

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)



Département : Biotechnologie

N° d'ordre : 34/DS/2019

N° de série : 04/IN/2019

Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Sciences Alimentaires

Thème

**Contribution à l'étude de la diversité des bactéries
thermophiles de quelques environnements chauds
algériens et essai de production et de caractérisation
de leurs protéases extracellulaires**

Présentée par :

GOMRI Mohamed Amine

Soutenue le : 13/02/2019

Devant le Jury composé de :

Présidente :	Pr. BARKAT Malika	INATAA, Univ. Frères Mentouri Constantine1
Rapporteur :	Pr. KHARROUB Karima	INATAA, Univ. Frères Mentouri Constantine1
Examineurs :	Pr. KARAM Nour-Eddine	Univ. d'Oran 1 Ahmed Ben Bella
	Pr. HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid	SNV, Univ. Frères Mnetouri Constantine1
	Pr. DJABRI Belgacem	Univ. Larbi Tébessi, Tebessa
	Dr. YAHIAOUI Bilal	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Pr. Malika Barkat, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance de cette thèse et à messieurs les membres du jury qui ont bien voulu prendre sur leur temps et évaluer ce travail. Je cite :

- Pr. Nour-Eddine Karam, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella ;
- Pr. Mohamed Abdelhafid Hamidechi, Université Frères Mentouri Constantine 1 ;
- Pr. Belgacem Djabri, Université Larbi Tébessi Tébessa ;
- Dr. Bilal Yahiaoui, Université Ferhat Abbas Sétif 1 ;

À Pr. Karima Kharroub, chef d'équipe Métabolites des extrémophiles (METEX) et directrice du laboratoire de recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Université Frères Mentouri Constantine 1, qui m'a fait l'honneur de proposer et de diriger ce travail. Je lui sais gré pour la confiance qu'elle m'a accordée durant toutes ces années, pour sa disponibilité et pour ses encouragements sans lesquels ce travail n'aurait jamais pu aboutir.

Je tiens également à adresser toute ma reconnaissance à Dr. Djamel-Eddine Mekhancha et à Pr. Lahcène Nezzal du laboratoire de recherche Alimentation, Nutrition et Santé, Universités Frères Mentouri Constantine 1 et Salah Boubnider Constantine 3, pour m'avoir permis d'accéder aux moyens du laboratoire, pour leur confiance et leurs encouragements.

À Pr. Abdelghani Boudjellal, directeur de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1, pour son aide et ses encouragements. Qu'il reçoit ici toute ma gratitude.

Je tiens à remercier chaleureusement Pr. Don A. Cowan, directeur du centre d'écologie microbienne et de génomique (CMEG), Université de Pretoria, Afrique du Sud, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser toutes les analyses génétiques dans son laboratoire. Je tiens également à remercier Dr. Thulani P. Makhalanyane, Dr. Oliver K. Bezuidt, Dr. Marc W. Van Goethem, Dr. Angel Valverde, ainsi que Dr. Fiyinfoluwa Adesioye-Olaitan du même centre pour leur contribution à ce travail.

Mes vifs remerciements vont également à Pr. María-Isabel González-Siso du département de biologie cellulaire et moléculaire, Université de la Corogne, Espagne, pour m'avoir permis de réaliser la partie protéomique. Je remercie également les autres membres de l'équipe régulation de l'expression génétique et ses applications (EXPRELA) : Dr. María-Esperanza Cerdán, Dr. Mónica Lamas-Maceiras, Dr. Agustín Rico-Díaz et Dr. Juan-José Escuder-Rodríguez pour leur aide précieuse.

Mes sincères remerciements vont également à toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, notamment les collègues enseignants, je citerai en particulier Mmes. Tedj El-Moulouk Khaldi et Nadia Bachtarzi, mais aussi M. Loucif Chemache pour leur aide et contribution. Sans oublier l'ensemble du personnel administratif et technique de l'I.N.A.T.A.A.

Enfin, je tiens à exprimer mes profonds sentiments de gratitude et de reconnaissance à ma famille qui m'a soutenu et encouragé durant toutes ces années d'étude et de travail. À mon père, Achour Gomri qui m'a accompagné dans toutes mes sorties de terrain et qui a toujours cru en moi. À ma mère, Yamina Gomri, pour son vital soutien moral et affectif.

MERCI.

Pour Aicha

Table des matières

	Page
Avant-propos	I
Liste des abréviations	II
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	VI
Introduction	1
Revue bibliographique	
Chapitre 1. Organismes thermophiles et leurs applications	6
1. Extrémophilie.....	6
1.1. Notion anthropocentrique de l'environnement extrême.....	6
1.2. Organismes extrémophiles.....	6
1.3. Intérêt des extrémophiles.....	7
2. Thermophilie comme limite extrême.....	8
3. Habitats des thermophiles.....	9
3.1. Habitats naturels.....	9
3.1.1. Zones volcaniques et sources géothermales terrestres.....	10
3.1.2. Réservoirs pétroliers.....	11
3.1.3. Sols et sédiments chauffés par le soleil.....	11
3.2. Habitats artificiels.....	11
4. Diversité des microorganismes thermophiles.....	12
4.1. Diversité microbienne des sources chaudes terrestres.....	13
4.2. Diversité microbienne des réservoirs pétroliers.....	13
4.3. Diversité microbienne des sols/sédiments chauffés par le soleil.....	15
5. Mécanismes d'adaptation des organismes thermophiles.....	15
5.1. Stabilité des protéines.....	15
5.2. Stabilité des acides nucléiques.....	16
5.3. Stabilité des lipides membranaires.....	17
5.4. Accumulation des solutés compatibles.....	17
6. Bactéries aérobies thermophiles formant-endospores.....	19
6.1. Position taxonomique des bactéries aérobies thermophiles formant-endospores.....	19
6.2. Taxonomie des membres thermophiles de l'ordre des <i>Bacillales</i>	19
7. Applications des thermophiles.....	20
7.1. Exemples d'utilisations des cellules.....	20

7.1.1. Bioremédiation.....	20
7.1.2. Traitement de matières lignocellulosiques.....	20
7.1.3. Biocontrôle.....	21
7.1.4. Production d'énergie.....	21
7.1.5. Cellules hôtes.....	21
7.1.6. Utilisations en Nanotechnologie.....	22
7.2. Utilisations de biomolécules.....	22
7.2.1. Solutés compatibles.....	22
7.2.2. Substances antimicrobiennes.....	22
7.2.3. Lipides et biopolymères.....	23
7.2.4. Enzymes employées en biologie moléculaire et en biocatalyse.....	23
7.2.5. Enzymes de dégradation.....	24
Chapitre 2. Bioprospection des microorganismes thermophiles.....	27
1. Méthodes de bioprospection des microorganismes thermophiles.....	28
1.1. Étude de la diversité des populations microbiennes thermophiles.....	28
1.1.1. Méthodes culturales.....	28
1.1.2. Méthodes non culturales.....	29
1.2. Bioprospection de nouvelles enzymes.....	29
2. Approche polyphasique de la taxonomie des procaryotes.....	30
3. Approche protéomique de l'étude des microorganismes thermophiles.....	31
3.1. Extraction et préparation des solutions protéiques.....	31
3.2. Séparation et purification des protéines.....	31
3.3. Identification des protéines.....	32
Chapitre 3. Protéases.....	33
1. Définition et rôles physiologiques des protéases.....	33
2. Classification des protéases.....	33
3. Mécanismes catalytiques.....	34
4. Sources des protéases.....	35
5. Applications des protéases.....	36
5.1. En industrie agroalimentaire.....	36
5.2. Autres applications.....	38
Matériel et Méthodes.....	39
1. Préambule.....	39
1.1. Déroulement de l'expérimentation.....	39
1.2. Échantillonnage.....	41

1.2.1. Description des sites étudiés.....	41
1.2.2. Prélèvement des échantillons.....	45
1.2.2.1. Isolement des souches.....	45
1.2.2.2. Analyse métagénomique.....	45
2. Isolement, purification et sélection des souches bactériennes.....	47
2.1. Isolement et purification des souches bactériennes.....	47
2.2. Conservation des isolats.....	49
2.3. Caractérisation morphologique des isolats.....	49
2.4. Screening des activités protéolytiques extracellulaires.....	51
2.4.1. Dégradation de la gélatine.....	51
2.4.2. Dégradation de la caséine.....	51
3. Caractérisation moléculaire des isolats.....	51
3.1. Extraction de l'ADN génomique.....	51
3.2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution.....	52
3.3. Réaction de polymérisation en chaîne des gènes de l'ARNr 16S.....	53
3.4. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR.....	54
3.5. Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié.....	55
3.6. Purification des produits PCR.....	57
3.7. Séquençage des produits PCR.....	57
3.8. Analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S.....	58
3.8.1. Alignement avec les séquences nucléotidiques des banques de données biologiques...	58
3.8.2. Étude phylogénétique.....	58
3.8.3. Numéros d'accèsion des séquences nucléiques.....	59
3.9. Analyse génomique.....	59
3.9.1. Préparation des échantillons.....	59
3.9.2. Séquençage MiSeq Illumina.....	59
3.9.3. Traitement bioinformatique.....	59
4. Analyse métagénomique.....	61
4.1. Extraction de l'ADN environnemental.....	61
4.2. Purification de l'ADN environnemental extrait.....	61
4.3. Séquençage MiSeq Illumina.....	64
4.4. Traitement bioinformatique.....	64
5. Caractérisation phénotypique des isolats.....	65
5.1. Caractérisation physiologique.....	65
5.1.1. Détermination des intervalles limites et des optima de croissance.....	65

5.1.2. Utilisation des substrats carbonés comme unique source de carbone, d'azote et d'énergie.....	66
5.1.3. Détermination de la croissance en anaérobiose.....	66
5.2. Caractérisation biochimique.....	66
5.3. Construction de phénogramme.....	68
6. Caractérisation des activités protéasiques extracellulaires des souches.....	69
6.1. Dosage de l'activité protéasique.....	69
6.1.1. Dosage de l'activité protéasique à l'azocaséine.....	69
6.1.2. Dosage de l'activité protéasique à la caséine.....	70
6.1.3. Dosage par fluorescence à la caséine BODIPY FL.....	70
6.2. Sélection de souches productrices de protéases extracellulaires.....	71
6.3. Mesure de la croissance en conditions de fermentation.....	71
6.4. Production des protéases extracellulaires.....	72
6.5. Purification des protéases extracellulaires.....	74
6.5.1. Étapes d'extraction.....	74
6.5.2. Purification par méthodes chromatographiques.....	74
6.5.2.1. Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions.....	75
6.5.2.2. Purification et concentration sur système Amicon.....	75
6.5.2.3. Fractionnement par filtration sur gel.....	75
6.6. Dosage des protéines totales et expression de l'activité enzymatique	76
6.7. Caractérisation des protéases.....	76
6.7.1. Détermination du poids moléculaire et zymographie.....	76
6.7.1.1. Électrophorèse SDS-PAGE.....	76
6.7.1.2. Zymographie.....	78
6.7.1.3. Lecture des gels et détermination du poids moléculaire.....	79
6.7.2. Détermination de la température optimale de l'activité protéasique.....	79
6.7.3. Effet du chauffage à température optimale sur l'activité protéasique.....	79
6.7.4. Détermination du pH optimal de l'activité protéasique.....	80
6.7.5. Effet des métaux lourds sur l'activité protéasique.....	80
6.7.6. Effet des solvants sur l'activité protéasique.....	80
6.7.7. Effet des détergents et des inhibiteurs sur l'activité protéasique.....	80
6.8. Analyse statistique.....	80
Résultats et Discussion.....	81
1. Caractéristiques physico-chimiques des sites de l'étude.....	81
2. Isolement, purification et sélection des souches.....	85

2.1.	Caractères morphologiques des isolats.....	89
2.1.1.	Caractères culturels.....	89
2.1.2.	Caractères microscopiques.....	91
2.2.	Activités protéolytiques extracellulaires des isolats.....	94
3.	Caractérisation moléculaire des isolats par analyse des gènes de l'ARNr 16S.....	95
3.1.	Amplification des gènes de l'ARNr 16S.....	95
3.2.	Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié.....	97
3.3.	Séquençage et analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S.....	100
3.3.1.	Alignement avec les séquences nucléotidiques des banques de données biologiques.....	100
3.3.2.	Liens phylogénétiques.....	102
4.	Caractérisation des génomes.....	104
4.1.	Souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69.....	104
4.2.	Souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95.....	115
5.	Analyse métagénomique.....	121
6.	Caractérisation phénotypique des souches.....	129
6.1.	Liens de parenté phénotypiques.....	133
7.	Caractérisation des activités protéasiques extracellulaires des souches.....	139
7.1.	Sélection de souches productrices de protéases extracellulaires.....	139
7.2.	Conditions optimales de croissance en milieu de culture liquide.....	143
7.2.1.	Conditions optimales de croissance de la souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69.....	143
7.2.2.	Conditions optimales de croissance de la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95.....	145
7.2.3.	Conditions optimales de croissance de la souche <i>Brevibacillus</i> sp. OA30.....	147
7.3.	Production des protéases extracellulaires.....	149
7.3.1.	Production de protéases extracellulaires par la souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69.....	149
7.3.2.	Production de protéases extracellulaires par la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95...	150
7.3.3.	Production de protéases extracellulaires par la souche <i>Brevibacillus</i> sp. OA30.....	152
7.4.	Purification des protéases extracellulaires des souches <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 et <i>Brevibacillus</i> sp. OA30.....	152
7.4.1.	Extraction des protéines extracellulaires.....	152
7.4.2.	Purification des extraits protéasiques.....	156
7.4.2.1.	Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions.....	156
7.4.2.2.	Fractionnement par filtration sur gel.....	158
7.5.	Caractéristiques des protéases purifiées.....	160
7.5.1.	Poids moléculaire et zymogramme.....	160
7.5.2.	Températures optimales des activités protéasiques.....	162
7.5.3.	Stabilité des protéases à température optimale.....	164

7.5.4. pH optimaux des activités protéasiques.....	166
7.5.5. Effet des agents chimiques sur l'activité protéasique.....	168
Conclusion.....	172
Références bibliographiques.....	175
Annexes	i-xxxvi
Résumés	

Avant-propos

Le présent travail a fait l'objet des publications et des communications internationales et nationales suivantes :

Bezuidt, O. K., T. P. Makhalanyane, **M. A. Gomri**, K. Kharroub et D. A. Cowan Draft genome sequence of thermophilic *Geobacillus* sp. strain Sah69, isolated from Saharan soil, southeast Algeria. Genome announcements, 2015, 3(6). [<https://doi.org/10.1128/genomea.01447-15>] ;

Bezuidt, O. K., R. Pierneef, **M. A. Gomri**, F. Adesioye, T. P. Makhalanyane, K. Kharroub et D. A. Cowan The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(723). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00723>] ;

Bezuidt, O. K., **M. A. Gomri**, R. Pierneef, M. W. Van Goethem, K. Kharroub, D. A. Cowan et T. P. Makhalanyane Draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 isolated from a Sebkhha in Thamelah, Algeria. Standards in Genomic Sciences, 2016, 11(1), 68. [<https://doi.org/10.1186/s40793-016-0186-2>] ;

Gomri, M. A., A. Rico-Díaz, J.-J. Escuder-Rodríguez, T. E. Khaldi, M.-I. González-Siso et K. Kharroub Production and Characterization of an Extracellular Acid Protease from Thermophilic *Brevibacillus* sp. OA30 Isolated from an Algerian Hot Spring. Microorganisms, 2018, 6(2), 31. [<https://doi.org/10.3390/microorganisms6020031>] ;

Gomri M. A., T.E. Khaldi, K. Kharroub. Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods. Annals of Microbiology, 2018, 68(12): 915. [<https://doi.org/10.1007/s13213-018-1401-8>] ;

Gomri M. A., K. Kharroub, T.E. Khaldi. Phenotypic and molecular characterization of two thermophilic aerobic bacteria strains isolated from an Algerian hot spring and investigation of their hydrolase production. Séminaire International des Biotechnologies, Constantine, Octobre 2015 ;

Gomri M. A., K. Kharroub, T.E. Khaldi. Diversity of thermophilic *Bacillus* species in 02 algerian terrestrial hot springs. 2^e Workshop International Gestion et Amélioration Génétique Des Ressources Végétales Et Microbiennes, Tlemcen, Mars 2017 ;

Gomri M.A. Study of thermophilic aerobic bacteria with proteolytic activity isolated from Algerian hot environments. International Minisymposium : Metagenomics of thermophiles and thermozymes, La Corogne, Espagne, Mai 2017 ;

Gomri M. A., T.E. Khaldi, K. Kharroub. Characterization of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria with extracellular proteases from Two Algerian hot springs. Séminaire International sur les Sciences Alimentaires, Constantine, Octobre 2018 ;

Gomri M. A., T.E. Khaldi, K. Kharroub. Production and characterization of an extracellular protease from thermophilic *Thermoactinomyces* sp. AS95 isolated from an Algerian Sebkhha. Séminaire International sur les Sciences Alimentaires, Constantine, Octobre 2018 ;

Lahmer-Benmebarek H., **M. A. Gomri**, K. Kharroub. *Anoxybacillus* spp., a thermophilic aerobic bacteria able to produce extracellular proteases, isolated from an Algerian hot spring. 20es Journées Nationales de Microbiologie, Jijel, Novembre 2014.

