffant, du lisier de porc (« aerobic thermophilic – sequencing batch reactor ») (Juteau et al., 2004). Des températures de 70-75°C étaient atteintes dans le bioréacteur. Ce bioprocédé permettait de réduire la charge organique et la quantité d'azote ammoniacal, de détruire les pathogènes et d'éliminer les mauvaises odeurs du lisier. La microflore bactérienne qui s'était développée dans le bioréacteur a été partiellement caractérisée (Juteau et al., 2004; Tremblay, 2003). Des bactéries ont été isolées de ces bioréacteurs et ont été ajoutées à celles trouvées à la fin des années 1980 (Beaudet et al., 1990) pour constituer une banque de bactéries aérobies thermophiles. Certaines bactéries de cette banque représentaient des espèces bactériennes peu étudiées ou même de nouvelles espèces dont leur capacité à produire des enzymes thermostables avait été peu ou pas étudiée.

Des travaux ultérieurs ont mené à l'évaluation du potentiel enzymatique de ces bactéries thermophiles (Castonguay, 2005). Outre leur potentiel à produire 19 activités enzymatiques différentes (galeries API ZYM), la capacité de ces bactéries à sécréter des xylanases, des cellulases et des phytases a été évaluée. Plusieurs des souches ont démontré des activités estérase (C4), estérase-lipase (C8), glucosidase et protéase pour ne donner que ces exemples. Toutefois, aucune activité lipase n'a été détectée parmi les souches testées. La xylanase et la β -glucosidase de *Geobacillus thermodenitrificans* SB1,

une souche de la banque, ont fait l'objet d'une caractérisation préliminaire (Castonguay, 2005).

L'emploi d'enzymes thermostables dans certains procédés industriels ou pour des applications biotechnologiques présente des avantages par rapport aux enzymes mésophiles. En général, les thermozymes sont plus résistantes que les mésozymes à la dénaturation thermique et chimique. Ces propriétés permettent leur utilisation dans des conditions parfois extrêmes (p.ex. pH très élevé ou très faible, température élevée) où leurs équivalentes mésophiles seraient moins performantes. Les propriétés de thermostabilité des enzymes thermophiles ont suscité l'intérêt de divers secteurs industriels. Les industries des pâtes et papiers, de l'alimentation, pharmaceutique, des détergents et le secteur de la synthèse organique sont des exemples de domaines où les thermozymes trouvent des applications importantes. Les lipases, les estérases, les amylases, les cellulases et les protéases sont parmi les enzymes thermophiles les plus recherchées dans ces secteurs d'activités.

Les bactéries thermophiles constituent une source valable d'enzymes thermostables avec des propriétés souvent reliées à la stabilité dans des solvants ou des détergents. Les sources de bactéries thermophiles sont abondantes et diversifiées. Toutefois, l'étude et la caractérisation de ces microorganismes sont souvent très difficiles puisque seulement 1% des microorganismes de l'environnement peuvent être isolés en culture pure (Lorenz et al., 2002).

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'ajouter l'approche métagénomique à l'approche classique de l'isolement des microorganismes en culture pure pour la recherche d'enzymes. L'approche métagénomique permet de palier aux problèmes d'isolement et de culture des bactéries. À partir de l'ADN total d'un consortium bactérien, une métagénothèque contenant des milliers de clones est construite et ces derniers sont directement criblés pour identifier des gènes d'intérêt qui codent pour une activité enzymatique recherchée. Toutefois, l'expression de certains gènes pour donner

une protéine active dans des hôtes hétérologues est parfois un facteur problématique dans cette approche.

La ligne directrice de ce projet de maîtrise repose sur le fait que des bactéries aérobies thermophiles ont la capacité de produire des enzymes thermostables originales d'intérêt industriel. Le projet comprend trois principaux objectifs. **Le premier objectif** consiste en l'enrichissement et le suivi de différentes flores bactériennes aérobies thermophiles pour la production de différentes activités enzymatiques. L'enrichissement de microflores bactériennes en fonction de différentes sources de carbone permettra d'alimenter deux approches de recherche différentes: une première approche métagénomique, sous la responsabilité du Dr Pierre Juteau, cible l'isolement d'une grande variété d'activités enzymatiques et une seconde approche, plus classique, visant à isoler des souches bactériennes thermophiles produisant des enzymes lipolytiques thermostables sera utilisée dans ce projet. **Le deuxième objectif** consiste à isoler et à caractériser des bactéries ayant des activités estérases/lipases à partir des microflores obtenues des enrichissements réalisés en présence de lipides comme source de carbone. Une attention particulière est portée sur la recherche d'activités de type lipase. **Le troisième objectif** du projet concerne la caractérisation préliminaire des activités lipolytiques de certaines bactéries sélectionnées.

Chapitre 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les enzymes et l'industrie

1.1.1. Généralités

Les enzymes jouent un rôle prédominant au niveau de plusieurs processus et ce depuis bien longtemps. Il suffit de penser à l'utilisation des enzymes microbiennes en cuisine, au brassage de la bière, à la production de vin et fromage, pour ne donner que ces exemples.

Les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions chimiques spécifiques. Elles permettent d'augmenter la vitesse de réaction de celles-ci, car l'énergie d'activation des réactions catalysées est inférieure à celle des réactions non catalysées. L'augmentation des vitesses réactionnelles est de l'ordre de 10^6 à 10^{12} par rapport aux réactions non catalysées par des enzymes et d'au moins quelques ordres de grandeur par rapport aux mêmes réactions catalysées par des catalyseurs chimiques. Il existe six classes d'enzymes : les oxydoréductases qui favorisent des réactions d'oxydoréduction (classe 1), soit des réactions impliquant des transferts d'électrons; les transférases qui catalysent le transfert de groupements chimiques ou de radicaux (classe 2); les hydrolases qui provoquent la rupture de lien chimique avec l'implication d'une molécule d'eau (classe 3); les lyases qui entraînent l'élimination de groupes fonctionnels et la formation de doubles liaisons (classe 4), la réaction inverse peut aussi se produire et on parle alors de synthèses; il y a aussi les isomérases qui catalysent des réactions d'isomérisation (classe 5), c'est-à-dire qu'elles provoquent un réarrangement moléculaire, sans perte ni gain d'atome; et finalement, il y a les ligases ou synthétases qui entraînent la formation de liaisons covalentes, réaction couplée à l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) (classe 6). (Voet et Voet, 1998)

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale (Barnabé et al., 2003). En 2000, le marché mondial des enzymes industrielles était évalué à plus de 1,5 milliards de dollars américains, une croissance de 33% par rapport au marché de 1995 (1 milliard de dollars américains) (Kirk et al., 2002).

Le marché des enzymes spécialisées est très lucratif : par exemple, les ventes de Taq polymérase pour les réactions de PCR (« polymerase chain reaction ») totalisent plus de 80 millions de dollars américains alors que ce montant s'élève à plus de 100 millions pour les enzymes de restriction en biologie moléculaire (Demain, 2000). Dans une optique de développement durable, plusieurs industriels recherchent des procédés de production plus propres et respectueux de l'environnement. C'est le cas de l'industrie des pâtes et papiers qui, dès 1994, a engendré des ventes d'enzymes atteignant 25 millions de dollars (américains) aux États-Unis et en Europe (van Beilen et Li, 2002).

1.1.2. Applications industrielles

La majorité des enzymes actuellement utilisées en industrie sont de la classe des hydrolases. Elles peuvent être réparties en quatre groupes principaux : les protéases, les carbohydrases, les lipases et les oxydases (qui font toutefois partie de la classe des oxydoréductases).

1.1.2.1. Les protéases

Les protéases sont particulièrement importantes en raison de leur utilisation répandue dans l'industrie laitière et les détergents. Dans l'industrie laitière, les protéases jouent un rôle lors du caillage du lait dans la production du fromage, elles peuvent aussi influencer le goût des produits. Au niveau des détergents, elles permettent l'élimination des taches de nature protéique. Les protéases ont aussi des applications dans les domaines de l'alimentation, du textile, du tannage et des pâtes et papiers. Dans ce dernier champ d'application, elles sont employées pour le blanchiment des pâtes et le nettoyage des équipements (élimination de biofilms). (Barnabé et al., 2003; Kirk et al., 2002)

1.1.2.2. Les carbohydrases

Les carbohydrases, principalement les amylases, les cellulases et les xylanases, représentent le deuxième groupe en importance sur le marché des enzymes. Elles

trouvent des applications dans les secteurs agro-alimentaire (p.ex. industrie brassicole, fabrication de l'éthanol, du sucre, de l'amidon), des pâtes et papiers (p.ex. blanchiment des pâtes, désencrage du papier, nettoyage des équipements, traitement de la biomasse forestière), du textile et des soins personnels (p.ex. amylases dans les dentifrices). (Barnabé et al., 2003; Kirk et al., 2002)

1.1.2.3. Les lipases

Depuis plusieurs années, les lipases apparaissent comme des enzymes clés en biotechnologie. Leurs multiples propriétés en font des candidates idéales pour les industries agro-alimentaire (p.ex. fabrication d'huiles, traitement des eaux usées), des détergents (p.ex. élimination des taches grasses), des pâtes et papiers (p.ex. nettoyage des équipements) et en synthèse organique. (Barnabé et al., 2003; Kirk et al., 2002) Les propriétés de cette catégorie d'enzymes ainsi que leurs applications seront approfondies ultérieurement dans ce chapitre, la recherche de nouvelles lipases thermostables étant l'un des objectifs de recherche ciblés dans ce travail.

1.1.2.4. Les oxydases

Les oxydases, comme les peroxydases et les dioxydases, permettent la dégradation de la lignine (partie non cellulosique du bois), l'oxydation du phénol, des chlorophénols et des composés aromatiques. Ces propriétés font que les oxydases ont des applications surtout dans les domaines des pâtes et papiers (p.ex. blanchiment des pâtes, traitements des eaux usées), du traitement des boues d'épuration, du textile et de la décontamination des sols (p.ex. biorestauration, dégradation des pesticides). (Barnabé et al., 2003)

1.1.3. Les thermozymes

1.1.3.1. Intérêt pour les enzymes thermostables

Selon leur température optimale de croissance, les bactéries peuvent être classées en quatre groupes : les psychrophiles (-5 à 20°C), les mésophiles (15 à 45°C), les

thermophiles (45 à 80°C) et les hyperthermophiles ($\geq 80^\circ\text{C}$) (Vieille et Zeikus, 2001). Les enzymes produites par les thermophiles et les hyperthermophiles sont habituellement thermostables, c'est-à-dire qu'elles sont résistantes à l'inactivation irréversible à des températures élevées. Elles sont thermophiles, donc la température où leur activité est optimale se situe entre 60 et 125°C. On les appelle thermozymes ou thermoenzymes (Li et al., 2005). Les enzymes produites par les mésophiles sont, quant à elles, connues sous le nom de mésozymes.

Les mésozymes ne sont souvent pas appropriées pour certains procédés industriels qui requièrent des conditions réactionnelles parfois rudes et particulières (température, pH, présence de solvants). Les thermozymes possèdent des avantages biotechnologiques par rapport aux mésozymes. Elles sont, généralement, plus résistantes que les mésozymes à la dénaturation thermique et chimique (Zeikus et al., 1998). Elles sont plus faciles à purifier par traitement à la chaleur (Li et al., 2005). En raison de leur thermostabilité dans des conditions de température élevée, les réactions catalysées par des thermozymes sont moins susceptibles d'être contaminées par des microorganismes et ont souvent des taux réactionnels plus élevés que les mêmes réactions catalysées par des mésozymes. Par surcroît, le fait d'opérer des procédés à des températures élevées entraîne une diminution de la viscosité du milieu réactionnel en plus d'augmenter la solubilité des substrats (Bruins et al., 2001). Ces avantages indéniables ont su susciter l'intérêt de l'industrie.

1.1.3.2. Sources et applications des thermozymes

Géographiquement, les bactéries thermophiles peuvent être isolées à partir de plusieurs endroits : les sources géothermales, les failles hydrothermales océaniques et les composts en sont de bons exemples (Haki et Rakshit, 2003). Juteau et al. (2004) en ont même isolées à partir de la biomasse provenant d'un réacteur aérobique thermophile traitant le lisier de porc. Les sources de thermozymes et donc, de bactéries qui les produisent, peuvent être assez variables. Haki et al. (2003) rapportent que plusieurs enzymes, aux propriétés thermophiles, produites par différentes bactéries, ont été caractérisées, comme

par exemple des α -amylases, des pullulanases, des cellulases, des xylanases et des lipases.

Plusieurs secteurs industriels trouvent des applications pour les thermozymes. L'industrie de l'amidon est une grosse consommatrice d'enzymes pour l'hydrolyse et la modification de cette matière première. Elle requiert l'utilisation d'amylases et de pullulanases efficaces pour faire la bioconversion de l'amidon en sirop de dextrose, qui par exemple, servira à alimenter d'autres industries en substrats fermentescibles. Des amylases et des pullulanases d'intérêt ont en effet été isolées à partir de bactéries appartenant aux espèces *Bacillus* et *Thermococcus*, par exemple. (Haki et Rakshit, 2003)

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur Terre, étant la composante structurale principale des plantes. Elle se compose d'unités de glucose reliées linéairement par des liens glucosidiques β -1,4. La structure intrinsèque de ce polymère le rend très résistant à la digestion et à l'hydrolyse. La bioconversion de la cellulose en glucose nécessite l'emploi de cellulase. Des espèces de *Pyrococcus* et de *Thermotoga* produisent des cellulases dont les températures optimales d'activité dépassent les 95°C. Actuellement, les cellulases sont utilisées, entre autre, au niveau de détergents, dans le prétraitement de déchets industriels et pour la production de bioéthanol. (Haki et Rakshit, 2003; Vieille et Zeikus, 2001)

Si la cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur Terre, la chitine est certainement le deuxième plus abondant. Il s'agit d'un polymère linéaire de N-acétylglucosamine relié par des liens β -1,4. Dans la nature, la chitine est la composante principale de la paroi cellulaire de champignons, de l'exosquelette des arthropodes, comme les crustacés (p.ex. crevettes, crabes), et des insectes. La chitine et ses dérivés, comme le chitosane, ont beaucoup d'applications dans les domaines alimentaire, agrochimique, pharmaceutique et des cosmétiques. Afin de la rendre accessible pour ces diverses applications, la chitine/chitosane doit souvent être digérée par des chitinases/chitosanases qui hydrolysent les liens glucosidiques du polymère et par des

déacétylases qui déacétylent la glucosamine. Plusieurs espèces thermophiles de *Bacillus* ont été rapportées comme producteurs de telles enzymes (Haki et Rakshit, 2003).

Au cours des dernières années, plusieurs auteurs ont publié des articles très intéressants qui font une revue des sources et des applications industrielles des thermozymes, un complément d'information y sera trouvé (Demirjian et al., 2001; Haki et Rakshit, 2003; Vieille et Zeikus, 2001).

1.1.3.3. Mécanismes stabilisateurs des thermozymes

Comme il a été question précédemment (section 1.1.3.1.), les thermozymes possèdent des avantages biotechnologiques importants par rapport aux mésozymes, en bonne partie en raison de leur grande stabilité. Plusieurs mécanismes stabilisateurs peuvent expliquer cette réalité. En effet, les chercheurs n'ont trouvé aucun nouvel acide aminé, aucune modifications covalentes ni motifs structuraux pouvant expliquer la capacité des thermozymes à fonctionner dans des environnements parfois assez extrêmes (p.ex. conditions de température et de pH). Il s'agit plutôt d'une combinaison de plusieurs petites modifications structurales et interactions intramoléculaires, les mêmes qui sont impliquées dans la stabilisation des protéines mésophiles, qui permet de maintenir l'intégrité structurale des protéines dans ces conditions (Fields, 2001). L'élément clé au niveau du bon fonctionnement des thermozymes est le maintien d'un équilibre entre la stabilité moléculaire (rigidité) et la flexibilité structurale. La stabilité moléculaire permet d'assurer la bonne géométrie (conformation) pour la liaison au substrat et d'éviter la dénaturation, alors que la flexibilité assure un taux catalytique métaboliquement approprié.

Les principaux facteurs qui contribuent à la stabilité des enzymes thermophiles sont : l'augmentation du pairage ionique, l'augmentation des interactions hydrophobes (p.ex. à l'interface des sous-unités), une diminution du ratio surface/volume (« packing efficiency »), l'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes, une diminution des contraintes conformationnelles et une stabilisation des boucles. Tous ces

éléments sont intimement reliés par un dernier facteur très important : la composition et le changement au niveau d'acides aminés spécifiques (Demirjian et al., 2001; Zeikus et al., 1998).

Le pairage ionique, organisé dans de larges réseaux à la surface des protéines, est une force stabilisatrice majeure. La présence d'arginines dans ces réseaux est très fréquente et cet acide aminé est présent en plus grande quantité dans les thermozymes. La diminution du ratio surface/volume se fait en augmentant l'hydrophobicité du cœur des protéines. La stabilité générale des protéines est augmentée par l'internalisation d'acides aminés plus labiles dans le cœur hydrophobe. La présence d'acides aminés labiles comme la cystéine, l'asparagine et l'acide aspartique est moins importante chez les enzymes thermostables. Un nombre plus élevé d'isoleucines, d'alanines et de prolines permet généralement un compactage plus efficace au niveau du cœur hydrophobe et une stabilité supplémentaire au niveau des boucles. Les acides aminés qui ont des embranchements sur leur C^β (p.ex. valine, isoleucine, thréonine) entraînent plus de contraintes conformationnelles, ils sont donc moins présents chez les thermozymes. Les enzymes qui ont moins d'asparagines, de glutamines, de cystéines, de méthionines et de tryptophanes dans leur composition sont moins susceptibles à la dégradation par modifications chimiques. L'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes permet d'augmenter la stabilité moléculaire (rigidité conformationnelle). (Bruins et al., 2001; Demirjian et al., 2001)

Mise à part les articles de Bruins et al. (2001) et Demirjian et al. (2001), Li et al. (2005) et Vieille et Zeikus (2001) ont publié d'excellentes revues sur les caractéristiques structurales des thermozymes et leurs mécanismes stabilisateurs.

Du point de vue du mécanisme catalytique des enzymes, des études suggèrent la conclusion générale suivante, soit que les mécanismes catalytiques sont identiques entre les enzymes mésophiles et thermophiles. Bauer et Kelly (1998) ont fait la comparaison entre le mécanisme catalytique de deux enzymes homologues provenant de sources thermophile et mésophile. Ils ont comparé l'activité catalytique de la β -glucosidase recombinante provenant de l'*Archaea* hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* à celle de la

β -glucosidase mésophile produite par *Agrobacterium faecalis*. Les propriétés de l'enzyme recombinante, produite chez *Escherichia coli*, ont préalablement été testées et confirmées identiques à celles de l'enzyme sauvage. Plusieurs tests de caractérisation ont été effectués (p.ex. spécificité du substrat, dépendance face au pH, paramètres cinétiques, comportement en présence d'inhibiteurs) et les similarités sont indéniables, en dépit de la large différence au niveau de leur température optimale d'activité. Les auteurs suggèrent qu'au cours de l'évolution qui a séparé les deux enzymes, les modifications structurales qui ont été sélectionnées ont permis de conserver l'intégrité structurale du site actif et par conséquent, de conserver la spécificité des interactions à l'état de transition, tout en adaptant la structure générale de la protéine pour fonctionner à la température où le microorganisme évoluait.

1.2. Les bactéries thermophiles

1.2.1. Généralités

Comme il a été mentionné précédemment (section 1.1.3.1.), les bactéries peuvent être classées en quatre groupes, selon leur température optimale de croissance : les psychrophiles (-5 à 20°C), les mésophiles (15 à 45°C), les thermophiles (45 à 80°C) et les hyperthermophiles ($\geq 80^\circ\text{C}$) (Vieille et Zeikus, 2001). Certains subdivisent même les thermophiles en deux avec les thermophiles modérés (45 à 65°C) et les thermophiles à proprement dit (65 à 85°C) (Demirjian et al., 2001). Mise à part l'élément température, il existe des bactéries pouvant croître dans toutes sortes de conditions environnementales : il y a les microaérophiles qui ne poussent qu'en présence d'une moins grande quantité d'oxygène dans l'air ($< 21\% \text{ O}_2$), sans oublier les anaérobies strictes qui ne tolèrent pas l'oxygène. Il y a aussi les acidophiles (faible pH), les alcalinophiles (pH élevé), les halophiles (forte concentration de sels), les piezophiles (forte pression) et les métalophiles (forte concentration de métaux) pour ne donner que ces exemples. En raison de la vaste distribution géographique et des divers habitats possibles pour les thermophiles, il est fréquent de retrouver des bactéries qui répondent à un autre ou plusieurs autres critères extrêmes mise à part la température.

Généralement, on s'attend à ce que les microorganismes thermophiles croissent dans des environnements chauds, comme les sources géothermales et les failles océaniques hydrothermales, par exemple (McMullan et al., 2004). Beaucoup des thermophiles qui ont été isolés et caractérisés font partie de la famille des *Archaea* et sont anaérobies. Considérant que la solubilité de l'oxygène diminue avec l'augmentation de la température, il n'est pas surprenant que les bactéries isolées des sources géothermales et des failles océaniques hydrothermales soient anaérobies. Toutefois, Marchant et al. (2002a; 2002b) ont rapporté qu'il était aussi possible d'isoler des bactéries thermophiles provenant d'environnements froids (par opposition aux conditions thermophiles, <45°C). Ils ont isolé cinq souches bactériennes à partir d'échantillons de sols récoltés à 50 mm de profondeur et dont la température du sol ne dépassait jamais 25°C. Les cinq souches ont démontré leur capacité à croître dans un intervalle de températures variant de 40 à 80°C et toutes ces souches étaient aérobies strictes. Des analyses du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S ont démontré que trois des cinq souches avaient une forte similarité de séquence avec *Bacillus kaustophilus* (maintenant classifié comme *Geobacillus kaustophilus* (Nazina et al., 2001)) et que les deux autres se rapprochaient de *Bacillus thermoglucosidasius* (maintenant classifié comme *Geobacillus thermoglucosidasius* (Nazina et al., 2001)). Les résultats de Marchant et al. (2002a; 2002b) ont permis de démontrer que des bactéries thermophiles peuvent être retrouvées de façon ubiquitaire dans l'environnement et qu'il est possible d'en isoler sur des géloses suite à un enrichissement ou directement de l'environnement. Le dénombrement sur plaque à partir des sols utilisés a démontré que les thermophiles sont présents de manière significative et qu'ils représentaient jusqu'à 10% des bactéries aérobies cultivables totales.

1.2.2. Besoins nutritifs des bactéries thermophiles

Les bactéries thermophiles ont parfois des besoins nutritifs particuliers voire même essentiels. Plusieurs auteurs ont rapporté ces observations, comme par exemple Sürücü (1999). Dans ses travaux, il expose les besoins spécifiques des thermophiles au niveau des acides aminés, des vitamines et des minéraux. La méthionine s'avérait être absolument essentielle dans ce cas, alors que l'histidine stimulait la croissance. Les

vitamines B1 (thiamine) et B2 (riboflavine) stimulaient aussi la croissance. Au niveau des minéraux, le magnésium, mais aussi le calcium et le fer, semblaient très important. Ses travaux démontraient aussi un effet nutritionnel synergique dans ses cultures, car les espèces dominantes étaient moins exigeantes, sur le plan nutritionnel, en culture mixte qu'en culture pure.

L'identification de facteurs physiologiques et environnementaux qui peuvent limiter une croissance appropriée des bactéries thermophiles est importante pour le développement d'applications industrielles (p.ex. enzymes, métabolites) à partir de ces microorganismes. En effet, plusieurs réactions secondaires peuvent survenir à des températures élevées. C'est le cas de la formation accélérée des produits de la réaction de brunissement de Maillard à de telles températures. La réaction de Maillard est la réaction entre des sucres réducteurs (p.ex. glucose) et des composés amino (p.ex. acides aminés). Kim et Lee (2003) ont rapporté que la croissance de l'*Archaea Aeropyrum pernix* est fortement inhibée par les produits de cette réaction. Cette conclusion n'est toutefois pas un absolu, car Einarsson et al. (1983) mentionnent des études où les auteurs affirment que les produits de la réaction de Maillard stimulent la croissance microbienne alors que d'autres auteurs soutiennent le contraire. Un autre exemple de réaction secondaire est la conversion du L-glutamate en L-pyroglutamate, ce dernier inhibant significativement la croissance de l'*Archaea Sulfolobus solfataricus* (Park et al., 2001). Ces données supportent l'idée que la modification chimique des milieux de culture à des températures élevées soit un facteur déterminant pour la croissance efficace des thermophiles.

1.2.3. Les *Bacillaceae*

Les *Bacillaceae* sont une famille de bactéries qui regroupe une quantité large et diversifiée de bâtonnets Gram positifs, sporulés ou non, aérobies ou anaérobies facultatifs. Il y en a qui croissent à toutes les températures et à tous les pH. Le genre *Bacillus* est le genre type de cette famille. Les espèces du genre *Bacillus* sont très intéressantes pour le développement d'applications industrielles pour plusieurs raisons. Leurs taux de croissance rapide menant à des cycles de fermentation courts, leurs

capacités à sécréter des protéines dans leur milieu extracellulaire ainsi que le fait que certaines espèces soient sur la liste du GRAS (« generally regarded as safe », considéré généralement comme sécuritaire) de la FDA (« Food and Drug Administration ») suscitent l'intérêt des industriels. Par exemple, il est estimé que les enzymes produites par les diverses espèces de *Bacillus* représentent environ 50% du marché total des enzymes (Schallmey et al., 2004).

Jusqu'à il y a quelques années, les bactéries thermophiles aérobies et sporulantes étaient classifiées dans les genres *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Sulfobacillus*, *Thermoactinomyces* et *Thermobacillus* (Nazina et al., 2001). En se basant sur leurs séquences d'ARN ribosomiaux 16S, la majorité des espèces décrites appartiennent aux groupes génétiques 1 et 5 du genre *Bacillus* (Ash et al., 1991; Rainey et al., 1994). Les récents développements techniques de la biologie moléculaire ont permis la reclassification de plusieurs espèces de *Bacillus* ainsi que la création de nouveaux genres. Le groupe 5, par exemple, est un groupe homogène sur le plan phénotypique et phylogénique de bacilles thermophiles qui ont une forte similarité de séquence au niveau de leur gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (98,5-99,2%). Ce groupe comprend des espèces comme *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus* et *Bacillus thermodenitrificans*, par exemple. En 2001, Nazina et al. ont reclassé les espèces de ce groupe dans le nouveau genre *Geobacillus*, *Geobacillus stearothermophilus* en étant l'espèce type. Il est possible d'isoler des souches de *Geobacillus* un peu partout dans le monde; ces bactéries sont présentes dans le sol, dans les champs pétrolifères, les sources géothermales et dans les composts, pour ne donner que ces exemples (Kuisiene et al., 2004; McMullan et al., 2004; Nazina et al., 2001; Schäffer et al., 2004; Sung et al., 2002).

1.3. Les lipases et les estérases

1.3.1. Généralités sur les enzymes lipolytiques

Les bactéries produisent principalement trois catégories d'enzymes lipolytiques : les lipases, les estérases et les phospholipases. En 1999, en se basant essentiellement sur

leurs séquences en acides aminés et sur quelques propriétés biologiques fondamentales, Arpigny et Jaeger (1999) ont proposé une classification des enzymes lipolytiques bactériennes. Ces enzymes ont été réparties en huit familles dont la plus grande comprend six sous-familles. La famille I, qui comprend les six sous-familles, représente les vraies lipases (par opposition aux estérases). Des lipases produites par des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (famille I.1.), *Burkholderia cepacia* (famille I.2.) et *Bacillus subtilis* (famille I.4.) composent cette famille. Les lipases produites par des bactéries thermophiles comme *G. stearothermophilus* et *G. thermocatenulatus* y trouvent aussi leur place (famille I.5.). À partir de la famille II, la classification comprend plutôt des estérases. Les estérases de *P. aeruginosa* et d'*Aeromonas hydrophila* constituent des exemples de membres de la famille II. Il est à noter que cette classification ne tient pas compte des phospholipases bactériennes, tout comme il n'en sera pas question dans ce travail.

1.3.2. Généralité sur les lipases et les estérases

Selon la nature de leur substrat, il est possible de diviser les enzymes lipolytiques en deux catégories: les lipases (triacylglycérol acylhydrolases, E.C. 3.1.1.3.) et les estérases (carboxylestérases, E.C. 3.1.1.1.). Les lipases sont des carboxylestérases qui catalysent l'hydrolyse et la synthèse d'acylglycérols à longues chaînes, c'est-à-dire qu'ils contiennent plus de dix atomes de carbone (>10 C), alors que les estérases catalysent l'hydrolyse de glycérolesters à courtes chaînes (<10 C). Il est à noter que parfois les lipases possèdent aussi une activité estérase, mais que l'inverse n'est pas vrai. Les lipases agissent en conditions aqueuses sur les liens carboxyl esters des triacylglycérols pour libérer des acides gras et du glycérol, c'est l'action hydrolytique des lipases. Toutefois, dans des conditions où les molécules d'eau sont moins abondantes ou disponibles, la réaction inverse, soit de synthèse, peut survenir (Gupta et al., 2004). La figure 1 schématise l'action catalytique des lipases.

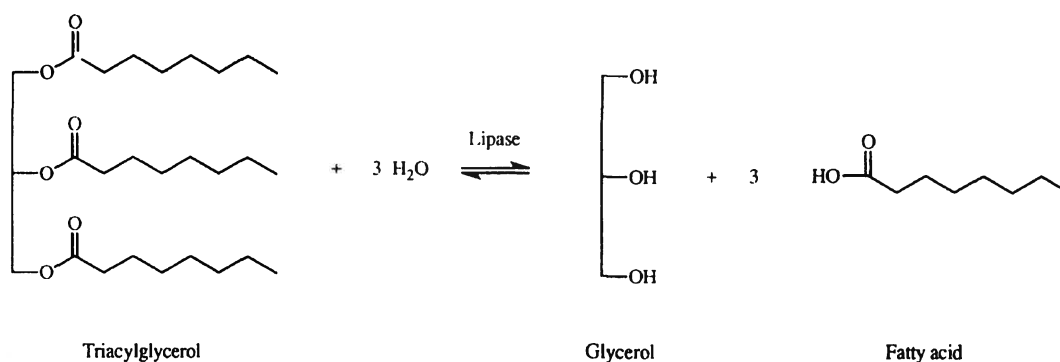


Figure 1. Réaction enzymatique d'une lipase catalysant l'hydrolyse complète ou la synthèse d'un substrat triacylgérol. (Tiré de Jaeger et al. (1994))

La trioléine et la tributyrine sont reconnues, respectivement, comme les substrats typiques des lipases et des estérases. Il est à noter qu'il existe une zone grise ou intermédiaire entre les lipases et les estérases où se retrouvent les enzymes dont les substrats acylglycérols ont des chaînes de carbone de longueur moyenne, c'est-à-dire de huit à 14 atomes de carbone. L'appellation estérase/lipase leur est parfois attribuée.

Les triacylglycérols sont des lipides non chargés. Ceux à courtes chaînes (p.ex. triacétine, tributyrine) sont solubles dans l'eau, alors que ceux à longues chaînes (p.ex. trioléine) ne le sont pas. La réaction de lipolyse pour les vraies lipases a lieu à l'interface eau-lipide. Elles ne démontrent que peu d'activité lorsque le substrat est sous une forme monomérique tandis que l'activité augmente rapidement lorsque la limite de solubilité est dépassée et que le substrat forme des émulsions. Ce phénomène est connu sous le nom d'activation à l'interface (« interfacial activation »), décrivant ainsi le fait que l'activité des lipases est fortement influencée par la présence de substrats sous forme d'émulsion (Jaeger et al., 1994; Jaeger et Reetz, 1998; Salameh et Wiegel, 2007). Dans le passé, les lipases, par opposition aux estérases, étaient ainsi définies comme des carboxylestérases agissant sur des substrats émulsifiés (Ferrato et al., 1997; Sarda et Desnuelle, 1958).

La détermination de la structure tridimensionnelle des lipases a permis d'émettre une explication plausible pour l'activation à l'interface. Le site actif des lipases est recouvert

par un segment hélicoïdal, un couvercle (« lid »). En se liant à l'interface, ce « couvercle » se retire, convertissant ainsi l'enzyme de sa forme fermée à sa forme ouverte. Le site actif de l'enzyme est maintenant accessible au solvant. Au même moment, une large surface hydrophobique est exposée ce qui faciliterait probablement la liaison de la lipase à l'interface (Brzozowski et al., 1991; Cygler et Schrag, 1997). Toutefois, Verger (1997) rapporte des exemples de lipases qui en dépit d'avoir cette structure recouvrant leur site actif, n'adhère pas au phénomène d'activation à l'interface. Ces observations mènent à la conclusion que la présence de ce couvercle et l'activation à l'interface sont des critères invalides pour classer une enzyme dans la catégorie des lipases. Il en découle donc la définition actuelle et simple des lipases qui, comme mentionné précédemment, sont des carboxylestérases qui catalysent l'hydrolyse d'acylglycérols à longues chaînes (Verger, 1997).

Le fait que les lipases agissent à l'interface eau-lipide implique que les paramètres cinétiques (p.ex. K_M et V_{max}) des vraies lipases ne peuvent pas être décrits par les équations de Michaelis-Menten (Jaeger et Reetz, 1998). En effet, ces dernières ne sont valides que si la réaction catalytique se produit dans une phase homogène. Il est donc nécessaire d'avoir un modèle approprié pour déterminer ces paramètres. Dans son article de revue, Holmquist (2000) résume et illustre bien le modèle proposé. Pour étudier les paramètres cinétiques des lipases, la technique monocouche (« monolayer technique ») a été largement employée dans le passé (Ransac et al., 1997) et plus récemment, la technique de la goutte d'huile (« oil-drop ») a été mise de l'avant (Labourdenne et al., 1997). Dans le cas des estérases, comme elles agissent sur des substrats solubles, les équations de Michaelis-Menten peuvent donc s'appliquer. La formation d'émulsion eau/substrat n'influence en rien l'activité des estérases.

Malgré l'absence d'un couvercle recouvrant leur site actif, les estérases partagent plusieurs similarités structurales avec les lipases (p.ex. séquences consensus, patron de repliement). Toutefois, l'analyse des séquences en acides aminés permet de relever quelques disparités (Fojan et al., 2000). Dans ce travail, comme les lipases constituent un point d'intérêt marqué, l'accent sera dorénavant mis sur elles.

1.3.3. Description structurale et mécanisme d'action des lipases

Les lipases sont des enzymes qui ont un poids moléculaire pouvant varier de 19 à 60 kDa. Structurellement, elles ont toutes le même modèle de repliement : le repliement α/β -hydrolase (Ollis et al., 1992). Ce modèle de repliement est partagé par une grande variété d'enzymes hydrolytiques (p.ex. protéases, estérases, lipases, déshalogénases), d'où le nom hydrolase. Le repliement « canonique » α/β -hydrolase typique est composé d'un feuillet β principalement parallèle comprenant huit segments différents ($\beta 1$ - $\beta 8$), seul le deuxième segment ($\beta 2$) est antiparallèle. Les segments $\beta 3$ à $\beta 8$ sont reliés par six hélices α (A à F) de part et d'autre du feuillet β central. La figure 2 illustre la structure secondaire générale du repliement « canonique » α/β -hydrolase. Au niveau du site actif des enzymes ayant ce type de repliement, les résidus catalytiques forment une triade catalytique très conservée : un nucléophile (sérine, cystéine, acide aspartique) positionné après le segment $\beta 5$, un résidu acide presque toujours situé après le segment $\beta 7$ et une histidine, toujours conservée, localisée après le segment $\beta 8$ (Nardini et Dijkstra, 1999). Chez les lipases, la triade catalytique se compose d'une sérine, d'un acide aspartique (ou glutamique) et d'une histidine (Jaeger et Reetz, 1998). La sérine nucléophile fait partie d'un pentapeptide très conservé (Gly-X-Ser-X-Gly) formant un motif caractéristique « β -turn- α » appelé « coude nucléophile ». Toutefois, les lipases de bactéries Gram positives (p.ex. *G. stearothermophilus*, famille I.5, selon la classification d'Arpigny et Jaeger (1999)) comportent une exception au niveau du pentapeptide conservé : une alanine remplace la première glycine dans ce dernier (Ala-X-Ser-X-Gly). De la même façon, les enzymes de la famille II (Arpigny et Jaeger, 1999) n'exprime pas le pentapeptide conventionnel, mais plutôt un motif Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)] contenant la sérine du site actif. C'est pour cette raison que la famille II est aussi appelé famille GDLS.

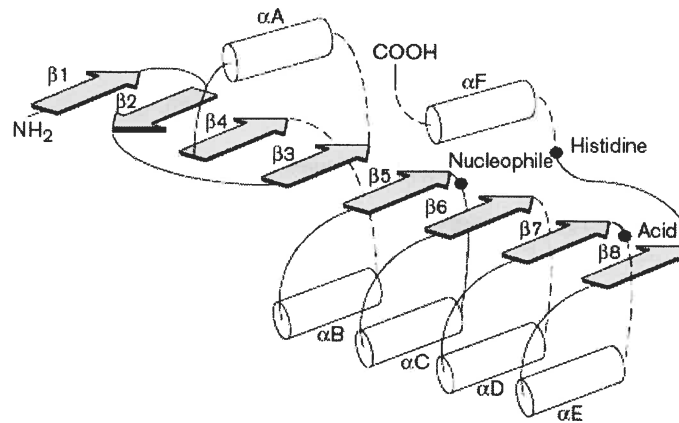


Figure 2. Schéma de la structure secondaire générale du repliement « canonique » α/β -hydrolase. (D'après Ollis et al. (1992), tiré de Nardini et Dijkstra (1999)) Les hélices α et les segments β sont représentés, respectivement, par des cylindres blancs et des flèches grises. Les résidus catalytiques sont indiqués par des points noirs. Les lignes tiretées indiquent les endroits où il est possible de retrouver des insertions.

En raison de la grande diversité d'enzymes hydrolytiques possédant ce modèle de repliement, plusieurs déviations peuvent apparaître dans la structure secondaire typique. Ces déviations comprennent autant des changements mineurs au niveau des acides aminés que des changements plus importants comme des segments β et des hélices α supplémentaires. Nardini et Dijkstra (1999) rapportent des exemples de telles déviations.

Comme il a été mentionné précédemment, les lipases sont des enzymes qui hydrolysent les liens carboxyl esters présents dans les triacylglycérols pour libérer des acides gras et du glycérol. La triade catalytique des lipases (Ser-Asp/Glu-His) est similaire à celle des protéases à sérine, ce qui a permis d'en déduire le mécanisme de lipolyse (Jaeger et al., 1999; Jaeger et Reetz, 1998). L'hydrolyse du substrat débute par l'attaque nucléophile de l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle de la sérine sur l'atome de carbone carbonyle du lien ester du substrat. Il en résulte la formation d'un intermédiaire tétraédrique, stabilisé par des liens hydrogène avec des groupes NH (« trou oxyanion ») de la chaîne principale d'acides aminés. Le caractère nucléophile de la sérine est augmenté par la présence de l'histidine catalytique, laquelle accepte le transfert du proton du groupement hydroxyle de la sérine. Ce transfert est favorisé par la présence de l'acide

catalytique (acide aspartique ou glutamique). La rupture de l'intermédiaire tétraédrique entraîne la libération d'un alcool. Le complexe acyl-lipase résultant est finalement hydrolysé libérant du coup un acide gras et entraînant la régénération de l'enzyme. Il est possible de retrouver une description mécanistique plus approfondie dans l'article de revue de Jaeger et al. (1999).

1.3.4. Propriétés physicochimiques des lipases

La grande diversité de bactéries produisant des lipases, et ce sous différentes conditions, entraîne inévitablement une grande variabilité au niveau des propriétés de ces enzymes. Généralement, les lipases ont un pH optimum d'activité aux alentours de pH 7 (neutre) ou à un pH plus élevé, c'est-à-dire dans des conditions alcalines. Elles sont aussi stables sur une grande fenêtre de pH, variant de pH 4 à pH 11 (Gupta et al., 2004). À l'opposé des lipases alcalines, les lipases acides n'ont fait l'objet que de peu d'études (Bradoo et al., 1999; Liu et al., 2007). Côté température d'activité, les lipases bactériennes sont optimales généralement entre 30 et 60°C. Toutefois, il existe des cas où la température optimale des lipases se retrouve dans des intervalles inférieurs ou supérieurs. Il suffit de penser aux lipases thermostables pour trouver des exemples d'enzymes où l'activité est optimale à des températures supérieures à 60°C. Par exemple, *Geobacillus thermocatenulatus* produit une lipase dont l'activité maximale est à 75°C en utilisant la trioléine comme substrat (Schmidt-Dannert et al., 1997). Cette même enzyme, à 60°C, a une activité maximale à pH 9,0 en employant toujours la trioléine comme substrat, illustrant ici le caractère alcalin de la lipase. *Burkholderia cepacia* RGP-10 sécrète aussi une lipase alcaline aux propriétés extrêmes (Rathi et al., 2000; Rathi et al., 2001). Son activité optimale a été observée à pH 11 et à 90°C tout en ayant une activité dans un large éventail de température (25-100°C). Dans certain cas, la thermostabilité des lipases peut être augmentée par l'addition de stabilisateurs. Par exemple, l'ajout d'éthylène glycol, de sorbitol ou de glycérol permet d'augmenter la thermostabilité de la lipase produite par *Bacillus* sp. J33 (Nawani et Kaur, 2000).

Généralement, les lipases sont reconnues comme étant stables dans des solvants organiques. Cela constitue une caractéristique intéressante pour le développement d'applications industrielles. Cependant, il existe quelques exceptions où les solvants organiques stimulent ou inhibent l'activité enzymatique (Gupta et al., 2004). Les cofacteurs ne sont ordinairement pas requis pour l'activité des lipases, mais des cations divalents (p.ex. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) peuvent stimuler l'activité. C'est le cas de la lipase thermophile produite par *Geobacillus thermoleovorans* ID-1 dont l'activité est stimulée par les cations Ca^{2+} ou Zn^{2+} (Lee et al., 1999). L'effet stimulateur des ions calciques pourraient s'expliquer par leur capacité de titrage des acides gras libérés par la lipolyse, ce qui préviendrait l'effet inhibiteur des acides gras libres sur l'activité des lipases. Il pourrait aussi y avoir un lien au niveau structural (Kim et al., 2000). Les métaux lourds (p.ex. Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+}), quant à eux, inhibent fortement les lipases. Par exemple, l'activité enzymatique de la lipase de *Geobacillus* sp. TW1 est inhibée par les ions Cu^{2+} et Mn^{2+} (Li et Zhang, 2005).