Liste des abréviations

▼: Valeur optimale de croissance	g: force gravitationnelle
°F: degré Français	GOLD: <i>Genomes OnLine Database</i>
1D: monoDimensionnelle	Gy: Gray
2-DE: <i>2-Dimensional Electrophoresis</i>	HPLC: <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
act: activité protéasique	id.sym.: identité symétrique
ADN: Acide DésoxyriboNucléique	IE: Focalisation Isoélectrique Préparative
ALNUTS: Laboratoire de recherche ALimentation, NUtrition et Santé	IJSEM: <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>
ANOVA: <i>ANalysis Of VAriance</i>	IMG/M: <i>Integrated Microbial Genomes and Microbiomes</i>
APS: <i>Ammonium PerSulfate</i>	INATAA: Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires
ARDRA: <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>	IS: Isolement de Souches bactériennes
ARNr: Acide RiboNucléique ribosomal	iso.: isolement
AS: Thamelah de Aït Smail	ITS: <i>Internal Transcribed Spacer</i>
ATCC: <i>American Type Culture Collection</i>	IUBMB: <i>International Union for Biochemistry and Molecular Biology</i>
ATP: Adénosine TriPhosphate	KCTC: <i>Korean Collection for Type Cultures</i>
A_w: <i>water Activity</i>	kDa: kilo Dalton
B: Blanc	KEGG: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
BAC: <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	MEB: Microscopie Électronique à Balayage
BGSC: <i>Bacillus Genetic Stock Center</i>	MEGA: <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
BIOQUAL: Laboratoire de recherche Biotechnologie et QUALité des ALiments	MG: Analyse MétaGénomique
BLAST: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	Mpa: Méga pascal
BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i>	Mrp: <i>Multidrug resistance protein</i>
cBPG: <i>cyclic 2,3-BisPhosphoGlycerate</i>	MS: <i>Mass Spectrometry</i>
CDS: <i>Coding DNA Sequences</i>	NA: Numéro d'Accession
Clustal: <i>Cluster analysis</i>	NBRC: <i>Biological Resource Center NITE</i>
CMC: CarboxyMéthylCellulose	NCBI: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
CMEG: <i>Centre for Microbial Ecology and Genomics</i>	NGS: <i>Next-Generation Sequencing</i>
COGS: <i>Clusters of Orthologous Groups</i>	NITE: <i>National Institute of Technology and Evaluation</i>
Couv.: Couverture	NT1: Tampon de liaison
CRISPR: <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	NT3: Tampon de lavage
Cryo-MEB: <i>Cryo-Microscopie Electronique à Balayage</i>	NTSYS: <i>Numerical Taxonomy SYStem</i>
Db: Debagh	OA: Ouled Ali
DDBJ: <i>DNA DataBase of Japan</i>	ONPG: 2-NitroPhényl-β-D-Galactopyrannoside
ddH₂O: eau ultra pure	Opt.: Optimal(e)
DIP: Di-myo-Inositol Phosphate	PAGE: <i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
DMA: Drainage Minier Acide	pb: paire de bases
DMSO: DiMéthylSulfOxyde	PBS: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
DNA: <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>	PC: <i>Personal Computer</i>
dNTP: désoxyriboNucléotides TriPhosphatés	PCA: <i>Plate Counting Agar</i>
DO: Densité Optique	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
DPS: <i>DNA-binding Protein from Starved cell</i>	PDB: <i>Protein Data Bank</i>
DS: Degré de Salinité	Pfam: <i>Protein families</i>
DSM: <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>	pH: potentiel Hydrogène
DTT: DiThioThréitol	PHAST: <i>PHAge Search Tool</i>
E: Essai	PMSF: <i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i>
EC: <i>Enzyme Commission</i>	prél.: prélèvement
EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique	Prot.: Protéinase
ENA: <i>European Nucleotide Archive</i>	PS: Peptide de Signal
ENAFOR: Entreprise Nationale de FORage	PVPP: PolyVinylPolyPyrrolidone
EPS: ExoPolySaccharides	RAST: <i>Rapid Annotations Using Subsystems Technology</i>
ET: Écart Type	
FD: <i>Fast Digest</i>	
FPLC: <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	

RDPII: *Ribosomal Database Project II*
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RM: Rouge de Méthyl
ROS: *Reactive Oxygen Species*
Sah1: Chaâbet Ntissa
Sah2: Aougrount
Sal: EsSalihine
SBS: *Sequencing By Synthesis*
SCP: *Single Cell Proteins*
SDS: *Sodium DodecylSulfate*
SecretomeP: Voie de sécrétion non classique
SIDA: Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SignalP: Voie de sécrétion classique
Sim.: Similarité
SM: *Simple Matching*
SRA: *Sequence Read Archive*
TAE: Tris, Acétate, EDTA
TCA: *TriChloroacetic Acid*
TEMED: N,N,N',N'-TEtraMéthylEthylèneDiamine
TH: Titre Hydrométrique
THG: Transfert Horizontal de Gènes
Tpm: Tour par minute
TSI: *Triple Sugar Iron*
U: Unité enzymatique
UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*
URMITE: Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes
UTO: Unité Taxonomique Opérationnelle
UV: UltraViolets
VP: Voges-Proskauer
WGS: *Whole Genome Sequencing*
 \bar{X} : Moyenne

Liste des figures

	Page
Revue bibliographique	
Figure 1	Classification des organismes selon les températures cardinales de croissances... 8
Figure 2	Températures des principales sources thermales algériennes..... 11
Figure 3	Mécanismes de réponses des thermophiles au stress abiotique..... 14
Figure 4	Dendrogramme consensus reflétant les relations phylogénétiques au sein de l'ordre des <i>Bacillales</i> appartenant à la classe des <i>Bacilli</i> basé sur l'analyse des séquences complètes du gène de l'ARNr 16S des représentants des différents sous-groupes taxonomiques..... 18
Figure 5	Étude de la biodiversité des microorganismes thermophiles et de leurs molécules par méthodes culturales et non culturales..... 27
Figure 6	Structure typique d'une peptidase..... 35
Matériel et Méthodes	
Figure 7	Carte montrant la répartition des sites étudiés..... 40
Figure 8	Schéma général de l'expérimentation..... 43
Figure 9	Prélèvements destinés à l'étude..... 46
Figure 10	Protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir d'une culture bactérienne.. 50
Figure 11	Protocole de purification des produits PCR..... 56
Figure 12	Protocole d'extraction de l'ADN environnemental..... 62
Figure 13	Schéma général des étapes d'extraction et de purification des protéases à partir des cultures des souches sélectionnées..... 73
Résultats et Discussion	
Figure 14	Distribution des cultures de l'étude selon les conditions d'isolement et l'origine des échantillons..... 87
Figure 15	Aspect cultural à l'œil nu et sous agrandissement 10x de quelques isolats de l'étude..... 91
Figure 16	Aspect microscopique de quelques isolats de l'étude sous agrandissement 1000x après coloration de Gram..... 92
Figure 17	Photomicrographies sur des sections de la souche AS95 par Cryo-MEB..... 94
Figure 18	Produits d'amplification PCR du gène d'ARNr 16S de quelques isolats sur gel d'agarose à 1,5 % (p/v)..... 95
Figure 19	Profils de restriction après digestion par AluI et HaeIII FD des amplicons du gène de l'ARNr 16S de 48 isolats sur gel d'agarose à 2,5 % (p/v)..... 96
Figure 20	Dendrogramme basé sur l'analyse ARDRA des profils de restrictions par AluI et HaeIII FD des amplicons des 53 isolats répartis en 5 groupes..... 98
Figure 21	Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des 28 souches de l'étude et de 26 souches types proches..... 101
Figure 22	Dendrogramme basé sur les valeurs du Blast génomique entre le génome de la souche Sah69 et les génomes annotés des membres du genre <i>Geobacillus</i> présents dans la banque Genome..... 108
Figure 23	Arbre phylogénomique du genre <i>Geobacillus</i> . L'arbre a été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance sur la base de l'alignement de 1048 gènes présents chez 63 souches de <i>Geobacillus</i> et la souche <i>Anoxybacillus flavithermus</i> E13 ^T 110
Figure 24	Carte thermique (<i>Heatmap</i>) représentant le degré de similarité de 29 génomes de <i>Geobacillus</i> basée sur l'identité moyenne des séquences nucléotidiques codantes..... 112

Figure 25	Carte thermique (<i>Heatmap</i>) représentant le degré de similarité entre les génomes de <i>Geobacillus</i> et d' <i>Anoxybacillus</i> basée sur identité moyenne des séquences nucléotidiques codantes.....	113
Figure 26	Dendrogramme basé sur les valeurs du Blast génomique entre le génome de la souche AS95 et les génomes annotés des membres du genre <i>Thermoactinomyces</i> présents dans la banque Genome.....	118
Figure 27	Pourcentages des phyla bactériens dominants au niveau de chaque point de prélèvement.....	122
Figure 28	Pourcentages des familles dominantes au sein du phylum des <i>Firmicutes</i> au niveau de chaque point de prélèvement.....	124
Figure 29	Phénogramme basé sur la similarité de 128 caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des 28 souches de l'étude.....	136
Figure 30	Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre l'azocaséine.....	138
Figure 31	Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre la caséine...	138
Figure 32	Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre la caséine BODIPY FL.....	140
Figure 34	Suivi de la croissance de la souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69 sous différentes conditions physiologiques.....	142
Figure 35	Suivi de la croissance de la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 sous différentes conditions physiologiques.....	144
Figure 36	Suivi de la croissance de la souche <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 sous différentes conditions physiologiques.....	146
Figure 37	Cinétiques de croissance et de production de protéases extracellulaires par la souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69 sur les milieux de culture à la caséine et au lait écrémé.....	148
Figure 38	Cinétiques de croissance et de production de protéases extracellulaires par la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 sur les milieux de culture à la caséine et au lait écrémé.....	148
Figure 39	Cinétiques de croissance et de production de protéases extracellulaires par la souche <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 sur les milieux de culture à la caséine et au lait écrémé.....	151
Figure 41	Chromatogramme de la purification de l'extrait protéasique de la culture <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 sur colonne échangeuse d'anions.....	155
Figure 42	Chromatogramme de la purification de la fraction 16 de la culture <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 par filtration sur gel.....	157
Figure 43	Chromatogramme de la purification de la fraction 32 de la culture <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 par filtration sur gel.....	157
Figure 44	Purification et analyse électrophorétique de la protéase 32-F38.....	159
Figure 45	Purification et analyse électrophorétique de la protéase 16-F39.....	159
Figure 47	Effet de la variation de température sur les activités des protéases.....	161
Figure 48	Stabilité des protéases à température optimale.....	163
Figure 49	Effet de la variation du pH sur les activités des protéases.....	165

Annexe 2

Figure 33	Courbe d'étalonnage de la L-Tyrosine utilisée pour le calcul de l'activité protéasique contre la caséine
Figure 40	Courbe d'étalonnage de la BSA par la méthode de Bradford
Figure 46	Estimation des poids moléculaires des protéases

Liste des tableaux

	Page
Revue bibliographique	
Tableau 1	Classification des organismes extrémophiles selon les facteurs physico-chimiques de l'environnement et les principales adaptations biochimiques et moléculaires correspondantes.....
	5
Tableau 2	Exemples de procaryotes thermophiles classés selon leur T_{opt}
	9
Tableau 3	Principaux groupes d'hydrolases isolées à partir de microorganismes thermophiles et leurs utilisations.....
	25
Tableau 4	Types de colonnes utilisées pour la purification des protéines par HPLC.....
	32
Tableau 5	Sources de quelques protéases thermostables.....
	36
Matériel et Méthodes	
Tableau 6	Répartition géographique des sites de prélèvement.....
	40
Tableau 7	Principaux caractères physico-chimiques des eaux des sources thermales étudiées.....
	42
Tableau 8	Distribution des échantillons par site et par point de prélèvement.....
	44
Tableau 9	Composition des milieux de culture solide utilisés pour l'isolement et/ou la culture des souches de l'étude.....
	48
Tableau 11	Composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification des gènes de l'ARNr 16S des isolats de l'étude.....
	54
Tableau 12	Conditions réactionnelles de la digestion des amplicons du gène de l'ARNr 16S des isolats par les enzymes de restriction AluI et HaeIII FD.....
	55
Tableau 13	Séquences codes-barres employées dans le séquençage MiSeq pour marquer l'ADN amplifié de chaque échantillon environnemental.....
	63
Tableau 18	Valeurs de température, de pH et de concentrations de NaCl utilisées pour l'estimation des taux de croissance.....
	72
Tableau 19	Composition des gels utilisés pour l'électrophorèse SDS-PAGE et la zymographie.....
	79
Résultats et Discussion	
Tableau 21	Valeurs moyennes de température et de pH des eaux et des sédiments des sites de l'étude.....
	83
Tableau 22	Données de l'isolement des cultures bactériennes de l'étude.....
	84 ; 86
Tableau 23	Caractères cultureux et microscopiques des isolats.....
	88 ; 90
Tableau 23	Caractères cultureux et microscopiques des isolats.....
	88 ; 90
Tableau 24	Résultats du screening des activités protéolytiques des isolats de l'étude.....
	93
Tableau 26	Résultats des alignements des séquences des gènes de l'ARNr 16S des souches de l'étude avec les banques ENA/Genbank/DDBJ et EzBioCloud.....
	99
Tableau 27	Informations générales sur les projets de séquençage des génomes <i>Geobacillus</i> sp. Sah69 et <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95.....
	104
Tableau 28	Statistiques relatives au génome de la souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69.....
	105
Tableau 29	Répartition des gènes du génome de <i>Geobacillus</i> sp. Sah69 sur les catégories fonctionnelles de la banque de données COG.....
	106
Tableau 30	Principaux types de protéases prédites dans le génome de <i>Geobacillus</i> sp. Sah69 et leurs voies de sécrétion.....
	109
Tableau 33	Statistiques relatives au génome de la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95.....
	114
Tableau 34	Répartition des gènes du génome de <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 sur les catégories fonctionnelles de la banque de données COG.....
	116
Tableau 35	Principaux types de protéases prédites dans le génome de <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 et leurs voies de sécrétion.....
	117

Tableau 38	Résultats du séquençage MiSeq de la région V4 du gène de l'ARNr 16S bactérien.....	120
Tableau 41	Pourcentages des genres aérobies thermophiles formant-endospores au sein des communautés bactériennes de chaque point de prélèvement.....	126
Tableau 42	Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats de la sélection et des souches types les plus proches.....	128 ;130 ;132 ;134 ;135
Tableau 59	Résultats des étapes d'extraction pour la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95.....	153
Tableau 60	Résultats des étapes d'extraction pour la souche <i>Brevibacillus</i> sp. OA30.....	153
Tableau 61	Résultats de la purification sur colonne échangeuse d'anions de la culture <i>Brevibacillus</i> sp. OA30.....	155
Tableau 62	Résultats de la concentration sur système Amicon des fractions protéasiques de la culture <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 obtenues par chromatographie échangeuse d'anions.....	155
Tableau 63	Résultats de la purification sur colonne de filtration sur gel de la culture <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 avant et après concentration sur système amicon....	158
Tableau 65	Valeurs moyennes de l'activité relative des protéases 16-F39 et 32-F38 en présence de différents agents chimiques.....	167

Annexe 1

Tableau 10	Références des réactifs utilisés durant l'expérimentation
Tableau 14	Composition du tampon phosphate
Tableau 15	Composition du tampon phosphate/citrate
Tableau 16	Composition du tampon glycine/NaOH
Tableau 17	Composition des milieux de culture utilisés pour la caractérisation biochimiques des souches
Tableau 20	Composition du tampon Na ₂ HPO ₄ /Acide citrique

Annexe 2

Tableau 25	Profils de restriction des 53 isolats après digestion par AluI et HaeIII FD
Tableau 31	Caractérisation des gènes codant pour des protéases présents sur le génome de la souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69
Tableau 32	Résultats du blast génomique entre le génome de <i>Geobacillus</i> sp. Sah69 et les génomes du genre <i>Geobacillus</i>
Tableau 36	Caractérisation des gènes codant pour des protéases présents sur le génome de la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95
Tableau 37	Résultats du blast génomique entre le génome de <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 et les génomes du genre <i>Thermoactinomyces</i>
Tableau 39	Pourcentages des phyla bactériens présents au niveau de chaque point de prélèvement
Tableau 40	Pourcentages des familles au sein du phylum des <i>Firmicutes</i> au niveau de chaque point de prélèvement
Tableau 43	Codification des caractères phénotypiques des souches pour la construction du phénogramme
Tableau 44	Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre l'azocaséine
Tableau 45	Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre la caséine
Tableau 46	Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre l'azocaséine la caséine BODIPY FL
Tableau 47	Résultats du dosage de la L-Tyrosine à DO 660 nm
Tableau 48	Résultats de l'analyse de la variance à un facteur pour la méthode à la caséine
Tableau 49	Résultats de l'analyse de la variance à un facteur pour la méthode à la caséine BODIPY FL

Tableau 50	Résultats de l'analyse de la variance à un facteur pour la méthode à l'azocaséine
Tableau 51	Valeurs de densité optique à 660 nm des souches <i>Geobacillus</i> sp. Sah69, <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 et <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 sur différentes températures et pH
Tableau 52	Valeurs de densité optique à 660 nm des souches <i>Geobacillus</i> sp. Sah69, <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 et <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 sur différentes concentrations de NaCl
Tableau 53	Taux de croissance par heure de la souche <i>Geobacillus</i> sp. Sah69 sous différentes conditions physiologiques de température, de pH et NaCl
Tableau 54	Taux de croissance par heure de la souche <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 sous différentes conditions physiologiques de température, de pH et NaCl
Tableau 55	Taux de croissance par heure de la souche <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 sous différentes conditions physiologiques de température, de pH et NaCl
Tableau 56	Valeurs de la turbidité des cultures à 660 nm et des activités protéasiques contre l'azocaséine des souches <i>Geobacillus</i> sp. Sah69, <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 et <i>Brevibacillus</i> sp. OA30 sur les milieux de culture MC et ME
Tableau 57	Valeurs des dosages de l'activité protéasique à l'azocaséine et de la concentration en protéines totales par la méthode de Bradford pour les étapes d'extraction des protéases des souches <i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95 et <i>Brevibacillus</i> sp. OA30
Tableau 58	Valeurs de la DO à 595 nm de la BSA à différentes concentrations lors de l'essai Bradford
Tableau 64	Valeurs des dosages de l'activité protéasique à l'azocaséine et de la concentration en protéines totales par la méthode de Bradford pour les étapes de purification des protéases de la culture <i>Brevibacillus</i> sp. OA30
Tableau 66	Dosage des activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38 contre l'azocaséine à différentes valeurs de températures
Tableau 67	Estimation de l'effet de la température optimale sur les activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38
Tableau 68	Dosage des activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38 contre l'azocaséine à différentes valeurs de pH
Tableau 69	Dosage des activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38 contre l'azocaséine en présence de différents agents chimiques

INTRODUCTION

Les préoccupations économiques et environnementales liées à l'utilisation des procédés chimiques en industrie ont emmené les chercheurs à explorer des alternatives technologiques plus rentables et présentant un moindre impact négatif sur l'environnement. La biocatalyse, qui exploite le potentiel catalytique des enzymes grâce à leur énantiosélectivité et à leur régiosélectivité sous conditions contrôlées, est une approche efficace pour la production de composés d'intérêt industriel (Schmid *et al.*, 2001; Shoemaker *et al.*, 2003). Les enzymes ont été utilisées depuis l'antiquité pour la fabrication de produits alimentaires comme les fromages, le vin, le vinaigre et pour l'élaboration d'autres marchandises comme le cuir, l'indigo et le lin. Le développement des procédés de fermentation durant la deuxième moitié du XX^e siècle a permis la production d'enzymes à une plus large échelle (Mishra *et al.*, 2017; Esclapez-Espliego *et al.*, 2018).

Les applications de plus en plus nombreuses des enzymes dans les industries alimentaires, chimiques et pharmaceutiques créent une forte demande en biocatalyseurs possédant des propriétés améliorées ou nouvelles. Les percées en biotechnologie, particulièrement dans le secteur des génies génétique et protéique ont permis de fournir des enzymes sur mesure montrant de nouvelles activités adaptées à de nouvelles conditions réactionnelles et permettant d'augmenter le champ de leur utilisation industrielle (Liu et Kokare, 2017; Esclapez-Espliego *et al.*, 2018).

Malgré le fait que plus de 3000 enzymes diverses aient été identifiées et que beaucoup de ces dernières aient réussi à trouver des applications biotechnologiques, l'offre en enzymes est encore insuffisante pour satisfaire toutes les demandes. Une raison importante de ceci est le fait que beaucoup d'enzymes disponibles sont incapables de résister sous les conditions extrêmes de réactions exigées pour certains procédés industriels. Comme conséquence, une filière de recherche consistant en un criblage et une caractérisation des microorganismes pouvant prospérer dans les environnements extrêmes comme source potentielle d'enzymes s'est développée ces dernières décennies. De telles enzymes montrent généralement une bonne stabilité envers les variations de température, de pH, de la composition du milieu réactionnel et possèdent des vitesses de réaction plus élevées. Ces paramètres sont importants pour l'application industrielle de n'importe quelle enzyme (Kumar *et al.*, 2016a).

Les thermophiles (croissance optimale au-delà de 50 °C) et les hyperthermophiles (croissance optimale au-delà de 80 °C) figurent parmi les microorganismes des milieux extrêmes les plus étudiés (Wagner et Wiegel, 2008). Leurs biotopes naturels sont très variés et peuvent être terrestres (sources géothermales, sols désertiques et volcaniques, forages pétroliers, composts) ou marins (monts hydrothermaux profonds). Les conditions extrêmes de

température, et parfois de pH et d'anoxie de ces environnements chauds explique la grande flexibilité génomique et métabolique des communautés microbiennes thermophiles les colonisant et rend attrayant l'exploitation de leurs protéines pour des applications biotechnologiques (Badhai *et al.*, 2015; Dumorné, 2018).

Par conséquent, la recherche de nouveaux biocatalyseurs thermostables à partir des thermophiles a mené à la description et à la caractérisation de polymérases (Kwon *et al.*, 2016; Aschenbrenner et Marx, 2017), de glucosidases (Hassan *et al.*, 2015; Sathe *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018), d'estérases (Zhang *et al.*, 2014; Lewin *et al.*, 2016; Zarafeta *et al.*, 2016), de xylanases (Bhalla *et al.*, 2015; Mitra *et al.*, 2015), ainsi que beaucoup d'autres hydrolases d'intérêt industriel (Nisha et Satyanarayana, 2016).

En plus de la bioprospection, le but de l'analyse des environnements chauds est également fondamental. En effet, elle permet une meilleure compréhension de la diversité microbienne de ces écosystèmes et de mieux cerner les mécanismes adaptatifs et évolutionnistes dans des conditions physico-chimiques considérées comme proches de celles ayant accompagnées l'apparition de la vie et pouvant être rencontrées ailleurs dans l'univers (Stetter, 2006; Lewin *et al.*, 2013; DeCastro *et al.*, 2016).

Les premières études des thermophiles nécessitaient leur isolement et leur culture (Morrison et Tanner, 1922; Brock et Freeze, 1969; Fiala et Stetter, 1986; De La Torre *et al.*, 2008). Depuis, les techniques culturales ont été considérablement améliorées et constituent toujours des outils puissants de bioprospection (Pham et Kim, 2012; Daebeler *et al.*, 2018). Toutefois, l'étude de la diversité des microorganismes thermophiles par ces techniques rencontre des limites pratiques dans la mesure où elles ne permettent d'isoler qu'une partie infime de la biodiversité réelle. Le développement des techniques de séquençage de l'ADN environnemental à haut débit et l'apparition de méthodes d'analyses génomiques et métagénomiques très performantes a permis une estimation plus précise des populations microbiennes d'une multitude d'écosystèmes chauds terrestres et marins, ainsi que l'étude de leur potentiel métabolique (Ilmberger *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2014; Adriaenssens *et al.*, 2015; Ghelani *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Sangwan *et al.*, 2015).

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique. De nombreux environnements chauds tels que les sources géothermales, les sols désertiques, les réservoirs pétroliers et les sebkhas sont recensés sur tout son territoire.

Des travaux académiques se sont déjà intéressés à la biodiversité des écosystèmes chauds algériens. Par approches non-culturelles (Amarouche-Yala *et al.*, 2014), mais surtout par l'utilisation de techniques culturelles (Bouanane-Darenfed *et al.*, 2011; Yakhlef et Darbouche, 2012; Khelil et Cheba, 2014; Arab *et al.*, 2018). Quelques essais de production et de caractérisation de xylanases et de protéases thermostables ont également été réalisés (Bouacem *et al.*, 2014; Bouacem *et al.*, 2015; Bouacem *et al.*, 2016). Toutefois, ces études restent insuffisantes considérant la richesse et le nombre élevés de ces environnements.

Ce travail de thèse constitue la continuité d'une démarche visant à étudier la biodiversité des microorganismes thermophiles d'une sélection d'environnements chauds algériens et à évaluer leur capacité de produire des enzymes hydrolytiques pouvant présenter un intérêt pour l'industrie agroalimentaire. Un mémoire de magistère réalisé auparavant prospectait déjà le potentiel enzymatique de souches bactériennes thermophiles aérobies isolées à partir de plusieurs sources thermales de l'Est algérien (Gomri, 2012). Les résultats de ce travail indiquaient que chez les souches isolées, les activités hydrolytiques extracellulaires les plus fréquemment mises en évidence étaient protéolytiques.

Les protéases d'origine microbienne, et notamment celles issues de bactéries aérobies représentent la plus grande part du marché des enzymes industrielles et sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour la transformation et la fabrication de produits laitiers, de boissons, de produits carnés ainsi que pour d'autres applications (Li *et al.*, 2013; Barzkar *et al.*, 2018). La recherche de nouvelles enzymes protéasiques à moindre coût de production, plus stables et plus performantes est toujours d'actualité et c'est dans ce contexte que se place cette thèse. Les objectifs de ce travail peuvent être résumés dans les points suivants :

- Isoler des bactéries aérobies thermophiles à partir d'échantillons d'eau, de sédiments et de sols de divers environnements chauds situés en Algérie et mettre en évidence leur capacité à produire des protéases extracellulaires ;
- Caractériser sur le plan phénotypique (morphologique, physiologique et biochimique) et moléculaire (phylogénétique et génomique) les souches productrices d'activité protéolytique extracellulaire les plus intéressantes ;
- Étudier la biodiversité microbienne d'une sélection d'environnements chauds par méthodes métagénomiques ;

Introduction

- Produire et purifier les protéases extracellulaires d'une sélection de ces souches et caractériser certaines de leurs propriétés enzymatiques.

Ce manuscrit est organisé en quatre parties :

- Une revue bibliographique présentant l'essentiel des données citées par la littérature concernant les organismes thermophiles et leurs applications, y compris leurs protéases, ainsi que les principales méthodes employées pour l'étude de leur biodiversité et pour la prospection de leurs enzymes ;

- Une partie méthodologie dans laquelle sont présentées la démarche expérimentale adoptée pour la réalisation de ce travail et les différentes techniques employées ;

- Une partie résultats et discussion où sont présentés et discutés les principaux résultats obtenus ;

- Enfin, une conclusion qui récapitule les principaux résultats obtenus et expose les perspectives possibles de ce travail.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

**Chapitre 1. Organismes
thermophiles
et leurs applications**

Tableau 1. Classification des organismes extrémophiles selon les facteurs physico-chimiques de l'environnement et les principales adaptations biochimiques et moléculaires correspondantes [Tableau adapté de Seckbach (2006) ; Capece *et al.* (2013) ; Tse et Ma (2016) et Kumar *et al.* (2018a)].