Les inhibiteurs de lipases sont utiles pour étudier les propriétés structurales et mécanistiques des lipases, mais aussi d'un point de vue pharmacologique. En effet, les inhibiteurs de lipases peuvent aider à créer des médicaments pour le traitement de l'obésité et des problèmes d'acné, par exemple (Gupta et al., 2004). Les inhibiteurs peuvent être divisés en deux groupes : les inhibiteurs non-spécifiques (réversibles) et les spécifiques (irréversibles ou réversibles). Les non-spécifiques sont des composés qui n'agissent pas directement au site actif des lipases, ils exercent leur effet en modifiant la conformation ou les propriétés à l'interface de l'enzyme. Les sels biliaires et les surfactants en sont de bons exemples. Les inhibiteurs spécifiques agissent directement au site actif de l'enzyme, il s'agit souvent d'analogues de substrats.

1.3.5. Spécificité du substrat

Le glycérol constitue la molécule de base des triacylglycérols, les substrats typiques des lipases et des estérases. Dans une projection de Fisher et selon la nomenclature internationale, le groupement hydroxyle secondaire est positionné à gauche et les atomes

de carbone sont numérotés 1, 2 et 3 du haut vers le bas (sn-, stéréospécifiquement numéroté) (Jaeger et al., 1994). Cela permet une description claire et précise des glycérides.

Selon leur spécificité du substrat, les lipases microbiennes peuvent être regroupées en trois catégories : les non-spécifiques, les régiospécifiques et les acides gras spécifiques (Gupta et al., 2004). Les lipases non-spécifiques agissent au hasard sur la molécule de triacylglycérol (sur les trois positions) et ce, peu importe la nature des acides gras qui la compose. Il en résulte une hydrolyse complète, libérant du coup des acides gras et du glycérol. Les lipases régiospécifiques hydrolysent seulement les liens esters primaires, c'est-à-dire les liens esters des atomes C1 et C3 du glycérol. Ce sont des lipases 1,3-spécifiques. Plusieurs produits peuvent être générés : des acides gras libres, du 1,2(2,3)-diacylglycéride et du 2-monoacylglycéride. Peu de lipases démontrent une régiosélectivité pour la position sn-2 du glycérol (Lanser et al., 2002). En troisième lieu, les lipases, acides gras spécifiques, sont des enzymes qui ont une préférence marquée pour un type d'acide gras (p.ex. présence d'une double liaison à une position définie de l'acide). Les lipases bactériennes expriment davantage une préférence envers la longueur des acides gras qui composent le triacylglycéride (chaîne courte, moyenne ou longue) que sur la nature même de ceux-ci.

Les lipases ont aussi une nature énantio-/stéréosélective. Cela signifie qu'elles sont capables de différencier les énantiomères d'une paire racémique. Cette propriété est très utile, entre autre, en synthèse organique. Cette nature dépend principalement de la structure du substrat, des interactions au site actif et des conditions réactionnelles (Gupta et al., 2004).

1.3.6. Conditions de production des lipases

Les lipases bactériennes sont principalement extracellulaires et leur production est grandement influencée par une multitude de facteurs physicochimiques et nutritionnels

comme la température, le pH, l'agitation, la concentration d'oxygène dissous, les sources de carbone et d'azote, la présence de lipides et de sels inorganiques (Gupta et al., 2004).

La température optimale pour la production de lipase par une bactérie correspond à la température optimale pour la croissance de cette bactérie. Il en est de même pour les conditions de pH. Comme la production de lipase s'effectue tout au long de la croissance des bactéries, avec une production maximale en fin de croissance exponentielle, la période d'incubation peut donc varier d'une bactérie à l'autre.

La présence de cations divalents peut stimuler ou inhiber la production d'enzymes chez les microorganismes. Chez *Burkholderia cepacia* RGP-10, la production de lipase est augmentée en présence de Mg^{2+} et de Ca^{2+} (Rathi et al., 2001). Toutefois, la plupart des autres sels d'ions métalliques ont un effet inhibiteur sur la production. Les besoins en ions métalliques varient d'un microorganisme à l'autre.

La source d'azote serait aussi importante pour la production de lipase. Généralement, de l'azote organique (p.ex. des peptones et des extraits de levures) est employé dans les milieux de culture. Plusieurs espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas* utilisent de l'azote organique pour produire des lipases (Abdel-Fattah, 2002; Burcu Bakir Ateşlier et Metin, 2006; Lanser et al., 2002). Des sources d'azote inorganique, comme le chlorure d'ammonium et le sulfate d'ammonium, ont aussi été rapportées efficaces chez certaines bactéries (Becker et al., 1997; Bradoo et al., 1999; Rathi et al., 2002).

Le facteur ayant probablement le plus d'influence sur la production de lipase est, sans aucun doute, la source de carbone. Comme les lipases sont principalement des enzymes inductibles, elles sont généralement produites en présence d'une source de lipides comme de l'huile (p.ex. d'olive, de canola, de palme) ou d'autres inducteurs comme des triacylglycérols, des acides gras, des Tweens ou du glycérol (Abdel-Fattah, 2002; Becker et al., 1997; Gupta et al., 2004; Gupta et al., 2004; Handelsman et Shoham, 1994; Lee et al., 1999; Rathi et al., 2002). De plus, la production de lipase peut être grandement influencée par la présence d'autres sources de carbone comme des sucres, des sucres

réducteurs et d'autres sources complexes. Par exemple, la lipase de *Bacillus* sp. RGS-1 est faiblement induite par des huiles alors que des sucres comme le galactose, le lactose et le mannitol induisent sa production (Gupta et al., 2004). Aussi, l'effet combiné de la présence d'un inducteur et d'un sucre peut être bénéfique. C'est le cas pour cette souche (RGS-1) de *Bacillus* sp. En effet, Gupta et al. (2004) ont rapporté que l'incorporation de 10 mL/L de glycérol et 2 g/L de glucose dans le milieu de culture qu'ils ont défini, est optimale pour la production de lipase. Toutefois, l'influence des sucres n'est pas toujours positive. Fakhreddine et al. (1998) relatent des exemples où l'addition de Tween 80 (sorbitan monooléate de polyoxyéthylène) stimulait la production de lipase, mais que combiné à l'addition de glucose, cette production diminuait. Le même phénomène était observé lorsque le glucose ou d'autres sucres (p.ex. fructose, sucrose, maltose) constituaient la seule source de carbone. La situation est identique en ce qui concerne les acides gras à longues chaînes comme les acides oléique, linoléique et linoléique, parfois ils favorisent la production, parfois ils la répriment (Gupta et al., 2004). La source de carbone apparaît donc comme un élément clé pour la production de lipase, son choix est déterminant.

1.3.7. Méthodes de détection et de dosage des lipases

1.3.7.1. Détection et criblage de bactéries lipolytiques

Quand vient le temps de choisir une méthode pour la détection et le criblage de bactéries ayant une activité lipolytique, plusieurs facteurs sont à prendre en considération. Les conditions de culture et la nature du substrat utilisé sont deux éléments qui peuvent grandement influencer les résultats de cette démarche. Shelley et al. (1987) suggèrent que trois critères doivent être remplis afin de détecter une bactérie lipolytique. Premièrement, la bactérie doit croître sur le milieu de culture utilisé. Deuxièmement, la bactérie doit produire ou sécréter la lipase (ou estérase) dans les conditions de croissance qui lui sont fournies. Finalement, la méthode de détection doit être suffisamment sensible. En pratique, il est très difficile de combler ces trois critères, c'est pour cette raison que, la plupart du temps, plusieurs méthodes de détection sont combinées pour ne pas passer à côté de bactéries au potentiel intéressant.

Généralement, l'activité lipase est testée sur des triacylglycérols composés d'acides gras à longues chaînes, comme la trioléine. La trioléine est le substrat idéal pour les lipases et le fait qu'elle soit liquide à la température où la plupart des tests ont lieu, facilite son émulsification (Thomson et al., 1999). En effet, comme les lipases sont actives à l'interface eau-lipide, il est primordial que le substrat soit adéquatement émulsifié, avec ou sans l'aide de stabilisateurs (p.ex. gomme arabique) ou d'émulsifiants (p.ex. Triton X-100). Une bonne alternative à la trioléine est l'utilisation de l'huile d'olive comme substrat, cette dernière contient plus de 70% d'acide oléique et est beaucoup moins coûteuse que la trioléine (Brockerhoff et Jensen, 1974). La tributyrine est aussi un substrat intéressant, entre autre, parce qu'elle se disperse bien dans l'eau sans l'ajout d'émulsifiants. Il est cependant important de se rappeler que la tributyrine n'est pas un substrat approprié pour la détection d'une « vraie » lipase. La majorité des lipases hydrolyse la tributyrine, mais un résultat positif avec ce substrat doit être confirmé avec de la trioléine pour être certain qu'il ne s'agit pas d'une estérase. Les divers Tweens constituent une autre catégorie de substrats qui peuvent être employés; toutefois, leur utilisation est critiquée, car ils constituent aussi des substrats pour les estérases, ce qui peut donner des faux-positifs si des lipases sont recherchées (Thomson et al., 1999).

L'isolement et la détection de bactéries productrices de lipases se fait principalement sur milieux solides et plusieurs méthodes ont été décrites : il y a les méthodes basées sur des changements au niveau de l'apparence du substrat, les méthodes qui utilisent des substrats fluorogéniques et les méthodes basées sur l'emploi de colorants. Dans le premier cas, la production de lipase entraîne la formation d'une zone claire (éclaircissement) ou turbide (formation d'un précipité) autour de la colonie. Lorsque le Tween 80 est utilisé comme substrat en présence de calcium, l'activité lipase provoque la formation d'un halo opaque (il s'agit d'un précipité d'oléate de calcium) autour des colonies positives (Shelley et al., 1987). C'est la technique de précipitation au calcium. L'activité lipase bactérienne sur milieu solide peut aussi être évaluée en utilisant des substrats fluorogéniques. La technique la plus connue est certainement celle décrite par Kouker et Jaeger (1987) où de la rhodamine B est incorporée au milieu de culture comme

indicateur. À l'origine, ils ont utilisé de l'huile d'olive purifiée et émulsifiée comme substrat; toutefois, d'autres substrats peuvent être employés (p.ex. triacylglycérols, Tweens). Dans ce test, les colonies qui produisent une activité lipase entraînent la formation de halos fluorescents de couleur orange qui peuvent être visualisés sous une lumière ultra-violette (UV) à une longueur d'onde de 350 nm. À la lumière blanche, ces colonies ont une coloration rouge foncée alors que les colonies qui n'ont pas d'activité lipolytique sont roses. Comme le soulèvent Thomson et al. (1999), cette distinction basée sur la différence d'intensité de la couleur rouge amène inévitablement la possibilité que des colonies ayant une faible activité ne soient pas identifiées. À l'origine, Kouker et Jaeger avaient suggéré que la fluorescence était le résultat de la génération de dimères excités de rhodamine B (Kouker et Jaeger, 1987). Plus tard, Jaeger et al. ont réfuté cette hypothèse et postulé que la fluorescence était plutôt due à la formation d'un complexe rhodamine B-acide gras libre (Jaeger et al., 1994), l'acide gras provenant du substrat hydrolysé. Cette méthode possède deux avantages majeurs: elle est insensible aux variations de pH et elle permet le ré-isolement des bactéries, car la rhodamine B n'affecte en rien la croissance ni les propriétés physiologiques des bactéries. Il est même possible de corrélérer quantitativement le diamètre de la zone d'hydrolyse avec l'intensité de l'activité lipase.

Dans cet ouvrage, seules les deux premières méthodes sont priorisées. Le lecteur peut se référer à l'excellente revue de Thomson et al. (1999) pour des détails sur les méthodes basées sur l'emploi de colorants. Il y trouvera aussi davantage d'information sur les deux premières méthodes décrites ici.

1.3.7.2. Dosage de l'activité lipase

Afin d'évaluer la quantité de lipases produites et leurs propriétés (p.ex. spécificité du substrat, paramètres cinétiques), plusieurs méthodes de dosage ont été mises au point. La mesure de l'activité lipase peut se faire autant avec des préparations brutes (surnageants de culture, (Sarkar et al., 1998)) qu'avec des préparations purifiées (enzymes purifiées (Nawani et Kaur, 2000)).

Une des plus anciennes méthodes et répandues est la titrimétrie ou titrage. Cette méthode est connue sous le nom de « pH-stat method ». L'activité lipase est déterminée à partir de la quantité de NaOH (une base) qu'il faut ajouter à une solution émulsifiée de triacylglycérols pour neutraliser les acides gras libérés par l'action de la lipase dans le temps (Beisson et al., 2000; San Clemente et Vadehra, 1967). Le but est de maintenir le pH à une valeur constante définie. La trioléine ou l'huile d'olive sont généralement utilisées comme substrats, mais la tributyrine et la triacétine peuvent aussi être employées avec cette méthode (Gupta et al., 2003). Cette méthode de titrage est très sensible et quantitative et permet de mesurer jusqu'à 1 μ mole d'acides gras libérés par minute. Toutefois, à des pH inférieurs à 7, où les acides gras ne sont pas totalement ionisés, le titrage devient quasi impossible à réaliser. Ce dernier point représente le désavantage principal de cette technique.

La turbidimétrie est une autre méthode qui est utilisée pour le dosage de l'activité enzymatique. En effet, comme l'activité lipase s'exerce sur des substrats émulsifiés, il est donc possible de mesurer l'éclaircissement d'un milieu réactionnel et de faire le lien avec l'activité (Thomson et al., 1999). L'inverse peut aussi se faire, c'est-à-dire mesurer l'augmentation de la turbidité d'une solution. Par exemple, von Tigerstrom et Stelmaschuk ont utilisé du Tween 20 (sorbitan monolaurate de polyoxyéthylène) en présence de CaCl_2 pour déterminer l'activité estérolytique de *Lysobacter enzymogenes* (von Tigerstrom et Stelmaschuk, 1989). Ils ont suivi la réaction en mesurant l'augmentation de la densité optique à 500 nm, augmentation due à la libération des acides gras provenant du Tween 20 et leur précipitation sous forme de sels de calcium.

L'utilisation de substrats synthétiques pour le dosage de l'activité lipolytique est largement répandue dans la littérature, en particulier au niveau des tests spectrophotométriques. Les p-nitrophényl (pNP) esters d'acides gras sont généralement utilisés dans ce genre de test. Les esters à courtes chaînes comme le p-nitrophényl butyrate (pNPB) sont solubles dans l'eau et permettent la quantification de l'activité estérase alors que l'hydrolyse d'esters à longues chaînes comme le p-nitrophényl

palmitate (pNPP) permettent la mesure d'activité lipase (Gupta et al., 2003). Toutefois, l'utilisation du p-nitrophényl laurate (pNPL) et du pNPP pour déterminer l'activité lipase fait parfois l'objet de critique, car ces substrats peuvent aussi être hydrolysés par des estérases non-spécifiques (Jaeger et al., 1996; Thomson et al., 1999). Mais comme il s'agit de substrats synthétiques, toutes activités lipase devraient être confirmées avec un substrat naturel (p.ex. huile d'olive). Afin de quantifier l'activité enzymatique, le relâchement du p-nitrophénol est mesuré au spectrophotomètre à une longue d'ondes de 405 nm (cette valeur peut varier selon le spectrophotomètre utilisé). Une coloration jaune apparaît avec l'augmentation de la quantité de p-nitrophénol libéré. L'activité enzymatique peut être quantifiée en unité U et 1 U correspond à la quantité d'enzymes qu'il faut pour libérer 1 μmol de p-nitrophénol par minute (Gupta et al., 2002). Une limite très importante de cette méthode de dosage est le fait que les réactions enzymatiques ne peuvent avoir lieu à des pH acides, car le p-nitrophénol n'absorbe pas à des pH acides (Kademi et al., 2000). Elle est donc surtout utile pour faire des tests de caractérisation à pH neutre ou alcalin. Toutefois, il est possible de faire les réactions en conditions acides et suite à l'arrêt de la réaction, augmenter le pH et faire la lecture de l'absorbance. L'inconvénient, c'est que ça ne permet pas de faire de cinétiques. Un autre élément important à considérer est le coefficient d'extinction molaire (ϵ) du p-nitrophénol, en référence à la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$). La valeur du coefficient varie selon les conditions de pH et de température dans lesquelles les tests ont lieu (Gupta et al., 2003). Sa valeur varie même si un surfactant (p.ex. Triton X-100) est ajouté au tampon réactionnel (Gupta et al., 2002). Il est alors primordial de déterminer la valeur du coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol dans chacune des conditions où les tests d'activité enzymatique sont réalisés.

Il existe une multitude d'autres méthodes de dosage de l'activité lipase comme des méthodes fluorométriques (p.ex. des acides gras estérifiés à de l'umbelliférone), chromatographiques (p.ex. TLC, GC, HPLC), immunologiques (p.ex. ELISA), sans oublier les méthodes basées sur les propriétés à l'interface (p.ex. technique de la goutte d'huile). Plusieurs excellentes revues (Beisson et al., 2000; Gupta et al., 2003; Thomson et al., 1999) ont été publiées concernant ces techniques, le lecteur peut s'y référer pour de

plus amples informations. Dans le cadre du présent travail, la méthode spectrophotométrique a été utilisée.

1.3.8. Potentiel biotechnologique (industriel) des lipases/estérases

Plusieurs raisons expliquent le haut potentiel biotechnologique des lipases : elles sont généralement stables dans des solvants organiques; elles ne requièrent pas de cofacteurs et ne catalysent pas de réactions secondaires; elles ont une large spécificité de substrats, en plus d'exprimer une énantiosélectivité élevée (Jaeger et Eggert, 2002; Jaeger et Reetz, 1998). De plus, les lipases peuvent facilement être produites en grande quantité par des microorganismes (p.ex. bactéries et levures).

Ces propriétés font des lipases des candidates intéressantes pour une multitude d'applications industrielles. Le domaine d'applications des lipases le plus important commercialement est l'industrie des détergents. Il est estimé que 1000 tonnes de lipases sont ajoutées aux environ 13 milliards de tonnes de détergents produits chaque année (Jaeger et Reetz, 1998). En 1994, Novo Nordisk, le leader mondial dans la production d'enzymes industrielles, a commercialisé la première lipase, Lipolase™, et elle provenait de la levure thermophile *Thermomyces lanuginosus*. Les lipases sont présentes dans toutes sortes de détergents, comme les détergents à lessive et pour lave-vaisselle. Selon Jaeger et Reetz (1998), il y a trois défis auxquels doivent faire face les producteurs de lipases pour détergents. Premièrement, en raison de la grande diversité au niveau du contenu en triglycérides des taches de gras, les lipases doivent avoir une faible spécificité de substrats. Deuxièmement, l'exposition possible à de dures conditions de lavage (pH 10-11, 30-60°C) nécessite des enzymes stables. Finalement, les lipases doivent pouvoir résister à la dénaturation chimique et/ou à l'attaque de protéases que certains additifs peuvent causer. C'est pour cela que beaucoup de travaux sont réalisés chaque année sur la recherche de nouvelles lipases aux propriétés toujours plus intéressantes. Les bactéries thermophiles sont des cibles de choix en raison des caractéristiques inhérentes à la thermostabilité de leurs enzymes.

Un autre domaine d'application des lipases est l'industrie des pâtes et papiers. Dans cette industrie, les lipases sont employées pour éliminer la résine naturelle (« pitch ») de la pâte (Jaeger et Reetz, 1998). La résine naturelle désigne l'ensemble des composantes hydrophobes du bois, comme les triglycérides et les cires. Ces résines causent des problèmes au niveau des procédés de production des pâtes et du papier.

La capacité à catalyser des transformations chimio-, régio- et stéréosélectives fait des lipases et des estérases d'excellents catalyseurs en synthèse organique. Elles sont employées pour la synthèse de produits chimiques fins et surtout pour la préparation d'intermédiaires chiraux dans les industries pharmaceutiques (Panda et Gowrishankar, 2005; Salameh et Wiegel, 2007).

Outre des applications au niveau des détergents, des pâtes et papiers et de la synthèse organique, les lipases et les estérases sont très utiles dans les domaines alimentaire, pharmaceutique, médical, de l'agriculture et de production de biodiesel pour ne nommer que ceux-là. Pour de plus amples informations concernant ces applications, le lecteur est invité à consulter les articles de revue suivants : Jaeger et Reetz (1998), Panda et Gowrishankar (2005) et Salameh et Wiegel (2007).

1.3.9. Sources de lipases

Les lipases sont ubiquitaires dans l'environnement. Elles sont produites par une variété de plantes, d'animaux et de microorganismes. Les lipases microbiennes, c'est-à-dire produites par des bactéries ou des levures, sont largement exploitées pour des applications biotechnologiques. Les lipases bactériennes font l'objet exclusif de ce travail. Malgré la grande diversité de sources possibles de lipases, seules quelques espèces bactériennes font l'objet d'une exploitation commerciale, que ce soit au niveau de souches sauvages ou recombinantes. Les plus importantes proviennent des genres *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* et *Pseudomonas* (Gupta et al., 2004).

Voici quelques exemples de lipases thermostables connues. *Geobacillus (Bacillus) thermocatenulatus* produit une lipase thermostable de 43 kDa (Schmidt-Dannert et al., 1997). Elle possède une activité maximale entre 55 et 75°C dépendamment du substrat. Son pH optimum d'activité à 60°C dépend aussi du substrat : avec la trioléine, le maximum d'activité était observé à pH 9,0 alors qu'avec la tributyrine, il se trouvait à pH 8,0. Dans des conditions de pH variant de 9 à 11, l'enzyme est stable après 14 heures d'incubation à 30°C. La présence de détergents comme le CHAPS et le Triton X-100 augmente aussi son activité. *Bacillus* sp. J33 (Nawani et Kaur, 2000) secrète aussi une lipase d'une grande stabilité (12 heures à 60°C). Cette stabilité s'observe aussi en présence de divers additifs. Rathi et al. (2000; 2001) ont caractérisé une lipase produite par *Burkholderia cepacia* RGP-10 dont les propriétés remarquables en font un additif potentiel pour des détergents. Mise à part des conditions optimales d'activité de pH 11 à 90°C et une demi-vie de plus de 13 heures à 90°C, cette lipase possède une très grande stabilité envers des surfactants, des détergents commerciaux, des agents oxydants et des protéases. C'est ce genre de caractéristiques qu'idéalement les lipases/estérases recherchées dans le cadre de ce projet de recherche devraient posséder. Le tableau I résume quelques propriétés d'exemples de lipases thermostables.

Tableau I. Exemples de bactéries et des propriétés de leurs lipases thermostables.

Bactéries	Température optimale (°C)	pH optimal	Autres propriétés	Références
<i>Burkholderia cepacia</i> RGP-10	90	11,0	demi-vie de 13h à 90°C	(Rathi et al., 2000; Rathi et al., 2001)
<i>Bacillus</i> sp. J33	60	8,0	stable 12h à 60°C	(Nawani et al., 1998; Nawani et Kaur, 2000)
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	55-75	8,0-9,0	stable à pH 9-11 pour 14h à 30°C	(Schmidt-Dannert et al., 1997)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> ID-1	75	7,5	demi-vie de 30 min à 70°C	(Lee et al., 1999)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> YN	70	9,0	---	(Abdel-Fattah, 2002)
<i>Bacillus</i> strain A30-1	60	9,5	90-95% d'activité résiduelle après 15h à pH 5,0-10,5; demi-vie de 8h à 75°C	(Wang et al., 1995)
<i>Pseudomonas</i> sp.	65	9,6	75% d'activité résiduelle après 90 min à 65°C; plus de 70% d'activité résiduelle après 2h à pH 5-9	(Kulkarni et Gadre, 1999)

1.4. Deux approches de recherche d'enzymes

La vaste diversité microbienne est une ressource d'une grande importance pour les industriels à la recherche de produits ou de procédés biotechnologiques. Les microorganismes sont ubiquitaires dans l'environnement et la majorité d'entre eux n'ont pas encore été découverts et/ou étudiés. Cela est dû au fait qu'historiquement pour être adéquatement caractérisés, les microorganismes doivent être isolés en culture pure. Toutefois, puisque seul 1% des microorganismes peuvent être isolés en culture pure, cela signifie que 99% des ressources microbiennes échappent à la communauté scientifique (Lorenz et al., 2002). Avec les récents progrès de la biologie moléculaire, la recherche de nouveaux biocatalyseurs bénéficie maintenant de nouveaux outils. À l'approche classique

de l'isolement des microorganismes en culture pure s'ajoute maintenant l'approche métagénomique.

1.4.1. L'approche métagénomique

Traditionnellement, la méthode utilisée pour obtenir de nouvelles enzymes bactériennes consistait à isoler et cultiver des bactéries via des techniques standards et à partir de cultures pures, cribler pour l'activité recherchée. Afin de palier aux problèmes d'isolement et de culture de ces dernières, l'approche métagénomique a été développée. Dans cette approche, la diversité génétique d'un consortium bactérien, le « métagénome » provenant d'un environnement défini est extrait et est introduit dans un hôte hétérologue. Il en résulte une métagénothèque contenant des milliers de clones. Les clones sont ensuite criblés pour identifier les gènes d'intérêt, c'est-à-dire qui codent pour l'activité enzymatique recherchée.

Le criblage peut s'effectuer selon deux méthodes complémentaires : le criblage par hybridation et le criblage fonctionnel (Lorenz et al., 2002). Le criblage par hybridation est la méthode la plus conservatrice des deux, car elle se base sur la recherche de séquences déjà connues. Elle se fait sur puces à ADN. Le criblage fonctionnel ou par activité possède un avantage notable sur le criblage par hybridation : il permet la découverte de gènes d'intérêt complètement nouveaux, c'est-à-dire qui n'ont pas d'homologie avec les séquences connues. Cependant, cela implique que les gènes soient exprimés par l'hôte hétérologue pour que l'activité soit détectée, ce qui n'est pas toujours évident. En effet, cela peut constituer une limite importante de cette approche. Le cas des lipases bactériennes illustre bien cette complication. Les lipases produites par diverses espèces de *Bacillus* peuvent facilement être surexprimées dans *Escherichia coli*, selon des systèmes de surexpression conventionnels (Kim et al., 1998; Kim et al., 2000; Sinchaikul et al., 2001). Toutefois, plusieurs enzymes, comme les lipases de *Pseudomonas* et *Burkholderia*, ne peuvent être surexprimées dans de tels systèmes. Les lipases produites par les espèces de *Pseudomonas* nécessitent l'assistance fonctionnelle d'une trentaine de protéines cellulaires différentes avant de pouvoir être récupérées dans

un surnageant de culture sous une forme active. Cela sous-entend que le repliement et la sécrétion de ces lipases est un processus spécifique qui ne peut se faire adéquatement dans un hôte hétérologue (Rosenau et Jaeger, 2000).

Depuis quelques années, plusieurs études employant l'approche métagénomique ont permis d'identifier des gènes codant pour des biocatalyseurs. À partir d'un consortium microbien dégradant l'agar, Voget et al. (2003) ont identifié des gènes codant pour une amidase stéréosélective, deux cellulases, une α -amylase et deux pectate lyases. Plusieurs études ont aussi permis d'identifier des gènes codant pour des lipases et des estérases (Elend et al., 2006; Henne et al., 2000), parfois même ayant des propriétés thermophiles (Rhee et al., 2005).

1.4.2. L'approche classique

Le principal désavantage de l'approche classique de recherche d'enzymes, soit les problèmes d'isolement de bactéries en cultures pures, est en grande partie attribuable au manque de connaissances des conditions de culture particulières de certaines bactéries. Selon Davis et al.(2005), une partie importante de l'explication pour cette incapacité à faire croître la majorité des bactéries est la faible fréquence avec laquelle les bactéries de l'environnement (p.ex. du sol) forment des colonies visibles lorsqu'elles sont inoculées sur des milieux microbiologiques standards. Au cours des dernières années, quelques travaux (Davis et al., 2005; Joseph et al., 2003) se sont penchés sur l'amélioration des conditions de culture pour réaliser de tels isollements. Davis et al. (2005) ont relevé trois facteurs déterminants : la grosseur de l'inoculum, la composition du milieu de culture et le temps d'incubation.

Un avantage indéniable de l'approche classique est l'isolement possible de nouvelles espèces ou souches bactériennes originales provenant d'environnements particuliers et ayant potentiellement des activités enzymatiques intéressantes parfois difficilement exprimables dans des hôtes hétérologues. Par exemple, Burcu Bakir Ateşlier et Metin

(2006) ont caractérisé une estérase thermostable produite par une souche de *Bacillus* (*Bacillus* sp.4) nouvellement isolée d'une source thermale en Turquie.

1.4.3. Étape d'enrichissement

Avant de procéder à la recherche d'enzymes en tant que telle, il est primordial d'avoir une biomasse diversifiée dont les caractéristiques favoriseront la découverte de biocatalyseurs d'intérêt. Une manière d'arriver à cette fin est d'utiliser une biomasse qui a été assujettie à des conditions particulières (p.ex. pH, température, sources de carbone) et dont, idéalement, les enzymes issues de la biomasse de cet environnement seront capables de fonctionner dans lesdites conditions. Autant dans l'approche métagénomique que dans l'approche classique de recherche d'enzymes, une étape d'enrichissement peut être très utile. Suite à leur enrichissement, Elend et al. (2006) ont isolé deux estérases via une approche métagénomique. Dans une approche classique, suite à leurs enrichissements respectifs, Abdel-Fattah (2002) et Li et Zhang (2005) ont isolé et caractérisé des lipases thermostables produites par des espèces de *Geobacillus*. Avec l'approche métagénomique, l'enrichissement n'est pas essentiel, mais cela permet d'augmenter la possibilité de trouver des gènes qui expriment l'activité désirée, car dans des environnements naturels, la fréquence de détection des gènes d'intérêt est faible. Par exemple, à partir d'échantillons de sols, Henne et al. (2000) recherchaient des lipases : ils n'ont trouvé qu'un seul clone positif sur 730 000 clones criblés. Il est à noter que l'enrichissement en fonction d'une caractéristique particulière doit être équilibré avec la diminution parallèle de la diversité génétique (Elend et al., 2006). De plus, l'enrichissement diminue les chances de trouver des enzymes qui ont des activités optimales en dehors des conditions dudit enrichissement. Celles-ci doivent donc être choisies adéquatement.

Le potentiel industriel de plusieurs catégories d'enzymes a largement été exposé au cours de ce chapitre. Les propriétés des enzymes thermostables font de ces enzymes des candidates de grand intérêt pour des applications biotechnologiques. Il apparaît donc intéressant de se pencher sur la capacité des bactéries aérobies thermophiles à produire de telles enzymes originales. Suite à divers enrichissements et au suivi des diverses flores bactériennes, une attention particulière sera portée sur l'isolement et la caractérisation de bactéries ayant des activités lipases/estérases. Une caractérisation préliminaire de ces dernières sera effectuée.

Chapitre 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Enrichissement de microflores bactériennes aérobies thermophiles

2.1.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour tous les enrichissements thermophiles en mini-fermenteurs est une adaptation du milieu de base salin (« Basal Salts Medium », BSM) employé comme milieu de culture pour les espèces *Thermus* (Gerhardt et al., 1994) et auquel une composante carbone spécifique était ajoutée. La composante saline du milieu était constituée à partir d'un mélange de trois solutions (A, B et C) dont voici la composition.

Solution A1 : CaSO ₄ •2H ₂ O (Sigma)	0,6 g
MgSO ₄ •7H ₂ O (Anachemia)	1,00 g
NaCl (EM Science)	0,08 g
KNO ₃ (EM Science)	1,03 g
NaNO ₃ (EMD)	6,89 g
Acide nitrilotriacétique (3Na ⁺) (Sigma)	1,00 g

Ces composés ont été dissous dans un volume final de 900 mL d'eau milli-Q et cette solution correspondait à la solution A1.

Solution A2 : Na ₂ HPO ₄ (J.T.Baker)	1,11 g/100 mL d'eau milli-Q
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O (J.T.Baker)	1,07 g/100 mL d'eau milli-Q

Pour compléter la solution A2, la solution basique (Na₂HPO₄) a été préparée et son pH ajusté avec la solution acide (NaH₂PO₄•H₂O). La **solution A** finale a été constituée en ajoutant 100 mL de la solution A2 aux 900 mL de la solution A1.

Solution B : $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker) 0,046 g

Le chlorure ferrique a été dissous dans un volume final de 1000 mL d'eau milli-Q pour donner la solution B.

Solution C : $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)	0,22 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker)	0,05 g
H_3BO_3 (Anachemia)	0,05 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker)	0,0025 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker)	0,0025 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (EM Science)	0,0046 g
H_2SO_4 36,5N (Fisher)	0,5 mL

Tous ces éléments étaient dissous dans un volume final de 1000 mL d'eau milli-Q pour donner la solution C.

Pour obtenir 1 L de milieu BSM, 100 mL, 10 mL et 10 mL des solutions A, B et C, respectivement, ont été mélangés. Le volume de cette solution était augmenté à environ 500 mL avec de l'eau milli-Q et 0,10 g (0,01%) de Yeast Extract (Difco) y était ajouté. Le volume a été complété à 1 L avec de l'eau milli-Q. Le pH du milieu a été ajusté à environ 7,0 avec du NaOH 1N ou du HCl 1N. Comme les divers enrichissements ne se font pas dans des conditions stériles, le milieu BSM servant à cet effet n'a pas été stérilisé (ni par filtration, ni par autoclavage). Pour ralentir la contamination du milieu de culture avec le temps, celui-ci était conservé dans un réfrigérateur (~4-10°C) adjacent au montage des mini-fermenteurs d'où il était pompé pour l'alimentation de ces derniers, lorsque nécessaire.

2.1.2. Sources de carbone

Pour favoriser l'implantation d'une biomasse spécifique et par le fait même, induire la production d'enzymes spécifiques, diverses sources de carbone étaient ajoutées au milieu

de culture des différents mini-fermenteurs comme substrats. Au total, neuf enrichissements différents ont été réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise. Les mini-fermenteurs (FN, F pour fermenteur et N pour le numéro) étaient identifiés en fonction du substrat utilisé. Il est à noter que le F7 n'a pas été utilisé en raison de problèmes techniques au niveau de la console de contrôle des mini-fermenteurs.

2.1.2.1. Préparation des substrats

À l'origine, les substrats utilisés pour les divers enrichissements étaient sous de multiples formes (p.ex. liquides, floconneux, particulaires, poudreux). Pour être adéquatement pompés vers leurs mini-fermenteurs respectifs, les substrats ont dû subir certaines transformations.

2.1.2.1.1. Extrait de viande (F1)

Une solution à 2% de protéines de viande hachée a été utilisée comme substrat pour l'enrichissement dans le mini-fermenteur F1. La viande hachée employée provenait d'un supermarché local (Métro Dépatie, Laval) et était de catégorie extra-maigre. Les informations nutritives fournies par le commerçant indiquaient que par 100 g de viande, il y avait 10 g de lipides, 0 g de glucides et 21 g de protéines. Pour préparer 1 L d'une solution à 2% de protéines de viande hachée, 100 g ont été mis en suspension dans 1 L d'eau milli-Q. Le tout a été homogénéisé dans un mélangeur (Waring commercial blender) et tamisé sur un tamis dont les mailles ont 850 µm de diamètre (mesh 20). Le pH de cette préparation a été ajusté à environ 7,0 avec du NaOH 1N. La préparation a ensuite été tamisée de nouveau sur le même tamis.

La viande qui n'a pas été utilisée à la première préparation de cet extrait a été séparée en paquets de 100 g et conservée à -20°C pour utilisation ultérieure.

2.1.2.1.2. Son de blé (F2)

Une préparation à 2% de son de blé a été utilisée comme source de carbone pour l'enrichissement dans le mini-fermenteur F2. Le son de blé utilisé était du son de blé biologique La Milanaise (La Meunerie Milanaise Inc., Milan, QC). Cette préparation a été élaborée à partir de son de blé préalablement tamisé sur un tamis dont les mailles avaient 1,18 mm X 1,18 mm (mesh 16). 20 g de son de blé ont été mis en suspension dans 1 L d'eau milli-Q pour obtenir une préparation à 2%. Le pH de cette préparation a été ajusté à environ 7,0 avec du NaOH 10N et 1N.

2.1.2.1.3. Lignine (F3)

La lignine utilisée pour l'enrichissement dans le mini-fermenteur F3 était de la lignine alcaline avec un faible contenu en sulfonate (Aldrich, Lignin, alkali, low sulfonate content, M_n 10 000, M_w 60 000). Des solutions à 2% (20 g/1 L eau milli-Q) et à 1% (10 g/1 L eau milli-Q) de lignine ont été employées pour l'enrichissement. Le pH des solutions a été ajusté à environ 7,0 avec du HCl 6N et 1N.

2.1.2.1.4. Chitine (F4)

De la chitine colloïdale a été préparée pour l'enrichissement dans le mini-fermenteur F4. Le protocole utilisé pour préparer la chitine colloïdale est inspiré de plusieurs protocoles (Hsu et Lockwood, 1975; Shimahara et Takiguchi, 1988; Wu et Tsai, 2004). 40 g de chitine (Practical Grade from Crab Shells, Sigma) ont été broyés avec un broyeur à café (Braun) pendant deux périodes de 30 secondes. Il en résultait des particules, dont la majorité, avait un diamètre inférieur à 850 μm (mesh 20). La chitine a ensuite été « dissoute » dans 400 mL de HCl concentré (12N) et laissée sous agitation pendant au moins 1h-1h30. Le tout devait être le plus homogène possible : le mélange avait une apparence brunâtre et visqueuse. Sous la hotte chimique, la chitine a été précipitée en ajoutant lentement le mélange acide dans environ 2,5 L d'eau milli-Q à 4°C sous agitation. La chitine a été agitée pendant cinq à dix minutes et ensuite récupérée par centrifugation (15 min, 4°C, 17 700 \times g, FIBERLite JSP-F10, F10BC1-6x500y, Carbon

Fiber Centrifuge Rotor). Le précipité a été lavé à plusieurs reprises (5-7 fois) dans un grand volume d'eau jusqu'à ce que le pH de la suspension soit d'environ 3. La chitine a été lyophilisée pour fin de conservation. Le taux de récupération était d'environ 75% et plus.

Une préparation à 2% chitine (20 g de chitine lyophilisée/1 L eau milli-Q) était employée pour alimenter le mini-fermenteur. Le pH de la solution était ajusté à environ 7,0 avec du NaOH 10N et 1N. Elle a ensuite été tamisée sur un tamis dont les mailles avaient 850 µm X 850 µm (mesh 20).

2.1.2.1.5. Gélatine (F5)

Une solution à 2% gélatine (Gelatin Dri-Form, Gibco Diagnostics) a été utilisée pour l'enrichissement dans le mini-fermenteur F5. Cette solution a été préparée, à la température ambiante, en resuspendant 20 g de gélatine dans 1 L d'eau milli-Q. Le pH de cette suspension a été ajusté à environ 7,0 avec du NaOH 1N.

2.1.2.1.6. Mélange de lipides (F6, F8 et F2(2))

Un mélange d'huile de canola (Compliments Value, préparé pour Sobeys, Mississauga, ON) et d'huile de palme (Cockbrand Zomi, Ghana, préparé pour le Marché Ghanacan, Montréal, QC) a été utilisé pour les enrichissements dans les mini-fermenteurs F6, F8 et F2(2). Les deux sortes d'huiles composaient le mélange dans un rapport 1:1.

2.1.2.1.7. Huile d'olive et Tween 80 (F1(2))

Un mélange d'huile d'olive (Sélection Mérite, Extra Vierge, 100% pure, embouteillé en Italie, importé pour BRISKA, Montréal, QC) et de Tween 80 (Sigma) a été utilisé pour l'enrichissement dans le mini-fermenteur F1(2). L'huile d'olive et le Tween 80 étaient employés dans un rapport 6:1 dans le mélange de réserve pour l'alimentation du F1(2).

2.1.2.1.8. Protéose peptone

Pour les mini-fermenteurs F8, F1(2) et F2(2), le milieu de culture de base BSM (voir section 2.1.1.) a été légèrement enrichi avec du protéose peptone (Protéose Peptone No.3, Difco). Une solution de base à 20% (20 g/ 100mL d'eau milli-Q, pH 7,5) était utilisée pour supplémenter à différents pourcentages les mini-fermenteurs. Cette solution était autoclavée 20 minutes, à 121°C et 15 psi et conservée stérilement. Le F8 était supplémenté à 0,5% pour les cycles de fermentation 1 à 13 inclusivement, à 0,1% des cycles 14 à 20 inclusivement et à 0,25% des cycles 21 à 54. Quant aux F1(2) et F2(2), ils étaient supplémentés à 0,5% pour toute la durée de leur enrichissement respectif.

2.1.2.2. Conservation des substrats

Comme les enrichissements ne se faisaient pas dans des conditions stériles, les substrats n'étaient pas stérilisés lors de leur préparation. Afin d'assurer le plus possible leur intégrité (p.ex. par rapport à une contamination éventuelle), certains substrats (viande hachée, son de blé, lignine et chitine) étaient conservés dans un réfrigérateur (~4-10°C) adjacent au montage des mini-fermenteurs (figure 3). Le son de blé et la chitine y étaient maintenus sous agitation. L'alimentation des mini-fermenteurs se faisait à partir de ce réfrigérateur, lorsque nécessaire. Dans le cas de la gélatine et des divers mélanges d'huiles, ils étaient conservés sous agitation à température ambiante. Toutefois, il est impossible de prévenir toute contamination alors seul le minimum requis était préparé à l'avance. Pour tous les substrats, le pH des solutions de réserve était régulièrement vérifié et ajusté lorsque nécessaire.

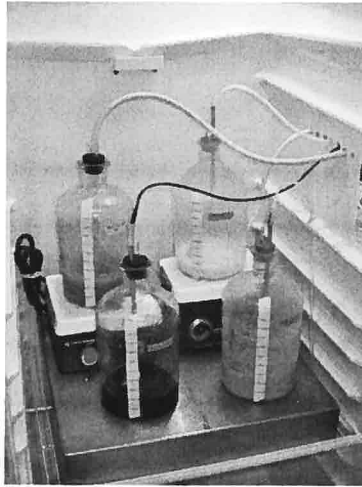


Figure 3. Photo du réfrigérateur où étaient conservés certains substrats ainsi que le milieu de culture pour l'alimentation des mini-fermenteurs. Sont présentes sur la photo (de gauche à droite en partant du haut) les bouteilles de réserve de son de blé, de chitine, de lignine et d'extrait de viande.

2.1.3. Inoculum de départ

L'inoculum de départ pour les mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4, F5, F6 et F8 comprenait les éléments suivants :

- 10 g de terre noire (Terre Noire Préparée);
- 10 g de compost de crevette, rehausseur de terre (Voilà! Jardinage pur et simple, ®/MC S. Boudrias Inc. H7M 1S7);
- 50 mL de biomasse provenant d'un réacteur en cuvée séquentielle (RBS 2) opéré pour l'élimination biologique du phosphore dans un procédé de traitement de lisier de porc (Potvin-Barakatt, 2008);
- 50 mL de biomasse provenant de l'effluent d'un réacteur en cuvée séquentielle aérobie thermophile traitant le lisier de porc (Juteau et al., 2004);
- 2 échantillons (2 écouvillons) provenant de la cafétéria (lavabo et friteuse de la cuisine) de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

Des aliquotes de chaque composante ont été conservées à -20°C (voir procédure section 2.2.1.1.). Les six composantes ont été mélangées dans du milieu BSM, dans un volume

final de 1 L. Suite à une bonne mise en suspension, l'inoculum a été tamisé sur un tamis dont les mailles ont 850 µm de diamètre (mesh 20) et ensuite entreposé à 4°C jusqu'à utilisation. Au moment de démarrer les mini-fermenteurs, 200 mL de l'inoculum ont été mélangés à 800 mL de milieu BSM et 200 mL de ce mélange ont été injectés à chaque mini-fermenteur, chaque mini-fermenteur contenant déjà 200 mL de milieu BSM. Des aliquotes de l'inoculum final ont été conservées à -20°C.