Facteur environnemental	Extremophilie	Paramètres de croissance	Exemple	Adaptations		
				Membrane	Cytoplasme	Génome/Protéome
Température	Psychrophilie	-20 °C ; <15 °C	<i>Psychrobacter, Polaromonas</i>	- acides gras insaturés - étherlipides - EPS - acide teichoïque	- accumulation de chaotropes organiques polaires	- facteurs de transcription t-dépendants - voie du choc froid - flexibilité du site actif
	Thermophilie	50 °C ; 80 °C	Algues vertes ; bactéries	- acides gras saturés - acides gras ω-allyclics - étherlipides	- accumulation de thermolytes organiques polaires	- voies de réparation de l'ADN - voie de choc thermique - chapronines - surfaces protéiques non chargées
	Hyper Thermophilie	80 °C ; >100 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i>			
pH	Acidophilie	pH 0-4	<i>Picrophilus, Dunaliella</i>	- acides gras ω-allyclics - étherlipides - canaux transporteurs à petits pores - canaux à charge positive - antipores K ⁺ /H ⁺	- accumulation de cation - potentiel de Donnan positif - catabolisme des acides organiques	- voies de réparation de l'ADN - voie du choc acide - chapronines - surfaces protéiques chargées positivement - facteurs de transcription pH-dépendant
	Alcaliphilie	pH > 9	<i>Spirulina</i>	- surface chargée négativement - symport Na ⁺ /solutés - antiport Na ⁺ (H ⁺)/K ⁺	- ATP synthase Na ⁺ -couplée - accumulation de Na ⁺ - moteur flagellaire Na ⁺ -couplé	- surfaces protéiques chargées négativement
Salinité	Halophilie	> 5% (p/v) [NaCl]	<i>Halobacteriales</i>		- accumulation de K ⁺ - accumulation d'osmolytes organiques polaires	- surfaces protéiques chargées négativement - ponts ioiniques
Dessiccation	Xérophilie	A _w ≤ 0,85	Lichens, procaryotes		- accumulation de Mn ²⁺ - accumulation de solutés organiques polaires lyoprotecteurs	- voies de réparation d'ADN
Pression	Piézophilie	> 60 MPa	<i>Pyrococcus</i>	- acides gras insaturés - étherlipides - EPS	- accumulation de piezolytes organiques polaires	- voie de choc thermique - voie du choc froid - surface non chargée - élongation hélicoïdale de l'ARNr 16S
Radiation UV et ionisante	Radorésistance	> 5 kGy	<i>Deinococcus radiodurans</i>		- accumulation de Mn ²⁺ - accumulation de solutés organiques polaires	- polyploïdie - voies de réparation d'ADN

ADN: acide désoxyribonucléique ; ARN: acide ribonucléique ; ATP: adénosine triphosphate ; A_w: activité d'eau ; EPS: expolysaccharides ; Gy : Gray ; MPa : mégapascal ; UV: ultraviolets.

1. Extrémophilie

1.1. Notion anthropocentrique de l'environnement extrême

À mesure que nos connaissances sur la diversité microbienne se sont approfondies, il est devenu clair que peu d'habitats naturels sur terre soient stériles et que la plupart d'entre eux renferment une grande diversité de microorganismes, particulièrement des procaryotes (bactéries et archées), à condition qu'ils contiennent suffisamment d'eau pour garantir la présence d'une vie cellulaire (Madigan, 2000; Giddings et Newman, 2015).

La croissance et la survie des organismes sont commandées par une série de facteurs physiques et chimiques, biotiques et abiotiques. Un biotope pour un organisme est défini par un intervalle pour chacun de ces facteurs environnementaux (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995). D'un point de vue anthropocentrique, les conditions physico-chimiques permettant la vie mammifère apparaissent comme normales, et les conditions déviant de ces dernières sont considérées comme extrêmes (Torsvik et Øvreås, 2008; Stan-Lotter, 2017).

Les environnements extrêmes sont donc considérés comme « hostiles à des formes supérieures de la vie ». Ils ont été définis du point de vue taxonomique comme étant « des environnements avec une diversité d'espèces restreinte et une absence de certains groupes taxonomiques » (Brock, 1969; Brock, 2012; Stan-Lotter, 2017).

1.2. Organismes extrémophiles

MacElroy a inventé le terme « extrémophile » en 1974 pour décrire des organismes pouvant se développer dans des environnements où les conditions sont extrêmes, c'est-à-dire à des températures élevées ou basses, des pH acides ou alcalins, des concentrations élevées en sel, une pression élevée, un niveau de radioactivité important, une faible concentration en nutriments, une faible activité d'eau ou un stress oxydatif important. Ils possèdent en conséquence des systèmes biologiques pouvant fonctionner dans ces conditions (MacElroy, 1974; Antranikian *et al.*, 2005) (Tableau 1).

Tout en incluant un certain nombre de protozoaires, d'espèces d'algues et de moisissures, la majorité des extrémophiles sont des procaryotes (Horikoshi, 1998; Canganella et Wiegel, 2011; Rao et Durvasula, 2018).

Une distinction est faite entre un extrémophile, qui exige des conditions extrêmes pour croître et un extrémotolérant, qui peut supporter des valeurs extrêmes d'un ou de plusieurs paramètres physico-chimiques, mais dont la croissance optimale se produit sous des conditions plus modérées (López-García, 2005). À noter également que beaucoup de ces organismes sont polyextrémophiles, montrant une capacité d'adaptation envers deux ou

plusieurs éléments de l'environnement en même temps (par exemple : adaptations aux températures et aux pressions élevées; adaptations aux températures élevées et à la salinité élevée ; adaptations aux pH alcalins et à la salinité élevée ; adaptations aux températures élevées, à la pression et à l'effet de dessiccation, etc.) (Capece *et al.*, 2013; Rao et Durvasula, 2018).

1.3. Intérêt des extrémophiles

Depuis leur découverte, les extrémophiles ont fasciné et attiré les scientifiques de diverses disciplines :

- en biologie moléculaire, beaucoup d'études ont été consacrées à la compréhension des adaptations permettant aux molécules des extrémophiles de fonctionner sous des conditions dénaturantes ou empêchant le fonctionnement des molécules des non-extrémophiles (López-García, 2005) ;
- les percées en phylogénie sont en partie dues aux premières études sur les extrémophiles qui ont mené à la découverte du domaine des *Archaea*, avec des conséquences fondamentales pour la biologie de l'évolution (Woese et Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990). Cet intérêt évolutionniste pour les extrémophiles réside dans le fait que les conditions physico-chimiques de la planète Terre à ses débuts aient pu être semblables à celles de certains environnements extrêmes contemporains. En conséquence, les extrémophiles constituent un bon modèle pour l'étude des origines de la vie sur terre (Nisbet et Sleep, 2001) ;
- l'exobiologie est un champ interdisciplinaire visant à étudier les conditions d'apparition de la vie sur notre planète et ailleurs dans le cosmos. Son principe est de croiser nos connaissances sur les habitats terrestres et leurs habitants (extrémophiles) avec des données astronomiques et astrophysiques afin de mesurer les possibilités d'une vie extraterrestre (López-García, 2005; Seckbach, 2006) ;
- en biotechnologie, les extrémophiles ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales qui intéressent les industriels. Parmi ces biomolécules figurent les extrémozymes, les solutés compatibles (extrémolytes), les pigments, les constituants membranaires, etc. (Quérellou et Guézennec, 2010; Cavicchioli *et al.*, 2011; Gómez et Parro, 2012; Rao et Durvasula, 2018).

2. Thermophilie comme limite extrême

L'extrémophilie est une notion biologique stricte. Par exemple, si la température est prise comme facteur extrême, la présence de la vie s'étend entre approximativement -20 °C (quelques bactéries) et 120 °C (quelques espèces archéennes pouvant atteindre des températures supérieures à 130 °C) (López-García, 2005; Brock, 2012).

Dans cet intervalle, les organismes sont divisés en différentes catégories selon leurs températures minimales et maximales de croissance, mais surtout selon leurs températures optimales de croissance (Figure 1) (López-García, 2005). Cette classification est considérée comme un aspect fondamental de la taxonomie microbienne (Wiegel et Canganella, 2001).

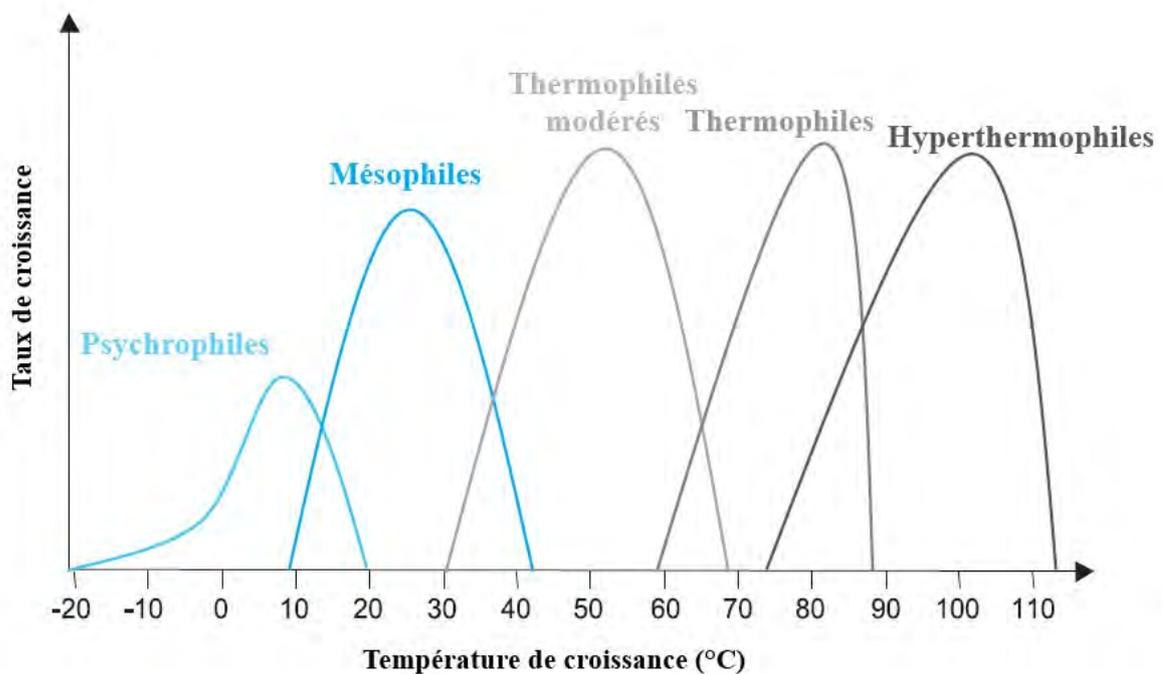


Figure 1. Classification des organismes selon les températures cardinales de croissances (López-García, 2005).

Le terme “thermophilie” est dérivé de 2 mots grecs : “*thermotita*” (chaleur) et “*philia*” (aimant). Les thermophiles requièrent des températures élevées pour leur croissance et leur survie (Tiquia-Arashiro et Rodrigues, 2016).

La classification la plus commune des thermophiles les divise selon leur température optimale de croissance (T_{opt}) en thermophiles modérés (T_{opt} entre 50 °C et 70 °C), thermophiles extrêmes (T_{opt} entre 70 °C et 80 °C), et hyperthermophiles (ayant une température optimale de croissance supérieure à 80 °C) (Stetter *et al.*, 1990; Stetter, 1996; Mesbah et Wiegel, 2008) (Tableau 2). Le terme «température-tolérant» peut être utilisé pour décrire des organismes

ayant un intervalle de croissance supérieur à 35 °C (Wiegel, 1990; Canganella et Wiegel, 2011).

On considère généralement que la vie thermophile (T_{opt} entre 50 °C et 80 °C) est dominée par les bactéries, avec une très faible présence taxonomique des eucaryotes (Stetter, 1996; Takahata *et al.*, 2001) et que la vie hyperthermophile est dominée par les archées (Tiquia-Arashiro et Rodrigues, 2016). La limite inférieure de thermophilie est retrouvée dans peu d'environnements dans la nature, et est considérée comme étant la température au-dessus de laquelle il est très rare de retrouver des eucaryotes (Holden, 2009).

La frontière thermophile et hyperthermophile est arbitraire, mais permet de séparer les organismes qui se développent au-dessus de 80 °C des autres organismes (Mehta et Satyanarayana, 2013). Les hyperthermophiles sont caractérisés par la présence de la gyrase inverse, une enzyme responsable de la stabilisation de la molécule l'ADN double brin aux températures élevées (Holden, 2009).

Tableau 2. Exemples de procaryotes thermophiles classés selon leur T_{opt} . (Mehta et Satyanarayana, 2013).

Groupe	T_{opt} (°C)	Exemples
Thermophiles modérés	50-70	<i>Clostridium</i> , <i>Vulcanibacillus</i> , <i>Marinotoga</i> , <i>Sulfobacillus</i> , <i>Thermus</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Thermoanaerobacter</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Bacillus</i>
Thermophiles extrêmes	70-80	<i>Thermococcus</i> , <i>Aeropyrum</i> , <i>Methanothermococcus</i> , <i>Rhodothermus</i> , <i>Desulfurobacterium</i> , <i>Thermovibrio</i> , <i>Marinithermus</i> , <i>Petrotoga</i> , <i>Thermaerobacter</i>
Hyperthermophiles	> 80	<i>Methanopyrus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermoproteus</i> , <i>Methanothermus</i> , <i>Thermotoga</i> , <i>Aquifex</i>

Opt.: optimale.

3. Habitats des thermophiles

Selon la source de chaleur, les habitats susceptibles d'abriter une forme de vie thermophile peuvent être naturels ou artificiels (Mehta et Satyanarayana, 2013; Cayol *et al.*, 2015).

3.1. Habitats naturels

Les biotopes naturels des thermophiles sont présents partout sur notre planète. Ces habitats, relativement plus chauds en comparaison avec ceux créés par les activités humaines, peuvent être terrestres ou marins. La plupart des thermophiles connus ont été isolés à partir des zones volcaniques, des sources géothermales terrestres, et des monts hydrothermaux marins profonds. Les autres habitats chauds naturels incluent les champs pétroliers chauffés

géothermiquement et les sols/sédiments chauffés par le soleil (Calteau, 2005; Mehta et Satyanarayana, 2013; Cayol *et al.*, 2015).

3.1.1. Zones volcaniques et sources géothermales terrestres

Les zones volcaniques et les sources géothermales terrestres contiennent une importante biodiversité thermophile. Elles sont présentes partout sur terre et sont associées aux zones tectoniques actives de la croûte terrestre. Ces zones incluent les fumerolles terrestres (exemple de la Solfatare en Italie), les sources chaudes, et les geysers (Calteau, 2005; Hedlund *et al.*, 2016).

❖ Sources chaudes terrestres et geysers

Une source chaude terrestre est produite par l'émergence d'une eau souterraine chauffée, par des systèmes géologiques volcaniques ou non volcaniques, de la croûte terrestre. Les eaux de ces sources sont souvent très chargées en différents minéraux (H_2S , CO_2 , CH_4 , H_2 , NH_3 , etc.) (Brock, 2012). La composition chimique de la roche affecte celle de l'eau qui peut être acide, neutre ou alcaline. Leurs températures à l'émergence peuvent varier de la température ambiante jusqu'à celle de l'ébullition (Mehta et Satyanarayana, 2013; Madigan *et al.*, 2014).

Les sources thermales sont présentes dans beaucoup de pays (États-Unis d'Amérique, Islande, Nouvelle-Zélande, Chili, Japon, etc.). En Algérie, on recense plus de 240 sources chaudes, réparties géographiquement entre le Nord (plus particulièrement dans les régions de l'Oranie, de la Kabylie et du Constantinois), et le Sud du pays (la région orientale du Sahara septentrional algérien) (Ouali *et al.*, 2007; Saibi, 2009; Ouali, 2015). Les températures mesurées à l'émergence varient de 22 °C à 98 °C (Kedaid, 2007; Bahri *et al.*, 2011; Amarouche-Yala *et al.*, 2015; Belhai *et al.*, 2016) (Figure 2). Les températures les plus élevées sont enregistrées à Hammam Bouhnifia (68 °C) pour la région Ouest, à Hammam El Biban (80 °C) dans la région Centre, et à Hammam Debagh (98 °C) pour la région Est. Dans la région Sud, certaines sources chaudes dépassent parfois les 50 °C (Saibi, 2009; Bahri *et al.*, 2011; Amarouche-Yala *et al.*, 2015; Chenaker *et al.*, 2018).

Les geysers sont un type particulier et rare de sources chaudes où l'eau, la vapeur et parfois même de la boue sont éjectées périodiquement à travers une brèche (Mehta et Satyanarayana, 2013; Cayol *et al.*, 2015).

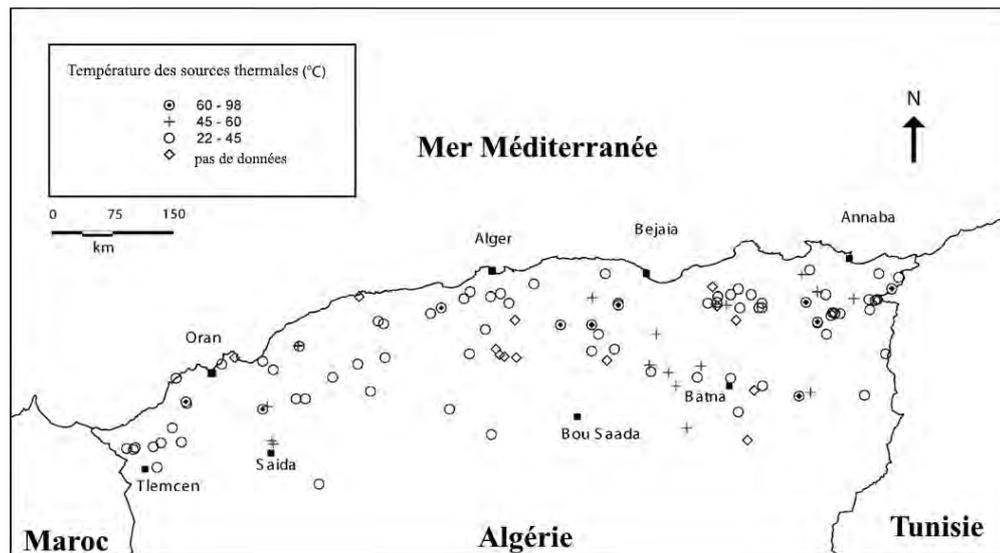


Figure 2. Températures des principales sources thermales algériennes (Kedaid, 2007).

❖ Monts hydrothermaux marins profonds

Un mont hydrothermal profond est une fissure dans la surface de la planète, localisée dans les fonds marins et caractérisée par l'émergence d'une eau chauffée géothermiquement (Thornburg *et al.*, 2010; Cayol *et al.*, 2015).

3.1.2. Réservoirs pétroliers

Les champs pétroliers en exploitation, chauffés géothermiquement, subissent souvent des injections d'eau afin d'augmenter leur pression interne et la température de l'eau dans ce cas peut varier d'un puit à un autre. Ces champs représentent un biotope unique aux conditions favorables pour le développement des communautés thermophiles (Salinas *et al.*, 2004; Jayasinghearachchi et Lal, 2011).

3.1.3. Sols et sédiments chauffés par le soleil

Des représentants de plusieurs genres thermophiles ont été isolés à partir de sols et de sédiments exposés à un fort taux de rayonnement solaire, et où la température peut dépasser 70 °C. Ces environnements incluent notamment les sols désertiques tels que ceux du Sahara et des zones arides (Geiger *et al.*, 1995; Torsvik et Øvreås, 2008; Mehta et Satyanarayana, 2013; Heulin *et al.*, 2017).

3.2. Habitats artificiels

Des procaryotes thermophiles ont été isolés à partir d'une variété d'environnements chauds, résultants des activités humaines et animales : des chaudières domestiques et

industrielles, des usines de production d'électricité, de drainage minier acide (DMA), des piles de compostage auto-chauffées (*Self-Heated Compost Piles*), des installations de traitement de biodéchets ainsi que d'autres biotopes artificiels réunissant les conditions nécessaires au développement de thermophiles (Mehta et Satyanarayana, 2013; Madigan *et al.*, 2014; Cayol *et al.*, 2015).

4. Diversité des microorganismes thermophiles

Une large diversité de microorganismes a été découverte tout au long des 150 dernières années dans les environnements chauds naturels et artificiels (Tiquia-Arashiro et Rodrigues, 2016). Cette diversité couvre essentiellement des procaryotes non photosynthétiques (hétérotrophes et autotrophes) (Ferrera et Reysenbach, 2001; Holden, 2009; Hedlund *et al.*, 2016). En effet, la plupart des procaryotes photosynthétiques sont incapables de croître à des températures atteignant la limite supérieure de 70-75 °C (Mehta et Satyanarayana, 2013). La limite est approximativement de l'ordre de 60-65 °C pour les microorganismes eucaryotes, représentés par quelques espèces fongiques (Tansey et Brock, 1972), alors que la croissance des algues et des protozoaires est très limitée à 55-60 °C (Mehta et Satyanarayana, 2013; Oliverio *et al.*, 2018).

L'étude phylogénétique basée sur les séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S, obtenues par approches classique ou environnementale, a permis de distribuer tous les représentants thermophiles dans les domaines des *Archaea* et des *Bacteria* (Itoh et Iino, 2013).

Ainsi, des membres thermophiles et hyperthermophiles ont été décrits chez les phyla archéens des *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Thaumarchaeota* et des *Aigarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2012; Itoh et Iino, 2013; Rosenberg *et al.*, 2014b; Hedlund *et al.*, 2015; Nishizawa *et al.*, 2016; Adam *et al.*, 2017).

Chez les bactéries, les thermophiles sont largement distribués dans la majorité des phyla, et incluent des phototrophes, des chimiolithotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes, avec une abondance variable d'un phylum à un autre (Itoh et Iino, 2013; Madigan *et al.*, 2014).

Les espèces thermophiles et hyperthermophiles sont dominantes chez les phyla des *Aquificae* (Reysenbach, 2015a) et des *Thermotogae* (Reysenbach, 2015b). De larges groupes thermophiles sont présents chez les phyla des *Firmicutes* (De Vos *et al.*, 2011) et des *Chloroflexi* (Overmann, 2001), alors que des thermophiles modérés sont signalés occasionnellement ou exceptionnellement chez d'autres phyla tels que les *Actinobacteria* (Trujillo, 2001) et les *Bacteroidetes* (Ludwig *et al.*, 2010), respectivement (Itoh et Iino, 2013).

Un des facteurs importants influençant la diversité thermophile est la présence d'O₂. En effet, la plupart des espèces thermophiles et hyperthermophiles sont anaérobies, en raison de l'insolubilité de l'O₂ dans l'eau aux températures élevées et au faible contact entre la surface liquide et l'air. Cependant, il existe plusieurs microorganismes qui sont aérobies obligatoires, microaérophiles, ou anaérobies facultatifs. Ils sont généralement rencontrés dans les environnements géothermiques comme les sources thermales terrestres qui rentrent facilement en contact avec des environnements oxiques (Towe, 1996; Wagner et Wiegel, 2008; Marchant et Banat, 2010).

4.1. Diversité microbienne des sources chaudes terrestres

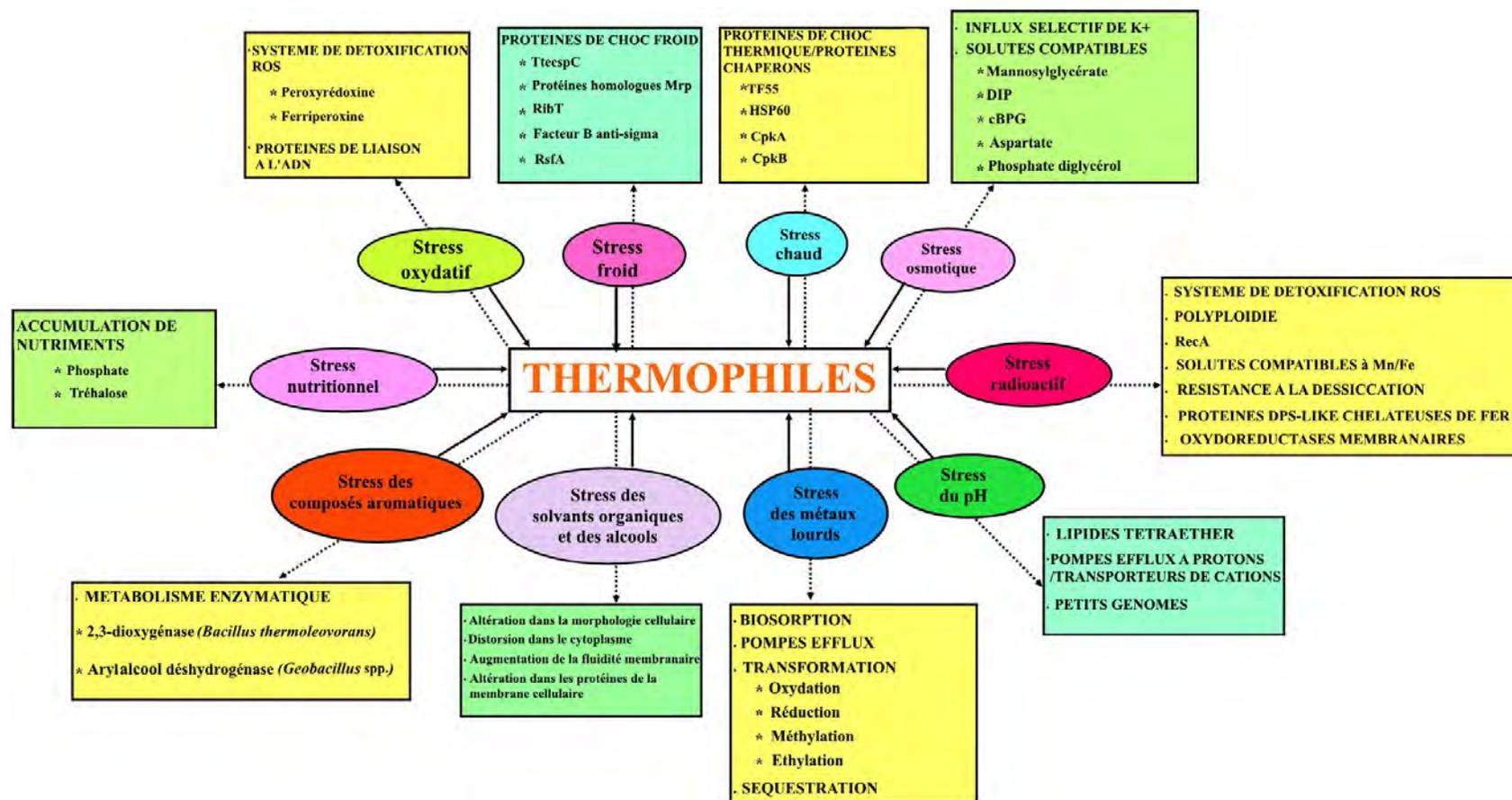
De nombreuses études ont utilisé des approches culturales et non culturales afin d'étudier la diversité des sources chaudes terrestres (Madigan *et al.*, 2014). Ainsi, beaucoup de thermophiles et d'hyperthermophiles, chimiolithotrophes ou chimioorganotrophes et mêmes phototrophes ont été isolés à partir de sources chaudes terrestres, parmi lesquelles figurent de nouveaux taxons, en Algérie (Bouanane-Darenfed *et al.*, 2011; Amarouche-Yala *et al.*, 2014; Bouanane-Darenfed *et al.*, 2014; Mokrane *et al.*, 2016), et ailleurs (Aguiar *et al.*, 2004; Meyer-Dombard *et al.*, 2005; Derekova *et al.*, 2007; Vésteinsdóttir *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2017; Khalil *et al.*, 2018).

Une grande diversité bactérienne et archéenne a été également révélée par l'étude du gène de l'ARN ribosomal 16S récupéré depuis des échantillons de l'environnement (Kambura *et al.*, 2016; Amin *et al.*, 2017; Prieto-Barajas *et al.*, 2017; Power *et al.*, 2018).

4.2. Diversité microbienne des réservoirs pétroliers

Des types physiologiques thermophiles variés ont été isolés à partir des forages pétroliers, incluant des hétérotrophes, des sulfato-réducteurs, des méthanogènes, et d'autres types métaboliques (Miranda-Tello *et al.*, 2003; DiPippo *et al.*, 2009; Tamazawa *et al.*, 2017). La plupart de ces procaryotes sont anaérobies, mais des espèces aérobies telles que les bactéries formant-endospores sont également présentes (Nazina *et al.*, 2001; Nazina *et al.*, 2005).

Des méthodes moléculaires non culturales ont également permis de découvrir une grande diversité bactérienne et archéenne dans les champs et réservoirs pétroliers (Orphan *et al.*, 2000; Plenge *et al.*, 2017; Sierra-Garcia *et al.*, 2017).



ROS : *Reactive Oxygen Species*
 Mrp : *multidrug resistance protein*
 DIP : *di-myo-inositol phosphate*
 cBPG: *cyclic 2,3-bisphosphoglycerate*
 DPS: *DNA-binding protein from starved cell.*

Figure 3. Mécanismes de réponses des thermophiles au stress abiotique. Les flèches continues représentent les stress exercés sur les thermophiles, les flèches discontinues représentent la réponse des thermophiles à ces stress particuliers (Ranawat et Rawat, 2017).

4.3. Diversité microbienne des sols/sédiments chauffés par le soleil

La présence de représentants thermophiles de bactéries et de moisissures dans les sols et les sédiments chauffés par le soleil a été révélée par des approches culturelles et non culturelles. Ces organismes incluent des bactéries formant-endospores, des actinomycètes, des levures et des moisissures (Touzel *et al.*, 2000; Péter *et al.*, 2007; Aanniz *et al.*, 2015; Adriaenssens *et al.*, 2015; Busarakam *et al.*, 2016).

5. Mécanismes d'adaptation des organismes thermophiles

L'actuelle limite de température de croissance pour un organisme vivant est enregistrée chez une souche archéenne de *Methanopyrus kandleri* qui peut se développer à 122 °C sous une pression de 40 MPa (Takai *et al.*, 2008; Schulze-Makuch *et al.*, 2017). Toutefois, on estime que la limite théorique à toute forme de vie pourrait se situer à 150 °C, température à laquelle l'ADN et l'ATP se désintègrent en conditions aqueuses (White, 1984; Madigan et Orent, 1999; Clarke, 2014).

Subséquentement, la vie sous de telles conditions extrêmes nécessite des modifications moléculaires et physiologiques (Feller, 2017). En effet, les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles ont cumulé une multitude d'adaptations au niveau de leurs molécules (protéiques, nucléiques et lipidiques), accompagnées de changements au niveau membranaire et cytoplasmique visant à rendre stables toutes les activités cellulaires à températures élevées (Cayol *et al.*, 2015; Schulze-Makuch *et al.*, 2017).

Les thermophiles semblent également déployer une multitude de stratégies physiologiques en réponse à divers stress abiotiques. La figure 3 résume les mécanismes de réponses rencontrés chez diverses espèces bactériennes et archéennes thermophiles (Ranawat et Rawat, 2017).

5.1. Stabilité des protéines

Les protéines des microorganismes thermophiles et hyperthermophiles ont besoin de maintenir un état natif fonctionnel à des températures dénaturant celles des mésophiles, et quelques enzymes thermostables peuvent rester actives à des températures de 140 °C (Adams et Kelly, 1995).