L'inoculum de départ des mini-fermenteurs F1(2) et F2(2) était légèrement différent. Il comprenait les éléments suivants :

- 10 g de terre noire (Terre Noire Préparée);
- 10 g de compost de crevettes, rehausseur de terre (Voilà! Jardinage pur et simple, ®/MC S. Boudrias Inc. H7M 1S7);
- 30 g de fumier de moutons
- 50 mL de biomasse provenant d'un réacteur en cuvée séquentielle (RBS 2) opéré pour l'élimination biologique du phosphore dans un procédé de traitement de lisier de porc (Potvin-Barakatt, 2008);
- 50 mL de l'inoculum des mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4, F5, F6 et F8 conservé à 4°C;
- 4 mL de biomasse du F8 (cycle 6, 10-06-2006);
- 4 mL des biomasses des F1, F2, F3 (cycle 27, 22-07-2006) et F5 (cycle 20, 22-07-2007);
- 4 mL de biomasse du F4 (cycle 33, 09-08-2007).

Des aliquotes de chaque composante ont été conservées à -20°C (voir procédure section 2.2.1.1.). Toutes les composantes ont été mélangées dans du milieu BSM, dans un volume final de 500 mL. La suite de la préparation de cet inoculum ainsi que le démarrage des F1(2) et F2(2) se sont effectués de la même manière que pour le premier inoculum. Des aliquotes de l'inoculum final ont été conservées à -20°C.

2.1.4. Mini-fermenteurs

Afin de réaliser les multiples enrichissements, deux types de mini-fermenteurs ont été utilisés : des mini-fermenteurs à agitation par circulation d'air (« air-lift ») et à agitation mécanique. Dans le premier cas, l'injection d'air dans le réacteur joue un double rôle : l'aération, mais aussi le mélange du milieu de culture contenu dans le réacteur alors que dans les mini-fermenteurs à agitation mécanique, l'aération et l'agitation se font de manière distincte. Les mini-fermenteurs à agitation par circulation d'air (figure 4) ont été employés pour les enrichissements où les substrats étaient solubles, émulsifiables (lipides) ou facilement maintenus en suspension tandis que les mini-fermenteurs à agitation mécanique (figure 5) l'ont été pour les substrats insolubles ou difficilement maintenus en suspension. Donc, les F1 (extrait de viande), F3 (lignine) et F5 (gélatine) étaient de type à agitation par circulation d'air et les F2 (son de blé) et F4 (chitine) étaient à agitation mécanique. En ce qui a trait aux F6 (mélange de lipides) et F8 (mélange de lipides avec milieu enrichi), initialement, ils étaient de type à agitation par circulation d'air, mais au cycle 17 de fermentation, ils ont été changés pour des mini-fermenteurs à agitation mécanique. Les F1(2) (huile d'olive et Tween 80 avec milieu enrichi) et F2(2) (mélange de lipides avec milieu enrichi) étaient des mini-fermenteurs à agitation mécanique.

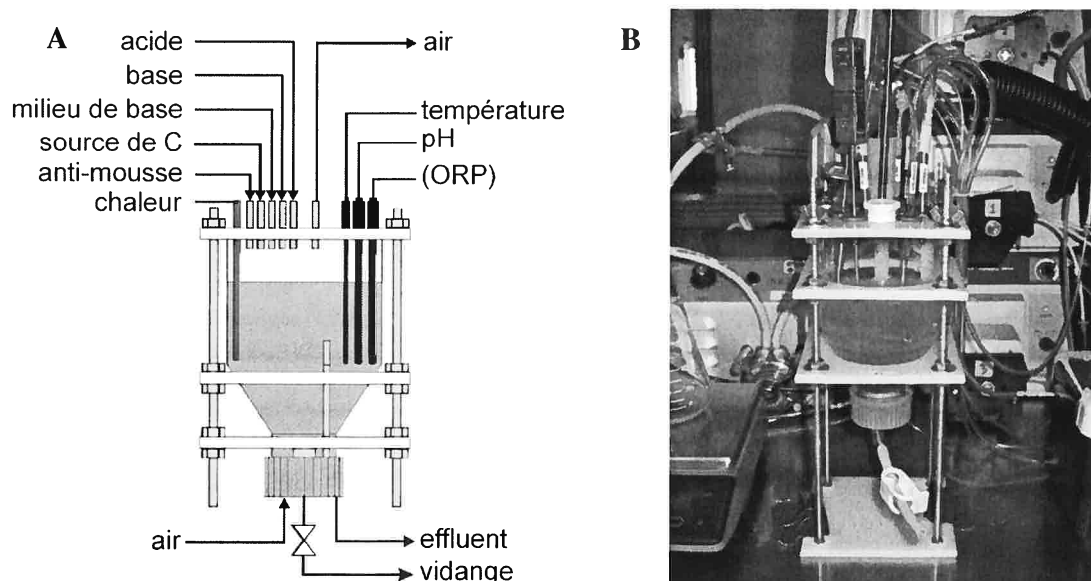


Figure 4. Mini-fermenteur à agitation par circulation d'air. A) Schéma général; B) Exemple de mini-fermenteur assemblé : photo du F1 (extrait de viande).

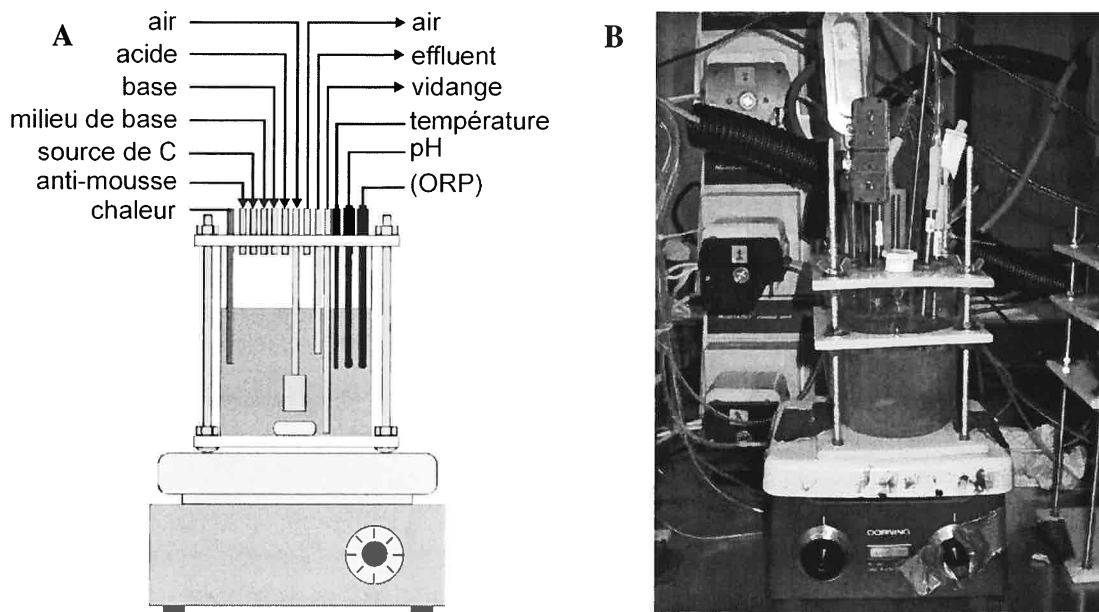


Figure 5. Mini-fermenteur à agitation mécanique. A) Schéma général; B) Exemple de mini-fermenteur assemblé : photo du F2 (son de blé).

Les mini-fermenteurs ont été construits à partir de bouteilles de 1 L en PYREX® (Corning). Dans le cas des mini-fermenteurs à agitation par circulation d'air, l'extrémité inférieure a été coupée (par un souffleur de verre) alors que pour les mini-fermenteurs à agitation mécanique, c'est l'extrémité supérieure qui a été coupée. Les mini-fermenteurs avaient une capacité maximale de 600 mL. Ils étaient hermétiquement fermés avec des « couvercles » (plaques de plastique en polypropylène et joint d'étanchéité en caoutchouc de type EPDM) dans lesquels des trous avaient été percés pour les différentes entrées et sorties des mini-fermenteurs. Il y avait des entrées pour l'injection d'acide, de base, de milieu de culture, de source de carbone, d'anti-mousse et d'air. L'aération se faisait par injection d'air comprimé grâce à une valve solénoïde (ASCO, Brantford, ON) via un diffuseur sphérique d'un pouce de diamètre (Fisherbrand Gas Diffusing Stones, Fisher). Dans les mini-fermenteurs à agitation mécanique employés ici, l'agitation se faisait via l'action d'un barreau magnétique (en forme de croix, 38 mm X 38 mm, modèle 04765-18, Cole-Parmer Instrument Co.) contrôlé par une plaque agitatrice standard localisée sous le réacteur. La vitesse de rotation du barreau était réglée de façon à permettre un mélange adéquat du milieu de culture. Le chauffage du milieu de culture dans les mini-fermenteurs se faisait avec des éléments chauffants de 150 W (Les Industries de Résistances Chauffantes Canada Limitée, Lachine, QC). Au niveau des sorties, il y en avait trois : pour l'air, l'effluent et la vidange. Les mini-fermenteurs comprenaient aussi une sonde à pH (modèle 5998-30, Cole-Parmer Instrument Co.) ainsi qu'une sonde de température, un thermocouple de type E (Omega, Stamford, CT). De plus, il y aurait eu la possibilité d'incorporer une sonde à ORP, si nécessaire.

Les signaux des thermocouples étaient transmis directement à un convertisseur analogique/numérique (pDAQ-56 avec modèle d'extension PDQ1, Omega, Stamford, CT). Pour le pH, les électrodes étaient branchées à des amplificateurs (construction maison à partir d'amplificateurs opérationnels LF444, National Semiconductor, Santa-Clara, CA) eux-mêmes connectés au convertisseur analogique/numérique. Le convertisseur et l'amplificateur font partie de la console de contrôle des mini-fermenteurs (figure 6). Cette console comprenait, outre ces deux éléments, les éléments pour le contrôle de l'aération, soit une valve solénoïde, des rotamètres (1,0 L/min, modèle

32047-09, Cole-Parmer Instrument Co.) et des connecteurs. Elle contenait aussi des valves pour les ajouts d'acide et de base, des prises 120 VAC pour les éléments chauffants et des pompes ainsi que divers relais. Les relais faisaient le lien entre le convertisseur analogique/numérique et les différentes pompes utilisées pour l'alimentation des mini-fermenteurs. Pour l'injection de milieu de culture, d'anti-mousse, des sources de carbone (sauf le son de blé et les huiles) et la sortie des effluents, quatre pompes péristaltiques constituées d'un moteur à vitesse variable (MasterFlex modèle 77521-40, Cole-Parmer Instrument Co.) et de têtes à huit canaux et six cylindres (Kassettenblock MS-CA 8/6 7623-00 ISM185, Cole-Parmer Instrument Co.) ont été utilisés. Pour l'alimentation en son de blé, une pompe Millipore munie d'une tête de pompe MasterFlex (modèle 7015-00, Cole-Parmer Instrument Co.) a été utilisée. Pour les mélanges d'huiles, une pompe constituée d'un moteur à vitesse fixe de 30 rpm (MasterFlex modèle 07540-30, Cole-Parmer Instrument Co.) et d'une tête à deux canaux (MasterFlex Easy Load II, modèle 77202-60, Cole-Parmer Instrument Co.) a été employée. Le contrôle du pH se faisait par injection d'acide ou de base par une pompe à deux canaux et à débit variable (MasterFlex modèle 77120-42, Cole-Parmer Instrument Co.) et une série de valves à pincement (Bio-Chem Fluidics, Boonton, NJ)).

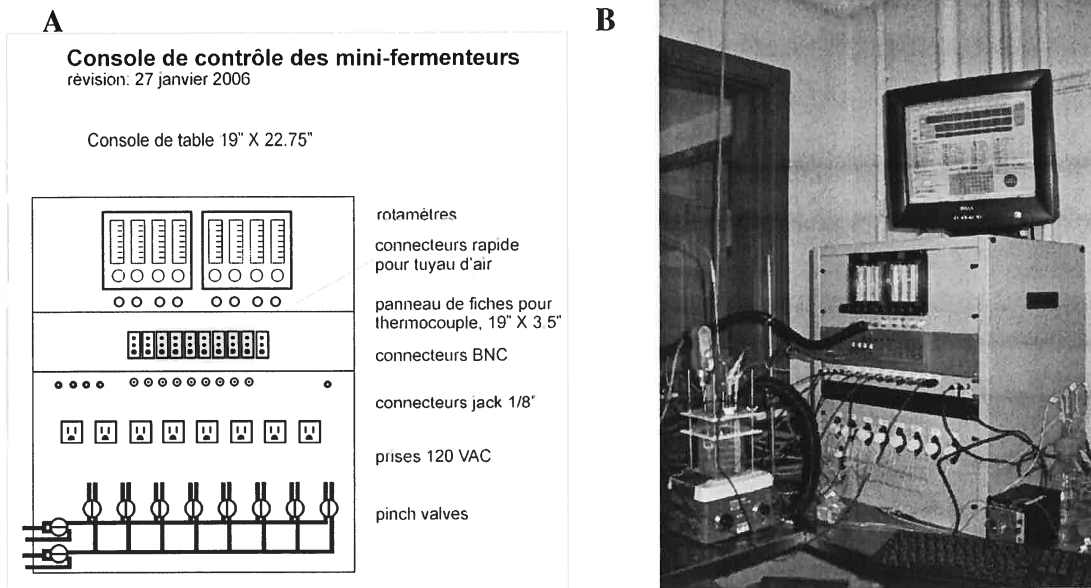
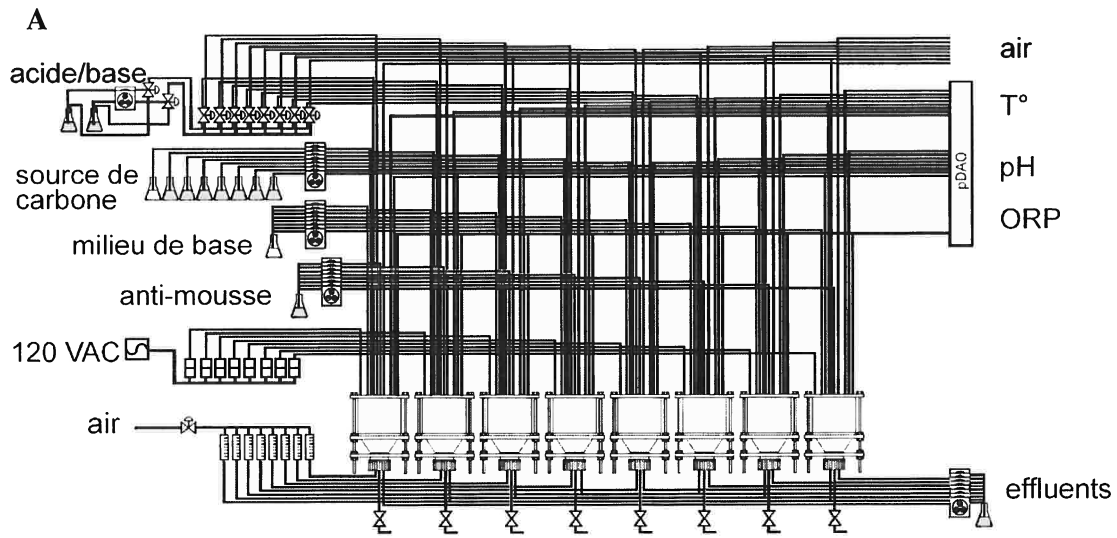


Figure 6. Console de contrôle des mini-fermenteurs. A) Schéma général; B) Photo de la console (au centre). La console comportait aussi huit prises 120 VAC à l'arrière (non représentées).

Le convertisseur analogique/numérique de la console était relié à un ordinateur via un port USB. La figure 7 illustre la vision globale du montage. L'acquisition des données et le programme de contrôle ont été écrits dans le logiciel LabView 7.1 (National Instrument, Austin, TX). Toutes les actions posées sur les mini-fermenteurs se faisaient selon les consignes programmées pour le déroulement des cycles de fermentation.



B

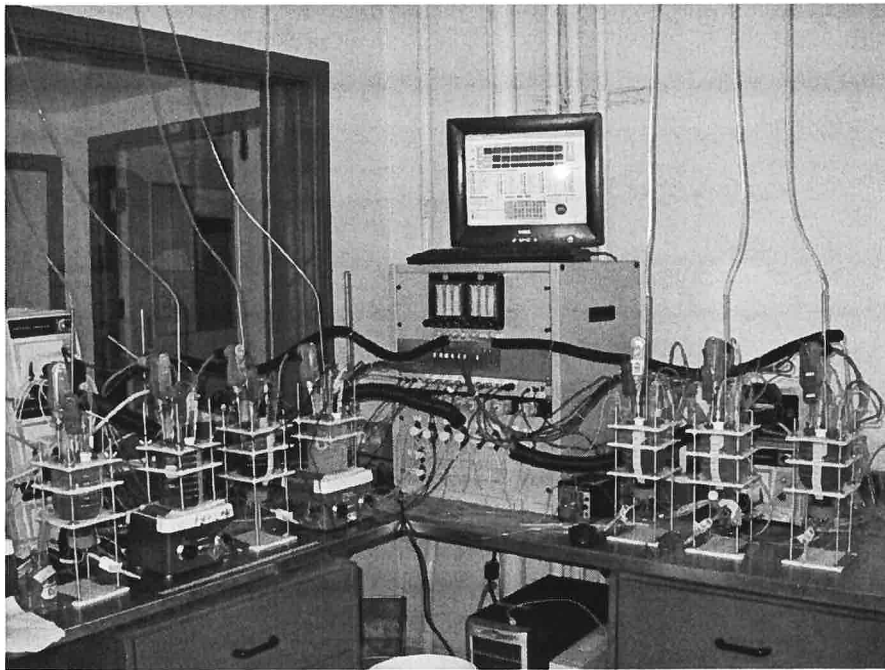


Figure 7. Vision globale du montage. A) Schéma général; B) Photo du montage. Sont présents sur la photo (de gauche à droite) les F1, F2, F3, F4, la console et l'ordinateur de contrôle suivis des F5, F6 et F8.

2.1.5. Conditions d'enrichissement

Comme il a été mentionné précédemment, neuf enrichissements différents ont été réalisés dans le cadre de ce projet. Une seule source de carbone a été utilisée par mini-fermenteur. Les enrichissements ont été réalisés en cuvées alimentées séquentielles (« sequencing fed-batch ») dont les cycles étaient de 72 heures. À la fin de chaque cycle, 50% du milieu de culture était renouvelé pour revenir à un volume initial de 400 mL pour le départ du cycle subséquent. Les effluents étaient conservés pour une période de deux cycles suivant leur récupération au cas où des problèmes surviendraient (p.ex. pannes d'électricité, variation de pH). Dans de telles situations, des aliquotes des effluents des cycles précédents étaient utilisées pour réensemencer les mini-fermenteurs.

Pour tous les enrichissements sauf celui du F1(2), les conditions de pH et de température variaient dans le temps au cours d'un même cycle. Initialement, le pH était de 7,0 alors que la température était de 50°C. Ces valeurs augmentaient graduellement, de façon linéaire, jusqu'à 8,5 et 70°C sur une période de 36 heures. Ensuite, au cours des prochaines 36 heures, le pH et la température étaient ramenés à leurs valeurs initiales. Au niveau du F1(2), le pH et la température étaient maintenus constants à 8,2 et 65°C. Pour le pH et la température, la tolérance vis-à-vis la consigne du programme était de $\pm 0,1$ et $\pm 0,5^\circ\text{C}$, respectivement. L'ajustement du pH se faisait par des injections d'acide (HCl 1N) ou de base (NaOH 1N) d'une durée de quatre à six secondes. Une période de 60 à 120 secondes était allouée pour que le mélange se fasse dans les mini-fermenteurs; toutefois, un temps maximal de 1800 à 7200 secondes (0,5 à 2 heures) était accordé pour que les corrections s'effectuent, sinon, il y avait déclenchement d'une alarme. Il y avait aussi des consignes pour le pH minimum (4,0) et maximum (10,0). Des consignes similaires régissaient le contrôle de la température. L'aération se faisait par injection d'air comprimé à un débit de 300 mL/min pour la majorité des mini-fermenteurs. Pour les F6 et F8, au cours du cinquième cycle, l'aération a été augmentée à 500 mL/min pour ensuite être diminuée à 400 mL/min lors du changement du type de réacteur (cycle 17). Pour les F1(2) et F2(2), l'aération se faisait à un débit de 400 mL/min. Après chaque trois minutes d'aération, celle-ci s'arrêtait six secondes afin de permettre à la condensation qui se formait dans les lignes de sortie d'air des mini-fermenteurs de s'écouler.

Au début de chaque cycle, 3 mL d'anti-mousse (huile de silicone, [diméthylpolysiloxane], 20 centistokes, Sigma DMPS-2X) étaient pompés dans les mini-fermenteurs. Au besoin, une quantité supplémentaire y était ajoutée. L'ajout du protéose peptone (section 2.1.2.1.8.) pour les mini-fermenteurs qui utilisaient un milieu BSM enrichi (F8, F1(2) et F2(2)) se faisait aussi en début de cycle. Pour les diverses sources de carbone, il y avait un ajout initial au début de chaque cycle et par la suite, les ajouts subséquents se faisaient à chaque 12 heures (sauf pour le son de blé où il n'y avait qu'un seul autre ajout à 36 heures). Pour les huiles (F6, F8, F1(2) et F2(2)), les ajouts étaient de 4,7 mL à chaque fois pour un total de 28 mL d'huile injectée au cours d'un cycle. Pour l'extrait de viande, la lignine, la chitine et la gélatine, les ajouts étaient de 20 mL (total de 120 mL) alors que les ajouts de son de blé étaient de 50 mL (total de 100 mL).

2.2. Suivi de la flore bactérienne aérobie thermophile des enrichissements

2.2.1. Prélèvement et conservation d'échantillons des mini-fermenteurs

2.2.1.1. Échantillonnage des mini-fermenteurs pour le suivi de la diversité

À la fin de chaque cycle, des échantillons ont été prélevés pour chaque mini-fermenteur. Ces échantillons ont servi à faire le suivi de la diversité bactérienne dans le temps. Pour les mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5, quatre fois 1,5 mL du bouillon de culture étaient répartis dans des tubes de 1,5 mL de type Eppendorf. Les surnageants de culture étaient éliminés suite à une étape de centrifugation (5 min, 13 000 rpm, micro-centrifugeuse de table SARSTEDT) et les culots étaient resuspendus dans du tampon TEN (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) avant d'être conservés au congélateur à -20°C pour un traitement ultérieur. La même procédure a été réalisée pour conserver des aliquotes des inoculum de départ (section 2.1.3.). Pour les mini-fermenteurs F6, F8, F1(2) et F2(2), les quatre tubes de bouillon de culture étaient congelés tels quels pour un traitement ultérieur.

Pour les mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5, au cours de leur dernier cycle d'enrichissement, des échantillons ont été prélevés à chaque 12 heures afin d'évaluer l'évolution de la flore bactérienne à l'intérieur d'un même cycle. Les échantillons étaient traités de la même manière que pour ceux prélevés en fin de cycle.

2.2.1.2. Échantillonnage de sécurité des mini-fermenteurs

Afin de conserver des échantillons de biomasse au cas où des problèmes surviendraient en cours de fermentation et que des mini-fermenteurs doivent être repartis, des échantillons des divers enrichissements ont été prélevés à la fin des cycles à intervalles réguliers (environ chaque sept cycle). Ces échantillons (4 mL) ont été conservés dans des tubes (14 mL Polystyrene Round-Bottom Tube, 17 x 100 mm style, Falcon®) auxquels du glycérol avait été ajouté de manière à obtenir une concentration finale de glycérol de 25%. Ces tubes sont conservés dans un congélateur à -70°C.

2.2.2. Suivi de l'évolution de la flore bactérienne par DGGE

2.2.2.1. Élaboration d'un marqueur de référence pour le DGGE

2.2.2.1.1. Culture des souches pures

Les souches bactériennes suivantes ont été utilisées pour confectionner le marqueur de référence pour le DGGE (« Denaturing Gradient Gel Electrophoresis »): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptomyces lividans* 1326 (ADN fournie par le laboratoire du Dr. François Shareck). Sauf dans le cas de *Streptomyces lividans* 1326, souche pour laquelle l'ADN était directement disponible, les diverses souches bactériennes ont étéensemencées sur des géloses TSB-agar (Tryptic Soy Broth - Soybean - Casein Digest Medium, BD, additionné de 15 g/L d'Agar Noble, Difco) de manière à obtenir une bonne biomasse suite à une incubation à 37°C pendant 24 heures. La biomasse de chaque souche a été récupérée en resuspendant la culture dans du tampon TEN (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0).

2.2.2.1.2. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des souches pures a été réalisée après broyage des cellules avec des billes de verre. La préparation de biomasse (cellules et tampon TEN) a été centrifugée (5 min, 13 000 rpm) puis le culot resuspendu dans 500 µL de TEN. Les bactéries ont été ajoutées à 250 mg de billes stériles (0,25-0,5 mm de diamètre) dans des tubes vissés de 1,5 mL. Le tout a été mis sur glace. Un volume équivalent (500 µL) de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) a été ajouté au mélange précédant ainsi que 40 µL de SDS 20% (Sodium Dodécyl Sulfate). Le mélange a été mis au FastPrep FP120 (Bio 101, ThermoSavant) pendant 20 secondes, ce qui a permis le broyage des cellules. Les tubes ont ensuite été mis sur glace cinq minutes. Cette étape (broyage et glace) a été répétée une autre fois avant de centrifuger les tubes (15 min, 13 000 rpm). La phase supérieure a été récupérée sans toutefois chercher à prendre le maximum. Un volume équivalent de chloroforme/alcool isoamylique (49/1) a été ajouté et les deux phases ont été mélangées avec quelques mouvements verticaux (« up and down ») avant de centrifuger les tubes (1 min, 13 000 rpm). La phase supérieure (~400 µL) a été récupérée. Le surnageant a été précipité avec deux volumes d'éthanol 100% (800 µL) et ¼ de volume d'acétate d'ammonium 10M (100 µL). Les tubes ont été légèrement mélangés par inversion et ensuite entreposés au minimum 30 minutes à -20°C. Suite à cet entreposage, les tubes ont été centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm. Les culots (contenant l'ADN) ont été lavés avec 500 µL d'éthanol 70%. Cet éthanol a été éliminé suite à une dernière centrifugation (5 min, 13 000 rpm) et les culots ont été asséchés (évaporation de ce qu'il reste d'éthanol). Les culots ont été resuspendus selon l'abondance dans 50 µL de tampon TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). La présence, la qualité et la concentration d'ADN ont été vérifiées sur gel d'agarose (voir section 2.2.2.1.3.)

2.2.2.1.3. Estimation de la concentration d'ADN génomique sur gels

Des gels d'agarose de dix centimètres de longueur ont été utilisés pour vérifier la présence d'ADN ainsi que pour en estimer la concentration dans diverses préparations.

Ces gels ont été préparés à une concentration d'agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen life technologies) de 1% dans un tampon TAE 1X (Tris-HCl 500 mM, acide acétique 500 mM, EDTA 50 mM pH 8,0). Les gels, une fois chargés des échantillons, étaient soumis à un voltage de 80-90 V pour une durée minimale de 45 minutes. Suite à la migration, les gels étaient colorés dix minutes dans une solution aqueuse de bromure d'éthidium avec agitation (Orbit Shaker Lab-Line, 80 rpm) puis décolorés 10-15 minutes dans de l'eau avec agitation. Les échantillons d'ADN à charger dans les puits des gels étaient composés de 5 µL de solutions d'ADN ainsi que de 1-2 µL de tampon de chargement 6X (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 30% glycérol, dans de l'eau). Afin d'estimer la quantité (concentration) et la qualité (taille des fragments) de l'ADN, les bandes des échantillons étaient comparées à l'ADN du phage lambda digéré par l'enzyme Hind III (Lambda DNA-Hind III Digest, BioLabs, N3012S). La concentration et la longueur des bandes de cet ADN contrôle étaient connues (Tableau II). Les gels ont été observés et photographiés par un transilluminateur UV (AlphaImager™ 3400, équipé du logiciel AlphaEase, Alpha Innotech).

Tableau II. Taille (pb) et masse approximative (ng) des fragments d'ADN du phage lambda digéré par Hind III. Les masses des fragments sont exprimées par rapport à un microgramme d'ADN du phage digéré (2 µL).

Fragments	Taille (pb)	Masse (ng)
1	23130	477
2	9416	194
3	6557	135
4	4361	90
5	2322	48
6	2027	42
7	564	12
8	125	3

2.2.2.1.4. Amplification par PCR d'un fragment de l'ADN ribosomal 16S

Pour réaliser les DGGE, la paire d'amorces suivantes a été utilisée pour l'amplification de la région hypervariable V3 du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) :

341f-GC et 534r. En tenant compte de la pince GC, les amplicons produits ont une taille d'environ 233pb. Le tableau III présente les détails de ces amorces.

Tableau III. Amorces utilisées pour les PCR-DGGE.

Amorces	Séquences	Positions chez <i>E. coli</i>	Références
341f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	341-357	(Muyzer et al., 1993)
534r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	534-518	(Muyzer et al., 1993)
Pince GC*	5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCG GGGCGGGGGCACGGGGGG-3'		

*La pince GC est insérée en amont de la séquence de l'amorce 341f.

L'amplification a été réalisée à l'aide de l'appareil GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Le volume total réactionnel pour chaque échantillon était de 50 µL. Tous les réactifs provenaient de la compagnie Amersham Biosciences. Chaque réaction comprenait 5 µL de tampon d'amplification 10X (Tris-HCl 100 mM pH 9.0, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM), 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de chacune des amorces diluées dans de l'eau (10 pmol/µL), 1 µL d'albumine de sérum bovin (BSA) 20 µg/µL, 0,5 µL de Taq polymérase (rTaq DNA Polymerase) et 38,5µL d'eau milli-Q stérile. Un volume de 2 µL d'échantillons d'ADN était rajouté aux tubes réactionnels. Pour les souches pures, 10-50 ng d'ADN étaient rajoutés comme échantillons d'ADN par réaction. Un tube réactionnel était aussi prévu pour un contrôle négatif, cela permettait de s'assurer de l'absence de contamination au niveau des réactifs. Pour ce tube, 2 µL d'eau milli-Q stérile remplaçaient les 2 µL d'échantillons d'ADN. Une fois l'appareil à PCR préchauffé à 80°C, les tubes réactionnels y étaient insérés. La température était ensuite augmentée à 94°C pour une période de cinq minutes afin de permettre la dénaturation des brins d'ADN. Par la suite, la température était ramenée à 55°C pour une durée de cinq minutes ce qui permettait aux amorces de se lier aux brins d'ADN dénaturés (hybridation). Après ces cinq minutes, les trois prochaines étapes se répétaient en boucles pendant 30 cycles consécutifs : 45 secondes à 72°C, 45 secondes à 94°C et 45 secondes à 55°C. Les 45 secondes à 72°C permettaient à la Taq polymérase de procéder à l'élongation des brins d'ADN à partir des amorces. L'amplification PCR prenait fin par

une période de dix minutes à 72°C. La présence des amplicons, leur quantification ainsi que l'absence de contamination ont été vérifiées sur gel d'agarose (voir section 2.2.2.1.5.).

2.2.2.1.5. Estimation de la concentration des produits PCR sur gels

Des gels d'agarose de dix centimètres de longueur ont été utilisés pour vérifier la présence des amplicons PCR ainsi que pour en estimer la concentration. Ces gels ont été préparés à une concentration d'agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen life technologies) de 2% dans un tampon TAE 1X (Tris-HCl 500 mM, acide acétique 500 mM, EDTA 50 mM pH 8,0). Les gels, une fois chargés des échantillons, étaient soumis à un voltage de 90-100V pour une durée minimale de 45 minutes. Suite à la migration, les gels étaient colorés dix minutes dans une solution aqueuse de bromure d'éthidium avec agitation (Orbit Shaker Lab-Line, 80 rpm) puis décolorés 10-15 minutes dans de l'eau avec agitation. Les produits PCR à charger dans les puits des gels étaient composés de 5 µL de solutions d'ADN ainsi que de 1-2 µL de tampon de chargement 6X (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 30% glycérol, dans de l'eau). Afin d'estimer la concentration des amplicons dans les tubes et de confirmer l'exactitude de la taille des fragments attendus, la bande d'un amplicon était comparée aux bandes d'ADN d'un marqueur de poids moléculaires (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas Life Sciences #SM0241). La concentration et la longueur des bandes de ce marqueur sont connues (Tableau IV). Les gels ont été observés et photographiés par un transilluminateur UV (AlphaImager™ 3400, équipé du logiciel AlphaEase, Alpha Innotech).

Tableau IV. Taille (pb) et masse approximative (ng) des fragments d'ADN du marqueur de poids moléculaires GeneRuler™ 100bp DNA Ladder. Les masses des fragments sont exprimées par rapport à 500 nanogrammes d'ADN du marqueur.

Fragments	Taille (pb)	Masse (ng)
1	1031	66,6
2	900	58,1
3	800	51,8
4	700	45,4
5	600	38,8
6	500	94,3
7	400	35,0
8	300	35,0
9	200	35,0
10*	100	35,0
11*	80	4,9

*Les fragments 10 et 11 peuvent ne pas être distincts sur gels d'agarose.

2.2.2.1.6. Obtention du marqueur de référence pour DGGE

Pour élaborer le marqueur de référence, une quantité équivalente des produits PCR de chaque souche (60 ng par souche) ont été mélangés. Lors du chargement des échantillons sur un gel de DGGE, 300 ng du marqueur étaient chargés de part et d'autre des échantillons pour favoriser la comparaison. Afin de permettre la correspondance des bandes du marqueur avec leurs souches respectives, les amplicons de ces dernières ont été migrés séparément sur DGGE (300 ng par souche). La technique du DGGE est expliquée en détails à la section 2.2.2.2.3.

2.2.2.2. Traitement des échantillons provenant des enrichissements par PCR-DGGE

2.2.2.2.1. Extraction de l'ADN génomique total

L'ADN total de tous les échantillons de biomasse provenant des mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4, F5, F6, F8, F1(2), F2(2) ainsi que des deux inoculums a été extrait selon la méthode décrite à la section 2.2.2.1.2.

Quelques étapes additionnelles ont été nécessaires pour les inoculums et les échantillons de biomasse provenant des mini-fermenteurs F6, F8, F1(2) et F2(2). Pour les inoculums, la biomasse a d'abord été centrifugée et resuspendue dans du tampon TEN à deux reprises avant d'en extraire l'ADN. Pour les échantillons provenant des F6, F8, F1(2) et F2(2), 500 µL d'un mélange acétone/éthanol/chloroforme (25/25/2) étaient ajoutés dans les tubes contenant les bouillons de culture (Déziel, 2001). Les tubes étaient vortexés vigoureusement puis centrifugés (10 min, 13 000 rpm). Le solvant, la phase aqueuse et l'huile étaient retirés le plus possible. Cette procédure était répétée jusqu'à l'élimination « maximale » de l'huile et l'obtention d'un culot de biomasse. Les culots étaient lavés une fois avec du tampon TEN avant de poursuivre l'extraction d'ADN.

2.2.2.2.2. Amplification par PCR de fragments d'ADN génomique

L'amplification de la région hypervariable V3 du gène codant pour l'ARNr 16S des échantillons a été effectuée comme à la section 2.2.2.1.4. La seule modification concerne la quantité d'ADN matrice qui était ajouté aux tubes réactionnels : pour les complexes microbiens, 50-100 ng d'ADN étaient ajoutés par réaction d'amplification.

2.2.2.2.3. Migration des échantillons sur DGGE

Les produits PCR des échantillons recueillis pour faire les différents suivis des microflore bactériennes des enrichissements ont été déposés sur des gels (16 cm x 16 cm) de 8% de d'acrylamide dont l'épaisseur était de 1,5 mm. Ces gels contenaient un gradient linéaire (croissant du haut vers le bas) de dénaturant. L'intervalle de gradient dénaturant utilisé ici pour permettre de bien visualiser les bandes des échantillons se situait entre 20% et 80% d'urée:formamide. Les solutions de polyacrylamide ont été obtenues à partir d'une solution de 40% d'acrylamide:bis (38:2) (Acrylamide 99,9% Electrophoresis Purity Reagent; Bis N,N'-Methylene-bis-acrylamide Electrophoresis Purity Reagent, Bio-Rad Laboratoires, Hercules, CA). Pour obtenir le gradient, la quantité requise de polyacrylamide pour former le gel était séparée en deux (2 x 20 mL) : la première partie contenait une concentration plus faible en dénaturant alors que la

deuxième contenait la concentration la plus élevée. Une concentration de dénaturant de 100% correspond à 7M d'urée (Urea Harnstoff, Bio-Rad Laboratoires) et 40% (V/V) de formamide (Fisher Scientific). Le formamide était préalablement déionisé au moins deux heures sous la hotte chimique et sous agitation en présence d'une résine échangeuse d'ions (12,5 g de résine/250 mL de formamide) (AG® 501-X8 Resin 20-50 Mesh, Molecular Biology Grade, Bio-Rad Laboratoires). Une fois les deux solutions de polyacrylamide préparées avec les bonnes concentrations de dénaturant, ces dernières étaient désoxygénées dans une jarre mise sous vide, avec agitation, pendant 15 minutes. Les gels étaient coulés à l'aide d'une chambre double formatrice de gradient en chromatographie (modèle 385, Gradient Former, Bio-Rad Laboratoires). La chambre la plus éloignée de la sortie contenait la solution d'acrylamide contenant le moins de dénaturant alors que la chambre la plus près de la sortie contenait la solution la plus concentrée en dénaturant. Cette dernière chambre était agitée par un barreau magnétique pour assurer un bon mélange des deux solutions avant la sortie. L'écoulement se faisait par gravité : la chambre double était surélevée d'environ 52 cm par rapport à la base des gels. Tout juste avant de couler les gels, 100 µL d'ammonium persulfate (Bio-Rad Laboratoires) et 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylene-diamine, Bio-Rad Laboratoires) étaient ajoutés aux solutions de chaque chambre. L'équipement utilisé pour préparer les gels (grande vitre 18,3 cm x 20 cm, petite vitre 16 cm x 20 cm, espaceurs, pinces à sandwich, support à sandwich, peignes) provenait de chez Bio-Rad Laboratoires (Protean II xi [16 cm] system). Suite à l'insertion des peignes pour la formation des puits (15 puits), les gels étaient laissés à température ambiante pendant deux heures afin de permettre la polymérisation.

Dans une cuve à électrophorèse munie d'un module de contrôle de température (DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad Laboratoires), sept litres de tampon TAE 1X étaient chauffés à 60°C. La température était d'ailleurs maintenue à cette valeur tout au long de la migration. Après la polymérisation des gels, les puits étaient nettoyés en y injectant du tampon TAE 1X. Ils étaient ensuite placés sur le support à migration puis immergés dans le tampon à 60°C pendant une heure, ce qui leur permettait de s'équilibrer.

Les échantillons (produits de PCR) à faire migrer étaient déposés dans les puits avec un tampon de chargement (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 100% glycérol). Pour le suivi de l'évolution d'une population bactérienne, environ 400 ng de matériel génétique étaient nécessaires. Un minimum de 40% du volume était ajouté en tampon de chargement. Les puits des extrémités des gels n'étaient pas utilisés, car le gradient s'y formait moins bien et le champ magnétique produit à ces endroits par le support de migration risquait de déformer les bandes. Un marqueur de référence était chargé de part et d'autre des échantillons (voir section 2.2.2.1.6.).

La migration s'effectuait à 100 V pendant 16 heures. Par la suite, les gels étaient colorés pendant dix minutes dans une solution aqueuse de bromure d'éthidium avec agitation (Orbit Shaker Lab-Line) puis décolorés 10-15 minutes dans de l'eau avec agitation. Les gels ont été observés et photographiés par un transilluminateur UV (AlphaImager™ 3400, équipé du logiciel AlphaEase, Alpha Innotech).

2.2.3. Évaluation sommaire du potentiel enzymatique des microflores enrichies par des galeries API ZYM.

Les galeries API ZYM (bioMérieux) ont été utilisées pour évaluer sommairement la capacité des différentes microflores enrichies à produire des activités enzymatiques selon 19 différentes enzymes. Ces enzymes et leurs substrats respectifs sont énumérés dans le tableau V. Les tests ont été effectués selon le protocole fourni par le fabricant pour les biomasses provenant des mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5. Les biomasses ont été récoltées à la fin du cycle 26 (cycle 19 pour le F5). Pour les autres mini-fermenteurs, la présence d'huile empêchait la réalisation des tests. La biomasse de chaque mini-fermenteur a été resuspendue dans un total de 2 mL d'eau milli-Q stérile par galerie. Les tests n'ont été effectués qu'une seule fois par mini-fermenteur. Les 20 cupules de chaque galerie ont été inoculées avec trois gouttes de la préparation bactérienne avec des micro-pipettes (pipettes Pasteur). Les galeries étaient ensuite placées dans des sacs scellés contenant de la ouate humide et incubées quatre heures à 60°C. Les résultats ont été

visualisés en ajoutant une goutte de chacun des réactifs ZYM A et ZYM B dans toutes les cupules. Une incubation minimale de cinq minutes à la lumière était nécessaire avant de noter les résultats. Une coloration d'une très forte intensité était notée par un 5 alors qu'une absence totale de coloration l'était par un 0. L'intensité de la coloration est dépendante de l'activité enzymatique et était jugée d'une manière comparative. À titre de témoin négatif, les 20 cupules d'une galerie ont été inoculées avec de l'eau milli-Q stérile.

Tableau V. Liste des substrats associés aux 20 cupules des galeries API ZYM et leurs enzymes correspondantes testées.

Cupules	Substrat	Enzyme testée
1	-	Témoin négatif
2	2-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline
3	2-naphtyl butyrate	Estérase (C4)
4	2-naphtyl caprylate	Estérase Lipase (C8)
5	2-naphtyl myristate	Lipase (C14)
6	L-leucyl-2-naphtylamide	Leucine arylamidase
7	L-valyl-2-naphtylamide	Valine arylamidase
8	L-crytyl-2-naphtylamide	Cystine arylamidase
9	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	Trypsine
10	N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide	α -chymotrypsine
11	2-naphtyl phosphate	Phosphatase acide
12	Naphtol-AS-BI-phosphate	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase
13	6-Br-2-naphtyl- α -D-galactopyranoside	α -galactosidase
14	2-naphtyl- β -D-galactopyranoside	β -galactosidase
15	Naphtol-AS-BI- β -D-glucuronide	β -glucuronidase
16	2-naphtyl- α -D-glucoopyranoside	α -glucosidase
17	6-Br-2-naphtyl- β -D-glucoopyranoside	β -glucosidase
18	1-naphtyl-N-acétyl- β D-Glucosaminide	N-acétyl- β -glucosaminidase
19	6-Br-2-naphtyl- α -D-mannopyranoside	α -mannosidase
20	2-naphtyl- α -L-fucopyranoside	α -fucosidase

2.3. Isolement et caractérisation de bactéries ayant des activités lipases/estérases

2.3.1. Isolement de bactéries

L'isolement de bactéries ayant des activités lipases/estérases a été tenté à partir d'échantillons de biomasses fraîches (24-10-2006, 06-11-2006 et 11-11-2006) des mini-

fermenteurs F6, F8, F1(2) et F2(2) et à partir d'un échantillon congelé (05-10-2006) du F1(2) (voir section 2.2.1.2.). L'isolement a été réalisé à partir de plusieurs milieux solides différents (voir section 2.3.1.1.). Les géloses étaient inoculées avec trois stries ou 100 µL d'une dilution 10^0 ou 10^{-1} de la biomasse dans du PBS (4 g/L NaCl, 1 g/L KCl, 0,72 g/L Na_2HPO_4 , 0,12 g/L KH_2PO_4 , pH 7,4) contenant 0,01% (V/V) de Tween 80. Les boîtes de Pétri étaient incubées à l'endroit à 60°C. Les boîtes étaient placées dans des sacs de plastique contenant quelques boîtes vides dans le fond et ces sacs étaient fermés de manière à prévenir le plus possible la perte d'humidité. La majorité des isolements se sont faits dans des conditions aérobies, mais quelques-uns ont aussi été réalisés dans des conditions microaérophiles. Dans ce dernier cas, les boîtes de Pétri étaient disposées dans une jarre anaérobie en présence d'une enveloppe recréant des conditions microaérophiles (Microaerophilic System Envelopes with Palladium Catalyst, BD BBL™ CampyPak™ Plus).

2.3.1.1. Milieux de culture

L'isolement de bactéries a été effectué sur différents milieux de culture. Le pH de tous ces milieux de culture a été ajusté à environ 8,1-8,2 avec du NaOH 1N/10N ou du HCl 1N/6N avant la stérilisation. Comme la stérilisation par autoclavage peut modifier le pH des solutions basiques, le pH des milieux était réajusté stérilement suite à leur stérilisation.

2.3.1.1.1. Milieu BSM additionné de protéose peptone et de Tween 80 (BT)

Le milieu BSM a été préparé comme à la section 2.1.1.; toutefois, il a été additionné de 0,5% protéose peptone (Bacto™ Proteose Peptone No.3, BD), 1% (V/V) Tween 80 (Sigma) et 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fisher). Une quantité de 1,5% d'agar (Agar Granulated, BBL) y a aussi été ajouté. Le milieu a été autoclavé 20 minutes (121°C, 15 psi) et, une fois légèrement refroidi (~60°C), coulé sous la hotte biologique (~20-25 mL de milieu dans chaque Pétri). Les géloses ont été conservées à 4°C.

Il est à noter que le Tween 80 a été autoclavé séparément du reste du milieu et il a été ajouté stérilement juste avant de réajuster le pH après la stérilisation du milieu.

2.3.1.1.2. Milieu BSM additionné de protéose peptone et d'huile d'olive (BHO)

Le milieu BSM a été préparé comme à la section 2.1.1.; toutefois, il était additionné de 0,5% protéose peptone (Bacto™ Proteose Peptone No.3, BD), 0,5% (V/V) d'huile d'olive (Sélection Mérite, Extra Vierge, 100% pure, embouteillé en Italie, importé pour BRISKA, Montréal, QC), 0,001% de Rhodamine B (Sigma) et de 2% d'agar (Agar Granulated, BBL). Le milieu a été autoclavé 20 minutes (121°C, 15 psi) et, une fois légèrement refroidi (~60°C), coulé sous la hotte biologique (~20-25 mL de milieu dans chaque Pétri). Après séchage, les géloses ont été conservées à 4°C.

Il est à noter que l'huile d'olive et la Rhodamine B ont été préparées et stérilisées séparément du reste du milieu. L'huile d'olive était ajoutée au milieu sous une forme émulsifiée. Par exemple, pour un volume final de 500 mL de milieu, 2,5 mL d'huile d'olive, 3 µL de Tween 80, 7,5 mL d'eau milli-Q et une goutte de NaOH 1N étaient mélangés vigoureusement via l'action d'un mélangeur (Waring commercial blender) ou par vortex. Après autoclavage de cette émulsion, une solution de Rhodamine B (5 mg/5 mL d'eau) y était ajoutée stérilement avec une seringue munie d'un filtre 0,22 µm. Une goutte de NaOH 5N y était aussi ajoutée. Cette préparation était ajoutée stérilement juste avant de réajuster le pH après la stérilisation du reste du milieu.

2.3.1.1.3. Milieu BSM additionné de protéose peptone et des huiles de canola et de palme (BHCP)

Ce milieu a été préparé exactement de la même manière que le milieu BSM additionné de protéose peptone et d'huile d'olive (voir section 2.3.1.1.2.). La seule différence réside au niveau de l'huile employée: au lieu d'utiliser de l'huile d'olive, un mélange d'huile de canola (Compliments Value, préparé pour Sobeys, Mississauga, ON) et d'huile de palme

(Cockbrand Zomi, Ghana, préparé pour le Marché Ghanacan, Montréal, QC) a été employé. Ce mélange comprenait les deux huiles dans un rapport 1:1.

2.3.1.1.4. Milieu R2A additionné de Tween 80 (RT)

Le milieu R2A agar a été préparé selon les directives du fabricant (BBL) : 18,1 g de poudre ont été dissous dans 1 L d'eau milli-Q. Les géloses obtenues comprenaient 1,5% d'agar. Avant d'autoclaver le milieu (20 min, 121°C, 15 psi), 0,01% CaCl₂•2H₂O (Fisher) y était ajouté. 1% (V/V) Tween 80 (Sigma) stérile était ajouté au milieu avant de réajuster le pH après la stérilisation du milieu. Le milieu a été coulé sous la hotte biologique (~20-25 mL de milieu dans chaque Pétri) et après avoir séché, les géloses ont été conservées à 4°C.

2.3.1.1.5. Milieu NB/YE additionné de Tween 80 (NYT)

Le milieu NB/YE additionné de Tween 80 se composait de 9,0 g/L de Nutrient Broth (Difco™ Nutrient Broth BD), 2,5 g/L d'extrait de levure (Bacto™ Yeast Extract BD), 2% d'agar (Agar Granulated, BBL), 0,01% de CaCl₂•2H₂O (Fisher) et 1% (V/V) de Tween 80 (Sigma). Sa préparation a été réalisée exactement de la même manière que pour le milieu R2A additionné de Tween 80 (section 2.3.1.1.4.).

2.3.1.1.6. Milieu TSB-agar additionné de Tween 80 (TT)

Le milieu TSB-agar additionné de Tween 80 se composait de 30 g/L de poudre TSB (Tryptic Soy Broth - Soybean - Casein Digest Medium, BD), 1,5-2% d'agar (Agar Granulated, BBL), 0,01% de CaCl₂•2H₂O (Fisher) et 1% (V/V) de Tween 80 (Sigma). Sa préparation a été réalisée exactement de la même manière que pour le milieu R2A additionné de Tween 80 (section 2.3.1.1.4.).

2.3.1.1.7. Milieu TSB-agar additionné d'huile d'olive (THO)

Le milieu TSB-agar additionné d'huile d'olive se composait de 30 g/L de poudre TSB (Tryptic Soy Broth - Soybean - Casein Digest Medium, BD), 2% d'agar (Agar Granulated, BBL), 0,5% (V/V) d'huile d'olive (Sélection Mérite, Extra Vierge, 100% pure, embouteillé en Italie, importé pour BRISKA, Montréal, QC) et 0,001% de Rhodamine B (Sigma). Ce milieu a été préparé exactement selon la même procédure que pour le milieu BSM additionné de protéose peptone et d'huile d'olive (section 2.3.1.1.2.).

2.3.1.2. Conservation des souches

Afin de s'assurer de leur pureté, les différentes souches isolées étaient repiquées à plusieurs reprises. Suite à ces multiples repiquages, les souches étaient étalées grossièrement sur deux ou trois géloses de manière à obtenir une forte biomasse. La biomasse était récoltée avec du TSB stérile (30 g/L, Tryptic Soy Broth - Soybean - Casein Digest Medium, BD) contenant 15% (V/V) de glycérol et congelée dans des tubes (Cryovial with Internal Threads, 2 mL, Fisherbrand, Fisher Scientific) à -70°C. Des aliquotes de chaque culture ont été conservées à -20°C pour fins de caractérisation moléculaire des souches isolées (section 2.3.2.). Les souches ont été nommées selon le code alphanumérique suivant : FX-Y-Z où X réfère au numéro du mini-fermenteur d'où la souche a été isolée (p.ex. F8, F12), Y, le milieu de culture sur lequel la souche a été isolé (p.ex. BT, BHO) et Z, le numéro de l'isolat (p.ex. 01, 051).

2.3.2. Caractérisation moléculaire des souches isolées

La rapide caractérisation moléculaire des souches isolées a été réalisée à partir des aliquotes de biomasse des souches pures conservées à -20°C (section 2.3.1.2.). Cette caractérisation comprenait le profil de migration sur DGGE des souches, le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) ainsi qu'une étude phylogénique des représentants des groupes d'isolats.

2.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique des souches pures

L'extraction de l'ADN génomique des souches pures a été effectuée selon la même procédure qu'aux sections 2.2.2.1.2. et 2.2.2.1.3.

2.3.2.2. Amplification par PCR du gène codant l'ARN ribosomal 16S

Dans le but d'obtenir le profil de migration des souches pures sur DGGE, la région hypervariable V3 du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S de ces souches a été amplifiée par PCR avec les mêmes amorces (341f-GC et 534r) et les mêmes étapes que précédemment (voir sections 2.2.2.1.4. et 2.2.2.1.5.).

Dans le but de faire séquencer le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches isolées, le gène quasi complet de l'ADNr 16S a été amplifié avec les amorces pA et pH dont le tableau VI résume les propriétés. Les conditions de PCR étaient les mêmes que pour les PCR servant à faire des DGGE (section 2.2.2.1.4.).

Tableau VI. Amorces utilisées pour le PCR pré-séquençage.

Amorces	Séquences	Positions chez E. coli	Références
pA	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8-27	(Edwards et al., 1989)
pH	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	1541-1522	(Edwards et al., 1989)

La taille des amplicons était d'environ 1500 pb et les produits PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose comme il est décrit à la section 2.2.2.1.5. Toutefois, des gels de 1% (m/V) d'agarose ont été utilisés et le marqueur de poids moléculaires GeneRuler™ 100bp DNA Ladder a été remplacé par le marqueur 1kb DNA Ladder (BioLabs, N3232S). Le tableau VII rapporte la concentration et la taille des fragments de ce marqueur.

Tableau VII. Taille (pb) et masse approximative (ng) des fragments d'ADN du marqueur de poids moléculaires 1kb DNA Ladder. La masse des fragments est exprimée par rapport à 500 nanogrammes d'ADN du marqueur.

Fragments	Taille (Kb)	Masse (ng)
1	10,0	42
2	8,0	42
3	6,0	50
4	5,0	42
5	4,0	33
6	3,0	125
7	2,0	48
8	1,5	36
9	1,0	42
10	0,5	42

2.3.2.3. Profil de migration sur DGGE des souches pures

Les électrophorèses des produits PCR des souches pures ont été réalisées sur DGGE comme il est décrit à la section 2.2.2.2.3. 100 ng d'ADN (amplicons) par souche ont été chargés dans chaque puits.

2.3.2.4. Séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S des souches pures

Le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S des souches pures a été réalisé par la plateforme de séquençage du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. Le séquençage des produits PCR amplifiés par les amorces pA et pH a été fait à partir de ces mêmes amorces. Les résultats obtenus par la plateforme ont été visualisés et édités (correspondance entre l'abondance d'un nucléotide et la nature de celui assigné) à partir du programme Chromas (version 2.13, Technelysium). Les séquences obtenues ont été comparées à des bases de données informatiques de séquences nucléotidiques via le programme BLASTN du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cela a permis d'assigner un genre bactérien et/ou une espèce bactérienne aux différentes souches isolées au cours de ce travail (assignations les plus probables).

2.3.2.5. Étude phylogénique des souches isolées

L'étude phylogénique des souches isolées a été effectuée à partir des résultats obtenus à la section 2.3.2.4. Les séquences codant pour l'ARNr 16S des souches isolées, des bactéries (souches types) les plus semblables aux souches isolées ainsi que d'un « outgroup » ont toutes été recueillies et alignées dans le programme BioEdit (version 7.0.5.3., Ibis Biosciences). Un « outgroup » est une séquence appartenant à une espèce bactérienne très loin d'un point de vue phylogénique des espèces analysées. La séquence codant pour l'ARNr 16S de *Cryptanaerobacter phenolicus* (Juteau et al., 2005) a été utilisée comme « outgroup ». Les séquences ont été comparées entre elles à l'aide des outils informatiques (Dnadist, Fitch, Drawgram, Seqboot et Consense) fournis dans l'ensemble Phylip 3.67 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Cela a permis d'obtenir un arbre phylogénique de similarité de séquences où une valeur de « bootstrap » (réarrangements de séquences) de 1000 a été utilisée. Les arbres ont été redessinés et ajustés dans le logiciel CorelDraw 8 (Corel Corporation).

2.3.3. Évaluation du potentiel enzymatique des souches isolées

2.3.3.1. Galeries API ZYM des souches pures

Des galeries API ZYM (bioMérieux) ont été utilisées pour évaluer le potentiel enzymatique de 15 souches isolées, ces souches représentant les divers groupes d'isolats. Les souches F12-RT-011, F12-RT-03, F12-RT-051, F12-RT-06, F12-RT-07, F12-RT-091 et F12-RT-101 ont été cultivées sur des géloses R2A additionnées de Tween 80 (section 2.3.1.1.4.); les souches F12-THO-01, F12-THO-02 et F12-TT-02 l'ont été sur des géloses TSB-agar additionnées de Tween 80 (section 2.3.1.1.6.); et finalement, les souches F12-BT-01, F12-BT-02, F12-BT-041, F12-BHCP-011 et F12-BHCP-03 ont été cultivées sur des géloses BSM additionnées de protéose peptone et de Tween 80 (section 2.3.1.1.1.). Les souches F12-BT-01, F12-BT-02, F12-BT-041 et F12-THO-02 ont été cultivées en conditions microaérophiles comme il est décrit à la section 2.3.1. Une fois les cultures reparties, chaque souche était étalée sur une gélose de manière à obtenir une

forte biomasse (incubation de 24h à 60°C). Cette dernière a été récoltée dans un volume final de 4 mL d'eau milli-Q stérile. Pour chaque souche, les galeries ont été réalisées en duplicatas. Les galeries API ZYM ont été préparées et les résultats notés selon la même procédure qu'à la section 2.2.3.

2.3.3.2. Criblage pour une activité lipolytique sur milieux solides

Le potentiel lipolytique des isolats a été évalué selon deux méthodes : la méthode à la Rhodamine B (avec huiles) et la méthode de précipitation au calcium (avec Tween 80; formation d'un précipité blanc). Les souches testées sont les mêmes que celles qui ont été testées sur des galeries API ZYM (section 2.3.3.1.). Pour réaliser ce criblage, des aliquotes de chaque souche (provenant des géloses préparées pour les galeries API ZYM) ont été déposées sur diverses géloses : R2A additionnées de Tween 80 (section 2.3.1.1.4.), TSB-agar additionnées de Tween 80 (section 2.3.1.1.6.), TSB-agar additionnées d'huile d'olive (section 2.3.1.1.7.), BSM additionnées de protéose peptone et de Tween 80 (section 2.3.1.1.1.), BSM additionnées de protéose peptone et d'huile d'olive (section 2.3.1.1.2.), BSM additionnées de protéose peptone et des huiles de canola et de palme (section 2.3.1.1.3.) et NB/YE additionnées d'huile d'olive (NYHO) (ce milieu est une combinaison des milieux NB/YE additionné de Tween 80 et BSM additionné de protéose peptone et d'huile d'olive décrits respectivement aux sections 2.3.1.1.5. et 2.3.1.1.2.). Les géloses ont été incubées à 60°C pour 24 et 48 heures. Les souches F12-BT-01, F12-BT-02, F12-BT-041 et F12-THO-02 ont été cultivées en conditions microaérophiles comme il est décrit à la section 2.3.1.

Après les premières 24 heures d'incubation, les géloses étaient observées : pour celles contenant du Tween, la présence d'un précipité blanc était recherchée alors que pour celles contenant de la Rhodamine B, la présence de halos fluorescents ou de colonies fluorescentes orange était recherchée. Cette fluorescence était visualisée aux UV à une longueur d'onde de 365 nm. Les géloses contenant de la Rhodamine B ont été photographiées par un transilluminateur UV (AlphaImager™ 3400, équipé du logiciel AlphaEase, Alpha Innotech). Les géloses étaient incubées de nouveau pour une autre

période de 24 heures afin de voir si des changements surviendraient par rapport aux premières observations.

2.4. Caractérisation préliminaire des activités lipolytiques de bactéries sélectionnées

Les souches F12-THO-01 et F12-RT-091 ont été sélectionnées pour faire une brève caractérisation de leur activité lipolytique. À partir de surnageants de culture obtenus de cultures liquides en fioles, les activités lipolytiques des souches sélectionnées ont été testées selon deux méthodes : la méthode à la Rhodamine B (en présence d'huile d'olive) et une méthode par spectrophotométrie employant des substrats p-nitrophényl esters d'acides gras.

2.4.1. Culture en fioles pour obtenir du surnageant actif

2.4.1.1. Milieux de culture et inducteurs

Les cultures en fioles des souches F12-THO-01 et F12-RT-091 ont été effectuées avec des milieux TSB (30 g/L Tryptic Soy Broth - Soybean - Casein Digest Medium, BD) et NB/YE (9 g/L Difco™ Nutrient Broth BD, 2,5 g/L Bacto™ Yeast Extract BD). Dans le cas de la souche F12-RT-091, des essais ont aussi été effectués avec un milieu R2A sans agar dont voici la composition : 0,5 g/L d'extrait de levure (Bacto™ Yeast Extract BD), 0,25 g/L de tryptone peptone (Pancreatic Digest of Casein, Difco), 0,25 g/L de proteose peptone (Enzymatic Digest of Protein, Bacto™ Proteose Peptone No.3, BD), 0,5 g/L de casamino acids (Acid-Hydrolyzed Casein, Bacto™ Casamino Acids, Technical, Difco), 0,5 g/L de dextrose (The McArthur Chemical Co. Ltd.), 0,5 g/L d'amidon soluble (Fisher Scientific), 0,3 g/L de K_2HPO_4 (Fisher Scientific), 0,049 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Anachemia) et 0,3 g/L de pyruvate de sodium (Sigma). Le pH des milieux a été ajusté à environ 8,2 avant et après autoclavage (20 min, 121°C, 15 psi) avec du NaOH 1N ou du HCl 1N.

Afin d'induire la production de lipases et/ou d'estérases chez les deux souches sélectionnées, deux sources de carbone ont été employées : l'huile d'olive et le Tween 80.

Dans un premier temps, 2,5% (V/V) d'huile d'olive (Sélection Mérite, Extra Vierge, 100% pure, embouteillé en Italie, importé pour BRISKA, Montréal, QC) et 0,416% (V/V) de Tween 80 (Sigma) (ratio 6:1) ont été ajoutés au milieu de culture NB/YE. Cet essai n'a été effectué que pour la souche F12-THO-01. Dans un deuxième temps, tous les milieux de culture ont été supplémentés avec 1,5% (V/V) de Tween 80.

2.4.1.2. Remise en culture des souches et préparation des inoculums

Les souches F12-THO-01 et F12-RT-091 ont été reparties à partir des cultures conservées à -20°C. La souche F12-THO-01 a été remise en culture sur des géloses TSB-agar additionnées de Tween 80 (section 2.3.1.1.6.) alors que la souche F12-RT-091 l'a été sur des géloses R2A additionnées de Tween 80 (section 2.3.1.1.4.) et BSM additionnées de protéose peptone et de Tween 80 (2.3.1.1.1.). Une fois les souches remises en culture, la biomasse de deux géloses a été récoltée dans un total de 5 mL de tampon PBS stérile (4 g/L NaCl, 1 g/L KCl, 0,72 g/L Na₂HPO₄, 0,12 g/L KH₂PO₄, pH 7,4). La biomasse a ensuite été diluée dans ce même tampon PBS de manière à obtenir une densité optique (DO) pour l'inoculum d'environ 10. Les lectures de DO ont été réalisées avec un spectrophotomètre de type Milton Roy Spectronic 1001 Plus (laboratoire du Dr. Éric Déziel). Les fioles ont été inoculées en utilisant 2% d'inoculum.

2.4.1.3. Conditions de cultures et échantillonnages

Les cultures en fioles ont été réalisées dans des fioles coniques stériles de 1000 mL. Pour favoriser la meilleure aération possible, les fioles contenaient 60 mL de milieu de culture. Elles étaient fermées avec des bouchons vissés pour empêcher l'évaporation du milieu. Les fioles ont été incubées à 60°C dans un bain-marie à agitation latérale (niveau d'agitation 5).

Pour la souche F12-THO-01, trois séries de culture ont été réalisées : dans la première, des échantillons ont été prélevés après 7, 23, 29 et 47 heures d'incubation; dans la deuxième, après 5,25 et 24 heures; et dans la troisième, après 5 et 24 heures. Pour la

souche F12-RT-091, l'échantillonnage a été fait après 4, 8 et 24 heures d'incubation. L'échantillonnage, en conditions stériles, comprenait la prise de mesures de DO des milieux, l'ajustement du pH, si nécessaire et le prélèvement d'aliquotes pour réaliser les tests d'activités lipolytiques. Les mesures de DO ont été effectuées en employant du milieu de culture stérile correspondant comme blanc. Le pH des milieux de culture a été ajusté à environ 8,2 avec du NaOH 1N, 2N ou 5N stérile ou du HCl 1N ou 6N stérile, selon les besoins. Pour les aliquotes, elles étaient centrifugées (5 min, 13 000 rpm) et les surnageants étaient conservés à 4°C et -20°C, s'ils n'étaient pas utilisés sur le champ.

Dans le cas de la troisième série de cultures pour la souche F12-THO-01, une partie des surnageants de cultures a été concentrée sur des micro-colonnes ayant un « cut-off » de 3kDa (PALL Life Sciences, Nanosep® Centrifugal Devices). Les surnageants ont été concentrés par des cycles de centrifugation (15 min, 13 000 rpm). Les échantillons NB/YE t5, NB/YE t24, TSB t5 et TSB t24 ont été concentrés par des facteurs, respectivement, de 3.1, 2.4, 2.4 et 2,0.

2.4.2. Tests d'activités lipolytiques à partir des surnageants de cultures

2.4.2.1. Méthode à la Rhodamine B en présence d'huile d'olive

Des tests d'activités lipolytiques sur milieux solides à partir des surnageants de cultures des première et deuxième séries de cultures de la souche F12-THO-01 ont été réalisés. Pour la première série, 100 µL des surnageants des t23, t29 et t47 ont été déposés dans des trous percés dans diverses géloses. Les trous ont été percés à l'aide du gros bout d'un tip de pipette P1000 stérile. Des géloses NB/YE additionnées d'huile d'olive (section 2.3.3.2.) et TSB-agar additionnées d'huile d'olive (section 2.3.1.1.7.) ont été employées. Les géloses NYHO ont été incubées O/N à 37°C et 60°C alors que les géloses THO ne l'ont été qu'à 60°C. Un contrôle négatif (milieu NB/YE stérile) a aussi été déposé (100 µL) sur les géloses NYHO. Pour la deuxième série, les surnageants de t5, t25 et t24 ont été déposés dans les trous de trois types de géloses : des géloses NYHO (section 2.3.3.2.) et des géloses NYHO modifiées. Ces dernières comprenaient 3% d'huile d'olive au lieu de 0,5% et 1% d'agar au lieu de 2%. De plus, une des géloses modifiées avait un pH de

8,1 comme les autres géloses NYHO, mais l'autre avait un pH de 7,4. Ces géloses modifiées ont aussi été appelées Rhodamine B Lipase Agar (protocole inspiré de Alken-Murray Corporation, NY, courtoisie des Laboratoires Choisy Ltée., QC). Comme contrôle négatif, du milieu TSB stérile a été utilisé alors que de la LIPEX, une lipase commerciale, diluée par un facteur de 8000 a été employée comme contrôle positif. Les géloses ont été incubées cinq heures à 37°C et 60°C.

2.4.2.2. Méthode par spectrophotométrie

La méthode par spectrophotométrie employée dans le cadre de ce travail est basée sur l'hydrolyse de p-nitrophényl esters d'acides gras. L'apparition du p-nitrophénolate, produit de l'hydrolyse, est suivie via l'augmentation de la densité optique à une longueur d'onde définie, en fonction du temps. Cette méthode permet d'évaluer la spécificité du substrat des enzymes (longues chaînes vs courtes chaînes) et aussi de doser leurs activités.

2.4.2.2.1. Détermination du maximum d'absorption du pNP

Le maximum d'absorption du pNP (p-nitrophénol) a été déterminé avec le spectrophotomètre (laboratoire du Dr. Claude Dupont) qui a été utilisé pour faire tous les tests enzymatiques, soit un Varian Cary 300Bio UV-Visible Spectrophotometer (logiciel version 3.00(182), instrument version 9.00). Ce spectrophotomètre est munie d'un système contrôle de température pour les cuvettes.

À partir d'une solution mère 11 mM de p-nitrophénol (Sigma) dans de l'isopropanol (Sigma, 99,5% HPLC Grade), une solution à 0,11 mM est préparée : pour 1000 µL, 10 µL de la solution de pNP 11mM sont ajoutés à 910 µL de tampon (Tris 50 mM pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 0.05% CaCl₂•2H₂O) et 80 µL d'isopropanol. Une solution constituée de 910 µL du tampon et de 90 µL d'isopropanol a été utilisée comme blanc. Une fois les cuvettes contenant la solution à 0,11 mM et le blanc incubés à 37°C, un balayage de longueurs d'onde entre 450 et 350 nm a été effectué. Le pic d'absorption du

pNP a permis de déterminer à quelle longueur d'onde les tests enzymatiques devaient avoir lieu.

2.4.2.2.2. Courbes d'étalonnage du pNP

La courbe d'étalonnage du pNP permet de confirmer la zone de linéarité d'absorption du pNP et de déterminer la valeur de son coefficient d'extinction molaire (ϵ) dans les conditions données. Le tampon réactionnel de base pour les tests enzymatiques était du Tris 50 mM avec 0,05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La valeur d' ϵ a été déterminée pour les sept conditions réactionnelles suivantes (pH, température, concentration de Triton X-100) :

- pH 7,5 / 37°C / 0% Triton X-100;
- pH 7,5 / 37°C / 0,05% Triton X-100;
- pH 7,5 / 37°C / 0,5% Triton X-100;
- pH 8,5 / 37°C / 0% Triton X-100;
- pH 8,5 / 37°C / 0,05% Triton X-100;
- pH 8,5 / 37°C / 0,5% Triton X-100;
- pH 8,5 / 55°C / 0% Triton X-100.

À partir d'une solution 10 mM de pNP dans de l'isopropanol, des solutions à 10, 20, 30, 40 et 50 μM de pNP ont été préparées avec 910 μL de tampon et de l'isopropanol. Une fois les cuvettes comprenant les solutions incubées à la température désirée, la DO de ces solutions a été mesurée à la longueur d'onde déterminée à la section 2.4.2.2.1. 90 μL ajoutés aux 910 μL de tampon approprié ont servi de blanc pour faire les différentes lectures. Pour chacune des conditions et des concentrations de pNP, les lectures ont été réalisées en triplicatas.

2.4.2.2.3. Tests d'activité enzymatique

Les tests d'activité enzymatique ont été réalisés avec quatre substrats différents : pNP-palmitate (pNPP, C16, Sigma), pNP-stéarate (pNPS, C18, Sigma), pNP-laurate (pNPL, C12, Fluka) et pNP-butyrate (pNPB, C4, Sigma). Une solution mère de chaque substrat

de 10 mM a été préparée dans de l'isopropanol. Les solutions pouvaient nécessiter une agitation vigoureuse ainsi qu'une légère incubation à 37°C afin de bien dissoudre les substrats. Les divers tampons réactionnels énumérés à la section 2.4.2.2.2 ont été utilisés pour les tests. Pour chaque test, 810 μL de tampon réactionnel étaient transférés dans une cuvette de 1,5 mL (Fisherbrand Disposable Plastic Cuvette, Semimicro Style, Methacrylate, 10 mm Lightpath, Fisher Scientific). Ces cuvettes étaient insérées dans le spectrophotomètre afin d'incuber le tampon à la température appropriée. Une fois cette température atteinte, 90 μL du substrat pNP esters d'acides gras étaient ajoutés au tampon et mélangés immédiatement avec quelques mouvements de haut en bas avec la pipette. 100 μL de surnageant de culture (section 2.4.1.3.) étaient ensuite ajoutés et mélangés rapidement. La DO était alors lue immédiatement à toutes les dix secondes pendant 300 secondes (5 min) et toutes les 30 secondes pour 120 (2 min) ou 300 secondes supplémentaires. Pour le blanc, 910 μL de tampon réactionnel ont été utilisés auxquels 90 μL de substrat étaient ajoutés. Cela permettait de contrecarrer l'effet sur la DO d'une possible hydrolyse spontanée des substrats. Les tests ont été effectués en duplicatas.

Les valeurs d'absorbance ont été rapportées en fonction du temps. À partir du calcul de la pente maximale et de la valeur du coefficient d'extinction molaire dans les conditions du test, une valeur d'activité en nmol/min-mL de surnageant a été calculée pour un échantillon donné.

Chapitre 3. RÉSULTATS

3.1. Enrichissement de neuf microflores bactériennes aérobies thermophiles

Les divers enrichissements ont été réalisés dans du milieu BSM supplémenté avec une source de carbone différente pour chaque enrichissement. Les inoculums de départ ont été préparés de manière à avoir une grande diversité initiale de bactéries. Les populations qui ont réussi à s'établir sont celles qui théoriquement sont capables d'assimiler la source de carbone fournie ou ses dérivés.

3.1.1. Sources de carbone

Afin d'alimenter les mini-fermenteurs en sources de carbone, les multiples substrats ont été préparés ou transformés selon les besoins. Pour des fins d'économie de matériel, une pompe péristaltique à canaux multiples a été utilisée pour l'alimentation des sources de carbone (sauf pour le son de blé et les huiles). La tête de pompe employée utilisait des tubulures de 1/8 de pouce de diamètre interne. Cela constituait un problème pour certains des substrats, car ces derniers devaient pouvoir circuler aisément à l'intérieur des tubulures sans entraîner de résistance ou carrément les boucher. Il ne faut pas oublier que le système de contrôle des mini-fermenteurs se devait d'être semi-autonome. Dans la préparation des substrats, un critère secondaire s'ajoutait aussi : idéalement, les solutions de réserve devaient être de la même concentration pour tous les substrats, de manière à uniformiser l'alimentation.

Pour l'extrait de viande, un premier tamisage après l'homogénéisation de la viande hachée a permis d'éliminer beaucoup de filaments, corps gras ou toutes autres particules insolubles ou dont le diamètre était supérieur à 850 μm . Un deuxième tamisage éliminait les particules (p.ex protéines) qui ont précipité ou se sont agglutinées après l'ajustement du pH. Une préparation à 2% de protéine de viande n'offrait aucun problème de pompage.

Concernant le son de blé, plusieurs essais de broyage et de tamisage ont été réalisés, car de par la grosseur des particules de son, les tubulures se bouchaient très rapidement. Avec une préparation à 2% dont les particules sont de diamètre inférieur à 250 µm (mesh 60), aucun problème de pompage n'était observé. Toutefois, le temps requis pour préparer une quantité appréciable de son de blé dont les particules avaient une telle grosseur était inacceptable dans le cadre de ce travail. Étant limité au niveau des options en raison de la tête de pompe, la solution fut d'employer une pompe indépendante pour le son de blé. Une tubulure de 3/16 de pouce de diamètre interne a été utilisée ce qui a permis d'employer une préparation à 2% de son de blé dont les particules avaient moins de 1,18 mm de diamètre (mesh 16). Aucun broyage n'était nécessaire.

La lignine utilisée étant soluble dans l'eau, une solution à 2% ne posait aucun problème de pompage. Toutefois, assez rapidement, des problèmes de mousse et de contrôle de pH ont été observés dans le mini-fermenteur F3. Vers la fin du 6^e cycle d'enrichissement, la concentration de la solution de réserve de lignine a été diminuée à 1% et les problèmes de mousse ont disparu lors des cycles subséquents. Les problèmes de contrôle de pH ont aussi diminué sans toutefois disparaître complètement.

La chitine employée ici comme substrat était originalement sous forme de flocons, de particules grossières. Un broyage était nécessaire. Une fois tamisée, même sur un tamis dont les mailles ont 250 µm de diamètre (mesh 60), une préparation à 2% bloquait les tubulures. La circulation des particules débutait bien, mais en un instant, elles s'agglutinaient bloquant ainsi la circulation. La chitine a donc été transformée pour donner de la chitine « colloïdale ». Une préparation (tamisée) à 2% de cette chitine n'occasionnait aucun problème au niveau du pompage.

Le principal problème de la gélatine concernait sa gélification. Plusieurs essais de mise en solution ont été effectués. Pour des raisons évidentes, la gélatine ne pouvait être solubilisée complètement (par la chaleur), car cela entraînait sa gélification. Les premiers essais ont été tentés avec des solutions à 5%, ces dernières étaient maintenues sous agitation à 4°C et à température ambiante. Après une nuit sous agitation, la solution

maintenue à 4°C s'était gélifiée alors que celle à température ambiante ne l'était pas, mais son aspect était très visqueux. Des préparations contenant la moitié moins de gélatine (2,5%) ont été réalisées. La solution à 4°C s'était encore gélifiée, alors que celle à température ambiante était toujours visqueuse. Toutefois, le pompage de cette dernière était possible. Une solution de réserve de 2% gélatine a donc été utilisée pour l'enrichissement dans le F5. Cette solution était maintenue à température ambiante sous agitation vigoureuse afin d'éviter sa gélification.

Pour les enrichissements en présence des lipides, le choix des huiles s'est fait selon deux critères de sélection : la composition en acides gras et la diversité dans la distribution des acides gras à l'intérieur des triglycérides. L'huile de palme contient majoritairement des acides palmitique (C16) et oléique (C18:1) et dans de moindres proportions des acides linoléique (C18:2), stéarique (C18) et myristique (C14) ainsi qu'une faible quantité d'acides gras contenant 12 atomes de carbone et moins. L'huile de canola contient principalement des acides oléique et linoléique et dans de moindres proportions des acides palmitique, stéarique et linoléique (C18:3). Les huiles de palme et de canola contiennent respectivement plus de 33 et 38 triglycérides différents (Holčapek et al., 2003). C'est pour leur grande diversité que ces deux huiles ont été choisies pour les enrichissements dans les F6, F8 et F2(2). L'huile d'olive quant à elle se compose très majoritairement d'acide oléique avec un peu d'acides linoléique et palmitique. Pour l'enrichissement dans le F1(2), l'huile d'olive a été utilisée dans un rapport 6:1 avec du Tween 80.

3.1.2. Conditions d'enrichissement

Comme il a été mentionné à la section 2.1.5., les enrichissements ont été réalisés en cuvées alimentées séquentielles (« sequencing fed-batch ») dont les cycles étaient de 72 heures. Les divers enrichissements ont eu des durées variables. Pour les mini-fermenteurs F1, F2 et F3, les enrichissements ont duré 27 cycles. Pour les F4 et F5, ils ont été effectués, respectivement, sur 33 et 20 cycles alors qu'ils se sont étalés sur 54 cycles pour les F6 et F8 et 26 cycles dans le cas des F1(2) et F2(2).

Pour tous les enrichissements sauf celui du F1(2), les conditions de pH et de température variaient d'une manière contrôlée dans le temps au cours d'un même cycle : elles passaient respectivement de 7,0 et 50°C à 8,5 et 70°C en 36 heures pour revenir à leurs conditions initiales dans les 36 dernières heures. La figure 8 illustre ces variations dans le temps.

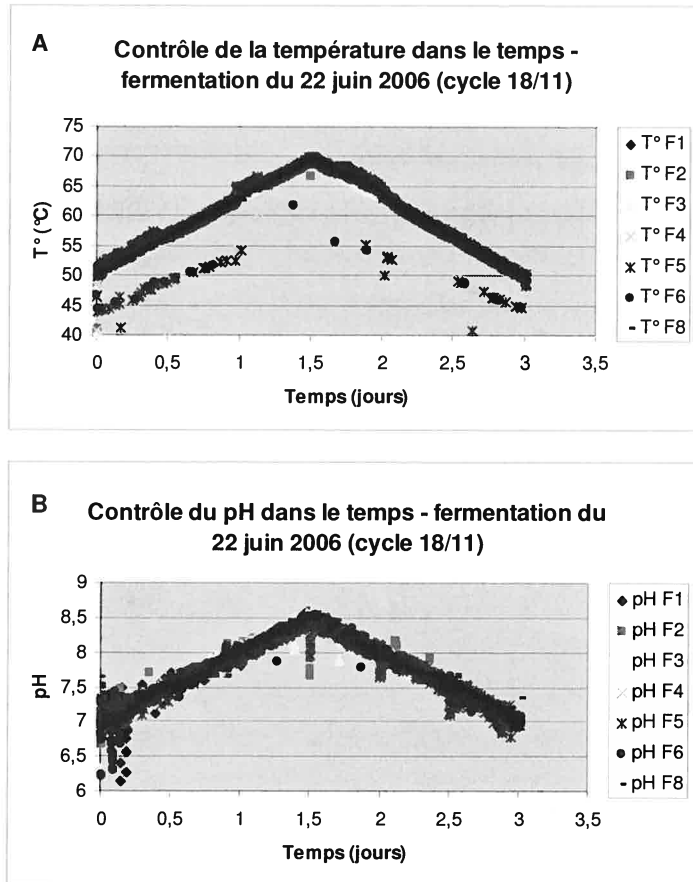


Figure 8. Exemple de contrôle de la température (A) et du pH (B) des mini-fermenteurs. Les données présentées sont pour les mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4, F5, F6 et F8 au cours d'un cycle de fermentation (cycle 18 pour F1, F2, F3 et F4; cycle 11 pour F5, F6 et F8). Dans le cas de la température, les quelques points situés nettement sous la tendance générale sont des artefacts de lecture dus à un problème d'interférence électrique.

Pour l'enrichissement du F1(2), le pH et la température étaient maintenus constants respectivement à 8,2 et 65°C pour toute la durée des cycles. Comme il est possible de le

constater à la figure 8, le contrôle de la température et du pH s'effectuait d'une manière assez efficace selon les consignes prescrites. Par exemple, au niveau du contrôle du pH (figure 8B), en début de cycle, des variations étaient observées, mais assez rapidement, le pH des divers mini-fermenteurs étaient ajustés selon les consignes. La chute du pH observé pour le F2 à 36 heures s'explique par l'ajout ponctuel de la préparation de son de blé qui s'effectuait à ce moment-là du cycle. Le pH de la préparation de réserve de son de blé était ajusté régulièrement, mais même conservée dans le réfrigérateur, la contamination provoquait l'acidification progressive de la solution. En ce qui a trait au contrôle de la température, il était assez précis. Toutefois, des lectures de température hors consignes pouvaient être observées (figure 8A). Ces dernières s'expliquaient par des problèmes de nature électronique au niveau de la console.

Plusieurs incidents sont venus perturber à divers moments les enrichissements. Leurs répercussions ne sont pas les mêmes pour tous les enrichissements. Leurs impacts sur la diversité bactérienne présente dans les mini-fermenteurs sont décrits à la section 3.2.2. Les incidents les plus fréquents sont survenus au niveau du contrôle du pH. Que ce soit en raison d'injections d'acide ou de base trop lentes, c'est-à-dire que l'ajustement du pH ne se faisait pas assez rapidement, ou en raison d'incidents hors de notre contrôle (coupure d'alimentation du bâtiment en électricité ou en air comprimé), tous les mini-fermenteurs, sans exception, ont eu de tels problèmes. Le F3 a été particulièrement affecté lors de ses cycles de fermentation 15 et 17 où le pH a connu des chutes drastiques descendant jusqu'à un pH d'environ 3 dans un des cas. En fin de cycle 14 (pour F1 à F4, cycle 7 pour F5, F6 et F8), une interruption dans l'alimentation en air des mini-fermenteurs a particulièrement affectée le contrôle du pH des mini-fermenteurs de type à agitation par circulation d'air (F1, F3, F5, F6 et F8). Au cycle 14 des enrichissements des F1(2) et F2(2) (cycle 42 pour F6 et F8), une interruption de l'alimentation électrique du système dans son ensemble est venue perturber leur fonctionnement : pour une période d'environ trois heures, les mini-fermenteurs n'ont pas été sous aucun contrôle (pH, température, aération).

3.2. Suivi de la flore bactérienne aérobie thermophile des enrichissements

3.2.1. Élaboration du marqueur de référence pour le DGGE

Un marqueur de référence a été élaboré pour faciliter la comparaison entre les divers échantillons d'un même mini-fermenteur ainsi qu'entre les divers enrichissements. D'un point de vue technique, un tel marqueur permet aussi de s'assurer du bon fonctionnement des électrophorèses. Évidemment, la même région de l'ADN codant pour l'ARNr 16S des souches bactériennes pures a été amplifiée pour les échantillons provenant des enrichissements. Les souches bactériennes utilisées ainsi que la méthode employée pour confectionner le marqueur sont tirées en grande partie des travaux de maîtrise de Danielle Tremblay (Tremblay, 2003). La figure 9 présente le marqueur de référence constitué des cinq bandes représentant chacune des espèces bactériennes employées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptomyces lividans* 1326).

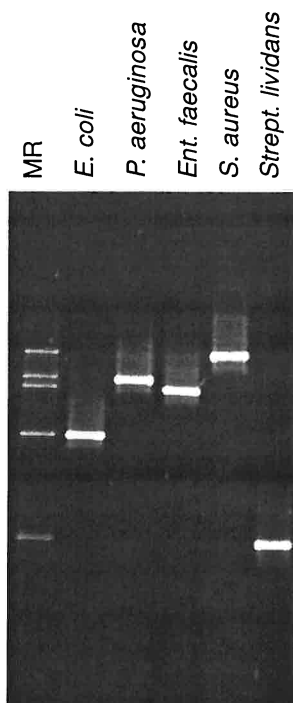


Figure 9. Marqueur de référence utilisée pour le DGGE. Le DGGE a été effectué dans un gel de 8% d'acrylamide composé d'un gradient dénaturant de 20 à 80% d'urée:formamide . MR : marqueur de référence; *E. coli* : *Escherichia coli* (ATCC 25922); *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Ent. faecalis* : *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *S. aureus* : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Strept. lividans* : *Streptomyces lividans* 1326.