L'étude de la structure de ces protéines a montré que leur thermostabilité n'était pas liée à un changement radical dans leur composition en acides aminés en comparaison avec celle des mésophiles. En réalité, c'est le repliement structural prononcé, lié essentiellement à une augmentation du nombre de liaisons de type faible, qui semble être la cause principale de la thermostabilité des protéines des thermophiles et des hyperthermophiles (Cayol *et al.*, 2015; Brininger *et al.*, 2018; Finch et Kim, 2018). La présence de facteurs structuraux participe à la

stabilisation de la conformation protéique (Ladenstein et Antranikian, 1998; Feller, 2017). En effet, il a été constaté la présence d'un noyau hydrophobe excluant la présence de solvants dans les régions internes des protéines empêchant ainsi les structures protéiques de se déplier (Mehta et Satyanarayana, 2013; Cayol *et al.*, 2015). D'autres éléments structuraux semblent renforcer le repliement protéique (Capece *et al.*, 2013; Cayol *et al.*, 2015; Brininger *et al.*, 2018), notamment :

- la présence d'une proportion importante de résidus thermostables comme la proline (Mehta et Satyanarayana, 2013) ;
- le passage d'une structure monomérique à une structure oligomérique (Cicicopol *et al.*, 1994) ;
- l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène et de ponts disulfures (Jaenicke et Böhm, 1998; Beeby *et al.*, 2005) ;
- une diminution de la longueur des boucles de surface reliant des éléments de la structure secondaire (Thompson et Eisenberg, 1999) ;
- la neutralisation de la charge superficielle des protéines (Fukuchi *et al.*, 2003), et la présence de liaisons ioniques non covalentes (Das et Gerstein, 2000; Luo et Robb, 2011).

Il a été également prouvé que les thermophiles renforçaient la thermostabilité de leurs protéines par l'expression de protéines chaperons de choc thermique afin de renforcer le repliement et prévenir la dénaturation protéique (Cayol *et al.*, 2015).

5.2. Stabilité des acides nucléiques

Deux principaux mécanismes contribuant à la stabilité moléculaire de l'ADN à température élevée ont été identifiés chez les procaryotes thermophiles (Schulze-Makuch *et al.*, 2017). Le premier type de mécanisme est l'accumulation de solutés compatibles, le deuxième est la présence de protéines liées à l'ADN telles que les histones-like (chez les archées) et certaines protéines cationiques, mais surtout celle de la gyrase inverse, une topoisomérase rencontrée uniquement chez les hyperthermophiles. La gyrase inverse surenroule l'ADN positivement alors que les gyrases conventionnelles des mésophiles le surenroulent négativement (Mehta et Satyanarayana, 2013; Schulze-Makuch *et al.*, 2017). Le surenroulement positif de l'ADN montre une plus grande thermostabilité que le surenroulement négatif (Forterre *et al.*, 1996).

À noter également que les voies de réparation de l'ADN sont stimulées chez les thermophiles afin de contrer la dénaturation des acides nucléiques par effet thermique et de préserver ainsi la stabilité génétique (Touaille et Sommer, 2011; Capece *et al.*, 2013).

En outre, il a été constaté que le contenu en C+G (cyosine+guanine) de l'ARN des petites sous unités ribosomales chez les espèces thermophiles était significativement plus élevé en comparaison avec leurs homologues mésophiles. Alors que ce même rapport est non significatif au niveau génomique ce qui suggérerait son importance pour le fonctionnement des ribosomes chez les thermophiles (Madigan *et al.*, 2014).

5.3. Stabilité des lipides membranaires

L'augmentation de la température du milieu provoque l'augmentation de la fluidité des membranes cellulaires, ce qui pourrait engendrer de graves dysfonctionnements de ces dernières. Afin de maintenir une fluidité membranaire optimale, les cellules thermophiles ont ajusté la composition, la concentration et le type de leurs lipides membranaires. Ainsi, ces derniers contiennent plus d'acides saturés à chaînes non ramifiées et d'acides gras oméga alicycliques que leurs homologues mésophiles. Les archées quant à elles, possèdent de manière générale des membranes en monocouches de diphytanoyl tétraéther, et des couches de surface cristalline (*S-layer*) protéiques ou glycoprotéiques offrant une grande résistance aux températures élevées. Des étherlipides membranaires sont rencontrés également chez quelques espèces bactériennes hyperthermophiles (Mehta et Satyanarayana, 2013; Madigan *et al.*, 2014; Cayol *et al.*, 2015).

5.4. Accumulation des solutés compatibles

Les protéines et les acides nucléiques sont stabilisés à températures élevées par l'accumulation dans le cytoplasme des cellules thermophiles de solutés organiques appelés solutés compatibles ou thermolytes (Santos *et al.*, 2011). Ces solutés compatibles empêcheraient la dénaturation de macromolécules et peuvent être des polyol-phosphodiesteres comme le di-myo-inositol phosphate ou des dérivés d' α -hexose tel que le mannosylglycérate (Capece *et al.*, 2013). De plus, des polyamines comme la putrescine et la spermidine interviendraient dans des mécanismes de protection de l'ADN et des autres macromolécules (Mehta et Satyanarayana, 2013).

Des sels de potassium et de magnésium peuvent également avoir un effet protecteur contre les mutations et l'hydrolyse de l'ADN (Marguet et Forterre, 1998).

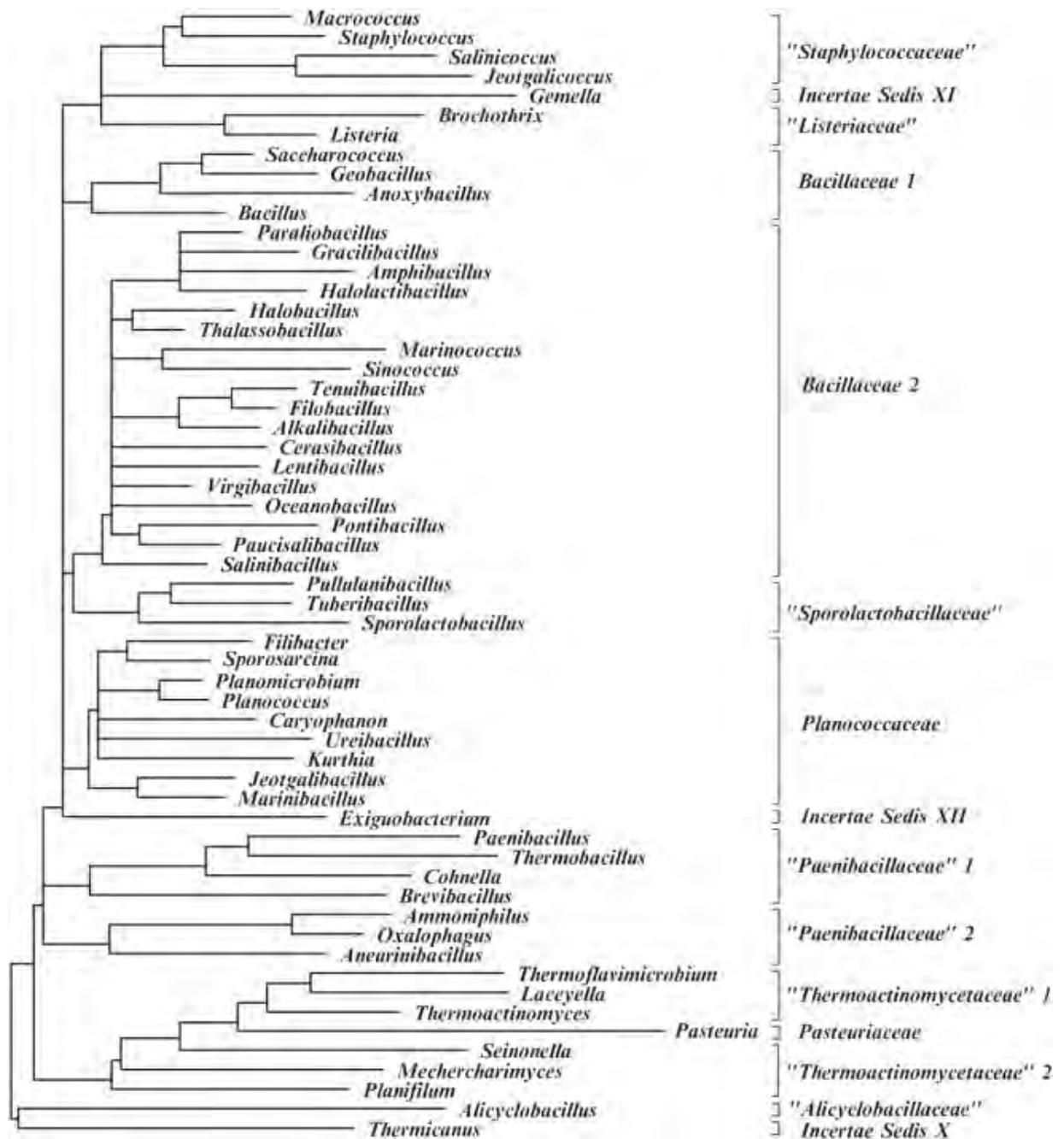


Figure 4. Dendrogramme consensus reflétant les relations phylogénétiques au sein de l'ordre des Bacillales appartenant à la classe des Bacilli basé sur l'analyse des séquences complètes du gène de l'ARNr 16S des représentants des différents sous-groupes taxonomiques (Ludwig *et al.*, 2015).

6. Bactéries aérobies thermophiles formant-endospores

6.1. Position taxonomique des bactéries aérobies thermophiles formant-endospores

Une partie considérable de la diversité des bactéries thermophiles appartient au phylum des *Firmicutes*, regroupant des espèces à Gram positif (Rosenberg *et al.*, 2014a). Cette diversité d'espèces thermophiles est présente particulièrement chez les ordres des *Clostridiales* et des *Bacillales*. Ces deux derniers sont constitués d'espèces formant des endospores capables de résister aux conditions physico-chimiques défavorables (De Vos *et al.*, 2011; Madigan *et al.*, 2014; Mandic-Mulec *et al.*, 2016; Setlow *et al.*, 2017).

Le terme "bactéries aérobies formant-endospores" est utilisé pour décrire au sein de l'ordre des *Bacillales*, les espèces du genre *Bacillus* et des genres apparentés produisant des endospores. Cependant, quelques membres sont incapables de sporulation (Logan et Allan, 2008; Logan *et al.*, 2009).

La particularité de ce groupe taxonomique est que ses membres présentent une très large distribution écologique, et avec une importante présence dans les environnements chauds, où ils peuvent être dominants. Ils sont également présents dans les environnements tempérés, voir froids tels que les habitats salins et les sols arctiques (Logan et Allan, 2008; Galperin, 2013; Mandic-Mulec *et al.*, 2016). Ce groupe présente une notable capacité de production d'enzymes extracellulaires variées d'un grand intérêt biotechnologique (Antranikian, 2007; Mandic-Mulec *et al.*, 2016).

6.2. Taxonomie des membres thermophiles de l'ordre des *Bacillales*

La dernière édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* publiée en 2015 (De Vos, 2015; Ludwig *et al.*, 2015) place l'ordre des *Bacillales* au sein de la classe des *Bacilli*, phylum des *Firmicutes*, et le divise, en se basant sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S, en 9 familles validées et en 3 familles *incertae sedis* (Figure 4). Les membres thermophiles de cet ordre sont regroupés, principalement, au sein de 3 familles:

- i. *Bacillaceae*. Elle contient de nombreuses espèces thermophiles modérées appartenant aux genres *Bacillus*, *Alkalibacillus*, *Amphibacillus*, *Anoxybacillus*, *Cerasibacillus*, *Geobacillus*, *Gracilibacillus*, *Saccharococcus* et *Virgibacillus* (Logan et Vos, 2015a) ;
- ii. *Paenibacillaceae*. Des membres thermophiles des genres *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella* et *Thermobacillus* ont été décrits (De Vos *et al.*, 2015) ;

iii. *Thermoactinomycetaceae*. Cette famille est constituée essentiellement de membres thermophiles des genres *Thermoactinomyces*, *Laceyella*, *Mechercharimyces*, *Planifilum*, *Seinonella*, et *Thermoflavimicrobium* (Goodfellow et Jones, 2015a).

7. Applications des thermophiles

Les microorganismes thermophiles possèdent un grand nombre d'applications biotechnologiques, déjà commercialisées ou en phase de recherche et de développement (Charlesworth et Burns, 2016). Deux types d'applications peuvent être distingués. Le premier repose sur l'utilisation directe des cellules de ces organismes et le second sur l'utilisation de leurs biomolécules purifiées (Quéréllou et Guézennec, 2010; Rekadwad et Gonzalez, 2018).

7.1. Exemples d'utilisations des cellules

Il s'agit d'applications pour lesquelles l'utilisation de biomolécules purifiées à partir des cultures est non rentable ou d'applications qui requièrent l'action directe d'une population microbienne, voire d'un mélange complexe de différentes espèces (Quéréllou et Guézennec, 2010; Mapelli *et al.*, 2016).

7.1.1. Bioremédiation

Beaucoup de microorganismes thermophiles ont été testés pour leur capacité de dégrader plusieurs types de polluants sous des conditions de température et de pression élevées (Peeples, 2014). Des souches d'archées et de bactéries ont été utilisées avec succès pour la biominéralisation des métaux lourds par leur réduction en présence de substances organiques ou minérales. Ceci permet par exemple de récupérer des métaux précieux tels que l'or à partir de minéraux sulfurés ou de concentrer de manière plus rentable d'autres métaux lourds comme le nickel et le mercure (Sar *et al.*, 2013; Urbietta *et al.*, 2015; Straub *et al.*, 2018). Les bactéries et les archées thermophiles sont également employées pour la détoxification des effluents de processus industriels, des hydrocarbures et de leurs dérivés (Goh *et al.*, 2013; Sar *et al.*, 2013; Panda *et al.*, 2014), et des pesticides (Hussein *et al.*, 2015). Les activités de compostage à températures élevées de ces microorganismes représentent également un moyen très efficace pour l'hydrolyse et l'élimination de plusieurs agents toxiques organiques (Rawat et Johri, 2013; Singh *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2016a; Azim *et al.*, 2018).

7.1.2. Traitement de matières lignocellulosiques

Des souches bactériennes appartenant à plusieurs genres thermophiles tels que *Geobacillus* et *Bacillus* ont été utilisées pour la production de lin, de papier, de matières

composites et de matériaux d'isolation par le traitement de matières lignocellulosiques (Juárez *et al.*, 2011; Sharma, 2014; Hussein *et al.*, 2015).

7.1.3. Biocontrôle

De nombreuses études ont montré que des espèces thermophiles de *Brevibacillus*, de *Geobacillus* et d'actinomycètes peuvent être utilisées comme agents efficaces contre les pathogènes des cultures agricoles de céréales et de légumineuses grâce à leurs activités nématocides, antifongiques et antibactériennes (Panda *et al.*, 2014; Sharma, 2014; Hussein *et al.*, 2015).

7.1.4. Production d'énergie

Les applications industrielles visant à produire de l'énergie à partir de produits et de sous-produits agricoles utilisant des microorganismes sont nombreuses. Plusieurs espèces archéennes, bactériennes et mycéliennes thermophiles sont utilisées pour produire des biogaz (méthane, hydrogène) et du biocarburant de 1^e, 2^e voire 3^e génération (Cappelletti *et al.*, 2014; Zurawski *et al.*, 2014; Olson *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2016a; Jiang *et al.*, 2017). Des essais de production d'électricité en employant des piles à combustible alimentées par l'oxydation de composés organiques et inorganiques par des microorganismes thermophiles ont également été réalisés avec succès (Urbieta *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2017; Shrestha *et al.*, 2018).

7.1.5. Cellules hôtes

Les cellules de certains thermophiles telles que l'archée *Sulfolobus solfataricus* ou de bactéries comme *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus thermoruber*, *Geobacillus stearothermophilus* et *Geobacillus kaustophilus* ont été utilisées comme cellules hôtes pour la production de protéines recombinantes thermostables et pour améliorer la thermostabilité des protéines issues d'organismes mésophiles (Albers *et al.*, 2006; Demain et Vaishnav, 2009; Kanamaru *et al.*, 2017; Drejer *et al.*, 2018; Miyano *et al.*, 2018).

Les thermophiles sont employés également comme cellules hôtes afin de produire leurs virus. Ces derniers sont une source intéressante de production d'enzymes thermoactives avec des applications en biologie moléculaire telles que des ADN et des ARN polymérases, des ligases et des nucléases (Uldahl et Peng, 2013).

Des espèces thermophiles de moisissures ont également été utilisées pour la production de protéines d'origine unicellulaire (*Single Cell Proteins*) de grande qualité nutritionnelle, destinées à l'alimentation du bétail (Singh *et al.*, 2016a).

7.1.6. Utilisations en Nanotechnologie

Des souches bactériennes et archéennes ont trouvé des applications en nanotechnologie pour la synthèse de nanoparticules (or, argent, palladium, silicium, etc.). Leurs enzymes ont été immobilisées avec succès en utilisant des nanoparticules magnétiques (Tiquia-Arashiro et Rodrigues, 2016).

7.2. Utilisations de biomolécules

L'utilisation de biomolécules extraites et purifiées représente la voie la plus commune d'exploitation des thermophiles. Ces biomolécules comprennent essentiellement des enzymes, des solutés compatibles ainsi que d'autres substances de natures diverses (Quérellou et Guézennec, 2010; Rekadwad et Gonzalez, 2018).

7.2.1. Solutés compatibles

Les solutés compatibles ou thermolytes ont gagné une attention particulière en raison de leur action comme stabilisateurs de biomolécules (enzymes, ADN, membranes, tissus), et comme agents protecteurs contre les facteurs de stress cellulaire (Borges *et al.*, 2002). En plus, les solutés compatibles augmentent les rendements de production des protéines recombinées actives et fonctionnelles exprimées chez différents hôtes (Barth *et al.*, 2000).

Des thermolytes tels que le mannosylglycérate, le mannosylglycéramide, le di-myo-inositol phosphate, le diglycérol phosphate et l'ectoïne isolés à partir de différents organismes thermophiles ont montré un effet protecteur *in vitro* et *in vivo* contre la dénaturation des protéines cellulaires causées par plusieurs maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, maladies à prions, amyloïdoses) (Jorge *et al.*, 2016).

Des essais d'incorporation de l'ectoïne en tant que composé fonctionnel dans des produits alimentaires tels que les fromages ont été menés (Raddadi *et al.*, 2015).

7.2.2. Substances antimicrobiennes

La grande biodiversité des environnements chauds peut induire la production de substances antimicrobiennes et autres métabolites secondaires par des organismes thermophiles suite à un stress concurrentiel. Beaucoup de composés bioactifs ont été isolés et identifiés à partir de ces environnements dans la perspective d'être utilisés dans des applications médicales et industrielles (Charlesworth et Burns, 2016). De nombreux exemples de la production de ces composés par des thermophiles peuvent être cités : des antibiotiques comme la thermorubine, la thermomycine et la thermocyridine produites par des espèces thermophiles d'actinomycètes, de moisissures et de *Thermoactinomyces* (Giddings et

Newman, 2015; Singh *et al.*, 2016a; Borgrave *et al.*, 2017) ; des lactonases isolées à partir de *Sulfolobus* et de *Geobacillus* (Kalia *et al.*, 2015; Charlesworth et Burns, 2016) ; des bactériocines de *Geobacillus* et de *Brevibacillus* (Singh *et al.*, 2012; Pranckute et Kuisiene, 2016); des archéocines de *Sulfolobus* (Quehenberger *et al.*, 2017) ainsi qu'une grande variété d'alcaloïdes, de composés phénoliques, de polysulfures, de polyamines et de nucléosides carbocycliques issue de plusieurs espèces bactériennes et archéennes (Giddings et Newman, 2015; Littlechild, 2015; Charlesworth et Burns, 2016; Aissaoui *et al.*, 2018).

7.2.3. Lipides et biopolymères

Plusieurs applications exploitant la grande stabilité de la structure particulière des membranes archéennes et bactériennes ont été développées.

Des vésicules artificielles fabriquées à partir des membranes archéennes ont été utilisées comme vecteurs de gènes, de protéines ou d'autres molécules. Et leurs lipides ont été testés comme lubrifiants, stabilisateurs protéiques ou comme matrices de nanoparticules (Antranikian, 2007; Finore *et al.*, 2015).

Les couches de surface cristalline (*S-layers*) composées de protéines, de sous-unités glycoprotéiques ou glycolipidiques des procaryotes ont été appliquées comme matrices d'immobilisation de biomolécules et comme biosurfactants (Antranikian, 2007; Hussein *et al.*, 2015; Urbieta *et al.*, 2015).

La production des exopolysaccharides a été observée chez plusieurs genres bactériens thermophiles (*Bacillus*, *Geobacillus*, *Thermus*, *Thermotoga*) et archéens (*Sulfolobus*, *Archaeoglobus*, *Methanothermobacter*) avec des applications potentielles en industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique et des avantages observés en milieu réactionnel à températures élevées (Finore *et al.*, 2015; Kambourova *et al.*, 2016).

7.2.4. Enzymes employées en biologie moléculaire et en biocatalyse

Une des premières utilisations des biomolécules issues des thermophiles a été l'emploi de leurs polymérase pour la réplication *in vitro* des acides nucléiques. Actuellement, un nombre considérable d'enzymes thermostables issues de microorganismes thermophiles sont employées en biologie moléculaire et dans les technologies de l'ADN recombinant : des ADN et des ARN polymérase ; des transcriptase reverse ; des enzymes de restriction ; des ligase et des nucléase, etc. (Sharma *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016a; Beygmoradi et Homaei, 2017; Straub *et al.*, 2018).

Une large panoplie d'enzymes isolées à partir de thermophiles sont également employées en biocatalyse pour la production et la transformation de molécules de grande valeur en analyse

fine. Les exemples des transaminases employées en pharmacologie, de la L-arabinose isomérase utilisée pour la fabrication d'édulcorants, des pyrimidine nucléoside phosphorylases servant à la synthèse d'analogues nucléosidiques d'intérêt médical et de certaines enzymes utilisées pour la synthèse de stéroïdes peuvent être cités (Hussein *et al.*, 2015; Littlechild, 2015; Ribeiro *et al.*, 2017).

7.2.5. Enzymes de dégradation

Le marché des enzymes industrielles représente selon des estimations récentes un chiffre d'affaires de 5 à 6 milliards de dollars (Dewan, 2017; The Freedonia Group, 2018). Environ 25% de cette demande en enzymes, principalement d'origine microbienne, est destinée à des utilisations en agroalimentaire (Buchholz et Bornscheuer, 2017; Sanchez et Demain, 2017). Actuellement, plus de 75% des enzymes commercialisées appartiennent à la classe des hydrolases et sont employées dans la dégradation et la transformation d'un nombre important de substrats naturels (Rigoldi *et al.*, 2018).

Les aptitudes technologiques (solubilité des substrats augmentée, viscosité diminuée, disponibilité biologique importante, vitesses de transfert et de réaction plus élevées, risque de contamination microbienne diminué, etc.) des enzymes de dégradation issues de microorganismes thermophiles ont été très largement décrites. Plusieurs d'entre elles sont exploitées dans des processus industriels nécessitant une conduite sous des températures élevées (Gomes et Steiner, 2004; Gomes *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2017). Ces enzymes sont supérieures aux biocatalyseurs traditionnels : thermostables, thermoactives, actives en présence des solvants organiques, résistantes aux agents protéolytiques et stables à des valeurs extrêmes de pH (Egorova et Antranikian, 2005; Finore *et al.*, 2015).

De nombreux exemples d'utilisations industrielles d'hydrolases appartenant à différentes sous-classes et issues de microorganismes thermophiles sont cités dans la littérature (Elleuche *et al.*, 2015; Neifar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2016a; Margaryan *et al.*, 2018).

Des amylases thermoactives sont employées pour la liquéfaction et la saccharification des granules d'amidon et pour la production de sirops de glucose (Kambourova, 2017; Rigoldi *et al.*, 2018). Des protéases produites par des bactéries formant-endospores thermophiles sont incorporées dans les détergents et dans des processus de fermentation alimentaire (Contesini *et al.*, 2017). Des lipases et des estérases thermoactives sont utilisées dans le raffinage des huiles végétales afin de remplacer les solvants chimiques ainsi que pour la synthèse de molécules bioactives (González-González *et al.*, 2017; Moura *et al.*, 2017).

Tableau 3. Principaux groupes d'hydrolases isolées à partir de microorganismes thermophiles et leurs utilisations.

Hydrolases	Espèces productrices	Utilisations	Références
Amylases (α -Amylase, β -Amylase, Glucoamylase, α -Glucosidase, Amylomaltase)	<i>Pyrococcus woesei</i> <i>Geobacillus thermoleovorans</i> <i>Thermomonospora viridis</i> <i>Malbranchea cinnamomea</i>	Panification, liquéfaction et saccharification d'amidon, production de glucose, désencollage de textile, industrie du papier, synthèse des oligosaccharides, application détergente, gélification, épaississants dans l'industrie alimentaire	(Antranikian <i>et al.</i> , 2005) (Han <i>et al.</i> , 2013) (Takahashi <i>et al.</i> , 1992) (Mehta et Satyanarayana, 2014)
Pullulanases	<i>Thermotoga neapolitana</i> <i>Fervidobacterium pennivorans</i> <i>Anoxybacillus</i> sp. SK3-4		(Kang <i>et al.</i> , 2011) (Koch <i>et al.</i> , 1997) (Kahar <i>et al.</i> , 2016)
Enzymes lignocellulolytiques (Endoglucanase, β -Glucosidase, Cellobiohydrolase, xylanases, β -Mannanase)	<i>Pyrococcus furiosus</i> <i>Bacillus halodurans</i> <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Dégradation des polymères, éclaircissement de la couleur, saccharification des déchets agricoles et industriels, alimentation des animaux, bio polissage des produits de coton, bioéthanol, synthèse des sucres et des polysaccharides purs. Blanchiment du papier, alimentation des animaux	(Irfan <i>et al.</i> , 2016) (Jiang <i>et al.</i> , 2006b) (Antranikian <i>et al.</i> , 2005) (Singh <i>et al.</i> , 2003)
Chitinases (Exochitinase, Chitobiase)	<i>Thermococcus chitinophagus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Utilisation de la biomasse des organismes des environnements marins, conversion de la cellulose en éthanol, synthèse de molécules d'intérêt pharmaceutique	(Takayanagi <i>et al.</i> , 1991) (Huber <i>et al.</i> , 1995) (Tsujiibo <i>et al.</i> , 1993)
Pectinases	<i>Thermotoga maritima</i> <i>Clostridium stercorarium</i> <i>Scytalidium thermophilum</i>	Clarification des jus de fruits et des vins	(Kluszens <i>et al.</i> , 2003) (Donaghy <i>et al.</i> , 2000) (Singh <i>et al.</i> , 2016a)
Lipases et phospholipases	<i>Thermotoga lettingae</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> <i>Aspergillus carneus</i>	Panification, production de boissons, synthèse de polymères, de surfactants, de substances bioactives, traitement de papier, de cuir et de pulpe, production de biocarburant	(Wei <i>et al.</i> , 2015) (Alabras <i>et al.</i> , 2017) (Singh et Singh, 2012) (Saxena <i>et al.</i> , 2003)
Estérases	<i>Sulfolobus solfataricus</i> <i>Thermus thermophilus</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Blanchiment du papier, bioremédiation, biotransformation en présence de solvants organiques	(Shang <i>et al.</i> , 2010) (Fuciños <i>et al.</i> , 2005) (Torres <i>et al.</i> , 2009)
Protéases	<i>Pyrococcus furiosus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> <i>Trichoderma asperellum</i>	Détergents, panification, coagulation laitière, brassage, production d'acides aminés, attendrissage de la viande	(Eggen <i>et al.</i> , 1990) (Ferrero <i>et al.</i> , 1996) (Fuciños <i>et al.</i> , 2005) (Kleine, 1982) (Viterbo <i>et al.</i> , 2004)

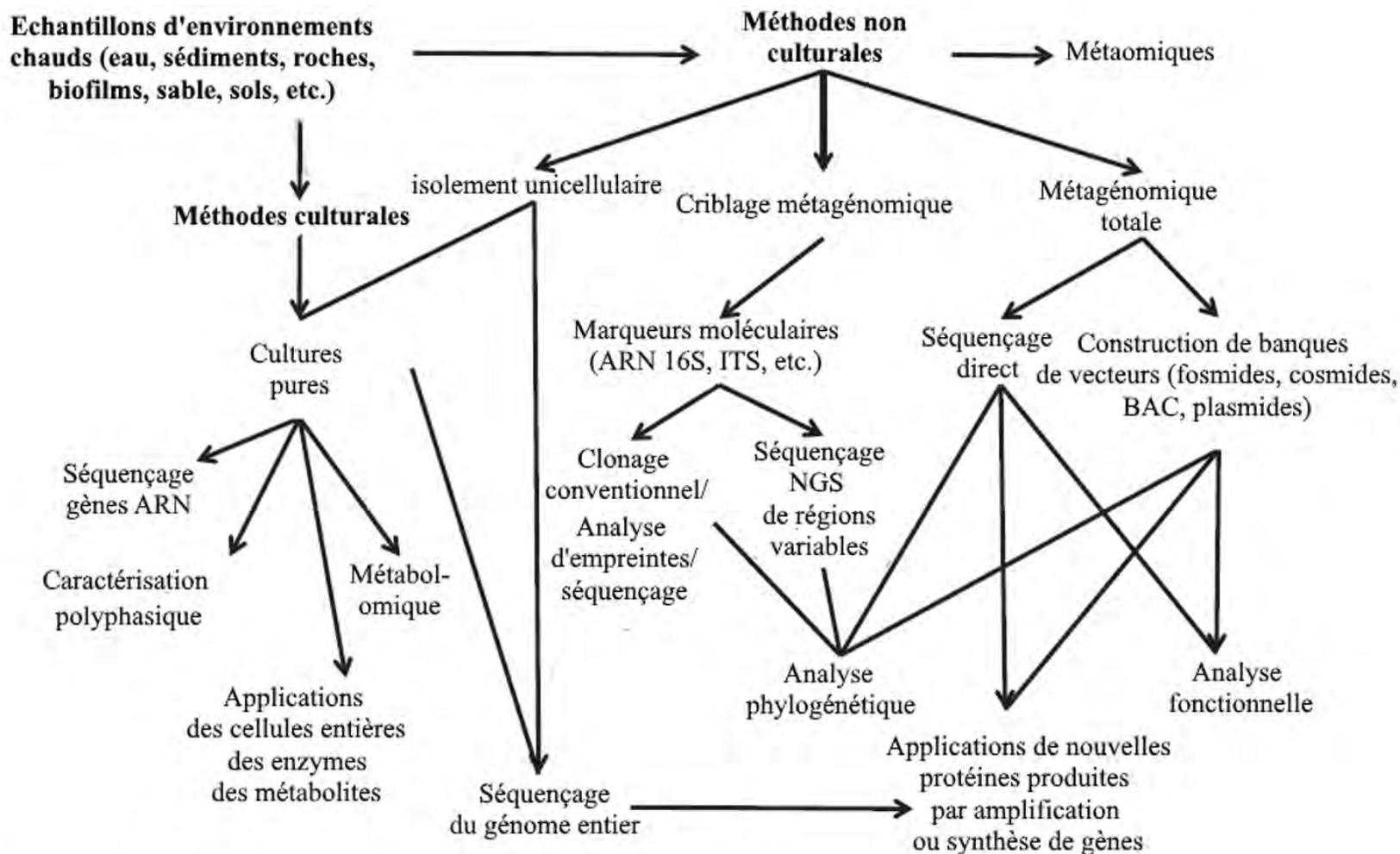
Des cellulases, des hémicellulases et des xylanases de plusieurs espèces thermophiles sont appliquées en bio-industrie pour transformer la lignocellulosique en énergie et en sous-produits à valeur ajoutée (Kambourova et Derekova, 2013; Kumar *et al.*, 2018b).