3.2.2. Suivi de l'évolution de la flore bactérienne des mini-fermenteurs par DGGE

Comme il a été mentionné précédemment (section 3.1.2.), les divers enrichissements se sont effectués sur plusieurs cycles. Pour faire le suivi de la diversité bactérienne dans le temps (au fil des cycles d'enrichissement), l'ADN total des échantillons récoltés à la fin des cycles était extrait et amplifié avec des amorces spécifiques pour une région hypervariable codant pour l'ARNr 16S. Les amplicons étaient ensuite séparés par DGGE, chaque bande représentant théoriquement une population bactérienne différente.

Pour les échantillons des F6, F8, F1(2) et F2(2), une étape supplémentaire devait être réalisée avant de procéder à l'extraction d'ADN de la biomasse provenant de ces mini-

fermenteurs (voir section 2.2.2.2.1.). En effet, une simple centrifugation du milieu de culture ne permettait pas de récupérer efficacement la biomasse. La présence d'huile était problématique : dans les mini-fermenteurs contenant de l'huile, une phase hydrophobe s'était formée et la majeure partie de la biomasse s'y retrouvait. Même en augmentant le temps de centrifugation, la biomasse ne parvenait pas à se défaire complètement de cette phase. Les bactéries adhéraient à leur substrat. La figure 10 illustre bien ce phénomène.

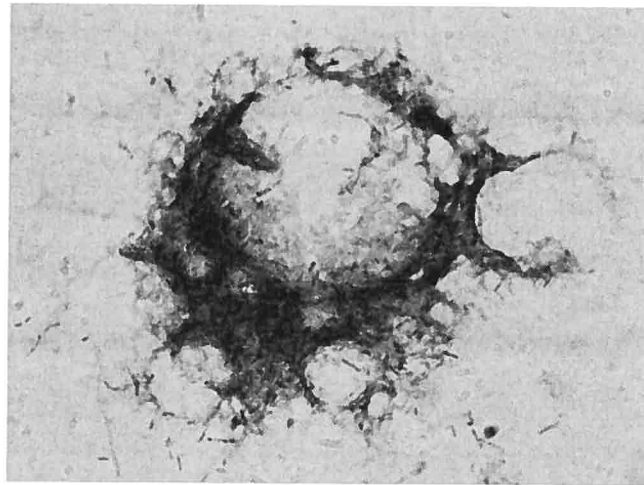


Figure 10. Coloration de Gram d'un échantillon de biomasse du F8 au cycle 9. Les bactéries sont regroupées autour des gouttelettes d'huile.

Comme le but de l'exercice était de caractériser la diversité bactérienne des enrichissements, il fallait récupérer le plus de biomasse possible des échantillons pour obtenir une représentation la plus fidèle possible de la réalité. Des essais d'extraction d'ADN directement du milieu de culture du F6 n'ont pas été concluants. L'hypothèse que la présence d'huile interférait probablement avec le processus d'extraction a été émise. Des essais incluant la séparation de la biomasse de l'huile avec des solvants organiques ont alors été tentés avec des échantillons provenant des F6 et F8. Parallèlement, des essais d'extraction directement sur le milieu de culture ont été refaits avec les mêmes échantillons. La migration sur gel d'agarose des échantillons extraits ne permettait pas de visualiser de l'ADN, mais les échantillons ont tout de même été amplifiés par PCR. La migration sur gel d'agarose des amplicons a permis de visualiser une amplification pour

les échantillons provenant du F8 et possiblement une très faible amplification de ceux du F6. La migration des amplicons par DGGE a permis de constater qu'il ne semblait pas y avoir de différence entre la méthode d'extraction directe et indirecte : les mêmes bandes apparaissaient et ce, avec la même intensité. Afin de maximiser la récupération de biomasse et le rendement de l'extraction d'ADN, la méthode indirecte (employant une séparation avec des solvants) a été retenue pour le traitement des échantillons subséquents.

L'évolution de la diversité bactérienne dans le temps pour les divers enrichissements a été étudiée après migration par DGGE de différents échantillons dans des gels de 8% d'acrylamide composés d'un gradient dénaturant de 20 à 80% d'urée:formamide. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 11 à 19 respectivement pour les mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4, F5, F6, F8, F1(2) et F2(2).

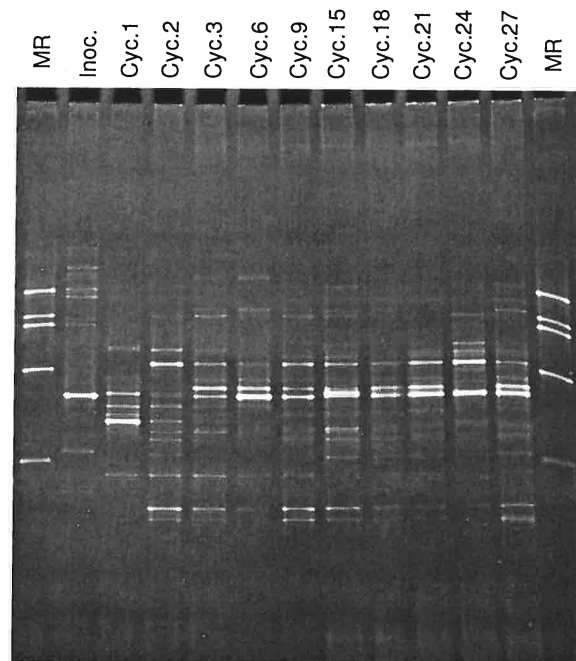


Figure 11. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement effectué avec de l'extrait de viande (F1). MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

L'enrichissement en fonction d'un extrait de viande (F1) comme source de carbone s'est déroulé sur une période de 27 cycles. Comme il est possible de le constater à la figure 11, dès le premier cycle de fermentation, la diversité bactérienne présente dans le mini-fermenteur s'est distinguée de celle présente dans l'inoculum de départ. Au deuxième cycle, la diversité était encore en évolution, mais dès le troisième cycle, les populations dominantes semblaient s'être déjà bien établies. Par la suite, de légères variations au niveau des populations moins dominantes ont été observées au fil des cycles, mais le profil global était bien établi. Au final, plus d'une quinzaine de bandes d'intensité variables sont observées dont six relativement majeures.

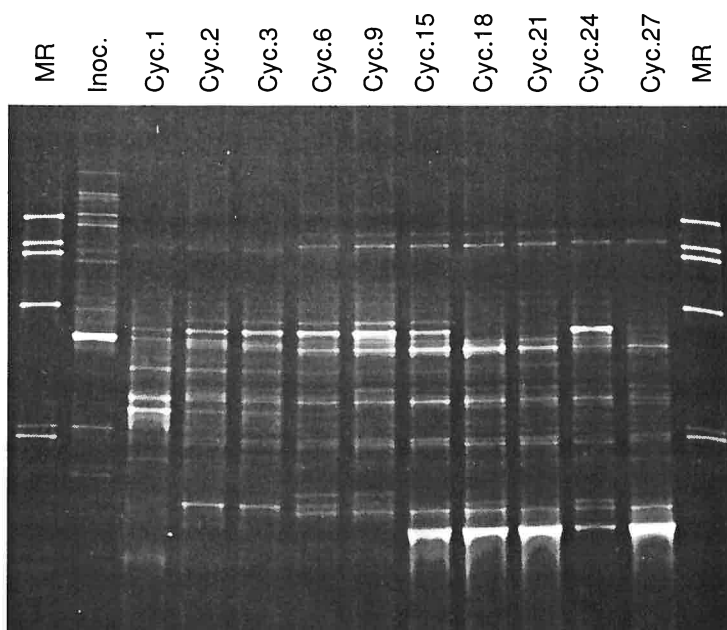


Figure 12. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du son de blé (F2). MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

L'enrichissement en fonction du son de blé (F2) comme source de carbone s'est aussi déroulé sur une période de 27 cycles. Comme dans le cas du F1, dès le premier cycle (figure 12), la diversité bactérienne s'est différenciée de celle présente dans l'inoculum de départ. Assez rapidement, la flore présente dans le mini-fermenteur s'est stabilisée en grande partie : du deuxième au neuvième cycle, seulement quelques bandes sont apparues dans le haut et le bas du profil. Toutefois, au quinzième cycle, l'apparition d'une bande

d'une forte intensité ainsi que la disparition de quelques bandes de moindre intensité sont observées. Cela s'explique par un incident qui est survenu au quatorzième cycle d'enrichissement : il y a eu une interruption dans l'alimentation en air du mini-fermenteur. Cet incident a eu un impact direct sur la diversité de la flore bactérienne présente dans le mini-fermenteur. Par la suite, la diversité s'est stabilisée de nouveau avec une légère variation d'intensité pour deux bandes au vingt-quatrième cycle d'enrichissement. Au final, une quinzaine de bandes sont observées dont une très majeure.

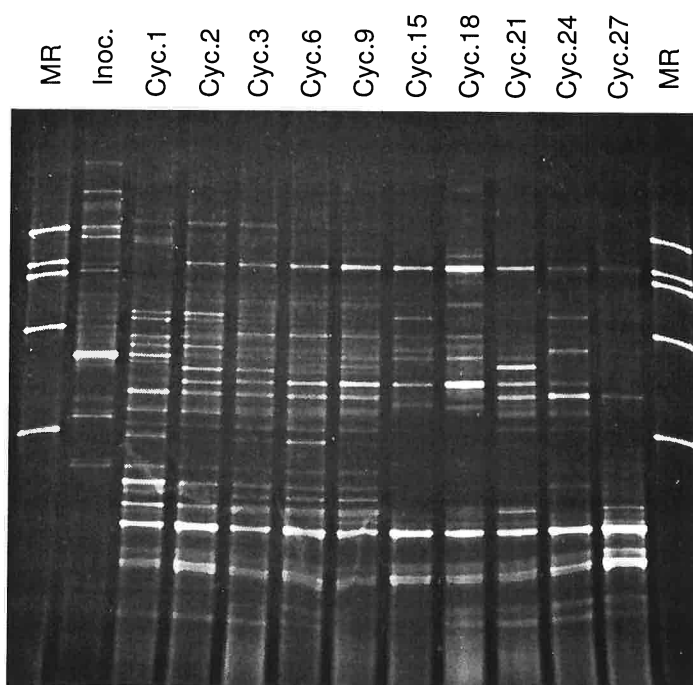


Figure 13. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en présence de la lignine (F3). MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

L'enrichissement en fonction de la lignine (F3) comme source de carbone s'est également effectué sur une période de 27 cycles. De la même manière que pour les F1 et F2, la flore bactérienne présente après le premier cycle d'enrichissement était différente de celle qui prédominait dans l'inoculum de départ. La diversité s'est stabilisée plus rapidement que dans les deux cas précédents : dès le premier et le deuxième cycle, la tendance était bien visible (figure 13). Ensuite, à partir du quinzième cycle, une diminution de la diversité est

observée. Cela va de pair avec le fait qu'une diminution de la biomasse présente dans le mini-fermenteur avait été remarquée lors des échantillonnages. Cela s'explique probablement par les nombreux chocs de pH étant survenus lors de l'enrichissement, particulièrement lors des cycles 15 et 17. Cela s'est reflété sur la diversité finale observée pour cet enrichissement : seulement une dizaine ou une douzaine de bandes tout au plus caractérise la microflore du F3.

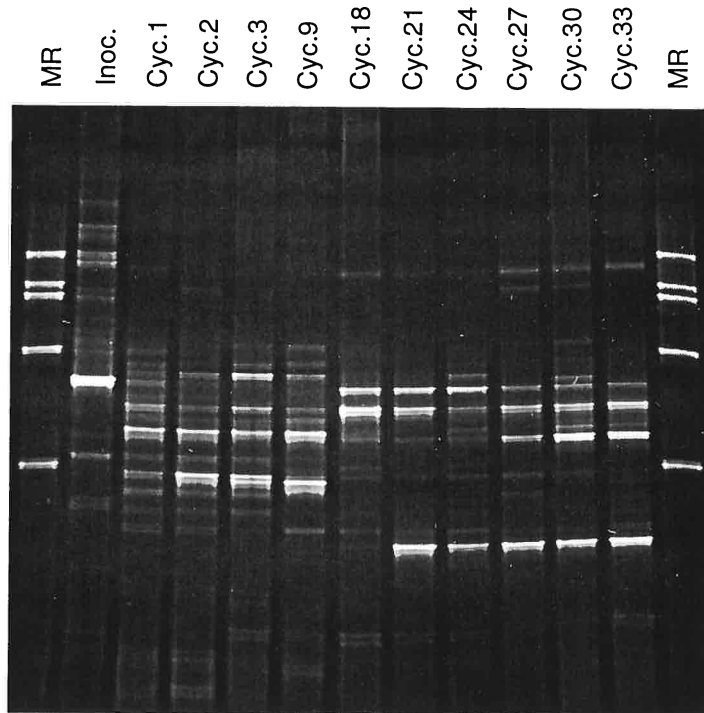


Figure 14. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction de la chitine (F4). MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

L'enrichissement en fonction de la chitine (F4) comme source de carbone s'est déroulé sur une période de 33 cycles. Contrairement aux trois enrichissements présentés jusqu'ici, certaines populations bactériennes de l'inoculum sont restées présentes pour plusieurs cycles au cours de l'enrichissement (figure 14). Une tendance vers une stabilisation de la microflore commençait à s'installer lorsque des problèmes d'aération au quatorzième cycle sont venus perturber l'enrichissement. Cela a fait disparaître certaines populations ou sinon diminuer grandement leur importance. Tout comme cela a aussi permis

l'émergence d'autres populations dominantes. À la fin du dernier cycle d'enrichissement, une douzaine ou une quinzaine de bandes représentant la diversité bactérienne de ce mini-fermenteur sont observées dont une demi-douzaine sont prédominantes.

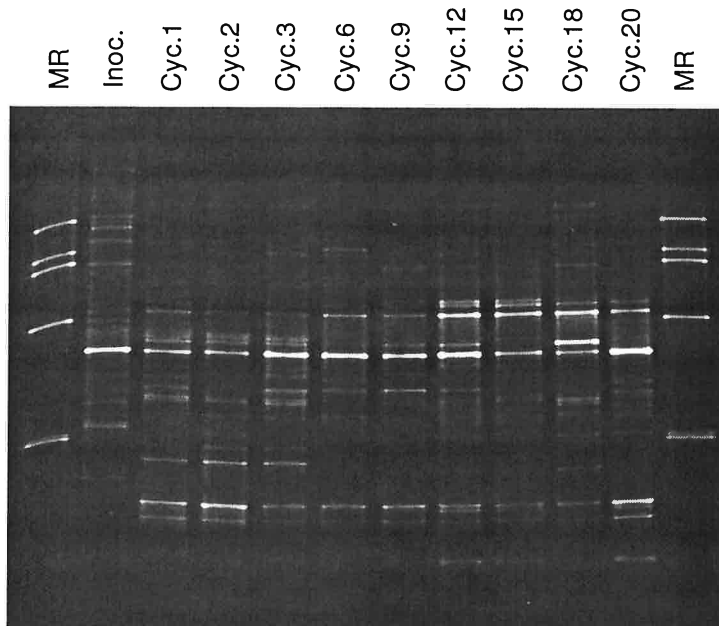


Figure 15. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction de la gélatine (F5). MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

L'enrichissement en fonction de la gélatine (F5) comme source de carbone a duré 20 cycles. Tout comme le F4, certaines populations bactériennes de l'inoculum sont restées bien présentes dans la microflore du F5 et quelques-unes jusqu'à la fin, dont la bande très dominante de l'inoculum (figure 15). Assez rapidement, des populations dominantes se sont établies et leur profil s'est stabilisé. À la fin de l'enrichissement, sept bandes majeures sont visibles et il est possible d'étendre le profil à une quinzaine de bandes en incluant les populations de moindre importance.

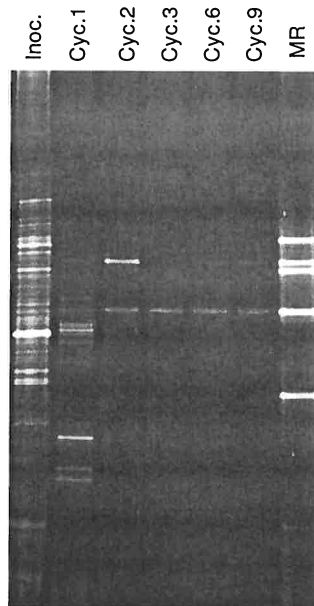


Figure 16. DGGE d'échantillons de quelques cycles de fermentation du F6, enrichissement en fonction d'un mélange d'huiles de canola et de palme. MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

Le mini-fermenteur F6, soit celui dont l'enrichissement devait se faire en fonction du mélange d'huiles de canola et de palme, a été en opération sur une période de 54 cycles. En raison du temps requis pour l'entretien des mini-fermenteurs, les premiers échantillons du F6 n'ont pas été traités avant plusieurs cycles de fermentation. Cela a eu pour effet de ne pas se rendre compte que l'enrichissement était problématique. En effet, comme il est possible de le constater à la figure 16, déjà après le deuxième cycle de fermentation, la diversité bactérienne était quasi inexistante. La principale bande observée à partir du troisième cycle est probablement une contamination au niveau du produit PCR. Ce dernier n'était d'ailleurs pas visible sur gel après amplification et un très grand volume du produit de cette réaction a dû être chargée sur le gel du DGGE pour voir quelque chose. Pour soutenir davantage la thèse de la contamination, cette bande migre à la même hauteur que la bande d'*E. coli* du marqueur de référence. Pour abonder dans le même sens, plusieurs tentatives d'observations microscopiques n'ont pas permis de visualiser la présence d'une biomasse. Cela expliquerait les problèmes d'extraction d'ADN rapportés plus haut. Comme il semblait y avoir une transformation de l'huile dans

le mini-fermenteur (p.ex. formation d'une phase hydrophobe, disparition de la couleur orangée de l'huile de palme), il est possible que de la biomasse était présente, mais en très faible quantité. De multiples essais pour réactiver la culture ont été tentés, sans succès apparents. Cet enrichissement fut donc abandonné.

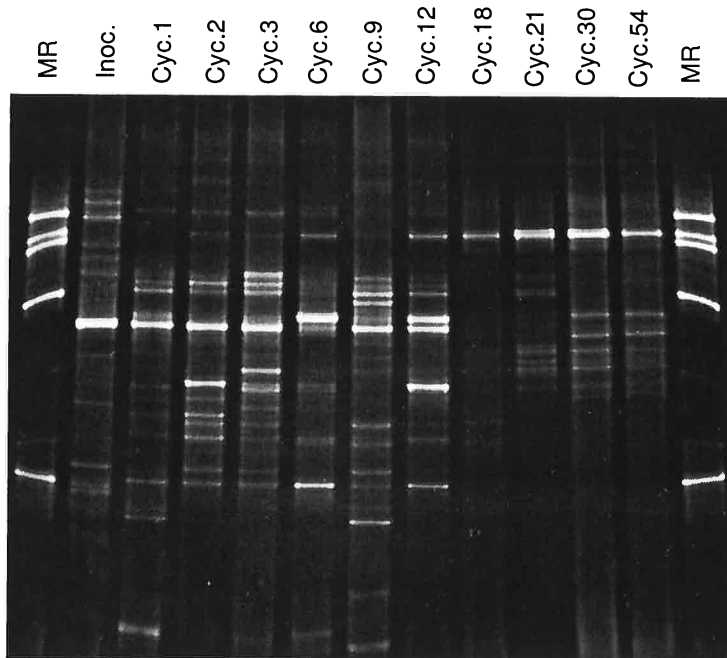


Figure 17. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du mélange d'huiles de canola et de palme dans un milieu de culture supplémenté avec du protéose peptone (F8). MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

L'enrichissement effectué dans le mini-fermenteur F8, soit en fonction d'un mélange d'huiles de palme et de canola et dont le milieu de culture était supplémenté en protéose peptone, s'est déroulé sur 54 cycles. Toutefois, deux cycles supplémentaires de 120 heures ont été réalisés dans le but d'augmenter la quantité de biomasse présente dans le mini-fermenteur. Cette prolongation se justifiait par l'insuccès dans les tentatives d'isoler des bactéries à partir du F8 vers la fin du processus d'enrichissement (voir section 3.3.1.). La diversité de la microflore présente dans le F8 (figure 17) semble avoir été influencée par deux facteurs en particulier. Dans un premier temps, au cycle 17, le type de mini-fermenteur a été changé : il est passé de type à agitation par circulation d'air à agitation

mécanique. Il est à noter que ce changement a aussi été effectué pour le F6. L'objectif était de favoriser un meilleur mélange du milieu de culture dans ces deux mini-fermenteurs. Ce changement semble avoir été plutôt positif sur le déroulement des cycles de fermentation, entre autre, le contrôle du pH se faisait mieux. L'élément qui a probablement eu le plus d'impact sur l'enrichissement est certainement le protéose peptone. Initialement, sa concentration était de 0,5% et au cycle 14, elle a été réduite à 0,1% afin de favoriser une plus grande consommation d'huile. Cependant, une diminution de la quantité de biomasse présente dans le mini-fermenteur a été observée lors de l'échantillonnage à la fin des cycles subséquents. Donc au vingt-et-unième cycle, la concentration de protéose peptone a été augmentée à 0,25%. L'impact de ces variations en protéose peptone peut être visualisé à la figure 17. Au cours des 12 premiers cycles, la diversité bactérienne évoluait beaucoup avec quelques populations qui semblaient bien s'établir dont celle qui prédominait dans l'inoculum de départ. Entre le douzième et le vingt-et-unième cycle, l'effet de la diminution de la quantité de protéose peptone est assez marquant. La diversité avait presque disparu, seules trois ou quatre bandes pouvaient être observées au cycle 18. L'augmentation à 0,25% a permis de rétablir quelque peu la diversité. Entre le trentième et le cinquante-quatrième cycle, la diversité a très peu changé et au final, environ sept bandes caractérisaient la microflore du F8.

En raison des problèmes rencontrés pour les enrichissements des F6 et F8 et comme la finalité du projet de maîtrise était d'isoler des bactéries ayant un haut potentiel lipolytique, deux autres enrichissements ont été réalisés. À la lumière des résultats précédents, le milieu de culture employé était supplémenté avec 0,5% de protéose peptone dans les deux cas. Pour l'enrichissement effectué dans le F1(2), la source de carbone employée était un mélange d'huile d'olive et de Tween 80 alors que pour le F2(2), il s'agissait d'une reprise du F8 (mélange d'huiles de canola et de palme). Les figures 18 et 19 illustrent respectivement l'évolution de la diversité bactérienne pour les mini-fermenteurs F1(2) et F2(2).

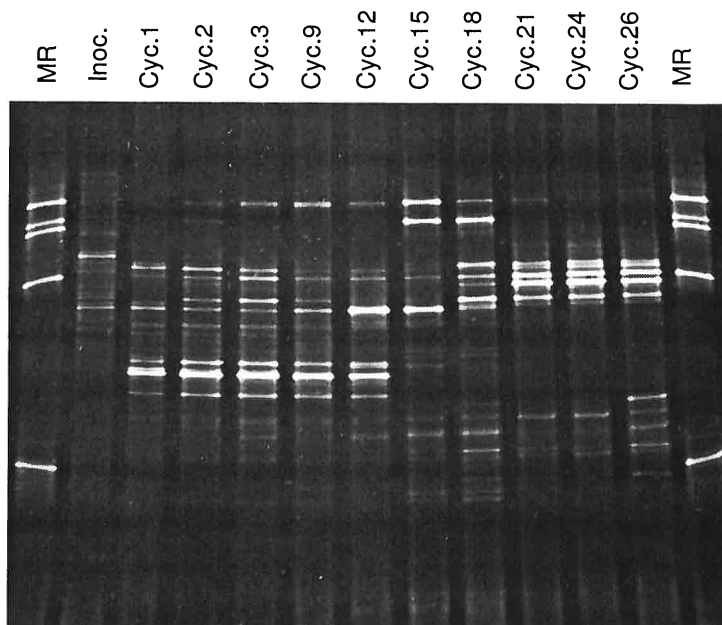


Figure 18. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du mélange d'huile d'olive et de Tween 80 dans un milieu de culture supplémenté en protéose peptone [F1(2)]. MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

Pour le F1(2), la microflore bactérienne s'est rapidement stabilisée : très peu de variations ont été observées entre les troisième et douzième cycles. Cette stabilité a été grandement perturbée au quatorzième cycle, une interruption dans l'alimentation électrique du système a empêché tout contrôle sur une période de trois heures. Avant cet incident, le milieu de culture avait une coloration rosée alors qu'après, il tirait sur le gris-beige. La comparaison des puits des cycles 12 et 15 sur le DGGE (figure 18) démontre bien la perte de populations importantes dans la diversité de la microflore. Des essais de ré-inoculation à partir de la biomasse des cycles précédents n'ont pas permis de rétablir ces populations. Malgré cela, au dernier cycle d'enrichissement (cycle 26), entre une douzaine et une quinzaine de bandes illustrent la diversité bactérienne du F1(2).

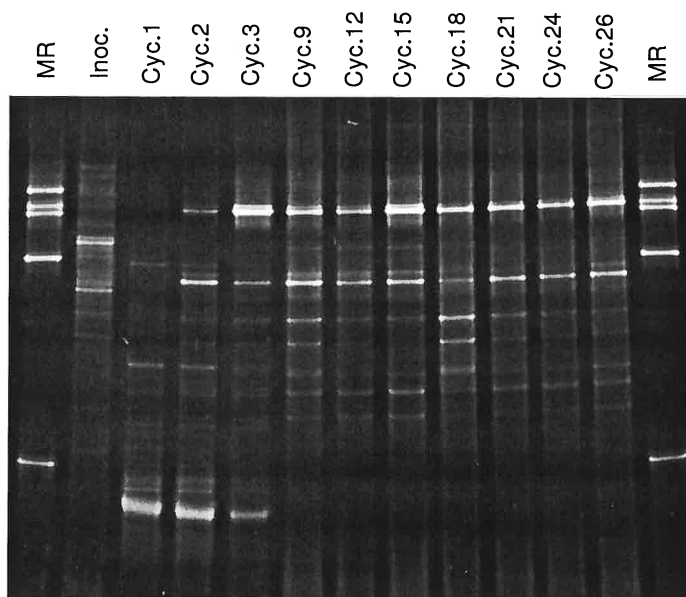


Figure 19. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par DGGE pour l'enrichissement en fonction du mélange d'huiles de canola et de palme dans un milieu de culture supplémenté en protéose peptone [F2(2)]. MR : marqueur de référence; Inoc. : inoculum de départ; Cyc.X : cycle numéro X.

En ce qui a trait au F2(2), la diversité était un peu plus variable au cours des premiers cycles de fermentation. Des populations dominantes au cours des trois premiers cycles (représentées par des bandes de fortes et moyennes intensités au bas du gel de la figure 19) ont perdu de leur importance graduellement. Par la suite, la diversité s'est stabilisée pour ne très peu variée du neuvième au vingt-sixième cycle. À la fin de l'enrichissement, de huit à dix bandes représentaient la diversité bactérienne du F2(2).

En comparant les gels des DGGE des divers enrichissements, il apparaît évident que la source de carbone a eu un impact sur l'évolution de la microflore bactérienne des différents mini-fermenteurs : certaines similitudes et divergences peuvent être notées. Afin d'illustrer plus clairement la diversité finale des enrichissements, la figure 20 A rapporte les profils de migration de la biomasse finale des F1, F2, F3, F4 et F5 alors que la figure 20 B, ceux des F8, F1(2) et F2(2).

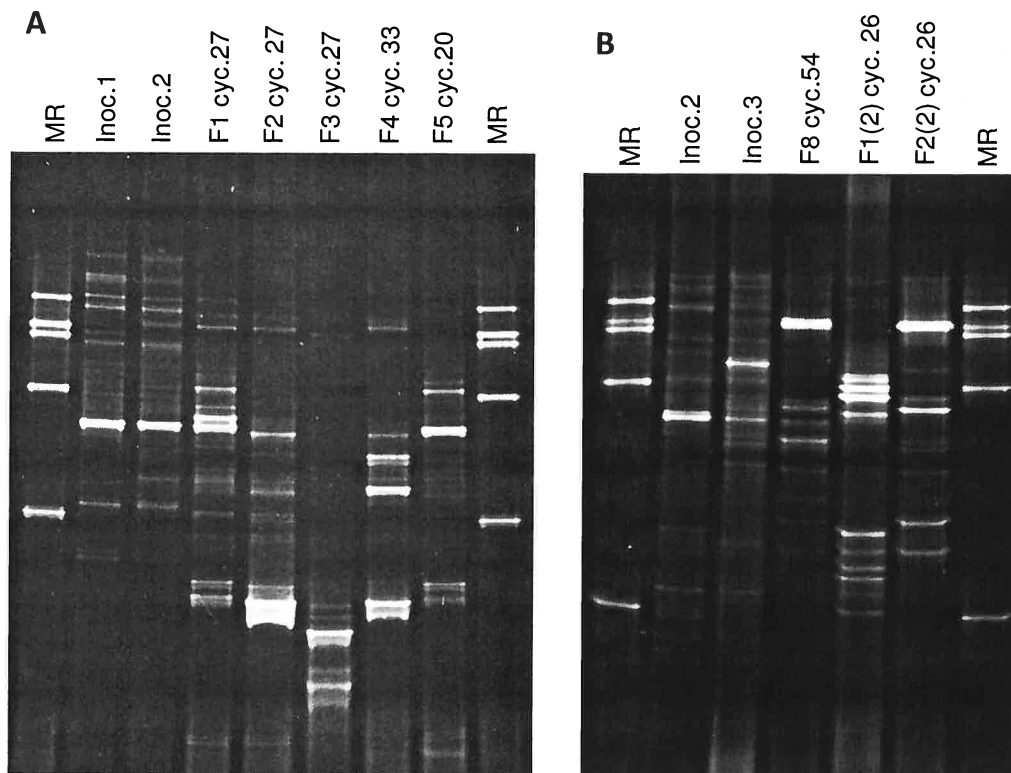


Figure 20. Profils de migration des biomasses finales (A) des F1 (extrait de viande), F2 (son de blé), F3 (lignine), F4 (chitine) et F5 (gélatine) et (B) des F8 (huiles de canola et de palme), F1(2) (huile d'olive et Tween 80) et F2(2) (huiles de canola et de palme). MR : marqueur de référence; Inoc.1 : inoculum de départ des F1, F2, F3 et F4; Inoc.2 : inoculum de départ des F5 et F8; Inoc.3 : inoculum de départ des F1(2) et F2(2); Cyc.X : cycle numéro X.

Dans un premier temps, la figure 20 A illustre bien la nature identique des inoculums 1 et 2 tandis que la figure 20 B illustre la nature commune des inoculums 2 et 3. En effet, les inoculums 1 et 2 sont les mêmes (section 2.1.3.), sauf qu'entre l'inoculation des F1 à F4 et des F5, F6 et F8, l'inoculum a passé trois semaines à 4°C. Cela explique sûrement la différence d'intensité de certaines bandes. Les inoculums 2 et 3 possèdent certaines composantes communes (section 2.1.3.) ce qui explique la présence de bandes similaires. Toutefois, des différences sont observables. Globalement, la diversité bactérienne résultante des divers enrichissements semble bien différente selon la source de carbone employée. Cependant, quelques similarités peuvent être notées. Dans le haut des profils des F1 et F2, il y a deux populations (deux bandes) qui semblent communes. Bien que la

diversité totale soit plus faible dans le F5, elle ressemble à celle du F1. Quelques bandes semblent partagées entre les F2 et F4. Le F3, quant à lui, possède un profil relativement unique. En ce qui concerne les enrichissements en fonction des lipides, le F1(2) se distingue considérablement des F8 et F2(2). Ces derniers, ayant été enrichis avec la même source de carbone, ont une microflore finale très semblable et ce, malgré un inoculum de départ quelque peu différent. La microflore bactérienne du F2(2) (figure 19) est peut-être légèrement supérieure en diversité d'une ou deux bandes à celle du F8 (figure 17).

Pour les enrichissements effectués dans les mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5, l'influence des conditions de pH et de température sur la microflore à l'intérieur d'un même cycle a aussi été évaluée. Cette expérience a été réalisée lors du dernier cycle d'enrichissement de ces mini-fermenteurs alors que la microflore s'est stabilisée : cycle 27 pour F1, F2 et F3, cycle 33 pour F4 et cycle 20 pour F5. Des échantillons ont été prélevés à chaque 12 heures à partir du temps zéro (t_0). À t_0 , le pH et la température étaient de 7,0 et 50°C et ces paramètres montaient graduellement et linéairement jusqu'à 8,5 et 70°C à t_{36} . À t_{72} , le pH et la température étaient revenus à 7,0 et 50°C. Les DGGE pour chaque mini-fermenteur sont rapportés à la figure 21. Globalement, une certaine stabilité au niveau du nombre de bandes caractérisant la diversité bactérienne des mini-fermenteurs est constatée. Toutefois, des variations au niveau de l'intensité des bandes en fonction de la température et du pH sont observées. L'impact de ces paramètres se fait particulièrement sentir à t_{36} où le pH et la température sont à leur valeur la plus élevée. En effet, à t_{36} , l'intensité des bandes présentes et observées depuis t_0 diminue dans la plupart des cas; toutefois l'inverse est aussi observé (figure 21 A et E). L'enrichissement au cours duquel les variations de pH et de température à l'intérieur d'un même cycle ont eu le plus d'influence est certainement le F3. Les populations dominantes à t_{72} ne sont pas les mêmes qu'en début de cycle (figure 21 C).

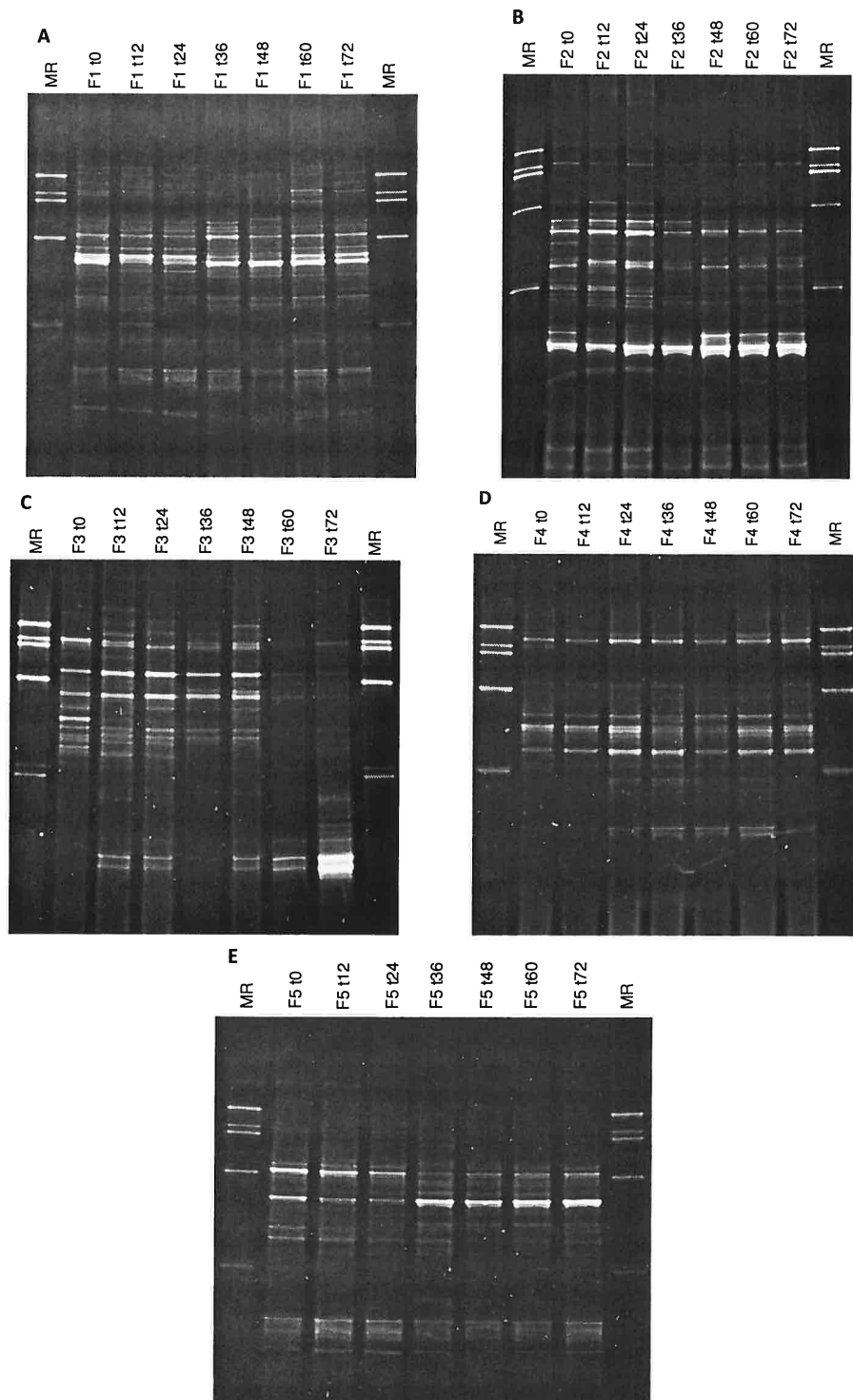


Figure 21. Suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps à l'intérieur d'un même cycle (t0 à t72) pour l'enrichissement des F1 (A), F2 (B), F3 (C), F4 (D) et F5 (E). MR : marqueur de référence.

3.2.3. Évaluation sommaire du potentiel enzymatique des microflores enrichies par des galeries API ZYM.

Le potentiel enzymatique de la biomasse des mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5 a été évalué vis-à-vis 19 activités enzymatiques différentes par des galeries API ZYM incubées à 60°C. Les résultats obtenus sont rapportés au tableau VIII. Ces tests n'ont pas pu être réalisés pour la biomasse provenant des mini-fermenteurs F8, F1(2) et F2(2), car la présence d'huile interférait avec le déroulement des tests.

Tableau VIII. Résultats des galeries API ZYM de la biomasse des mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5. ND : activité non déterminée.

Enzyme testée	Activités détectées				
	F1	F2	F3	F4	F5
	viande	blé	lignine	chitine	gélatine
Phosphatase alcaline					
Estérase (C4)					
Estérase Lipase (C8)					
Lipase (C14)					
Leucine arylamidase					
Valine arylamidase					
Cystine arylamidase					
Trypsine					
α -chymotrypsine					
Phosphatase acide					
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	ND	ND	ND	ND	ND
α -galactosidase					
β -galactosidase					
β -glucuronidase					
α -glucosidase					
β -glucosidase					
N-acétyl- β -glucosaminidase					
α -mannosidase					
α -fucosidase					

Légende: niveau d'activité

Aucune activité:

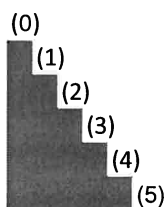
Très faible activité:

Faible activité:

Acitivité moyenne:

Forte activité:

Très forte activité:



Toutes les microflore ont démontré plusieurs activités enzymatiques différentes. La biomasse du F2 semble détenir le plus grand potentiel alors que celles des F3 et F4 ont moins d'activités qui peuvent être classées comme fortes. Les cinq microflore possèdent des activités phosphatase alcaline, phosphatase acide, estérase (C4), estérase-lipase (C8) et lipase (C14). Cette dernière est cependant moins importante que les activités estérase et estérase-lipase. Le F2 démontre l'activité lipase la plus intense des cinq mini-fermenteurs avec une activité d'intensité moyenne. La biomasse du F2 exprime aussi de fortes activités trypsine, α -chymotrypsine et α -glucosidase. Quoique très faible, la microflore du F5 est la seule à démontrer une activité N-acétyl- β -glucosaminidase. L'activité naphthol-AS-BI-phosphohydrolase n'a pu être déterminée pour aucune des microflore en raison de problèmes techniques des galeries pour cette activité : dans les conditions utilisées, les contrôles négatifs réagissaient positivement.

3.3. Isolement et caractérisation de bactéries ayant des activités lipases/estérases

3.3.1. Isolement de bactéries

Comme l'un des objectifs de ce projet de maîtrise est d'isoler et de caractériser des bactéries thermophiles ayant un potentiel lipolytique, les essais d'isolement de bactéries ont été effectués à partir d'aliquotes de biomasse des mini-fermenteurs F6, F8, F1(2) et F2(2). Dans le but de combiner l'isolement de bactéries et le criblage pour une activité lipolytique, les milieux de culture employés contenaient soit de l'huile et de la Rhodamine B ou du Tween 80 et du calcium. Dans un premier temps, les essais ont été faits pour le F6 et le F8. Les premiers tests d'isolement ont été réalisés à partir de géloses dont le pH était de 7,3-7,5 et contenant 3% d'huile d'olive. Plusieurs dilutions (de 10^{-1} à 10^{-6}) de la biomasse ont été étalées sur les géloses de natures différentes et aucune croissance n'a été observée. Quelques problèmes ont été rencontrés : l'absorption des inocula provenant des dilutions sur la gélose était très difficile ou absente et lors de l'incubation à 60°C, il y a eu une forte déshydratation des géloses, ce qui a aussi entraîné la libération de l'huile (présence de gouttelettes en surface des géloses). Il est possible que ces problèmes soient liés à la quantité d'huile présente dans les géloses, cette dernière a donc été réduite à 0,5% dans les milieux de culture. Les tests subséquents ont

permis d'établir les conditions optimales pour l'isolement de bactéries dans le cadre de ce travail (section 2.3.1.). L'isolement de bactéries s'est fait avec des géloses à pH plus basique (8,2), car la croissance semblait meilleure lors des tests effectués. Les géloses étaient incubées (à 60°C) à l'endroit contrairement aux cultures en conditions mésophiles où les géloses sont incubées à l'envers. Cela permettait au milieu de culture de conserver son eau et par le fait même, la croissance des bactéries était meilleure. Pour pallier aux problèmes liés à la présence d'huile dans les milieux (absorption difficile de l'inoculum et libération d'huile), la majorité des isollements ont été réalisés en utilisant du Tween 80 comme substrat.

Dans ces conditions, un total de 34 souches bactériennes ont été isolées, purifiées (par repiquages) et congelées dans du glycérol (voir tableau IX). Six souches proviennent du F8 (biomasses du 06-11-2006 et du 11-11-2006) et les 28 autres du F1(2) (biomasses du 24-10-2006 et du 05-10-2006). Les six souches du F8 ont été isolées sur des géloses BSM additionnées de protéose peptone et des huiles de canola et de palme (BHCP), soient les conditions qui prévalaient dans ce mini-fermenteur. Pour les souches du F1(2), elles ont été isolées sur des géloses R2A additionnées de Tween 80 (RT), TSB-agar additionnées de Tween 80 (TT), BSM additionnées de protéose peptone et de Tween 80 (BT), NB/YE additionnées de Tween 80 (NYT) et TSB-agar additionnées d'huile d'olive (THO). Évidemment, aucune souche n'a été isolée du F6, probablement en raison de l'absence de biomasse. Pour le F2(2), la croissance sur géloses était très faible et les colonies ressemblaient fortement aux isolats du F8 et n'ont pas été retenues.

Tableau IX. Liste des 34 souches isolées, leur regroupement ainsi que leur affiliation. L'identification des souches est basée sur une analyse phylogénique des séquences d'ADNr 16S (voir section 3.3.2.2).

Groupe #	Souches	Identification	Identité
1	F12-RT-011, F12-RT-012, F12-RT-02, F12-TT-031, F12-TT-032	<i>Geobacillus pallidus</i> , (<i>Geo</i>) <i>bacillus</i> sp.	99%
2	F12-RT-03, F12-RT-04, F12-BT-041, F12-BT-042, F12-BT-043	<i>Geobacillus pallidus</i> , (<i>Geo</i>) <i>bacillus</i> sp.	99%
3	F12-RT-051, F12-RT-052, F12-RT-053	<i>Geobacillus toebii</i>	99%
4	F12-RT-06, F12-RT-08, F12-BT-02	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> , <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> , <i>Geobacillus lituanicus</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Geobacillus kaustophilus</i>	99%
5	F12-RT-07	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	99%
6	F12-TT-02, F12-TT-04, F12-NYT-01, F12-BT-01, F12-BT-03	<i>Geobacillus debilis</i> (<i>B. thermozeamaize</i>)	99%
7	F12-RT-091, F12-RT-092, F8-BHCP-011, F8-BHCP-012, F8-BHCP-021, F8-BHCP-022, F8-BHCP-023, F8-BHCP-03	<i>Anoxybacillus beppuensis</i> <i>Anoxybacillus rupiensis</i>	99% 99%
8	F12-RT-101, F12-RT-102	<i>Brevibacillus thermoruber</i> <i>Brevibacillus levickii</i> <i>Brevibacillus borstelensis</i>	99% 97% 96%
9	F12-THO-01	<i>Bacillus</i> sp. Uncultured bacterium	99% ≤98%
10	F12-THO-02	<i>Rhizobiaceae</i> str. M100 <i>Chelatococcus asaccharovorans</i> Uncultured bacterium	99% 96% ≤95%

N.B. Le regroupement des 34 souches isolées a été effectué selon les profils DGGE de la région V3 de leur ADN 16S.

La majorité des souches ont été isolées en conditions aérobies; toutefois, huit souches l'ont été dans des conditions microaérophiles. Il s'agit des souches suivantes : F12-TT-04, F12-NYT-01, F12-RT-09 (091 et 092), F12-RT-10 (101 et 102), F12-THO-02, F12-BT-01, F12-BT-02, F12-BT-03 et F12-BT-04 (041, 042 et 043). Les numéros entre parenthèses représentent des souches qui ont été séparées lors des repiquages. De ces souches, seule la souche F12-THO-02 ne croît qu'exclusivement en conditions microaérophiles. Les autres croissent très faiblement et difficilement en aérobie (F12-BT-01, F12-BT-02, F12-BT-03 et F12-BT-04), semblent tolérer les conditions aérobies (F12-TT-04 et F12-NYT-01) ou croissent aussi bien en aérobie qu'en microaérophilie (F12-RT-09 et F12-RT-10).

Le criblage pour une activité lipolytique en même temps que l'isolement de bactéries n'a pas été très concluant. Peu de bactéries ont été isolées sur les milieux contenant de l'huile et de la Rhodamine B et la technique avec du Tween 80 et du calcium n'a pas donné beaucoup de résultats positifs. Seules les souches F12-BT-02 et F12-BT-04 ont démontré une activité lipolytique en présence de Tween 80 et de calcium (formation d'un précipité blanc dans la gélose autour des colonies). Le criblage a dû être refait ultérieurement (voir section 3.3.3.2.).

3.3.2. Caractérisation moléculaire des souches isolées

3.3.2.1. Profil de migration par DGGE des souches pures

Dans le but d'obtenir le profil de migration des souches isolées, une région du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S de ces souches a été amplifiée par PCR avec les amorces 341f-GC et 534r. Les amplicons obtenus ont été analysés par électrophorèse dans des gels par DGGE. Cela a permis le regroupement des souches en dix groupes selon leurs profils de migration (voir tableau IX). La figure 22 A illustre le profil de migration par DGGE d'un représentant de chaque groupe de souches. Plusieurs informations ressortent de ce gel. Premièrement, plusieurs souches sont caractérisées par la présence de plus d'une bande dans leur profil. Normalement, une souche pure ne comprend qu'une seule bande. Les multiples repiquages à partir de colonies isolées pour chaque souche semblent être garants de la pureté de celles-ci. Il est possible que les souches aient plusieurs copies différentes de leur gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. Fait à noter, les deux bandes caractérisant la souche F12-RT-011 semblent se retrouver dans le profil de migration de la souche F12-RT-03. Dans un deuxième temps, l'échantillon « F1(2) 05-10-2006 cyc.17 » représente l'aliquote de biomasse à partir de laquelle la majorité des souches F12 ont été isolées. Certaines des bandes caractérisant les souches isolées se retrouvent dans le profil de migration de cet échantillon. Toutefois, il apparaît évident que les souches isolées ne représentent pas les espèces dominantes présentes.

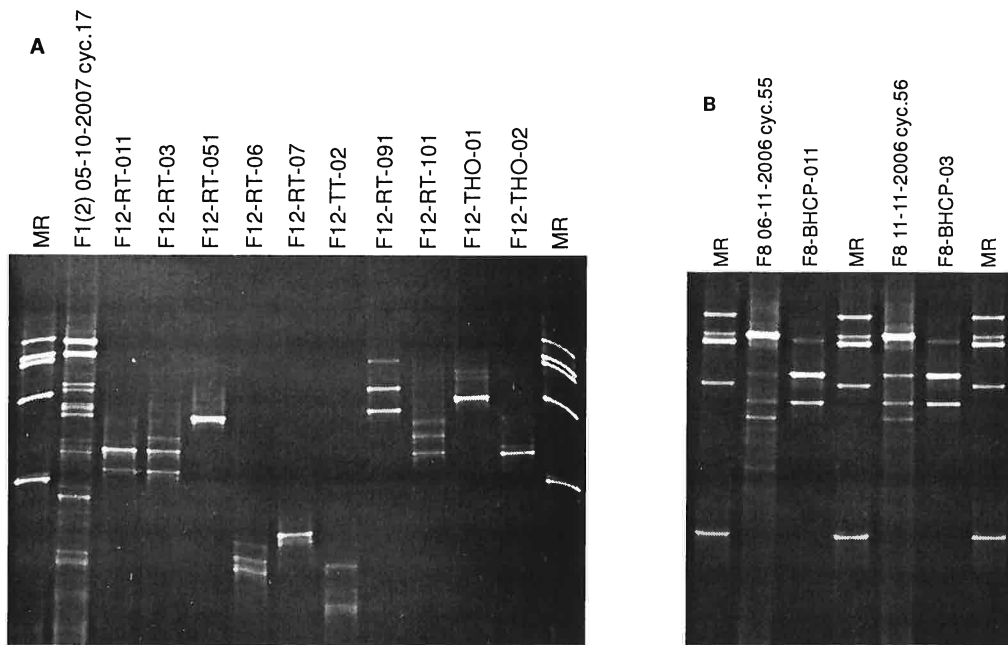


Figure 22. (A) Profil de migration par DGGE d'un représentant de chacun des groupes de souches isolées ainsi que de l'échantillon à partir duquel la majorité des souches F12 ont été isolées (« F1(2) 05-10-2006 cyc.17 »). (B) Profil de migration de deux souches provenant du F8 ainsi que des échantillons à partir desquels elles ont été isolées. Les DGGE sont des gels de 8% d'acrylamide composés d'un gradient dénaturant de 20 à 80% d'urée:formamide. MR : marqueur de référence.

La figure 22 B illustre le profil de migration par DGGE de deux souches provenant du F8. Toutes deux font partie du même groupe de souches, sauf qu'elles n'ont pas été isolées au même moment. Elles possèdent aussi un profil comprenant plusieurs bandes (trois), dont deux se retrouvent dans le profil des échantillons à partir desquels elles ont été isolées. Elles semblent représenter une espèce importante de la microflore présente dans ce mini-fermenteur.

3.3.2.2. Analyse phylogénique du gène codant pour l'ARNr 16S des souches isolées

Le gène codant pour l'ARNr 16S de 21 des souches isolées a été amplifié et séquencé à partir des amorces pA et pH. Ces souches couvraient tous les groupes rapportés au tableau IX. Les résultats obtenus ont permis de reconstituer une séquence nucléotidique consensus « complète » (plus de 1400 pb) pour 12 des souches (Appendice A). Ces

séquences ainsi que les séquences partielles (entre 700 et 800 pb) des autres souches ont été comparées à des bases de données informatiques de séquences nucléotidiques, ce qui a permis d'assigner un genre bactérien et/ou une espèce bactérienne aux différentes souches isolées. Les affiliations les plus probables ont été rapportées au tableau IX. La grande majorité des souches sont affiliées à la famille des *Bacillaceae*, la plupart appartenant au genre *Geobacillus*.

Dans le cas du groupe 4, la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S de ces souches a pu être reconstituée en bonne partie (environ 1400 pb), mais cette séquence comprend une région de 300 à 500 nucléotides du côté 5' du gène dont la qualité est mauvaise, c'est-à-dire qu'il y a beaucoup d'incertitudes concernant la nature des nucléotides identifiés par le séquençage. C'est pour cette raison que la comparaison avec des banques de données a seulement permis d'identifier avec certitude le genre bactérien auquel appartiennent ces souches, soit le genre *Geobacillus*. En effet, les souches F12-RT-06, F12-RT-08 et F12-BT-02 ont 99% d'identité avec les cinq espèces suivantes : *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus lituanicus*, *Geobacillus stearothermophilus* et *Geobacillus kaustophilus*. Quant aux souches du groupe 7, elles ont 99% d'identité avec deux espèces bactériennes non officiellement publiées (*Anoxybacillus rupiensis* et *Anoxybacillus beppuensis*) et 98% d'identité avec une espèce connue (*Geobacillus tepidamans*) très proche du genre *Anoxybacillus*. Les souches F12-RT-101 et F12-RT-102 sont fortement apparentées à *Brevibacillus thermoruber* alors que les souches F12-THO-01 et F12-THO-02 ne semblent pas affiliées avec des espèces connues, du moins, pas d'une manière significative.

Le séquençage a aussi permis de confirmer la composition des groupes. Les souches ont été séparées en dix groupes selon leur profil obtenu par DGGE; toutefois, cette répartition, selon le point de vue, pourrait aussi se faire en neuf groupes. En effet, les souches du groupe 1 (p.ex. F12-RT-011) et celles du groupe 2 (p.ex. F12-RT-03) ont une très forte similarité de séquences entre elles. Les souches de ces deux groupes sont affiliées à plus de 99% à *Geobacillus pallidus*. La seule différence réside au niveau du

nombre de bandes observées après DGGE pour leur ADNr 16S (figure 22 A) : le groupe 1 en comprend deux alors que le groupe 2 en comprend trois.

À partir des résultats du séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches isolées, l'analyse phylogénique des 12 séquences consensus (Appendice A) a permis d'obtenir l'arbre présenté à la figure 23. Cet arbre comprend des représentants pour neuf des dix groupes de souches isolées. Il comprend à la fois des séquences d'espèces n'ayant pas encore été officiellement publiées, comme *Anoxybacillus rupiensis*, *Chelatococcus daeguensis* et *Rhizobiaceae* str. M100, ainsi que des séquences d'espèces validement publiées. Ces dernières ont été sélectionnées selon leur probable affiliation aux souches isolées. Une fois recueillie, les séquences ont été alignées et ce sont des fragments d'environ 1300 pb qui ont servi pour réaliser l'analyse phylogénique. La figure 23 illustre bien l'affiliation des souches isolées et démontre bien le caractère original des souches F12-THO-01 et F12-THO-02. Les espèces connues et publiées les plus rapprochées de ces deux souches sont respectivement *Bacillus thermoamylovorans* (93-94% d'identité) et *Chelatococcus asaccharovorans* (95% d'identité). L'arbre phylogénique de la figure 23 corrobore l'affiliation de la souche F12-THO-01 à la famille des *Bacillaceae* et fort probablement au genre *Bacillus* (en considérant les résultats des banques de données). Pour la souche F12-THO-02, elle fait certainement partie de l'ordre des *Rhizobiales* et fort probablement de la famille des *Beijerinckiaceae*.

En ce qui a trait à la souche F12-RT-051, représentante du groupe 3 des souches isolées (tableau IX), elle faisait partie des souches pour lesquelles le séquençage n'a permis d'obtenir qu'une séquence partielle (environ 800 pb) du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. Afin de ne pas diminuer la qualité et la fiabilité de l'analyse phylogénique des autres souches, la souche F12-RT-051 n'a pas été incluse dans cette analyse. À partir de la séquence partielle (Appendice B) ainsi que de séquences du gène 16S d'espèces connues et affiliées à la souche F12-RT-051, une autre analyse phylogénique a été réalisée. Cela a permis d'obtenir l'arbre illustré à la figure 24. Ce sont des fragments d'environ 800 pb qui ont été utilisés pour conduire cette analyse. Cette dernière est venue confirmer l'affiliation de la souche F12-RT-051 avec *Geobacillus toebii* (99% d'identité).

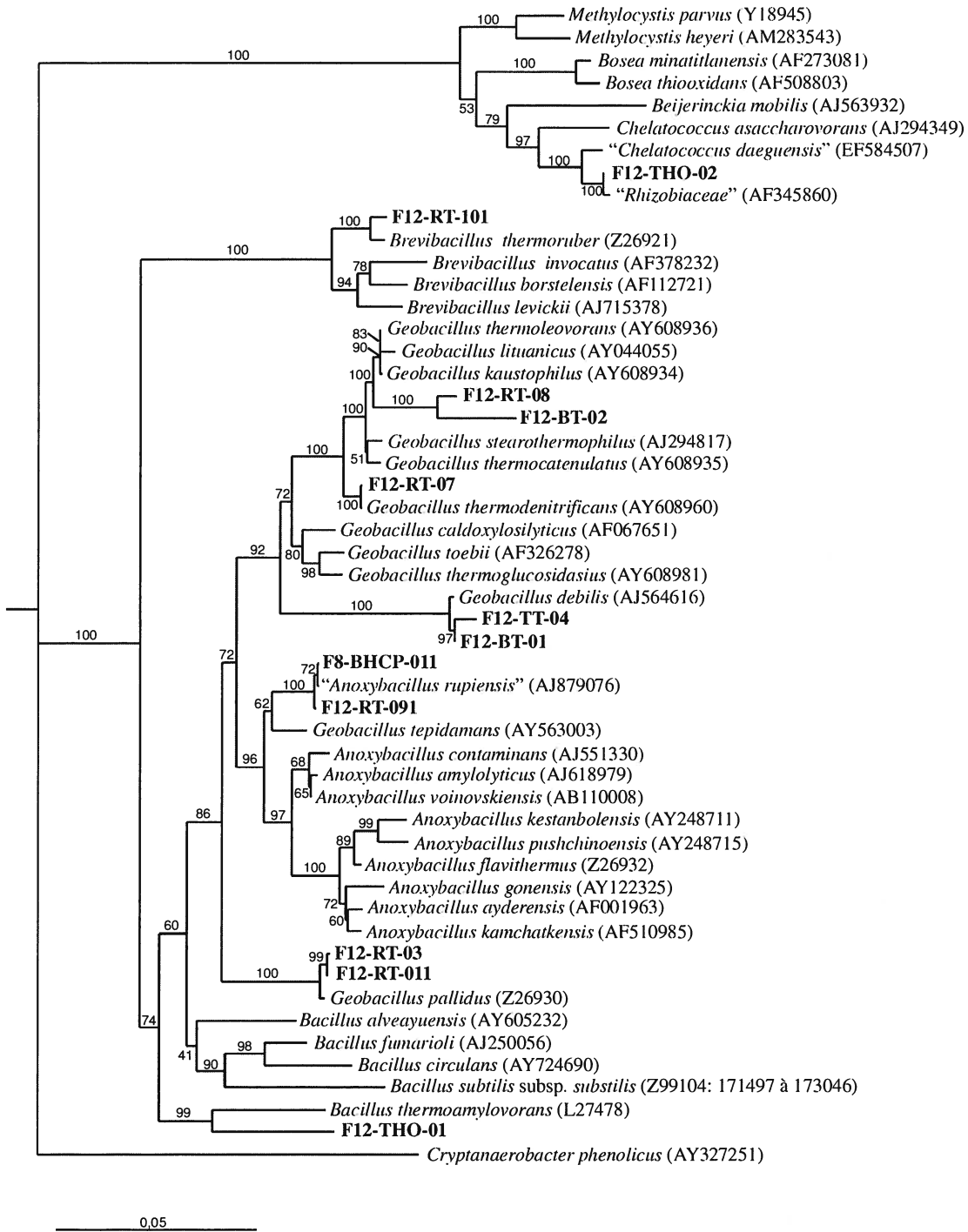


Figure 23. Arbre phylogénique des souches isolées des mini-fermenteurs F1(2) et F8 et des espèces affiliées les plus probables. Voir le tableau IX pour plus de détails sur les souches. Le gène codant pour l'ARNr 16S a servi d'outil de comparaison. Les nombres indiqués aux embranchements de l'arbre représentent le pourcentage de fois où le branchement a été obtenu sur un « bootstrap » (réarrangements de séquences) de 1000.

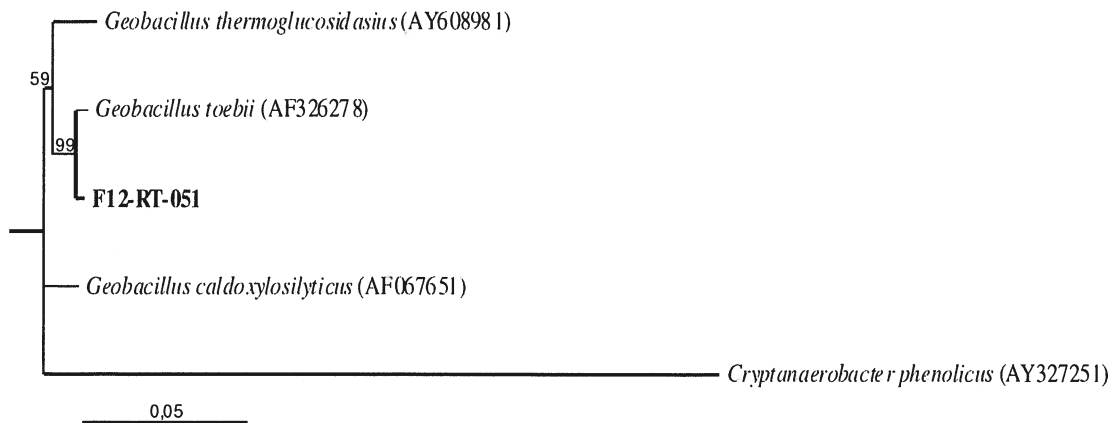


Figure 24. Arbre phylogénique de la souche F12-RT-051 isolée du mini-fermenteur F1(2) et des espèces affiliées les plus probables. Le gène codant pour l'ARNr 16S a servi d'outil de comparaison. Les nombres indiqués aux embranchements de l'arbre représentent le pourcentage de fois où le branchement a été obtenu sur un « bootstrap » (réarrangements de séquences) de 1000.

3.3.3. Évaluation du potentiel enzymatique des souches isolées

3.3.3.1. Galeries API ZYM de 15 souches

Le potentiel enzymatique de 15 des souches isolées a été évalué avec des galeries API ZYM (tableau X). Les souches F12-RT-06, F12-BT-02 et F12-RT-07 sont parmi les souches testées celles qui présentent la plus grande diversité ainsi que la plus forte intensité au niveau des activités enzymatiques testées. Les trois souches possèdent de fortes activités phosphatase alcaline, estérase (C4), estérase-lipase (C8) et α -glucosidase. Les souches F12-RT-06 et F12-BT-02 expriment une activité lipase (C14) moyenne ainsi que de fortes activités phosphatase acide et α -galactosidase. Fait à noter que les souches F12-RT-06 et F12-BT-02 appartiennent au même groupe de souches (groupe 4, tableau VIII), sauf que pour le présent test, la souche F12-BT-02 a été cultivée en conditions microaérophiles alors que F12-RT-06 l'a été en aérobie. Globalement, elles expriment le même potentiel enzymatique : une certaine variation d'intensité apparaît pour quelques activités (p.ex. β -glucosidase, α -chymotrypsine). Toutefois, la différence est plus marquée concernant les activités β -galactosidase et β -glucuronidase où celles-ci ne semblent pas présentes chez F12-BT-02. Cette même différence dans la présence ou

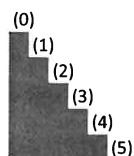
Tableau X. Résultats des galeries API ZYM de 15 souches isolées des mini-fermenteurs F1(2) et F8. La biomasse utilisée pour réaliser les galeries a été obtenue selon le protocole décrit à la section 2.3.3.1.

Enzyme testée	Activités détectées						
	F12-RT-011	F12-RT-03	F12-BT-041	F12-RT-051	F12-RT-06	F12-BT-02	F12-RT-07
Phosphatase alcaline	1/2		1/2				
Estérase (C4)							
Estérase Lipase (C8)		1/2	1/2				
Lipase (C14)			1/2	1/2			
Leucine arylamidase						1/2	
Valine arylamidase							
Cystine arylamidase							1/2
Trypsine				1/2			
α-chymotrypsine					1/2		
Phosphatase acide							
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase			1/2				
α-galactosidase							1/2
β-galactosidase							
β-glucuronidase							1/2
α-glucosidase	1/2						
β-glucosidase						1/2	1/2
N-acétyl-β-glucosaminidase							
α-mannosidase							
α-fucosidase							

Enzyme testée	Activités détectées							
	F12-RT-091	F8-BHCP-011	F8-BHCP-03	F12-RT-101	F12-TT-02	F12-BT-01	F12-THO-01	F12-THO-02
Phosphatase alcaline			1/2					
Estérase (C4)						1/2	1/2	
Estérase Lipase (C8)	1/2		1/2					1/2
Lipase (C14)		1/2	1/2		1/2	1/2		1/2
Leucine arylamidase	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	
Valine arylamidase		1/2	1/2					1/2
Cystine arylamidase								
Trypsine		1/2	1/2		1/2			
α-chymotrypsine								
Phosphatase acide								
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase								
α-galactosidase								
β-galactosidase	1/2				1/2	1/2		
β-glucuronidase		1/2	1/2				1/2	
α-glucosidase			1/2	1/2	1/2			1/2
β-glucosidase		1/2	1/2			1/2		
N-acétyl-β-glucosaminidase								
α-mannosidase								
α-fucosidase								

Légende

Aucune activité:
 Très faible activité:
 Faible activité:
 Activité moyenne:
 Forte activité:
 Très forte activité:



l'absence d'activité enzymatique entre deux souches du même groupe selon leur condition de culture (aération) est aussi observée pour les souches des groupes 2 et 6. Les souches F12-RT-03 et F12-BT-041 font partie du même groupe (groupe 2) et pourtant, le potentiel enzymatique exprimé par F12-BT-041, souche cultivée en microaérobie, est beaucoup plus faible que celui de F12-RT-03, souche cultivée en aérobie. La différence est moins marquée pour les souches F12-TT-02 et F12-BT-01 du groupe 6, mais elle est tout de même notable.

Pour les souches F12-RT-011 et F12-RT-03, deux souches très semblables à la différence que F12-RT-03 possède une bande de plus sur DGGE par rapport à F12-RT-011, les résultats des galeries API ZYM rapportent un profil presque identique. Les souches du groupe 7 (F12-RT-091, F8-BHCP-011 et F8-BHCP-03), bien qu'elles n'aient pas été isolées des mêmes mini-fermenteurs, ont des activités enzymatiques très similaires. Quoique très faible, les souches F12-RT-091 et F12-TT-02 sont les seules à exprimer une activité N-acétyl- β -glucosaminidase.

3.3.3.2. Criblage pour une activité lipolytique sur milieux solides

Afin d'évaluer plus en profondeur le potentiel lipolytique des 15 souches testées sur les galeries API ZYM, ces dernières ont été criblées selon deux méthodes : la méthode à la Rhodamine B (avec huiles) et la méthode de précipitation au calcium (avec Tween 80; formation d'un précipité blanc). Plusieurs milieux de culture différents ont été employés (voir section 2.3.3.2.). La figure 25, à titre d'exemple, illustre un résultat positif avec la méthode à la Rhodamine B pour la souche F12-THO-01. Un léger signal positif est aussi détecté pour la souche F12-TT-02. Le tableau XI rapporte les résultats obtenus avec les deux méthodes de criblage ainsi que le récapitulatif des résultats des galeries API ZYM par rapport aux activités lipolytiques.

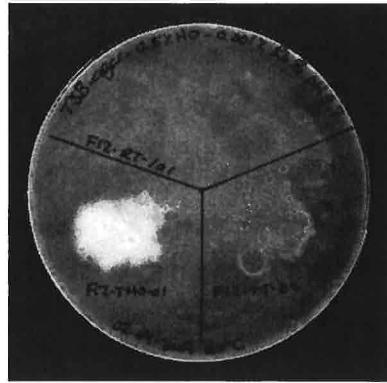


Figure 25. Photo (UV, $\lambda = 365 \text{ nm}$) des souches F12-THO-01, F12-TT-02 et F12-RT-101. Elles ont été cultivées sur un milieu TSB-agar pH 8,2 comprenant 0,5% d'huile d'olive et 0,001% Rhodamine B. La gélose a été incubée 24 heures à 60°C.

Tableau XI. Résultats du criblage pour une activité lipolytique chez 15 des souches isolées.

Isolats	Résultats galeries apiZYM			Méthodes de criblage	
	Estérase (C4)	Estérase Lipase (C8)	Lipase (C14)	Tween 80 - CaCl ₂ .2H ₂ O	Huile d'olive - Rhodamine B
F12-RT-011	5	3	1	-	+
F12-RT-03	5	3 1/2	1	-	+
F12-BT-041	2	1 1/2	1/2	+	+
F12-RT-051	4	3	1/2	-	+
F12-RT-06	5	5	3	-	+
F12-BT-02	5	5	3	-	+
F12-RT-07	5	5	1	-	+
F12-RT-091	5	4 1/2	2	-	+
F8-BHCP-011	4	4	1 1/2	-	+
F8-BHCP-03	4	3 1/2	1 1/2	-	+
F12-RT-101	4	4	3	-	-
F12-TT-02	3	1	1/2	-	+
F12-BT-01	3 1/2	2	1/2	-	+
F12-THO-01	3 1/2	1	0	-	+
F12-THO-02	3	2 1/2	1 1/2	-	+

Tel qu'observé au tableau XI, la majorité des souches testées ne démontrent pas d'activité lipolytique avec la méthode de précipitation au calcium alors que c'est tout le contraire avec la méthode à la Rhodamine B. En effet, seule la souche F12-BT-041 a démontré une activité avec la méthode de précipitation. Ce qui est étonnant, c'est que la souche F12-

BT-02 n'ait pas démontré d'activité avec cette méthode, car lors de son isolement, elle était la seule avec F12-BT-04 (cette désignation inclue F12-BT-041, 042 et 043) à avoir exprimée une telle caractéristique (section 3.3.1.).

La souche F12-RT-101 est la seule souche dont aucune activité lipolytique n'a été détectée par l'une ou l'autre des méthodes de criblage sur milieux solides. Toutefois, les résultats des galeries API-ZYM suggéraient que des activités estérase et estérase-lipase fortes ainsi qu'une activité lipase moyenne avaient été observées.

Globalement, les souches semblent posséder un très bon potentiel estérase et estérase-lipase; toutefois, en se fiant aux galeries API ZYM, l'activité lipase semble moins présente. Sur API ZYM, les souches F12-RT-06, F12-BT-02 et F12-RT-101 avaient la plus forte activité lipase avec une activité d'intensité moyenne (3). Comme les tests sur milieux solides avec Rhodamine B emploient de l'huile d'olive, un substrat pour lipase composé principalement de C18 (versus C14 dans les galeries API ZYM), toutes les souches isolées et testées, sauf F12-RT-101, semblent démontrer une activité lipase.

3.4. Caractérisation préliminaire des activités lipolytiques de bactéries sélectionnées

Comme il a été mentionné précédemment à la section 2.4., les souches F12-THO-01 et F12-RT-091 ont été sélectionnées pour une brève caractérisation de leur activité lipolytique. Les travaux ont d'abord été effectués avec la souche F12-THO-01 pour ensuite être entrepris avec F12-RT-091. Une attention particulière a été mise sur la recherche et la caractérisation d'une activité lipase chez ces deux souches.

3.4.1. Cultures en fioles pour obtenir du surnageant actif

Lors de la première série de cultures avec la souche F12-THO-01, deux types de substrats ont été utilisés pour tenter d'induire la production de lipase : un mélange d'huile d'olive et de Tween 80 et du Tween 80 seul. En parallèle d'une des fioles contenant de l'huile, une fiole identique a été préparée sans toutefois qu'elle soit inoculée. Les deux fioles ont

été incubées et assez rapidement, dans la fiole non inoculée, une modification de l'huile a été observée. La densité optique du milieu augmentait. Cela rendait impossible de suivre la croissance bactérienne par la mesure de la densité optique. Ce phénomène de modification n'était pas observé avec le Tween 80 comme seul substrat inducteur. C'est pour cette raison qu'il a été utilisé pour tous les autres essais de cultures.

3.4.2. Tests d'activités lipolytiques à partir des surnageants de cultures

3.4.2.1. Méthode à la Rhodamine B en présence d'huile d'olive

Comme il a été mentionné à la section 2.4.2.1., les tests d'activités lipolytiques sur milieux solides ont été effectués pour la première et la deuxième série de cultures de la souche F12-THO-01. Lors de ces tests, de l'huile d'olive a été utilisée comme substrat afin de mettre plus en évidence l'activité lipase de la souche.

Pour la première série de cultures, des incubations de plus de 40 heures ont été effectuées. L'activité des surnageants sur les géloses semblaient indiquer que le maximum d'activité était atteint après une vingtaine d'heures. C'est pour cette raison que les cultures subséquentes, autant pour F12-THO-01 et F12-RT-091, n'ont pas dépassé les 24 heures d'incubation. Lors de ces essais, de l'huile d'olive avait été utilisée pour induire la production de lipases. Sur les géloses, l'activité des surnageants provenant de ces fioles ne semblait pas supérieure à celle des surnageants provenant de fioles où du Tween 80 a été utilisé comme inducteur. Cette dernière paraissait même légèrement supérieure dans quelques cas. Cela est venu supporter la décision d'utiliser uniquement du Tween 80 comme substrat inducteur.

Dans la deuxième série de cultures de la souche F12-THO-01, les fioles ont été incubées pour une période de 24 heures. Les surnageants recueillis après un peu plus de cinq heures et 24 heures ont été déposés sur des géloses contenant de la Rhodamine B et de l'huile d'olive. Des contrôles positif et négatif y étaient aussi déposés. Deux conditions de pH (7,4 et 8,1) et de température (37°C et 60°C) ont été évaluées. La figure 26 illustre les résultats obtenus. Plusieurs informations ressortent de cette expérience. Premièrement,

l'activité est détectée, ce qui confirme son caractère extracellulaire. Une activité est détectée autant à 37°C qu'à 60°C, suggérant ses propriétés thermophiles. Finalement, l'activité semble supérieure à pH 8,1 qu'à pH 7,4 (les halos fluorescents sont plus étendus).

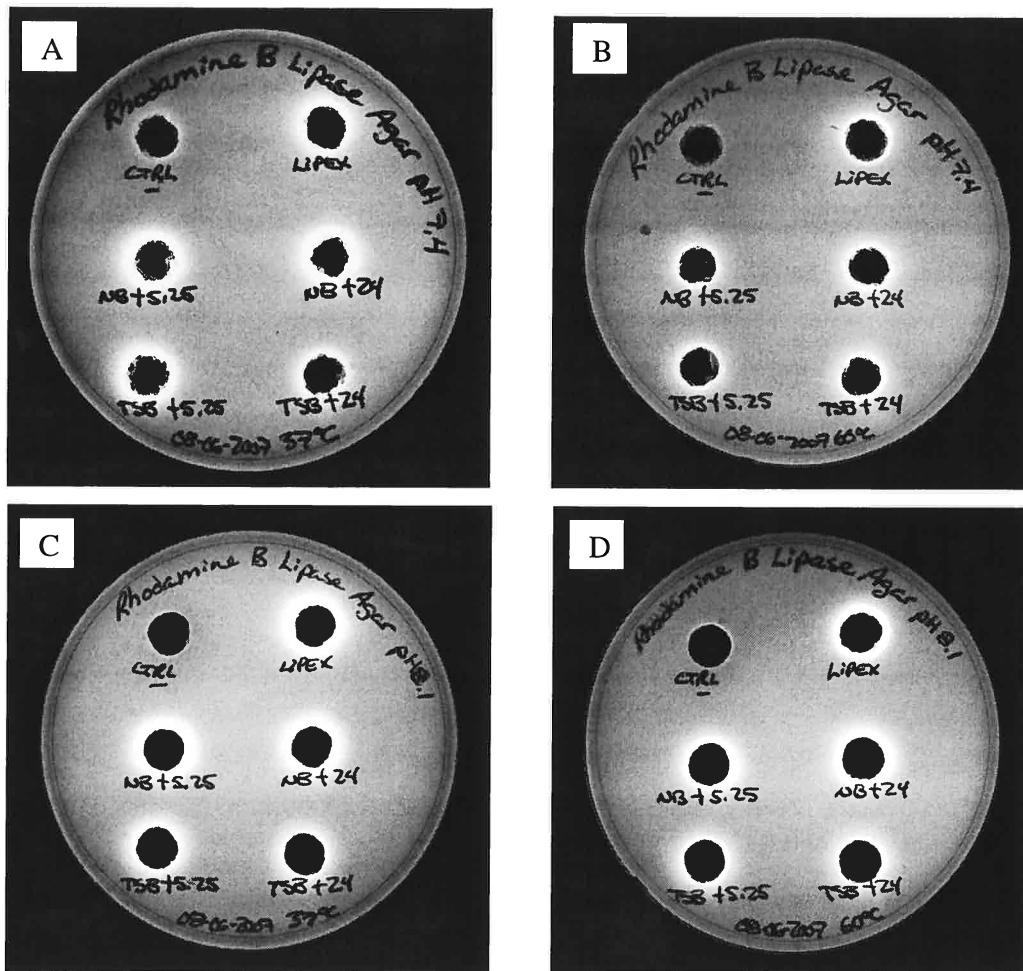


Figure 26. Photos (UV, $\lambda = 365 \text{ nm}$) des surnageants de culture de la souche F12-THO-01 déposés dans des trous percés dans des géloses Rhodamine B Lipase Agar. Les surnageants ont été recueillis après t5, t25 et t24 heures d'incubation de la souche à 60°C. Les géloses avaient un pH de 7,4 (A et B) ou de 8,1 (C et D) et ont été incubées pour la nuit à 37°C (A et C) ou 60°C (B et D). Contrôle négatif : milieu de culture stérile; Contrôle positif : LIPEX diluée par un facteur 8000.

3.4.2.2. Méthode par spectrophotométrie

Dans un premier temps, nous avons déterminé la longueur d'onde donnant le maximum d'absorption du p-nitrophénol (pNP) ainsi que son coefficient d'extinction molaire (ϵ) dans les conditions où les tests ont été effectués.

3.4.2.2.1. Détermination du maximum d'absorption du pNP

La longueur d'onde permettant l'absorption maximale du pNP a été déterminée à partir d'une solution 0,11 mM de pNP dans du tampon Tris 50 mM pH 7,5, 0,5% Triton X-100 et 0,05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La solution a été incubée à 37°C et soumise à un balayage de longueurs d'onde entre 350 et 450 nm. L'absorption maximale (λ_{max}) a été observée aux environs de 405 nm (figure 27). Cette dernière valeur a été utilisée pour tous les autres tests.

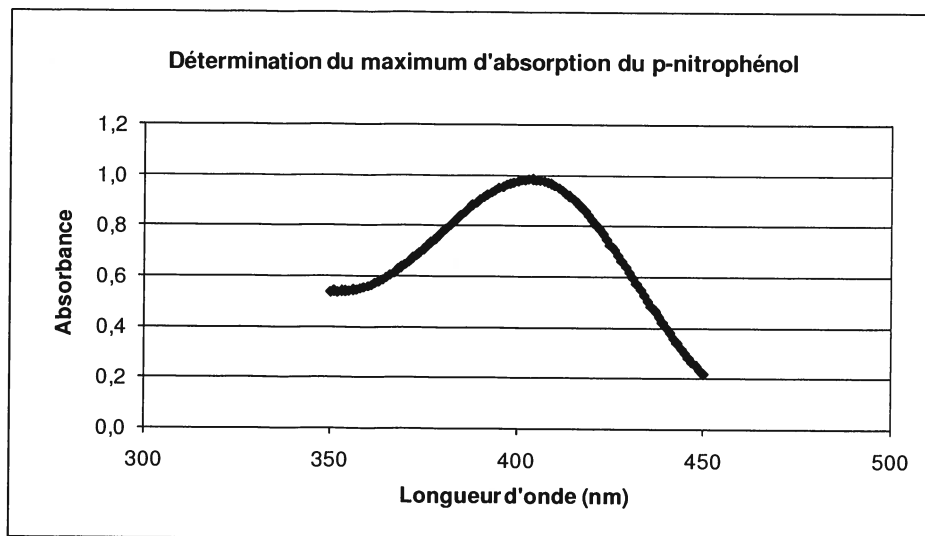


Figure 27. Absorbance du p-nitrophénol en fonction de la longueur d'onde. Une solution 0,11 mM pNP dans du tampon Tris 50 mM pH 7,5, 0,5% Triton X-100 et 0,05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a été utilisée.

3.4.2.2.2. Courbes d'étalonnage du pNP

Une courbe d'étalonnage a été réalisée pour toutes les conditions dans lesquelles les tests enzymatiques ont été effectués. À partir de l'équation de la droite de ces courbes et de la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$), les différentes valeurs du coefficient d'extinction molaire (ϵ) ont été déterminées. Le tableau XII rapporte ces valeurs avec leurs coefficients de corrélation. Chaque courbe a été effectuée en triplicatas.

Tableau XII. Coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol pour chacune des conditions expérimentales utilisées.

Conditions expérimentales (pH, T°, Triton X-100): Tris 50 mM, CaCl ₂ .2H ₂ O 0,05%	Coefficient d'extinction molaire (mM ⁻¹ cm ⁻¹) (ϵ)	Coeff. Corr. (R ²)
pH 7,5 37°C Triton 0%	11,3	0,979
pH 7,5 37°C Triton 0,05%	11,6	0,981
pH 7,5 37°C Triton 0,5%	8,6	0,982
pH 8,5 37°C Triton 0%	15,6	0,974
pH 8,5 37°C Triton 0,05%	17,3	0,993
pH 8,5 37°C Triton 0,5%	17,9	0,988
pH 8,5 55°C Triton 0%	16,2	0,999

3.4.2.2.3. Activité enzymatique de la souche F12-THO-01

À partir des surnageants de culture des première et deuxième séries de cultures, des tests d'activité enzymatique par spectrophotométrie en employant du p-nitrophényl palmitate (pNPP) ont été effectués. Aucune activité enzymatique (hydrolyse) n'a été détectée. Dans toutes les conditions testées, seul un léger jaunissement du tampon réactionnel était observé.

Avec les surnageants de la troisième série de cultures, d'autres essais ont été tentés : en plus d'utiliser à nouveau le pNPP comme substrat, des tests ont été effectués avec du pNP-stéarate et du pNP-laurate. Les résultats étaient non concluants : le même léger jaunissement était observé. L'hypothèse de la présence d'éléments inhibiteurs dans le tampon réactionnel a été émise. Comme il est peu probable que le calcium soit le problème, des essais ont été tentés avec les mêmes substrats, mais avec moins de Triton

X-100 (0,05% et 0% au lieu de 0,5%). De nouveau, aucune activité n'était obtenue. Les éléments inhibiteurs se retrouvaient peut-être dans le surnageant, ce qui aurait été peu probable considérant l'activité sur gélose (section 3.4.2.1.). Pour tout de même tester cette hypothèse, un essai a été fait avec de la LIPEX, une lipase commerciale, diluée dans du surnageant de culture et en utilisant le pNPP comme substrat. La figure 28 illustre les résultats obtenus.

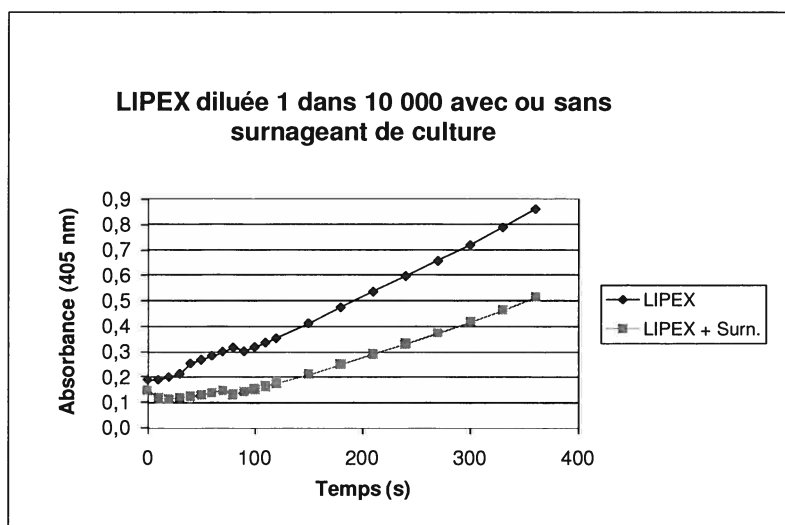


Figure 28. Activité enzymatique vis-à-vis du pNPP de la LIPEX avec ou sans surnageant de culture de la souche F12-THO-01. Le surnageant provient d'une culture de 24 heures dans du milieu NB/YE contenant du Tween 80. Les conditions réactionnelles sont : tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 0,5% Triton X-100 et 0,05% CaCl₂.2H₂O, 37°C. La LIPEX a été diluée par un facteur de 10 000 dans le surnageant de culture ou dans de l'eau milli-Q.

À partir du calcul de la pente maximale et du coefficient d'extinction molaire approprié, l'activité de la LIPEX seule a été définie à 14,65 nmol/min-mL alors qu'en présence de surnageant, elle était de 9,91 nmol/min-mL. Cela correspond à une diminution d'activité d'un peu plus de 30%, mais est-ce suffisant pour qu'aucune activité lipase ne soit détectée dans les surnageants? Des interrogations ont été soulevées concernant la présence d'une activité lipase dans les surnageants. Et s'il s'agissait plutôt d'une activité estérase.

Des essais, avec différentes concentrations de Triton X-100, ont été effectués avec du pNP-butyrate (pNPB) comme substrat. La figure 29 illustre ces résultats. Une activité estérase a bel et bien été détectée. Pour des concentrations de 0%, 0,05% et 0,5% de Triton X-100 dans le tampon réactionnel, l'activité a été définie respectivement à 3,30, 2,62 et 2,21 nmol/min-mL. L'effet inhibiteur du Triton X-100 a aussi été observé.

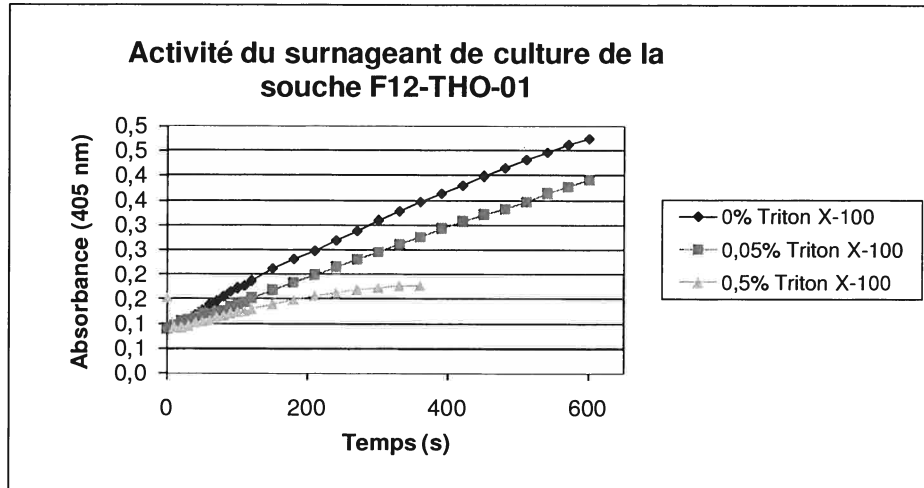


Figure 29. Activité enzymatique vis-à-vis de pNPB du surnageant de culture de la souche F12-THO-01. Le surnageant provient d'une culture de cinq heures dans du milieu NB/YE contenant du Tween 80. Les conditions réactionnelles sont : tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 0,05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 37°C. Trois concentrations de Triton X-100 ont été testées.

Comme l'activité estérase semblait faible, les surnageants ont été concentrés avec des mini-colonnes (voir section 2.4.1.3.) avant de faire d'autres tests enzymatiques. Les tableaux XIII, XIV et XV rapportent respectivement les résultats obtenus pour le suivi des fioles selon le temps d'incubation, l'effet du Triton X-100 et l'effet du pH.

Tableau XIII. Suivi des cultures en fioles de la souche F12-THO-01 dans le temps.

Milieux de culture	Temps (h)	DO (600 nm)	Activité* (nmol/min-mL)
NBYE	5	0,217	2,33
TSB		2,36	3,52
NBYE	24	1,52	3,15
TSB		1,86	4,89

* L'activité des surnageants de culture est déterminée par hydrolyse de pNP-butyrates dans un tampon Tris 50 mM pH 7,5 + 0,05% CaCl₂·2H₂O sans Triton X-100 à 37 °C.

Tableau XIV. Effet du Triton X-100 sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-THO-01. Le surnageant provient d'une culture de 24 heures dans du milieu TSB contenant du Tween 80.

% Triton X-100	Activité* (nmol/min-mL)
0,5	2,31
0,05	3,26
0	4,89

* L'activité des surnageants de culture est déterminée par hydrolyse de pNP-butyrates dans un tampon Tris 50 mM pH 7,5 + 0,05% CaCl₂·2H₂O à 37 °C.

Tableau XV. Effet du pH sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-THO-01. Le surnageant provient d'une culture de 24 heures dans du milieu TSB contenant du Tween 80.

pH	Activité* (nmol/min-mL)
7,5	4,89
8,5	14,61

* L'activité des surnageants de culture est déterminée par hydrolyse de pNP-butyrates dans un tampon Tris 50 mM + 0,05% CaCl₂·2H₂O sans Triton X-100 à 37 °C.

De ces résultats, nous observons que le fait d'avoir concentré les surnageants ne semble pas avoir augmenté l'activité. Ainsi, l'activité du surnageant provenant du milieu NB/YE après cinq heures d'incubation en fonction du pNPB dans un tampon à pH 7,5 sans Triton avant concentration était de 3,30 nmol/min-mL alors qu'après concentration, elle était de 2,33 nmol/min-mL. Avec les deux milieux de culture, l'activité est plus forte après 24 heures d'incubation qu'après cinq heures (tableau XIII). L'activité est aussi plus forte dans les surnageants provenant des cultures faites dans du milieu TSB. Le Triton X-100 a toujours un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique où l'on observe une baisse de 50% de l'activité en présence d'une concentration de 0,5% (tableau XIV). L'activité est près

de trois fois supérieure à pH 8,5 qu'à pH 7,5 (tableau XV). Finalement, avec les surnageants concentrés, des tests ont été refaits avec des substrats à plus longues chaînes (pNPP et pNPS) et aucune activité lipase n'a été détectée.

3.4.2.2.4. Activité enzymatique de la souche F12-RT-091

Dans la recherche d'une activité lipase, nos efforts se sont dirigés vers une autre souche, soit la souche F12-RT-091. Des essais de production ont été réalisés avec les mêmes milieux de culture, mais aussi avec un milieu R2A sans agar. Aucune activité lipase (pNPP, pNPS et pNPL) ni estérase (pNPB) n'a été détectée à partir des surnageants de culture provenant du milieu R2A. Pour les deux autres milieux (TSB et NB/YE), aucune activité d'hydrolyse n'a été détectée avec les substrats à longues chaînes (pNPP, pNPS et pNPL): seul un léger jaunissement était observé. Toutefois, une activité estérase (pNPB) a été détectée dans les deux types de surnageants. Les tableaux XVI, XVII, XVIII et XIX rapportent respectivement les résultats obtenus pour le suivi de l'activité selon le temps d'incubation des fioles, ainsi que l'effet du Triton X-100, du pH et de la température sur l'activité.

Tableau XVI. Suivi des cultures en fioles de la souche F12-RT-091 dans le temps.

Milieux de culture	Temps (h)	DO (600 nm)	Activité* (nmol/min-mL)
NBYE	4	2,74	4,71
TSB		0,819	8,30
NBYE	8	2,26	6,42
TSB		2,53	9,31
NBYE	24	0,538	7,22
TSB		1,25	11,30

* L'activité des surnageants de culture est déterminée par hydrolyse de pNP-butyrates dans un tampon Tris 50 mM pH 8,5 + 0,05% CaCl₂·2H₂O sans Triton X-100 à 37 °C.

Tableau XVII. Effet du Triton X-100 sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-RT-091. Le surnageant provient d'une culture de 24 heures dans du milieu TSB contenant du Tween 80.

% Triton X-100	Activité* (nmol/min-mL)
0,5	7,38
0,05	9,91
0	11,30

* L'activité des surnageants de culture est déterminée par hydrolyse de pNP-butyrates dans un tampon Tris 50 mM pH 8,5 + 0,05% CaCl₂·2H₂O à 37 °C.

Tableau XVIII. Effet du pH sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-RT-091. Le surnageant provient d'une culture de huit heures dans du milieu TSB contenant du Tween 80.

pH	Activité* (nmol/min-mL)
7,5	3,10
8,5	9,31

* L'activité des surnageants de culture est déterminée par hydrolyse de pNP-butyrates dans un tampon Tris 50 mM + 0,05% CaCl₂·2H₂O sans Triton X-100 à 37 °C.

Tableau XIX. Effet de la température sur l'activité d'hydrolyse du pNP-butyrates du surnageant de culture de F12-RT-091. Le surnageant provient d'une culture de 24 heures dans du milieu TSB contenant du Tween 80.

Température (°C)	Activité* (nmol/min-mL)
37	11,30
55	20,43

* L'activité des surnageants de culture est déterminée par hydrolyse de pNP-butyrates dans un tampon Tris 50 mM pH 8,5 + 0,05% CaCl₂·2H₂O sans Triton X-100.

Comme dans le cas de la souche F12-THO-01, l'activité estérases de la souche F12-RT-091 augmente avec le temps d'incubation et ce pour les deux milieux de culture (tableau XVI). L'activité est plus élevée dans les surnageants provenant des cultures faites dans du milieu TSB. Le Triton X-100 inhibe aussi l'activité estérases de la souche F12-RT-091 où une baisse de 35% de son activité est observée en présence de 0,5% Triton X-100 (tableau XVII). L'activité est 3 fois plus élevée à pH 8,5 qu'à pH 7,5 (tableau XVIII) et elle est définitivement thermophile avec une augmentation de son activité de presque deux fois à 55°C comparativement à 37°C (tableau XIX).

Chapitre 4. DISCUSSION

4.1. Enrichissement et suivi de neuf microflores bactériennes aérobies thermophiles

4.1.1. Impact de la source de carbone sur la diversité bactérienne des enrichissements

Les divers enrichissements ont été effectués en fonction de différentes sources de carbone dans le but de stimuler l'implantation d'une biomasse spécifique et spécialisée dans la dégradation de chaque substrat. Globalement, la diversité bactérienne résultante des enrichissements semble bel et bien différente selon la source de carbone utilisée. Toutefois, certaines similitudes sont observées entre les profils obtenus par DGGE des populations présentes dans les mini-fermenteurs. Un lien peut même être soulevé entre ces similitudes et la nature des substrats employés. Par exemple, il y a des éléments communs entre l'extrait de viande utilisé pour l'enrichissement du F1 et la gélatine du F5, de même qu'entre le son de blé du F2 et la chitine du F4. En effet, les deux premiers réacteurs contenaient des protéines en quantité importante ce qui impliquait, dans les deux cas, l'enrichissement de bactéries productrices de protéases. De la même manière, la biomasse présente dans le F2 doit être capable de dégrader les sucres et l'élément de base de la chitine est un sucre aminé et acétylé (N-acétylglucosamine). Cela peut expliquer en partie les similitudes observées entre les profils sur les gels de DGGE de F1 et F5 d'une part, et entre F2 et F4 d'autre part. Malgré des ressemblances, des différences sont aussi marquantes entre les populations des divers mini-fermenteurs. La lignine (F3), comportant des composés phénoliques, semble avoir stimulée l'implantation d'une biomasse unique. En dépit d'une nature comparable entre le mélange d'huiles de canola et de palme et le mélange d'huile d'olive et de Tween 80, les populations bactériennes des F8 et F2(2) sont largement différentes de celles du F1(2).

Le même constat de similitudes et de différences apparaît dans les résultats des galeries API ZYM de la biomasse des mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5. La biomasse du F2 se démarque toutefois des autres avec un potentiel enzymatique en apparence plus diversifié et dont les activités semblent plus intenses par rapport à celles des autres biomasses. Il faut cependant être prudent dans l'interprétation de ces résultats, car ces

derniers sont grandement influencés par les conditions dans lesquelles les tests ont lieu. Par exemple, les conditions dans lesquelles la biomasse a été produite, le pH et les tampons réactionnels ont une influence certaine sur les résultats des galeries API ZYM. Par contre, cela donne un aperçu du potentiel enzymatique de la biomasse enrichie dans chacun de ces mini-fermenteurs.

Comme il a été mentionné précédemment, des galeries API ZYM n'ont pas été réalisées pour la biomasse des mini-fermenteurs F8, F1(2) et F2(2) en raison de la présence d'huile. Pour les effectuer, il aurait fallu séparer la biomasse de l'huile présente dans le milieu de culture. La centrifugation des cultures ne permettait pas de séparer efficacement la biomasse de l'huile et de l'émulsion formée. Des essais de séparation auraient pu être faits avec des solvants tels que ceux utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique total provenant de la biomasse de ces mini-fermenteurs (section 2.2.2.2.1.). Toutefois, l'utilisation de ces solvants aurait affecté la viabilité des bactéries présentes et ainsi perturber l'expression des enzymes. Il aurait fallu mettre au point une technique de séparation efficace et plus douce pour les cellules.

4.1.2. Enrichissements en fonction des lipides

Comme l'un des objectifs de ce travail de maîtrise est d'isoler et de caractériser des bactéries thermophiles ayant un potentiel lipolytique, une attention particulière a été portée sur les enrichissements en fonction de lipides (F6, F8, F1[2] et F2[2]). Le choix des huiles a été fait selon leur composition en acides gras et la diversité dans la distribution des acides gras à l'intérieur des triglycérides. Initialement, les huiles de canola et de palme ont été sélectionnées en raison de la grande diversité de leur composition. Le but était de stimuler l'implantation de biomasses dont le potentiel global de dégradation des lipides soit le plus grand possible, c'est-à-dire que les enzymes produites par les bactéries aient la plus large spécificité du substrat possible.

Comme il a été mentionné à la section 3.2.2., l'élément qui a probablement eu le plus d'impact sur les enrichissements en fonction du mélange d'huiles de canola et de palme

est certainement le protéose peptone. Au début de l'enrichissement, le milieu de culture du F6 qui ne contenait pas de peptone avait une apparence blanc-beige malgré la présence d'huile de palme qui donnait une couleur orangée à la source de carbone. Le milieu de culture du F8, quant à lui, avait une coloration orangée, mais avec le temps, un léger changement vers le blanc-beige pouvait être observé. Toutefois, une accumulation d'huile en surface du milieu de culture a été remarquée, ce qui n'était pas le cas dans le F6. L'hypothèse a alors été émise que c'était peut-être dû à la présence de protéose peptone; il y avait peut-être une consommation préférentielle du protéose peptone par les bactéries. En se basant sur cette hypothèse, la concentration de protéose peptone dans le F8 a été diminuée au cycle 14. L'huile a semblé être plus dégradée, car il y avait formation d'une phase hydrophobe visqueuse dans le milieu de culture. La situation était devenue similaire au F6, il restait un peu d'huile non dégradée en surface, mais beaucoup moins qu'avant la diminution de la quantité de protéose peptone. Provoqué par le grillage de l'élément chauffant du F6 au cycle 17, les mini-fermenteurs F6 et F8, étant jusqu'alors des mini-fermenteurs à agitation par circulation d'air, ont été changés pour des mini-fermenteurs à agitation mécanique. Le but était de favoriser un meilleur mélange (agitation), car le milieu de culture était non homogène, la phase hydrophobe prenait de l'ampleur. Ce changement a été plutôt positif. Néanmoins, lors du prélèvement d'échantillons à la fin des cycles, la quantité de biomasse présente dans le F8 semblait diminuer de cycle en cycle depuis le cycle 14. Au cycle 21, la concentration de protéose peptone a été augmentée de nouveau afin de favoriser la croissance des bactéries présentes.

Parallèlement, il était impossible d'extraire de l'ADN à partir du F6. Les résultats d'analyse par PCR et DGGE sont venus confirmer l'absence probable de biomasse dans ce mini-fermenteur. Il manquait certainement un élément nutritif essentiel dans le milieu de culture du F6 afin de permettre l'implantation d'une biomasse viable. Le protéose peptone fournissait probablement cet ou ces éléments dans le F8, car aussitôt que sa concentration a été diminuée, la quantité de biomasse présente a commencé à décroître. Le fait que les bactéries thermophiles aient parfois des besoins nutritifs particuliers voire

même essentiels (p.ex. vitamines, certains acides aminés) a déjà été rapporté dans la littérature (Sürücü, 1999).

Les changements d'apparence observés dans le milieu de culture du F6 étaient probablement liés plus à un phénomène abiotique de modification de l'huile qu'à une modification biologique. Cette modification a potentiellement eu un impact sur l'implantation durable de bactéries dans ce mini-fermenteur. Dans des conditions de culture thermophiles, il a déjà été rapporté des cas où une modification chimique d'éléments du milieu de culture a eu un effet inhibiteur sur la croissance de bactéries thermophiles (Kim et Lee, 2003; Park et al., 2001). Il faut garder en tête que l'huile de palme est une huile non raffinée, probablement pleine d'impuretés. Il est aussi possible qu'avec le temps, la chaleur ait entraîné l'oxydation des huiles, libérant ainsi des molécules au potentiel inhibiteur pour la croissance de bactéries thermophiles. Par exemple, Becker et Märkl (2000) ont observé qu'une accumulation d'acide oléique dans le milieu de culture au-delà d'un certain niveau mène à une inhibition complète de la croissance de *Bacillus thermoleovorans* IHI-91. L'accumulation d'huile (riche en acide oléique) dans les mini-fermenteurs a peut-être favorisé ce phénomène. Il aurait fallu diminuer la quantité d'huile ajoutée lors des alimentations. L'impact a cependant été nettement moins prononcé sur l'enrichissement du F8, le protéose peptone, en plus de jouer un rôle nutritif, a peut-être joué un rôle d'antioxydant dans le milieu de culture, empêchant ainsi la libération ou la formation de molécules néfastes pour la croissance des bactéries.

En raison de l'échec du F6 et de la perte de diversité entraînée par les modifications de la concentration de protéose peptone dans le F8, les enrichissements du F1(2) et du F2(2) avaient été entrepris. Évidemment, le milieu de culture de ces deux enrichissements a été supplémenté avec du protéose peptone. Le F2(2) était une reprise du F8, mais au cas où la diversité de la flore bactérienne serait faible ou que l'huile de palme ait un impact négatif sur les bactéries, un mélange d'huile d'olive et de Tween 80 a été utilisé pour l'enrichissement du F1(2). L'utilisation de ces substrats est très répandue dans la littérature (Abdel-Fattah, 2002; Fakhreddine et al., 1998; Handelsman et Shoham, 1994).

4.1.3. Conditions d'enrichissement des microflores bactériennes

Les enrichissements ont été réalisés en cuvées alimentées séquentielles (« sequencing fed-batch ») dont les cycles étaient de 72 heures. Les divers enrichissements ont eu des durées variables. Après l'analyse des profils de migration sur gels par DGGE des microflores enrichies, il apparaît que la durée des enrichissements aurait pu être raccourcie de plusieurs cycles dans la majorité des cas. Pour cela, il aurait fallu faire un suivi par DGGE des microflores plus serré dans le temps, cela aurait permis de visualiser que la diversité bactérienne présente dans les mini-fermenteurs s'était stabilisée assez rapidement dans le temps. Moins d'une dizaine ou d'une douzaine de cycles auraient été suffisants pour faire les divers enrichissements. Cela aurait aussi permis de réduire les possibilités d'incidents (p.ex. pannes de courant, coupure d'aération, problèmes de contrôle de pH) et minimiser leurs impacts sur les populations bactériennes présentes. Seules les populations des F1 et F5 semblent avoir bien résisté aux fluctuations des conditions de culture occasionnées par les incidents subis durant l'enrichissement.

Concernant la stratégie de contrôle du pH et de la température, leurs valeurs étaient variables dans le temps à l'intérieur d'un même cycle. L'objectif était de favoriser l'implantation de biomasses bactériennes les plus diversifiées possibles, c'est-à-dire d'obtenir différentes bactéries croissant à des pH variant de 7,0 à 8,5 et à des températures variant de 50 à 70°C. En regardant les résultats des analyses par DGGE du suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps à l'intérieur d'un même cycle pour les mini-fermenteurs F1, F2, F3, F4 et F5 (figure 21), il pourrait être facile de penser que, en raison de la relative stabilité des populations bactériennes présentes à l'intérieur d'un cycle (mise à part l'intensité des bandes), les conditions de pH et de température auraient pu être maintenues à des valeurs intermédiaires (p.ex. pH 7,7 et 60°C). Les diversités bactériennes présentes s'étaient stabilisées depuis plusieurs cycles et rien ne permet d'affirmer que les mêmes populations bactériennes se seraient établies si les conditions de pH et de température avaient été maintenues à des valeurs fixes comme 7,7 et 60°C, respectivement. Par exemple, il y a peut-être des bactéries qui ne

croissent qu'à des températures supérieures à 65°C ou à un pH plus alcalin, celles-ci ne seraient pas implantées d'une manière durable dans les mini-fermenteurs. Dans de futurs travaux, il serait intéressant de comparer les deux stratégies d'enrichissement (conditions variables versus conditions constantes). Il faut aussi tenir compte du fait que des conditions de variation contrôlée de pH et de température comme celles utilisées pour les présents enrichissements sont de nature à favoriser l'implantation de populations microbiennes porteuses d'activités enzymatiques à plus large spectre de pH et de température. Or, ce type d'enzymes est très avantageux dans une perspective d'applications industrielles.

Pour l'enrichissement du F1(2), le pH et la température étaient maintenus constants respectivement à 8,2 et 65°C pour toute la durée des cycles. Comme la source de carbone employée pour cet enrichissement (mélange d'huile d'olive et de Tween 80) était différente de celle employée pour l'enrichissement du F2(2) (mélange d'huiles de canola et de palme), il serait inapproprié de comparer l'impact des deux stratégies de contrôle du pH et de la température sur l'évolution de leur flore bactérienne respective.

Un élément qui n'a presque pas été abordé jusqu'à maintenant et qui a sûrement eu un impact surtout sur les enrichissements en présence des lipides (des huiles) est l'aération. Plusieurs publications font mention de l'importance de l'aération pour la production de lipases par des microorganismes (Becker et al., 1997; Chen et al., 1999; Gupta et al., 2004; Stránský et al., 2007). L'aération n'est pas seulement importante pour la production de lipases, mais aussi pour obtenir une bonne croissance des bactéries. Becker et al. (1997), qui étudiaient la production de lipase par *Bacillus thermoleovorans* IHI-91, ont déterminé qu'une forte capacité d'aération du fermenteur est primordiale quand des huiles sont utilisées comme source de carbone et d'énergie. Cela est dû principalement au contenu réduit en oxygène des acides gras composant l'huile d'olive, par exemple, comparativement au contenu en oxygène de la molécule de glucose. Pour les enrichissements en présence des lipides, il aurait été intéressant d'utiliser des sondes pour suivre la quantité d'oxygène dissous dans les milieux de culture. Cela aurait pu permettre d'assurer une disponibilité constante et appropriée de l'oxygène dans le milieu pour les

bactéries. Comme Chen et al. (1999) l'ont rapporté, c'est davantage le taux de transfert d'oxygène (OTR, « oxygen transfert rate ») qui est déterminant pour la croissance cellulaire et la production de lipase que la concentration d'oxygène dissous, mais comme l'objectif ici était simplement d'enrichir et non une production optimale, le suivi de l'oxygène dissous aurait été suffisant pour avoir un bon aperçu de la situation. Les enrichissements des F8, F1(2) et F2(2) auraient peut-être été différents si la quantité d'oxygène dans les bioréacteurs avait été mesurée et maintenue à une concentration optimale pour les microorganismes aérobies. Cela dit, étant donné la faible taille des fermenteurs et l'intensité de l'aération dans ceux-ci, il serait très surprenant que la vitesse de transfert d'oxygène n'ait pas été suffisante pour combler la vitesse de consommation d'oxygène.

4.2. Isolement et caractérisation de bactéries ayant des activités lipolytiques

4.2.1. Isolement de bactéries

L'isolement de bactéries a été réalisé à partir d'aliquotes provenant des mini-fermenteurs F8 et F1(2), deux enrichissements effectués en fonction de sources de lipides. Comme l'objectif était d'isoler des bactéries ayant un potentiel lipolytique, l'isolement a été combiné au criblage. Deux méthodes ont été utilisées : la méthode avec de la Rhodamine B (huile d'olive) et la méthode de précipitation au calcium (Tween 80). Au début, la méthode avec de la Rhodamine B a présenté quelques problèmes liés à la présence d'huile. C'est pour cela que l'accent a davantage été mis sur l'emploi de l'autre méthode de criblage, bien que moins sensible. Pourtant, Li et Zhang (2005) ont rapporté avoir utilisé la méthode de la Rhodamine B avec de l'huile d'olive pour isoler une bactérie lipolytique, *Geobacillus* sp. TW1, après enrichissement. Le fait d'incuber les géloses à l'endroit a permis de pallier à plusieurs des problèmes de croissance rencontrés. L'ajout d'agents émulsifiants, telles que la lécithine ou la gomme arabique, aurait peut-être pu stabiliser l'émulsion.

Deux éléments ont peut-être limité le nombre de souches qui ont été isolées : le pH des milieux de culture (~8,2) et la température d'incubation des géloses (60°C). Des

restrictions de temps ont empêché de tester d'autres conditions d'isolement. Cela aurait peut-être permis d'isoler plus de souches à partir du F8 ou du F2(2), les présentes conditions favorisant davantage l'isolement à partir du F1(2) dont les conditions d'enrichissement étaient semblables au niveau du pH.

Le fait que dans certains cas, l'isolement des souches était réalisé à partir d'inoculum des mini-fermenteurs qui étaient faiblement dilués avant leur étalement sur milieu solide soulève quelques interrogations. En était-il ainsi en raison de la faible quantité de biomasse présente dans les mini-fermenteurs ou encore les conditions de culture pour l'isolement n'étaient-elles pas adéquates pour le type de microorganismes présents? Dans l'éventualité de la faible quantité de biomasse présente, cela ramène l'hypothèse d'un manque au niveau de l'aération ou de l'accumulation d'éléments inhibiteurs pour la croissance bactérienne. Le fait que huit des souches bactériennes isolées l'ont été en conditions microaérophiles supporte l'idée d'une insuffisance au niveau du transfert d'oxygène dans le milieu de culture, surtout qu'une des souches (F12-THO-02) ne croît qu'exclusivement en conditions microaérophiles. Toutefois, si les conditions du fermenteur avaient été globalement microaérophiles, cela impliquerait qu'il y avait une biomasse très abondante qui assimilait tellement de lipides que ses besoins en oxygène dépassaient la vitesse de transfert. Or, la biomasse n'était pas abondante. Par contre, la présence d'une phase huileuse dispersée dans la phase aqueuse peut avoir créé un milieu hétérogène avec de petites zones peu aérées, par exemple, une interface eau-huile coincée entre plusieurs gouttelettes d'huile. Il est aussi fort probable que les conditions d'isolement n'étaient pas adéquates et ce, malgré l'éventail de milieux de culture employés. Il est possible que certaines des bactéries présentes ne peuvent croître seules, qu'elles aient besoin d'un élément quelconque libéré dans leur milieu par une autre bactérie. Rhee et al. (2002; Rhee et al., 2000) ont rapporté un cas de commensalisme obligatoire entre une souche thermophile Gram négative (SC-1) et une souche thermophile de *Bacillus* (SK-1). Les auteurs ont suggéré que les facteurs de croissance libérés par la souche SK-1 pourraient être des protéines. Ces difficultés de culture soutiennent le potentiel de l'approche métagénomique de recherche d'enzymes. Malgré tout, un total de 34 souches bactériennes ont été isolées en cultures pures.

4.2.2. Affiliation des souches isolées

L'analyse par PCR-DGGE du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches isolées a permis de regrouper les 34 souches bactériennes en dix groupes. Le profil de migration de la majorité des souches est caractérisé par la présence de plusieurs bandes (plus de trois, dans certains cas). Normalement, une seule bande devrait caractériser une souche pure. Toutefois, Nübel et al. (1996) ont rapporté le cas d'une culture pure de *Paenibacillus polymyxa* où un patron de migration par TGGE (« Temperature Gradient Gel Electrophoresis ») de dix bandes caractérisait les gènes codant pour l'ARNr 16S de cette bactérie. En fait, *P. polymyxa* possède plusieurs copies différentes de son gène codant pour l'ARNr 16S. Villemur et al. (2007) ont, quant à eux, rapporté le cas de huit souches de *Desulfitobacterium* qui possédaient une hétérogénéité dans leurs copies du gène codant pour l'ARNr 16S. Chaque souche avait un patron de migration sur gel de DGGE composé de deux à sept bandes. Ces hétérogénéités étaient causées par des insertions de 100 à 200 pb dans la région 5' du gène codant pour l'ARNr 16S.

Il est possible que ce soit le cas pour les souches isolées ici. Pour s'en assurer et, par le fait même, confirmer la pureté des souches, il faudrait procéder au clonage des produits PCR du gène codant pour l'ARNr 16S de chaque souche et les faire séquencer individuellement. Plusieurs informations pourraient en être tirées. Par exemple, cela permettrait d'expliquer la présence de la troisième bande dans le profil du groupe 2 (p.ex. souche F12-RT-03) alors que les deux autres sont partagées avec le groupe 1 (p.ex. souche F12-RT-011). Dans le cas du groupe 4, les problèmes de séquençage du côté 5' du gène codant pour l'ARNr 16S laissent à penser qu'il y aurait vraiment la présence de copies multiples du gène. En effet, un décalage et du chevauchement dans la lecture des nucléotides sur le chromatogramme du séquençage ont été observés. Le séquençage séparé des différentes copies permettrait sûrement de cerner davantage l'espèce bactérienne à l'intérieur du genre *Geobacillus* à laquelle les souches F12-RT-06, F12-RT-08 et F12-BT-02 appartiennent.

Dans le cas des souches isolées à partir du mini-fermenteur F1(2) et dans une moindre mesure celles provenant du F8, elles ne représentaient pas les espèces dominantes caractérisant la microflore de ces mini-fermenteurs. Le fait que les espèces dominantes n'aient pas été isolées en cultures pures représente un attrait intéressant pour l'approche métagénomique.

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S des souches isolées a permis de faire l'affiliation de ces dernières avec un genre bactérien et/ou une espèce bactérienne. L'analyse phylogénique des séquences obtenues a permis de confirmer les résultats obtenus à partir des banques de données. Les souches du groupe 1 et 2 sont affiliées à plus de 99% à *Geobacillus pallidus*. À l'origine, *Bacillus pallidus* a été isolé d'eaux usées ayant subies un traitement thermophile (Scholz et al., 1987). En 2004, sur des bases d'analyses moléculaires, *B. pallidus* a été renommé *G. pallidus* (Banat et al., 2004). Les souches du groupe 3 sont affiliées (plus de 99% d'identité) à *Geobacillus toebii* dont la souche type SK-1 a été isolée de compost de foin provenant d'une ferme en Corée (Sung et al., 2002). C'est cette même souche qui démontrait une interaction commensale avec la bactérie thermophile Gram négative *Symbiobacterium toebii* SC-1 (Rhee et al., 2002; Rhee et al., 2000). Les analyses phylogéniques des souches du groupe 4 ont permis de définir qu'elles sont du genre *Geobacillus* mais non l'espèce à laquelle elles appartiennent. Il est simplement possible d'affirmer qu'elles sont affiliées à 99% avec les cinq espèces suivantes : *G. thermoleovorans*, *G. thermocatenulatus*, *G. lituanicus*, *G. stearothermophilus* et *G. kaustophilus*. Concernant *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus* et *G. thermocatenulatus*, leur similarité est tellement grande qu'il a même été proposé de les combiner sous la même espèce (*G. thermoleovorans*) (Sunna et al., 1997). Avant 2001, *G. thermoleovorans*, *G. thermocatenulatus*, *G. stearothermophilus* et *G. kaustophilus* faisaient partie du genre *Bacillus*, mais avec l'isolement de *Geobacillus subterraneus* et *Geobacillus uzenensis*, le genre *Geobacillus* a été défini (Nazina et al., 2001). *G. lituanicus* a, quant à elle, été isolée en 2004 d'un champ pétrolifère en Lituanie (Kuisiene et al., 2004). Les souches des groupes 5 et 6 ont plus de 99% d'identité avec *G. thermodenitrificans* (Manachini et al., 2000; Nazina et al., 2001) et *G. debilis* (Banat et al., 2004), respectivement. Particularité intéressante, *G. debilis* a été isolée d'un

échantillon de sol, un environnement froid par opposition aux conditions thermophiles requises pour sa croissance (Banat et al., 2004).

Comme l'illustre l'arbre phylogénique de la figure 23, les souches du groupe 7 sont plus près génétiquement d'*Anoxybacillus rupiensis* que de *Geobacillus tepidamans*. Le genre *Anoxybacillus* est un genre relativement nouveau. C'est en 2000 que la première espèce du genre, *Anoxybacillus pushchinoensis*, a été décrite (Pikuta et al., 2003; Pikuta et al., 2000). Initialement, le genre avait été décrit comme regroupant des bactéries anaérobies strictes, mais en 2003, elles ont été redéfinies comme anaérobies aérotolérantes ou anaérobies facultatives (Pikuta et al., 2003). En 2007, une souche d'*A. rupiensis* a été isolée en Bulgarie (Derekova et al., 2007). Le fait que de telles souches aient été isolées des mini-fermenteurs F8 et F1(2) supporte une fois de plus la possibilité que l'aération ait pu être un facteur limitant dans ces enrichissements. *Anoxybacillus beppuensis* n'a pas été incluse dans l'analyse phylogénique, car elle est très proche d'*A. rupiensis* et que seule cette dernière a fait l'objet d'une publication (Derekova et al., 2007). Comme le genre *Anoxybacillus* est relativement récent et que peu de travaux ont été effectués sur ces bactéries, il serait intéressant de caractériser davantage ces souches pour leur capacité de production d'enzymes thermostables ayant un potentiel pour des applications industrielles.

Les souches du groupe 8 seraient apparentées à l'espèce *Brevibacillus thermoruber*; toutefois, cette bactérie posséderait un pigment typique rouge (Manachini et al., 1985; Shida et al., 1996; Shida et al., 1997), ce qui n'a pas été observé lors de l'isolement des souches de ce groupe. D'un point de vue phénotypique, les souches du groupe 8 s'apparenteraient davantage à *Brevibacillus invocatus* (Logan et al., 2002) et *Brevibacillus levickii* (Allan et al., 2005) dont les colonies n'ont pas ce pigment rouge, mais plutôt une couleur crème et légèrement jaunâtre comme les souches isolées.

Les souches des groupes 9 (F12-THO-01) et 10 (F12-THO-02) sont originales d'un point de vue phylogénique, il pourrait bien s'agir de nouvelles espèces, voire d'un nouveau genre bactérien dans le cas du groupe 10. D'après les banques de données, l'affiliation la

plus probable des souches F12-THO-01 et F12-THO-02 avec des espèces connues et publiées se ferait avec *B. thermoamylovorans* et *Chelatococcus asaccharovorans*, respectivement. La souche F12-THO-01 n'a toutefois que 93-94% d'identité avec *B. thermoamylovorans* et la souche F12-THO-02, 95% avec *C. asaccharovorans*. Cette distance phylogénique est supportée par l'analyse rapportée à la figure 23, ce qui porte à confirmer l'originalité de ces souches. Certains éléments distancent les souches isolées de ces espèces connues. Selon Combet-Blanc et al. (1995), un pH de 8,5 et une température de 58°C représentent les conditions limites pour la croissance de *B. thermoamylovorans*, une bactérie anaérobie facultative, alors que la souche F12-THO-01 croît très bien en aérobie à pH 8,2 et 60°C. *C. asaccharovorans* est une bactérie mésophile aérobie stricte (Auling et al., 1993) tandis que la souche F12-THO-02 croît à 60°C et dans des conditions microaérophiles uniquement. Ce dernier point ramène encore la question de l'aération dans les mini-fermenteurs enrichis en fonction des lipides. Cependant, un lien existe tout de même entre la souche F12-THO-02 et *C. asaccharovorans*, cette dernière est connue pour utiliser le nitrilotriacétate (NTA) comme substrat (Auling et al., 1993) et le milieu de culture employé pour faire les enrichissements (section 2.1.1.), contenait aussi de l'acide nitrilotriacétique (3Na^+). À ce moment-ci, il n'est pas possible d'affirmer que la souche F12-THO-02 utilisait le NTA, mais cela reste une possibilité. Il serait intéressant de caractériser davantage ces deux souches afin de mieux cerner leur affiliation.

Globalement, la majorité des espèces affiliées aux souches isolées dans ce projet ont été isolées au cours des derniers dix ou 15 ans. Relativement peu de travaux ont été effectués au niveau de leur potentiel lipolytique ou de leurs enzymes en général. Ces souches ont donc un potentiel d'originalité. Évidemment, les espèces de *Geobacillus* sont connues depuis plus longtemps et certaines ont vu leurs lipases étudiées et caractérisées, comme par exemple *G. stearothermophilus* (Kim et al., 1998; Kim et al., 2000; Sinchaikul et al., 2001; Sinchaikul et al., 2001; Tyndall et al., 2002), *G. thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert et al., 1997) et *G. thermoleovorans* (Lee et al., 1999). Malgré cela, le potentiel d'originalité pour produire des enzymes ayant des possibilités d'applications industrielles est bien présent.

4.2.3. Potentiel enzymatique des souches isolées

Afin d'avoir un aperçu du potentiel enzymatique des souches isolées, des galeries API ZYM ont été réalisées pour 15 de ces souches. Les souches F12-RT-06, F12-BT-02 et F12-RT-07 se sont démarquées des autres par la grande diversité et l'intensité des activités enzymatiques détectées. La grande majorité des souches ont démontré des activités estérase et estérase-lipase d'une bonne intensité alors que l'activité lipase, lorsque détectée, était plutôt faible. Toutefois, comme il a été mentionné précédemment, il faut être prudent dans l'interprétation des résultats de ces galeries, car les conditions du test peuvent les influencer (p.ex. pH, tampons). La biomasse employée pour les galeries a été produite en incorporant du Tween 80 au milieu comme inducteur, il est possible que ces conditions aient favorisé les bactéries à produire des enzymes davantage de type estérase que lipase, les Tweens pouvant être hydrolysés par des estérases (Thomson et al., 1999).

Pour évaluer plus en profondeur le potentiel lipolytique de ces 15 souches, elles ont été criblées sur milieux solides. La méthode de précipitation au calcium n'a pas donné beaucoup de résultats positifs comparativement à la méthode à la Rhodamine B. Pourtant, l'emploi de Tweens est supposément une méthode sensible (Gupta et al., 2003), ce qui n'a pas été observé ici. Lorsque testées sur milieux solides avec la méthode à la Rhodamine B, 14 des 15 souches ont démontré une activité lipolytique. Comme l'huile d'olive a été utilisée comme substrat, ces résultats suggéraient que ces 14 souches avaient une activité lipase. Cependant, les résultats obtenus lors des expériences de dosage d'activité lipolytique par spectrophotométrie des souches F12-THO-01 et F12-RT-091 mettaient en doute les résultats du criblage avec la Rhodamine B. En effet, ces deux souches ont plutôt démontré une activité estérase que lipase lors des tests avec les p-nitrophényl esters d'acides gras. Ces résultats seront discutés plus en profondeur à la prochaine section. Afin d'éviter d'obtenir des faux-positifs avec cette méthode de criblage, l'huile d'olive aurait dû être préalablement purifiée. Selon Brockerhoff et Jensen (1974) et Jensen et al. (1966), l'huile d'olive commerciale contiendrait des impuretés qui pourraient agir comme substrat pour des enzymes de type estérase; toutefois, ces impuretés pourraient être éliminées par le passage de l'huile sur une

colonne d'alumine. Plus coûteuse, la trioléine peut aussi servir d'alternative à l'huile d'olive purifiée. En somme, les résultats obtenus suggèrent que les 14 souches qui ont démontré un résultat positif sur des milieux solides contenant de la Rhodamine B et de l'huile d'olive ont une activité lipolytique, mais qu'il n'est pas possible de conclure si ces activités sont de type lipase ou estérase. Il faudrait refaire le criblage avec de l'huile d'olive purifiée ou de la trioléine pour sélectionner les souches produisant une activité lipase.

Un facteur dont l'importance peut parfois être sous-estimée dans un protocole de criblage sur milieux solides concerne la quantité d'agar dans les géloses. Comme le résumait bien Thomson et al. (1999), dans ces méthodes de criblage, le substrat est essentiellement immobile, l'enzyme doit donc diffuser dans l'agar pour accéder au substrat, ce qui est un processus lent. Une réduction de la concentration d'agar de 2% à 1,5% favoriserait la diffusion des lipases ce qui, dans certains cas, rendrait peut être le test plus sensible. Il est aussi possible que pour certaines souches, qu'une faible quantité de lipase ne soit produite dans les conditions de culture utilisées.

4.3. Caractérisation préliminaire des activités lipolytiques de deux souches

4.3.1. Activité lipolytique de la souche F12-THO-01

Une caractérisation préliminaire d'une activité lipolytique a d'abord été entreprise avec la souche F12-THO-01. Principalement, deux raisons expliquent la sélection de cette souche. Malgré l'absence d'activité lipase sur les galeries API ZYM, la souche F12-THO-01 a démontré l'activité la plus forte lors du criblage sur milieux solides en présence de Rhodamine B. Aussi, l'originalité de la souche a promu ce choix.

Aucune activité lipase n'a été détectée avec des surnageants de culture de la souche F12-THO-01 lorsque testée par spectrophotométrie en utilisant du pNP-palmitate, du pNP-stéarate et du pNP-laurate comme substrat. La seule activité détectée a été obtenue en utilisant du pNP-butyrate ce qui suggérerait une activité estérase et non une activité lipase. Il est possible que les conditions de culture utilisées ne soient pas propices à la

production de lipase ou que la souche étudiée ne puisse produire qu'une estérase. Les résultats positifs d'activité obtenus avec des aliquotes de surnageant lorsque déposées dans des puits dans des géloses contenant de la Rhodamine B et de l'huile d'olive suggéraient la présence d'une bonne activité lipolytique. Cette activité lipolytique de la souche F12-THO-01 observée sur milieu solide était probablement plus de type estérase que lipase.

Les cultures liquides de même que la production de biomasse notamment pour les galeries API ZYM ont été effectuées en utilisant le Tween 80 comme inducteur de l'activité. Ce dernier contient un acide gras à longue chaîne (de l'oléate) et a été utilisé comme inducteur d'activité lipase pour plusieurs microorganismes (Handelsman et Shoham, 1994; Leow et al., 2007). Cependant, il y a aussi des exemples où la présence d'un autre substrat en plus du Tween 80 inhibait la production de lipase (Fakhreddine et al., 1998). La lipase de *G. thermoleovorans* CCR11 est inhibée par le Tween 80 et sa production est induite par l'huile d'olive (Castro-Ochoa et al., 2005). Les conditions de culture utilisées pour la souche F12-THO-01 n'étaient peut être pas propices à la production d'une lipase. D'autres essais de production devraient être effectués en utilisant d'autres substrats d'induction, comme de l'huile d'olive purifiée ou de la trioléine.

Une caractérisation très préliminaire de l'activité estérase d'un surnageant de culture de la souche F12-THO-01 a été réalisée. L'activité estérase est supérieure à pH 8,5 qu'à 7,5 et est thermophile (60°C), ce qui correspond aux conditions utilisées lors de l'enrichissement. De plus, l'activité est inhibée en présence de Triton X-100. Le fait d'avoir concentré les surnageants ne semble pas avoir augmenté l'activité. Ce résultat suggère qu'il y aurait eu perte d'activité lors de l'entreposage ou que des éléments inhibiteurs auraient été concentrés en même temps.

4.3.2. Activité lipolytique de la souche F12-RT-091

La souche F12-RT-091 a été sélectionnée comme deuxième choix afin d'en étudier le potentiel lipolytique. Les raisons de ce choix sont sa bonne croissance en condition

aérobie et les bonnes activités lipase et estérase observées avec les galeries API ZYM. De plus, cette souche est relativement originale, car peu de travaux ont été effectués sur les bactéries du genre *Anoxybacillus* et encore moins sur *A. rupiensis*.

À partir de surnageants de cultures en fioles, aucune activité lipase n'a été détectée en utilisant du pNP-palmitate, du pNP-stéarate et du pNP-laurate comme substrats. Encore une fois, seul les tests effectués avec du pNP-butyrate se sont révélés positifs. Cette souche produisait donc une activité estérase qui était détectée dans des surnageants de cultures liquides. La présence d'activité estérase a été détectée dans tous les temps de culture analysés suggérant, bien que les résultats obtenus soient préliminaires, qu'elle était produite lors de la phase exponentielle de croissance et maintenue dans la phase stationnaire. Les tests préliminaires ont démontré qu'il s'agissait d'une estérase définitivement thermophile, car plus active à 55°C qu'à 37°C, alcaline (activité supérieure à pH 8.5 qu'à 7.5) et sensible au Triton X-100. Cette sensibilité au Triton X-100, observée aussi pour l'activité estérase de la souche F12-THO-01, est intéressante, car dans bien des cas, le Triton X-100 est employé dans les tests de dosage d'activité lipase ou estérase (Abdel-Fattah, 2002; Gupta et al., 2002) où il affecte peu l'activité de l'enzyme (Li et Zhang, 2005). Dans le cas de la lipase de *G. thermoleovorans* CCR11, la présence de Triton X-100 entraîne même une augmentation de son activité (Castro-Ochoa et al., 2005). Comme dans le cas de la souche F12-THO-01, il est possible que l'absence d'activité lipase soit liée aux conditions de culture de la souche, notamment la source de carbone utilisée pour l'induction des lipases. Il est à noter qu'aucune activité lipase et estérase n'a été détectée dans les surnageants de culture provenant du milieu R2A.

Il pourrait être intéressant de poursuivre la caractérisation des activités estérases des souches F12-THO-01 et F12-RT-091. Dans un premier temps, il faudrait déterminer les conditions optimales de production des activités estérases. Leur caractérisation et éventuellement leur purification permettraient de comparer leurs propriétés et leur potentiel pour des applications industrielles (pH optimal, température optimale, stabilité, spécificité du substrat, propriétés cinétiques) avec celles d'autres bactéries ou microorganismes déjà rapportés dans la littérature. Comme il a déjà été mentionné, peu

de travaux ont été réalisés sur le potentiel lipolytique des bactéries du genre *Anoxybacillus*. Seules deux publications assez récentes ont rapporté la production de deux estérases par *A. gonensis* G2 et A4 (Çolak et al., 2005; Faiz et al., 2007). Les résultats préliminaires obtenus avec la souche F12-RT-091 laissent croire que son activité estérase est différente de celles d'*A. gonensis* G2 et A4. Par exemple, l'activité optimale de la souche A4 est à pH 5,5 (Faiz et al., 2007) alors que l'activité de la souche F12-RT-091 est trois fois plus élevée à pH 8,5 qu'à pH 7,5.

Les résultats obtenus nous ont permis d'isoler deux souches ayant des activités estérases intéressantes. Parmi les autres souches isolées, certaines pourraient produire des activités lipases intéressantes avec les propriétés de spécificité et de thermostabilité recherchées. Un nouveau criblage des souches sur milieux solides en utilisant de l'huile d'olive purifiée permettrait de sélectionner celles ayant un potentiel de production de lipases et serait suivi d'essais en culture liquide pour confirmation et caractérisation de leur activité.

Conclusion

Lors de ce projet, neuf enrichissements différents ont été effectués en fonction de diverses sources de carbone. Les sources de carbone employées étaient un extrait de viande, du son de blé, de la lignine, de la chitine, de la gélatine, un mélange d'huiles de canola et de palme et un mélange d'huile d'olive et de Tween 80. Les enrichissements ont été réalisés pendant plus de 60 jours dans des cycles de 3 jours où des conditions aérobies thermophiles (la température a varié entre 50°C → 70°C → 50°C) et de pH alcalins (entre 7,0 → 8,5 → 7,0) ont été maintenus. Le suivi de l'évolution de la diversité bactérienne dans le temps par PCR-DGGE a permis de constater que malgré certaines similitudes entre les microflore, globalement, les microflore résultantes des divers enrichissements sont différentes selon la source de carbone employée.

Les biomasses résultantes des enrichissements en fonction de l'extrait de viande, du son de blé, de la lignine, de la chitine et de la gélatine ont servi exclusivement à alimenter un autre projet impliquant la recherche d'enzymes via une approche métagénomique. Dans le cadre du présent projet de maîtrise, les efforts se sont concentrés sur la recherche de bactéries thermophiles ayant un potentiel lipolytique. À partir des microflore provenant des enrichissements réalisés en présence de lipides comme source de carbone, 34 souches bactériennes thermophiles ont été isolées et caractérisées. Ces souches ont été réparties en dix groupes différents selon leur profil obtenu par PCR-DGGE de leur gène codant pour l'ARNr 16S. Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S de 21 de ces souches a permis de confirmer la composition des groupes et de faire l'affiliation la plus probable de ceux-ci avec des espèces connues. La grande majorité des souches sont affiliées à la famille des *Bacillaceae*, la plupart appartenant au genre *Geobacillus*. Il y a aussi quelques souches qui sont affiliées à une espèce récemment isolée d'*Anoxybacillus rupiensis* et deux souches originales, F12-THO-01 et F12-THO-02, dont les espèces connues et publiées les plus rapprochées sont respectivement *Bacillus thermoamylovorans* (93-94% d'identité) et *Chelatococcus asaccharovorans* (95% d'identité). Ces résultats suggèrent que ces souches pourraient représenter de nouvelles espèces bactériennes jamais décrites.

Le potentiel enzymatique de 15 des souches isolées a été évalué par des galeries API ZYM et a montré que la majorité des souches exprimaient des activités phosphatase alcaline, estérase (C4), estérase-lipase (C8) et α -glucosidase d'une bonne intensité. L'activité lipase (C14) était beaucoup moins détectée auprès des souches testées. Les 15 souches sélectionnées ont ensuite été criblées pour une activité lipolytique sur milieux solides. La méthode employant de la Rhodamine B et de l'huile d'olive donnait plus de souches positives que la méthode de précipitation au calcium avec du Tween 80. Ainsi avec la méthode utilisant la Rhodamine B, une réponse positive a été obtenue avec 14 des 15 souches testées. L'utilisation de l'huile d'olive comme substrat suggérait la détection d'activité lipolytique de type lipase.

La caractérisation préliminaire des activités lipolytiques des souches F12-THO-01 et F12-RT-091 à partir de surnageants de culture a permis d'identifier des activités de type estérase plutôt que lipase. Cela a entraîné la remise en question des résultats du criblage avec la Rhodamine B et l'huile d'olive pour identifier des bactéries productrices de lipases. Des impuretés présentes dans l'huile d'olive pourraient être responsables des activités estérases observées, suggérant que le criblage devrait être effectué en utilisant de l'huile purifiée ou de la trioléine comme substrat. Les activités de type estérase des souches F12-THO-01 et F12-RT-091 ont été définies comme thermophiles, alcalines et sensibles au Triton X-100. Différentes conditions de culture impliquant d'autres inducteurs que le Tween 80 pourraient être utilisées pour vérifier la production de lipases chez ces souches.

Cette recherche a permis d'isoler des souches bactériennes thermophiles originales ayant un potentiel innovateur au niveau de leurs enzymes thermostables. Des enzymes comme les lipases et les estérases ont un haut potentiel d'applications industrielles. Suite à la reprise du criblage avec un substrat approprié, il serait intéressant d'identifier une enzyme ayant un tel potentiel. Selon ses propriétés (pH optimal, température optimale, thermostabilité, spécificité), cette enzyme pourrait ultérieurement faire l'objet d'une caractérisation plus poussée, incluant l'optimisation de sa production et sa purification.

Appendice A

Séquences ADN consensus du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S
de 12 des souches isolées

F12-RT-011

5' CCAAAATGCAAGTCGAGCGGACCGAAGGGAGCTTGCTCCTTTAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGGTGGGCAACCTGCCCTGCAGACTGGGATAACTTCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAAA
CCGCATGGTTTTTCGGTTGAAAGGCGGCTTTTAGCTGTCACTGCAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGT
TGTTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCCGGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCG
AACAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTG
AAATCTCGCGGCTCAACCGCGAGCGGCCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGGAGAGGGGAGCGGAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTA
ACTGACGTMGAGGCGCGAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGA
TGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTT
TCGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTAAAAGT
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG
TGGTACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAACCACTCTCAGTTCCGATTGCAGGC
TGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGTCTTGATACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCCTTACGG
GAGCCAGCCGCCGAAAGGTGGGACAAAATGATTGGGTGAGTC 3'

F12-RT-03

5' TATACATGCAAGTCGAGCGGACCGAAGGGAGCTTGCTCCTTTAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGGTGGGCAACCTGCCCTGCAGACTGGGATAACTTCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAAA
CCGCATGGTTTTTCGGTTGAAAGGCGGCTTTTAGCTGTCACTGCAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGT
TGTTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCCGGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCG
AACAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTG
AAATCTCGCGGCTCAACCGCGAGCGGCCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGGAGAGGGGAGCGGAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTACACGATG
AGTGCTAAGTGTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTTC
GGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTAAAAGTTCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTG
GTACAAAGGGCAGCGAACCAGGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAACCACTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTG
CAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
TCTTGATACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCCTTATCGGG
AGCCAGCCGCCGAAAGGTGGGACAAAATGATTGGGTGAAAGTC 3'

F12-RT-08

5' GGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA
TAACACCGAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCGCGGC
GCANTAANTANTTGGTGANGTAACGGCTCACCAAGGCGACCATGCGTAACCCGCTGAAANGGTGANCGGC
CACACTGGGACTGAAACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCANTANGGAATCTTCCGCAATGGGCGAA
AGCCTGACGGAACGACCCCCGTGAACGAAAAAGCCTTCNGGTCNTAAAGCTCTNTTGTGANGGACGAAA
GGGCGCCCTTCNAAAAAGGCGGCGCGGTGACCGTACCTCACGAAAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAACA
GCCGCGTAATACCTAAGGGGCGAACGTTGTCCNGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAAGCCGTCCCTT
AAGTCTGANGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGANGGTCATTGGAAACTGGGGACTTGAATGCARGAGA
RGAGAGCGGAATTCACGTTGACGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGT
CTCTGGCCTGCAACTGACGNTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTACACCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCAC
TCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTTAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTG
GGGCTTCCCCCTTCGGGGGACAGGGTGACAGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTTAGTTGCCAGCATGAAGGTGGGCACTCTAGAGGGAC
TGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACC CGGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAG
TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
TGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCACGAGAGCTTGCAACACCCGAAGTCGGTGA
GGCAACCCGCAAGGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGGCAAAGTGATTGGGT 3'

F12-BT-02

5' ATGCAAGTCGAGCGGACCATATCGGAGCTTGCTCTGGTTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGCAACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGACCGC
ANGGCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGNTGTCACTTGCGATGGGCCCCCGCGCAATAACTATTTTGT
GAGGNAACGGCTCCCCAGGGGANNATTCGTAACCCGCTGAGAGGGNGANCNGNCNCACTGGGANTGANA
CACNGCCNNACTCCNACNGGNGNANCANTNNGGAATCTTNCCAATGGGCGAAANCCTGACNGAACNAC
CCCCNTGAGCNAAAAAGNCNTNNGGTCNTAAANCTNTTTTNTGANGGANAAAAAGGCNCCCTTTTAAAA
AGNGGNCNGGTGACNGTNCCTCANNANAAAAACCCNGNTAAATNNNTNNCNCCNCCCGGTNATANNTN
TGGGNGAGCGTTTTCCCGAATTTTTGGGCGTAAAACGCNCGCANGNGGTCCNNTANTNTGATGTGAAAN
CCNCGGNTCAACCCTGGANGGTTATTNGAAANTGGGGGANTTTTGTGNAAGAAANNAGANCGGAANTNCC
CTGTAGCGGTGAAATGCGTARAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTG
ACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTAGAGGGGTACACCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACCGGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGA
AGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTTCGG
GGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATNAAGGTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGGCGACAAGTCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCG
GTACAAAGGGCTGCGAACC CGGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTG
CAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCCCGCTCACACCACGAGAGCTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGCAACCCGCAAGGGA
CCGACCCGCCGAAGGTGGGGCAAGTGATTGGGGTGAAGTC 3'

F12-RT-07

5' GTTCTGGTCAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGG
AAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCAAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCAC
TTGCGGATGGGCCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCG
GCCTGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAGC
TCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAATAAGGCGGCGCGGTGACGGTACCTCACGAGAAAGCCCC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGG
GGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAACGTGACGCTGAGCGCGAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCCTAAGTGTAGAGGGGTCACACCCTTTAGTGCTGT
AGCTAACGCGATAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCCC
TGACAACCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTGTCGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGCTCTAGTTGCCAGCATTGAGT
TGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGGCTAAAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCT
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAAGGCTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCGAATC
CCAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCCCGCTCACACCACGAGAGCTTGC
ACAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTACGGGAAGCCAGCCGCCGAAAG 3'

F12-TT-04

5' ATGCACTCGAGCGGGCTTGAGGAGGGCTTGCCCTTCGAGAGCCCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGTAACCTGCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACACCGGGGGCCG
CATGGCTTCCGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGCTGCCACTTACGGATGGGCCCCGCGGCATTANCTAGTTGG
CGGGGTAACGGCCCACCAAGGCNACGATACGTAGCCCGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTANGGAATCTTCCGCAAGTGGGCGAAAGCCTGACGGATCGA
CTCCGCGTGAGCGAGGAAGGCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAAGGCGCGCCGTTTGAAC
AGGGCGGCGCGGTGACGGTACCTGACNAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCTGCCGCGGTAACACGT
AAGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAA
TTCCGCGGCTCAACCGCGGGTGTGCATTGGAACCTGGGGGACTTGAGTGCAGGAAGAGGGGAGCGGAATTCC
CGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCCGCAACT
GACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGA
GTGCTAAGTGTAGAGGGGATTGACCTTTAGTGTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTA
CGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
AAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATCCCGCTGACCGGCTGGAGACAGGCCTTTCCCTTATG
GGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCA
GAGCGCAACCCCTGTCCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGCTAGAAGTCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGG
TACAAAGGGCAGCGAACCCGCGAGGGGGAGCGAATCCAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCTCGGGC
CTTGACACACCCCGCTCACACCACGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCCGCAAGGGAG
CCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTA 3'

F12-BT-01

5' GCGGGCTTGAGGAGGGCTTGCCTTCGAGAGCCAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACACCGGGGGCCGCATGGCTTCC
GGTTGAAAGGCGGCTTTGGCTGCCACTTACGGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGCGGGTAACG
GCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCCKCGTGA
GCGAGGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAAGGCGCGCCGTTTGAACAGGGCGGGCGC
GGTGACGGTACCTGACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGGGGCGAG
CGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAATCCGCGGCT
CAACCGCGGGTGTGCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAAAGAGGGGAGCGGAATCCCGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCCGCAACTGACCGTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGAGGGGATTGACCCTTGTAGTGTGCTGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGGTCTGGAGACAGGCCTTCCCTTATGGGACAGCGGT
GACAGGTGGTGCATGGTYGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTGTCCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGCTAGAAGTCCGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGC
AGCGAACC CGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG
CATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCTCGGGCCTTGATACACA
CCGCCCGTACACCACGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCCGGTGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCCG
AAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTC 3'

F8-BHCP-011

5' AGTCGAGCGGACCGAATAGAAGCTTGCTTCTGTTNGGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
ACCTGCCCGTAAGACGGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCCGATAACCTGAAGACCGCATGGT
CTTTAGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTACGGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGG
TGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTNTGGTTTGAATAGGGCCG
TACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTG
AGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTATACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGAGGGTATCCACCCTTGTAGTGCNGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCNTGGGGAGTACGCTCGC
AAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTGACACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCTTCGGGGACAG
GGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACNTAAGGTGACTGCCGATGACAAATCGGAGGAAGG
TGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAG
GTTGCGAACC CGGAGGGGGAGCCAAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGC
CTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATC
ACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCCGGTGGGGTAACCTTACGGGAGCCAGCCG
CCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTC 3'

F12-RT-091

5' CTATACATGCAAGTCGAGCGGACCGAATAGAAGCTTGCTTCTGTTYGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA
ACACGTGGGCAACCTGCCCGTAAGACGGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCCGATAACCCTGAA
GACCGCATGGTCTTTAGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTACGGATGGGCCCCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGC GGTTT
GAATAGGGCCGTACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGT
GAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAA
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGG
AGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACACCCCGAGAGATCGGGCGTTCCCT
TCGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGATGACAAA
TCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
GCGGTACAAAGGGTTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGG
CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCCGTTGGGGTAACCTTACG
GGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGA 3'

F12-THO-01

5' ACATGCAAGTCGAGCGGACCAATAGAAAAGCTTGCTTTTCTTGTAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGCAACCTACCTGTAAGACTGGGATAACTTACGAAACGTGAGCTAATACCGGATAGTTTCACTTC
TCGCATGAGAAGTGAAGGAAAGATGGCTTTTAGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCNACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGT
AACTGTGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATCATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGA
AATCTTGGCGCTCAACCGCAAGCGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGGAACACCAGTGGCGAATGCGGCTTTCTGGCCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACCGA
TGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCACTGCTGACGTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGA
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCCTGACCACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTC
GGGACAGGATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCATTCACTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGCTAAAAGTCCG
GAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATG
GTACAAAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTG
CAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
TCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCCGTTGAGGTAACCTTTTGGGA
GCCAGCCCGCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG 3'

F12-THO-02

5' CTACACATGCAAGTCGAACGGTTCCTTCGGGGACAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGC
CCTTCGGTTCGGAATAACTCAGGGAACTTGAGCTAATACCGGATACGTCCGAGTAGGAGAAAGATTTATC
GCCGAAGGATCGGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGC
TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGGACAATGGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAA
GCTCTTTTGTCCGGGACGATRATGACGGTACCAGGAAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGACGTTTAAAGTC
AGGGGTGAAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCCTTTGATACTGGATGTCTCGAGACCGGAAGAGGTAA
GTGGAACCTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGAACCACAKTGGCGAAGGCGGCTTACTG
GTCCGGTTCTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGC
TAAACGATGGATGCTAGCCGTTGGGCAGCTTGCCTGTTTCAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATCCCGCC
TGGGGAGTACGGTGCGAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCGCGTATGGATGCCAGAGATGGCTTC
CTTCAGTTCGGCTGGCGCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCCCTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACCTTAGGGGGACTGCCGG
TGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGCGGTGACAATGGGCAGCGAAAGGGCGACCTGGAGCTAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTTACA
TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATA
CGTTCGGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGAAGGCGCTGCGCCAAC
CGCAAGGGGGCAGGCGACCACGGTAGGGTACGCGACTGGGGTGAAGT 3'

F12-RT-101

5' ACATGCAAGTCGAGCGGACCTGWATGGAGCTTGTCCAGACAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTAGGCAACCTGCCCGAAAGACCGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGGATAGGGCACTCTCTC
GCTAGAGAGATGCGGAAAGGTGGCGCAAGCTACCATTGCGGATGGGCCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGGGGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAA
CGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAGTTCTGTTGTGTCAGGGACGAACAAGTACCGTTCGAAC
AGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCGGGTAAGTCTGATGTTAAA
GCCCCGGGCTCAACCCCGGTTTCGATTGGAACTGCTCGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTC
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGTCTGTA
ACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAG
TGCTAGGTGTTGGGGGTTTCAACACCCCTCAGTGCCGACGTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GCTCGCTAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACCGCCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGG
CAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGCAACAAGACGGAGG
AAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTAC
AACGGGACGCAAGCCCGCGAGGGTAAGCCAACTCTTAAACCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAAC
TCGCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCGCAAGGAGCCAGC
CGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGT 3'

Appendice B

Séquence ADN partielle du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S
de la souche F12-RT-051

F12-RT-051

5 ' CTATACATGCAAGTCGAGCGGACCGAACGGAAGCTTGCTTCTGTTTCGGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAACTGCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACACCGAA
GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGTGGCTTTTGTACTACTTACGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCGACGCCgCGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAGAAGTACCGTTC
GAATAGGGCGGTACGGTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAgGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGGGACTTGAGTGCAgAAgAGGAgAGCGGAA
TTCCACGTGTAgCGgTGAAATGCGTAgAGATGTGGAGGAACACCAgTGGCgAAgGCgGCTCTCTGGTCTGT
AACTGACgCTgAgGCGCGAAAGCgTGgGGAgCAAACagGATTAgATACCCTGGTAgTCCACgCCgTAaACg
ATgAgTGCTAAgTGTTAgAgGGGTTTTCCC 3 '

Références

- ABDEL-FATTAH, Y. R. 2002. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design. Biotechnology Letters. vol. 24, p. 1217-1222.
- ALLAN, R. N., L. Lebbe, J. Heyrman, P. De Vos, C. J. Buchanan et N. A. Logan. 2005. *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 55, p. 1039-1050.
- ARPIGNY, J. L., et K. E. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. The Biochemical Journal. vol. 343 Pt 1, p. 177-183.
- ASH, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks et M. D. Collins. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology. vol. 13, no. 4, p. 202-206.
- AULING, G., H. J. Busse, T. Egli, T. Elbanna et E. Stackebrandt. 1993. Description of the gram-negative, obligately aerobic, nitrilotriacetate (NTA)-utilizing bacteria as *Chelatobacter heintzii*, gen. nov., sp. nov., and *Chelatococcus asaccharovorans*, gen. nov., sp. nov. Systematic and Applied Microbiology. vol. 16, no. 1, p. 104-112.
- BANAT, I. M., R. Marchant et T. J. Rahman. 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 54, p. 2197-2201.
- BARNABÉ, S., J.-L. Sasseville, R. D. Tyagi et J. R. Valéro. 2003. Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? VECTEUR environnement. vol. 36, no. 2, p. 50-62.
- BAUER, M. W., et R. M. Kelly. 1998. The family 1 beta-glucosidases from *Pyrococcus furiosus* and *Agrobacterium faecalis* share a common catalytic mechanism. Biochemistry. vol. 37, no. 49, p. 17170-17178.
- BEAUDET, R., C. Gagnon, J. G. Bisailon et M. Ishaque. 1990. Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste. Applied and Environmental Microbiology. vol. 56, no. 4, p. 971-976.

- BECKER, P., I. Abu-Reesh, S. Markossian, G. Antranikian et H. Märkl. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 48, no. 2, p. 184-190.
- BECKER, P., et H. Märkl. 2000. Modeling of olive oil degradation and oleic acid inhibition during chemostat and batch cultivation of *Bacillus thermoleovorans* IHI-91. Biotechnology and Bioengineering. vol. 70, no. 6, p. 630-637.
- BEISSON, F., A. Tiss, C. Riviere et R. Verger. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. European Journal of Lipid Science and Technology. vol. 102, no. 2, p. 133-153.
- BRADDOO, S., R. K. Saxena et R. Gupta. 1999. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 15, no. 1, p. 87-91.
- BROCKERHOFF, H., et R. G. Jensen. 1974. Lipases. Chap. In Lipolytic enzymes, p.25-34. New York: Academic Press.
- BRUINS, M. E., A. E. Janssen et R. M. Boom. 2001. Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. Applied Biochemistry and Biotechnology. vol. 90, no. 2, p. 155-186.
- BRZOZOWSKI, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hüge-Jensen, S. A. Patkar et L. Thim. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature. vol. 351, no. 6326, p. 491-494.
- BURCU BAKIR ATEŞLİER, Z., et K. Metin. 2006. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. Enzyme and Microbial Technology. vol. 38, p. 628-635.
- CASTONGUAY, H. 2005. Étude des microorganismes aérobies thermophiles isolés d'un bioréacteur traitant le lisier de porc, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 126 p.
- CASTRO-OCHOA, L. D., C. Rodríguez-Gómez, G. Valerio-Alfaro et R. Oliart Ros. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme and Microbial Technology. vol. 37, p. 648-654.
- CHEN, J. Y., C. M. Wen et T. L. Chen. 1999. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. Biotechnology and Bioengineering. vol. 62, no. 3, p. 311-316.

- ÇOLAK, A., D. Sisik, N. Saglam, S. Guner, S. Canakci et A. O. Belduz. 2005. Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2. Bioresource Technology. vol. 96, no. 5, p. 625-631.
- COMBET-BLANC, Y., B. Ollivier, C. Streicher, B. K. C. Patel, P. P. Dwivedi, B. Pot, G. Prensier et J. L. Garcia. 1995. *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amylolytic bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology. vol. 45, no. 1, p. 9-16.
- CYGLER, M., et J. D. Schrag. 1997. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. Methods in Enzymology. vol. 284, p. 3-27.
- DAVIS, K. E., S. J. Joseph et P. H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology. vol. 71, no. 2, p. 826-834.
- DEMAIN, A. L. 2000. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. Biotechnology Advances. vol. 18, no. 6, p. 499-514.
- DEMIRJIAN, D. C., F. Moris-Varas et C. S. Cassidy. 2001. Enzymes from extremophiles. Current Opinion in Chemical Biology. vol. 5, no. 2, p. 144-151.
- DEREKOVA, A., C. Sjöholm, R. Mandeva et M. Kambourova. 2007. *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria). Extremophiles. vol. 11, no. 4, p. 577-583.
- DÉZIEL, É. 2001. Mécanismes physiologiques permettant à *Pseudomonas aeruginosa* d'accéder aux composés organiques hydrophobes : rôle de l'adhérence et des biosurfactants, et implication dans la formation de biofilms, Université de Montréal, Département des génies civil, géologique, et des mines, Écoles Polytechnique de Montréal, 254 p.
- EDWARDS, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde et E. C. Böttger. 1989. Isolation and complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research. vol. 17, no. 19, p. 7843-7853.
- EINARSSON, H., B. G. Snygg et C. Eriksson. 1983. Inhibition of Bacterial Growth by Maillard Reaction Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. vol. 31, no. 5, p. 1043-1047.
- ELEND, C., C. Schmeisser, C. Leggewie, P. Babiak, J. D. Carballeira, H. L. Steele, J. L. Raymond, K. E. Jaeger et W. R. Streit. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. Applied and Environmental Microbiology. vol. 72, no. 5, p. 3637-3645.

- FAIZ, O., A. Colak, N. Saglam, S. Canakci et A. O. Belduz. 2007. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. vol. 40, no. 4, p. 588-594.
- FAKHREDDINE, L., A. Kademi, N. Aït-Abdelkader et J. C. Baratti. 1998. Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. Biotechnology Letters. vol. 20, no. 9, p. 879-883.
- FERRATO, F., F. Carriere, L. Sarda et R. Verger. 1997. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. Methods in Enzymology. vol. 286, p. 327-347.
- FIELDS, P. A. 2001. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular and Integrative Physiology. vol. 129, no. 2-3, p. 417-431.
- FOJAN, P., P. H. Jonson, M. T. Petersen et S. B. Petersen. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. Biochimie. vol. 82, no. 11, p. 1033-1041.
- GERHARDT, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood et N. R. Krieg. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 791 p.
- GUPTA, N., G. Mehra et R. Gupta. 2004. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. Canadian Journal of Microbiology. vol. 50, no. 5, p. 361-368.
- GUPTA, N., P. Rathi et R. Gupta. 2002. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. Analytical Biochemistry. vol. 311, no. 1, p. 98-99.
- GUPTA, R., N. Gupta et P. Rathi. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 64, no. 6, p. 763-781.
- GUPTA, R., P. Rathi, N. Gupta et S. Bradoo. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnology and Applied Biochemistry. vol. 37, Pt 1, p. 63-71.
- HAKI, G. D., et S. K. Rakshit. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology. vol. 89, no. 1, p. 17-34.

- HANDELSMAN, T., et Y. Shoham. 1994. Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. Journal of General and Applied Microbiology. vol. 40, no. 5, p. 435-443.
- HENNE, A., R. A. Schmitz, M. Bomeke, G. Gottschalk et R. Daniel. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. vol. 66, no. 7, p. 3113-3116.
- HOLČAPEK, M., P. Jandera, P. Zderadička et L. Hrubá. 2003. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A. vol. 1010, no. 2, p. 195-215.
- HOLMQUIST, M. 2000. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. Current Protein and Peptide Science. vol. 1, no. 2, p. 209-235.
- HSU, S. C., et J. L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. Applied Microbiology. vol. 29, no. 3, p. 422-426.
- JAEGER, K. E., B. W. Dijkstra et M. T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annual Review of Microbiology. vol. 53, p. 315-351.
- JAEGER, K. E., et T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. vol. 13, no. 4, p. 390-397.
- JAEGER, K. E., K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek et M. T. Reetz. 1996. Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 46, no. 2, p. 99-105.
- JAEGER, K. E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel et O. Misset. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews. vol. 15, no. 1, p. 29-63.
- JAEGER, K. E., et M. T. Reetz. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends in Biotechnology. vol. 16, no. 9, p. 396-403.
- JENSEN, R. G., T. A. Marks, J. Sampugna, J. G. Quinn et D. L. Carpenter. 1966. Purification of triglycerides with an alumina column. Lipids. vol. 1, no. 6, p. 451-452.
- JOSEPH, S. J., P. Hugenholtz, P. Sangwan, C. A. Osborne et P. H. Janssen. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology. vol. 69, no. 12, p. 7210-7215.

- JUTEAU, P., V. Côté, M. F. Duckett, R. Beaudet, F. Lépine, R. Villemur et J. G. Bisailon. 2005. *Cryptanaerobacter phenolicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobe that transforms phenol into benzoate via 4-hydroxybenzoate. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 55, p. 245-250.
- JUTEAU, P., D. Tremblay, C. B. Ould-Moulaye, J. G. Bisailon et R. Beaudet. 2004. Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors. Water Research. vol. 38, no. 3, p. 539-546.
- JUTEAU, P., D. Tremblay, R. Villemur, J. G. Bisailon et R. Beaudet. 2004. Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 66, no. 1, p. 115-122.
- KADEMI, A., N. Aït-Abdelkader, L. Fakhreddine et J. Baratti. 2000. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 54, no. 2, p. 173-179.
- KIM, H. K., S. Y. Park, J. K. Lee et T. K. Oh. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. vol. 62, no. 1, p. 66-71.
- KIM, K. W., et S. B. Lee. 2003. Inhibitory effect of Maillard reaction products on growth of the aerobic marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. Applied and Environmental Microbiology. vol. 69, no. 7, p. 4325-4328.
- KIM, M. H., H. K. Kim, J. K. Lee, S. Y. Park et T. K. Oh. 2000. Thermostable lipase of *Bacillus Stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. vol. 64, no. 2, p. 280-286.
- KIRK, O., T. V. Borchert et C. C. Fuglsang. 2002. Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology. vol. 13, no. 4, p. 345-351.
- KOUKER, G., et K. E. Jaeger. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology. vol. 53, no. 1, p. 211-213.
- KUISIENE, N., J. Raugalas et D. Chitavichius. 2004. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 54, p. 1991-1995.
- KULKARNI, N., et R. V. Gadre. 1999. A novel alkaline, thermostable, protease-free lipase from *Pseudomonas* sp. Biotechnology Letters. vol. 21, no. 10, p. 897-899.

- LABOURDENNE, S., A. Cagna, B. Delorme, G. Esposito, R. Verger et C. Riviere. 1997. Oil-drop tensiometer: applications for studying the kinetics of lipase action. Methods in Enzymology. vol. 286, p. 306-326.
- LANSER, A. C., L. K. Manthey et C. T. Hou. 2002. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. Current Microbiology. vol. 44, no. 5, p. 336-340.
- LEE, D., Y. Koh, K. Kim, B. Kim, H. Choi, D. Kim, M. T. Suhartono et Y. Pyun. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS Microbiology Letters. vol. 179, no. 2, p. 393-400.
- LEOW, T. C., R. N. Rahman, M. Basri et A. B. Salleh. 2007. A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. Extremophiles. vol. 11, no. 3, p. 527-535.
- LI, H., et X. Zhang. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. Protein Expression and Purification. vol. 42, no. 1, p. 153-159.
- LI, W. F., X. X. Zhou et P. Lu. 2005. Structural features of thermozyymes. Biotechnology Advances. vol. 23, no. 4, p. 271-281.
- LIU, C. H., W. M. Chen et J. S. Chang. 2007. Methods for rapid screening and isolation of bacteria producing acidic lipase: feasibility studies and novel activity assay protocols. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 23, p. 633-640.
- LOGAN, N. A., G. Forsyth, L. Lebbe, J. Goris, M. Heyndrickx, A. Balcaen, A. Verhelst, E. Falsen, A. Ljungh, H. B. Hansson et P. De Vos. 2002. Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 52, p. 953-966.
- LORENZ, P., K. Liebeton, F. Niehaus et J. Eck. 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. Current Opinion in Biotechnology. vol. 13, no. 6, p. 572-577.
- MANACHINI, P. L., M. G. Fortina, C. Parini et R. Craveri. 1985. *Bacillus thermoruber* sp. nov., nom. rev., a red-pigmented thermophilic bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology. vol. 35, no. 4, p. 493-496.
- MANACHINI, P. L., D. Mora, G. Nicasastro, C. Parini, E. Stackebrandt, R. Pukall et M. G. Fortina. 2000. *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 50, p. 1331-1337.

- MARCHANT, R., I. M. Banat, T. J. Rahman et M. Berzano. 2002a. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. Environmental Microbiology. vol. 4, no. 10, p. 595-602.
- MARCHANT, R., I. M. Banat, T. J. Rahman et M. Berzano. 2002b. What are high-temperature bacteria doing in cold environments? Trends in Microbiology. vol. 10, no. 3, p. 120-121.
- McMULLAN, G., J. M. Christie, T. J. Rahman, I. M. Banat, N. G. Ternan et R. Marchant. 2004. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. Biochemical Society Transactions. vol. 32, Pt 2, p. 214-217.
- MUYZER, G., E. C. de Waal et A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. vol. 59, no. 3, p. 695-700.
- NARDINI, M., et B. W. Dijkstra. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. Current Opinion in Structural Biology. vol. 9, no. 6, p. 732-737.
- NAWANI, N., N. S. Dosanjh et J. Kaur. 1998. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. Biotechnology Letters. vol. 20, no. 10, p. 997-1000.
- NAWANI, N., et J. Kaur. 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. Molecular and Cellular Biochemistry. vol. 206, no. 1-2, p. 91-96.
- NAZINA, T. N., T. P. Tourova, A. B. Poltarau, E. V. Novikova, A. A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunyaka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev et M. V. Ivanov. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearotherophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 51, p. 433-446.
- NÜBEL, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig et H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. Journal of Bacteriology. vol. 178, no. 19, p. 5636-5643.

- OLLIS, D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag et al. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. Protein Engineering. vol. 5, no. 3, p. 197-211.
- PANDA, T., et B. S. Gowrishankar. 2005. Production and applications of esterases. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 67, no. 2, p. 160-169.
- PARK, C. B., S. B. Lee et D. D. Ryu. 2001. L-pyroglutamate spontaneously formed from L-glutamate inhibits growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Applied and Environmental Microbiology. vol. 67, no. 8, p. 3650-3654.
- PIKUTA, E., D. Cleland et J. Tang. 2003. Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1(T) : Emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 53, p. 1561-1562.
- PIKUTA, E., A. Lysenko, N. Chuvilskaya, U. Mendrock, H. Hippe, N. Suzina, D. Nikitin, G. Osipov et K. Laurinavichius. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus falvithermus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 50, p. 2109-2117.
- POTVIN-BARAKATT, J. 2008. Étude de procédés complémentaires au traitement aérobie thermophile du lisier de porc, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, en préparation.
- RAINEY, F. A., D. Fritze et E. Stackebrandt. 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16s rDNA analysis. Fems Microbiology Letters. vol. 115, no. 2-3, p. 205-211.
- RANSAC, S., M. Ivanova, R. Verger et I. Panaiotov. 1997. Monolayer techniques for studying lipase kinetics. Methods in Enzymology. vol. 286, p. 263-292.
- RATHI, P., S. Bradoo, R. K. Saxena et R. Gupta. 2000. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. Biotechnology Letters. vol. 22, no. 4, p. 495-498.
- RATHI, P., V. K. Goswami, V. Sahai et R. Gupta. 2002. Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. Journal of Applied Microbiology. vol. 93, no. 6, p. 930-936.
- RATHI, P., R. K. Saxena et R. Gupta. 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. Process Biochemistry. vol. 37, p. 187-192.

- RHEE, J. K., D. G. Ahn, Y. G. Kim et J. W. Oh. 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. Applied and Environmental Microbiology. vol. 71, no. 2, p. 817-825.
- RHEE, S. K., C. O. Jeon, J. W. Bae, K. Kim, J. J. Song, J. J. Kim, S. G. Lee, H. I. Kim, S. P. Hong, Y. H. Choi, S. M. Kim et M. H. Sung. 2002. Characterization of *Symbiobacterium toebii*, an obligate commensal thermophile isolated from compost. Extremophiles. vol. 6, no. 1, p. 57-64.
- RHEE, S. K., S. G. Lee, S. P. Hong, Y. H. Choi, J. H. Park, C. J. Kim et M. H. Sung. 2000. A novel microbial interaction: obligate commensalism between a new gram-negative thermophile and a thermophilic *Bacillus* strain. Extremophiles. vol. 4, no. 3, p. 131-136.
- ROSENAU, F., et K. E. Jaeger. 2000. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. Biochimie. vol. 82, no. 11, p. 1023-1032.
- SALAMEH, M., et J. Wiegel. 2007. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. Advances in Applied Microbiology. vol. 61, p. 253-283.
- SAN CLEMENTE, C. L., et D. V. Vadehra. 1967. Instrumental assay of microbial lipase at constant pH. Applied Microbiology. vol. 15, no. 1, p. 110-113.
- SARDA, L., et P. Desnuelle. 1958. [Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions.]. Biochimica et Biophysica Acta. vol. 30, no. 3, p. 513-521.
- SARKAR, S., B. Sreekanth, S. Kant, R. Banerjee et B. C. Bhattacharyya. 1998. Production and optimization of microbial lipase. Bioprocess Engineering. vol. 19, p. 29-32.
- SCHÄFFER, C., W. L. Franck, A. Scheberl, P. Kosma, T. R. McDermott et P. Messner. 2004. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 54, p. 2361-2368.
- SCHALLMEY, M., A. Singh et O. P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology. vol. 50, no. 1, p. 1-17.
- SCHMIDT-DANNERT, C., M. L. Rua, S. Wahl et R. D. Schmid. 1997. *Bacillus thermocatenuulatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. Biochemical Society Transactions. vol. 25, no. 1, p. 178-182.

- SCHOLZ, T., W. Demharter, R. Hensel et O. Kandler. 1987. *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage. Systematic and Applied Microbiology. vol. 9, p. 91-96.
- SHELLEY, A. W., H. C. Deeth et I. C. MacRae. 1987. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. Journal of Microbiological Methods. vol. 6, no. 3, p. 123-137.
- SHIDA, O., H. Takagi, K. Kadowaki et K. Komagata. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. vol. 46, no. 4, p. 939-946.
- SHIDA, O., H. Takagi, K. Kadowaki et K. Komagata. 1997. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. (vol 46, pg 940, 1996). International Journal of Systematic Bacteriology. vol. 47, no. 1, p. 248-248.
- SHIMAHARA, K., et Y. Takiguchi. 1988. Preparation of crustacean chitin. Methods in Enzymology. vol. 161, p. 417-423.
- SINCHAIKUL, S., B. Sookkheo, S. Phutrakul, F. M. Pan et S. T. Chen. 2001. Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification, and characterization. Protein Expression and Purification. vol. 22, no. 3, p. 388-398.
- SINCHAIKUL, S., B. Sookkheo, S. Phutrakul, Y. T. Wu, F. M. Pan et S. T. Chen. 2001. Structural modeling and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. Biochemical and Biophysical Research Communications. vol. 283, no. 4, p. 868-875.
- STRÁNSKÝ, K., M. Zarevúcka, Z. Kejík, Z. Wimmer, M. Macková et K. Demnerová. 2007. Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. Biochemical Engineering Journal. vol. 34, p. 209-216.
- SÜRÜCÜ, G. 1999. Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes. Water Science and Technology. vol. 40, no. 1, p. 53-60.
- SUNG, M. H., H. Kim, J. W. Bae, S. K. Rhee, C. O. Jeon, K. Kim, J. J. Kim, S. P. Hong, S. G. Lee, J. H. Yoon, Y. H. Park et D. H. Baek. 2002. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol. 52, p. 2251-2255.

- SUNNA, A., S. Tokajian, J. Burghardt, F. Rainey, G. Antranikian et F. Hashwa. 1997. Identification of *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermocatenuulatus* and *Bacillus* strain HSR as members of *Bacillus thermoleovorans*. Systematic and Applied Microbiology. vol. 20, p. 232-237.
- THOMSON, C. A., P. J. Delaquis et G. Mazza. 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. vol. 39, no. 2, p. 165-187.
- TREMBLAY, D. 2003. Caractérisation de la flore microbienne d'un bioprocédé aérobie thermophile pour le traitement du lisier de porc, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 151 p.
- TYNDALL, J. D., S. Sinchaikul, L. A. Fothergill-Gilmore, P. Taylor et M. D. Walkinshaw. 2002. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. Journal of Molecular Biology. vol. 323, no. 5, p. 859-869.
- van BEILEN, J. B., et Z. Li. 2002. Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology. vol. 13, no. 4, p. 338-344.
- VERGER, R. 1997. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. Trends in Biotechnology. vol. 15, p. 32-38.
- VIEILLE, C., et G. J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews. vol. 65, no. 1, p. 1-43.
- VILLEMUR, R., P. Constant, A. Gauthier, M. Shareck et R. Beaudet. 2007. Heterogeneity between 16S ribosomal RNA gene copies borne by one *Desulfitobacterium* strain is caused by different 100-200 bp insertions in the 5' region. Canadian Journal of Microbiology. vol. 53, no. 1, p. 116-128.
- VOET, D., et J. G. Voet. 1998. Biochimie. 2e édition. Bruxelles: De Boeck Université, 1361 p.
- VOGET, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. E. Jaeger et W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. Applied and Environmental Microbiology. vol. 69, no. 10, p. 6235-6242.
- von TIGERSTROM, R. G., et S. Stelmaschuk. 1989. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. Canadian Journal of Microbiology. vol. 35, no. 4, p. 511-514.
- WANG, Y., K. C. Srivastava, G.-J. Shen et H. Y. Wang. 1995. Thermostable alkaline lipase from newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841). Journal of Fermentation and Bioengineering. vol. 79, no. 5, p. 433-438.

WU, G. J., et G. J. Tsai. 2004. Cellulase degradation of shrimp chitosan for the preparation of water-soluble hydrolysate with immunoactivity. Fisheries Science. vol. 70, p. 1113-1120.

ZEIKUS, J. G., C. Vieille et A. Savchenko. 1998. Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships. Extremophiles. vol. 2, no. 3, p. 179-183.