De nouvelles applications sont également en cours de développement et incluent d'autres hydrolases telles que les chitinases, les pectinases, les phytases, les phosphatases, les mannanases, et les pullulanases (Kumar *et al.*, 2016a; Dumorne *et al.*, 2017; Gundala et Chinthala, 2017).

Le tableau 3 présente des exemples d'hydrolases produites par des microorganismes thermophiles et leurs principales utilisations actuelles ou potentielles.

À noter que d'autres enzymes appartenant à plusieurs classes catalytiques ont été également isolées et sont potentiellement utilisables dans des applications industrielles. Par exemple : les glucose isomérases employées pour la production de sirop de maïs à haute concentration de fructose (*high fructose corn syrup*), les laccases employées dans diverses industries et en bioremédiation, les peroxydases employées pour la biodégradation de polymères lignocellulosiques, les alcool déshydrogénases utilisées dans les réductions énantiosélectives et l'oxydation des alcools secondaires, les décarboxylases appliquées dans la production de blocs chiraux dans la synthèse de produits pharmaceutiques, etc. (Antranikian, 2007; Kumar *et al.*, 2016a).

**Chapitre 2. Bioprospection
des microorganismes
thermophiles**



TTS: internal transcribed spacer
BAC: bacterial artificial chromosome
NGS: next-generation sequencing

Figure 5. Étude de la biodiversité des microorganismes thermophiles et de leurs molécules par méthodes culturelles et non culturelles (Urbieta *et al.*, 2015).

1. Méthodes de bioprospection des microorganismes thermophiles

La méthodologie utilisée dans l'étude de la diversité des microorganismes thermophiles et de leurs actifs biotechnologiques, ou bioprospection, repose toujours sur l'isolement et la culture de leurs cellules, complétés par les approches de biologie moléculaire, les techniques de l'ADN recombinant et l'ingénierie des protéines. À cette approche classique «culture dépendante» sont venues se rajouter la métagénomique et la bioinformatique.

La métagénomique repose sur l'extraction de l'ensemble des acides nucléiques des espèces associées à un échantillon brut (sol, eau, sédiment, roche, animaux, végétaux, etc.), la construction de banques génomiques, le séquençage massif des ressources génétiques clonées d'intérêt et l'analyse bioinformatique du contenu génétique correspondant. La bioinformatique est aussi l'approche obligée pour la recherche de l'information génétique. Il s'agit de prospector les gènes d'intérêt dans les nombreux génomes complets de thermophiles accessibles dans des bases de données spécialisées disponibles sur Internet (Quérellou et Guézennec, 2010; Tanner *et al.*, 2017). La figure 5 résume les principales techniques de bioprospection utilisées pour l'étude des thermophiles et de leurs métabolites.

1.1. Étude de la diversité des populations microbiennes thermophiles

La diversité des microorganismes thermophiles a été recensée par des méthodes culturales et non culturales. Bien que les techniques culturales soient un moyen très fiable pour l'étude de la diversité, il est généralement admis que seul moins de 1% des espèces microbiennes existantes ont pu être isolées, la plupart d'entre elles étant difficilement cultivables (Vetriani *et al.*, 1998; Ward, 1998; Cayol *et al.*, 2015).

1.1.1. Méthodes culturales

Les méthodes classiques basées sur l'isolement et la culture de microorganismes thermophiles en amont de leur identification morphologique, physiologique, biochimique et génétique sont toujours aussi importantes pour l'étude des caractéristiques des cultures pures et dans le développement d'applications impliquant des cellules entières ou dans la production de leurs biomolécules. Elles sont également employées dans l'étude de la structure des populations microbiennes de plusieurs habitats chauds (Ramganesch *et al.*, 2014; Urbietta *et al.*, 2015).

1.1.2. Méthodes non culturales

Les méthodes d'étude de la diversité des microorganismes thermophiles par approche non culturale, basées sur l'analyse moléculaire directe d'échantillons de l'environnement, sont utilisées pour l'étude de microbiotes. Parmi les techniques utilisées, seules ou combinées figurent celles basées sur la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), telles que l'analyse RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) et la PCR quantitative, sur l'analyse métagénomique (métagénomique, métatranscriptomique, métaprotéomique, etc.) ou sur d'autres approches (puces à ADN, hybridation *in situ* en fluorescence, spectrométrie de masse, etc.) (Vetriani *et al.*, 1998; Ward, 1998; Jeanthon, 2000; Welker et Moore, 2011; Su *et al.*, 2012). Elles sont également très variées selon la nature des marqueurs ciblés (Urbieta *et al.*, 2015; DeCastro *et al.*, 2016):

- dans les méthodes clonales, les séquences presque complètes des gènes de l'ARNr 16S sont amplifiées à partir d'ADN génomique puis sont clonées dans des vecteurs afin de transformer des hôtes adaptés comme *Escherichia coli*. Permettant l'obtention de plusieurs centaines de clones recombinants, souvent différenciés manuellement par analyse de leurs empreintes génétiques, par exemple en analysant leurs profils RFLP;
- l'analyse métagénomique ciblée est basée sur le séquençage partiel des neuf régions variables (V1-V9), ou des neuf régions conservées (C1-C9) du gène de l'ARNr 16S. Cette méthode emploie des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS, *Next-Generation Sequencing*): séquençage par synthèse Illumina, pyroséquençage 454, etc. ;
- les méthodes métagénomiques globales ou *shotgun* permettant le séquençage de plus grandes portions des séquences du génome ont été employées pour l'analyse d'un grand nombre d'environnements chauds. Ceci a permis l'étude comparative et fonctionnelle de génomes entiers, et le criblage de gènes d'intérêt au sein d'une importante biodiversité.

1.2. Bioprospection de nouvelles enzymes

Les approches conventionnelles de prospection des activités enzymatiques des organismes thermophiles sont toujours d'actualité. Ces approches incluent l'isolement de microorganismes à partir d'échantillons de l'environnement, le criblage des activités enzymatiques d'intérêt sur milieu de culture solide ou liquide puis la production de ces enzymes en bioréacteurs. Elles permettent encore de découvrir et de produire un grand nombre d'enzymes d'intérêt industriel, notamment les hydrolases et les oxydoréductases (Martin et Vandenbol, 2016; Yoo *et al.*, 2017; Boteva et Kambourova, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

En plus, le criblage métagénomique (séquençage NGS, études comparatives et fonctionnelles, etc.) constitue un outil précieux pour la découverte d'enzymes d'intérêt, notamment à partir de la biodiversité non cultivable des environnements chauds. Des échantillons de ces environnements sont ainsi utilisés afin de constituer des banques métagénomiques et de cribler par méthodes bioinformatiques la présence de gènes de nouvelles enzymes au sein de ces banques (DeCastro *et al.*, 2016; Martin et Vandenberg, 2016). Les techniques de génie génétique permettent par la suite la modélisation, l'expression et la production de ces enzymes (Zhang *et al.*, 2018).

2. Approche polyphasique de la taxonomie des procaryotes

La taxonomie est la science qui étudie les relations entre les organismes (Vandamme *et al.*, 1996; Gillis *et al.*, 2015), et celle des procaryotes englobe :

- la classification des organismes en groupes hiérarchiques distincts (domaine, phylum, classe, ordre, famille, genre, espèce et sous-espèce) selon leurs similarités ;
- l'identification des organismes inconnus en les affiliant à l'un de ces groupes ;
- la nomenclature qui consiste à attribuer des noms à ces groupes (De Vos *et al.*, 2017).

Actuellement, la taxonomie des procaryotes est basée sur la détermination polyphasique des caractères phénotypiques et génotypiques (Vandamme *et al.*, 1996; Stackebrandt *et al.*, 2002; Tindall *et al.*, 2010; Ramasamy *et al.*, 2014; De Vos *et al.*, 2017).

Les tests phénotypiques font appel aux caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et chimiotaxonomiques des procaryotes en utilisant des techniques standardisées (Sneath et Sokal, 1973; Boero et Bernardi, 2014; Ramasamy *et al.*, 2014).

La chimiotaxonomie consiste en l'analyse de la composition chimique de certains constituants cellulaires tels que les lipides polaires, les acides gras membranaires et les constituants de la paroi par méthodes chromatographiques et spectrométriques (Zakhia et de Lajudie, 2006; Gillis *et al.*, 2015; De Vos *et al.*, 2017).

Les critères taxonomiques génotypiques incluent l'hybridation ADN-ADN, la détermination du contenu en G+C du génome et l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S auxquelles s'est ajouté ces dernières années le séquençage entier du génome (WGS, *Whole Genome Sequencing*) (Tindall *et al.*, 2010; De Vos *et al.*, 2017). La phylogénomique permet par exemple de confirmer ou de rectifier la classification taxonomique classique (Delsuc *et al.*, 2005; Maayer *et al.*, 2018).

3. Approche protéomique de l'étude des microorganismes thermophiles

Les techniques standards de protéomique sont applicables pour l'analyse des protéines des microorganismes thermophiles. Les données protéomiques obtenues peuvent être employées pour l'étude des caractéristiques physiologiques de ces organismes, mais également pour exploiter leurs protéines dans des applications biotechnologiques (Burg *et al.*, 2011). Les techniques employées serviront à séparer et à identifier les molécules protéiques d'intérêt et leurs choix dépendra de l'organisme, du choix du procédé de production, de la nature des protéines étudiées et de l'objectif de l'analyse protéomique (Neifar *et al.*, 2015).

3.1. Extraction et préparation des solutions protéiques

Les opérations qui suivent la fermentation optimisée de l'organisme pour la production de la protéine d'intérêt ont pour objectif d'assurer un rendement maximal dans la récupération de la protéine à des taux d'activité biologique satisfaisants. Ce processus inclut la séparation des cellules et des débris cellulaires, suivie par l'extraction et la purification de la protéine à partir du milieu de culture liquide (Harzevili, 2014). Une combinaison de méthodes de séparation physique (centrifugation, filtration, dialyse, sonication, traitement par choc thermique, etc.), et chimique (précipitation avec sels et solvants organiques, etc.) est employée (Yun *et al.*, 2016).

3.2. Séparation et purification des protéines

Les protéines récupérées en fractions solubles sont ensuite séparées selon leurs propriétés physico-chimiques : solubilité, charge électrique totale, poids moléculaire, hydrophobicité, etc. Cette séparation peut se faire avec des méthodes électrophorétiques basées sur l'utilisation des gels de polyacrylamide (PAGE, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) comme l'électrophorèse monodimensionnelle dénaturante en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE 1D), l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE), et la focalisation isoélectrique préparative (FIE).

Une autre alternative de purification des protéines consiste à employer les techniques de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans lesquelles les échantillons protéiques sont séparés sur colonnes selon leurs différentes propriétés physico-chimiques (Tableau 4) (Yun *et al.*, 2016).

Tableau 4. Types de colonnes utilisées pour la purification des protéines par HPLC (Yun *et al.*, 2016).

Type de colonne	Principe de séparation	Propriétés
Échange d'ions	Charge électrique	Haute résolution Grande capacité Grande vitesse
Filtration sur gel/d'exclusion stérique	Poids moléculaire	Haute résolution
En phase inverse	Hydrophobicité	Haute résolution
D'interaction hydrophobe	Hydrophobicité	Bonne résolution Bonne capacité Bonne vitesse
D'affinité	Spécificité du ligand	Haute résolution Grande capacité Grande vitesse

3.3. Identification des protéines

De manière générale, deux types de méthodes, à savoir le séquençage protéique par la méthode d'Edman et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), sont utilisées pour l'identification de protéines inconnues (Gasteiger *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2012). À ces méthodes sont combinées plusieurs outils bioinformatiques dont le principe est la comparaison des séquences protéiques et des spectres spectrométriques obtenus avec des banques de données de protéines connues telles que UniProt (*Universal Protein Resource*, <http://www.uniprot.org/>) ou PDB (*Protein Data Bank*, <https://www.wwpdb.org/>) (Yun *et al.*, 2016).

Chapitre 3. Protéases

1. Définition et rôles physiologiques des protéases

Les protéases (peptidases, peptides hydrolases ou enzymes protéolytiques) constituent un large groupe d'enzymes qui, d'après la définition du comité de nomenclature (EC, *Enzyme Commission*) de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB), sont des hydrolases agissant sur les liaisons peptidiques entre les acides aminés de la structure primaire des protéines (Souza *et al.*, 2015). Le clivage de ces liaisons peptidiques conduit à la dégradation des substrats protéiques en peptones, polypeptides, dipeptides, et finalement en acides aminés (Salleh *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2015).

La majorité des enzymes protéolytiques sont des hydrolases. Toutefois, il existe des enzymes, essentiellement de type lyases et transférases, ayant d'autres mécanismes catalytiques (parfois autocatalytiques) permettant de briser les liaisons peptidiques (Rawlings, 2013; Białkowska *et al.*, 2016).

Les protéases sont essentielles à toutes les formes de vie cellulaires, ainsi que pour la réplication des virus en assurant plusieurs fonctions physiologiques intra et extracellulaires.

La fonction principale des protéases extracellulaires est une fonction nutritionnelle permettant la dégradation des polypeptides et des protéines en plus petites molécules pouvant être assimilées par les cellules.

Les protéases intracellulaires jouent également des rôles nutritionnels, en plus d'assurer d'autres fonctions dans les modifications post-traductionnelles, dans la modulation de l'expression des gènes, dans les voies de sécrétion de plusieurs protéines enzymatiques et hormonales, et dans les phénomènes d'apoptose et d'autolyse. Elles sont également impliquées dans de nombreuses physiopathologies et dans le cycle de vie de plusieurs agents pathogènes et parasitaires (Rao *et al.*, 1998; Salleh *et al.*, 2006; Rawlings, 2013; Vranova *et al.*, 2013; Sawant et Nagendran, 2014).

2. Classification des protéases

Dans la nomenclature des enzymes (IUBMB, 1992; Webb, 1993) (mises à jour disponibles sur <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/>), les hydrolases constituent la classe 3 dans laquelle la sous-classe 3.4. est occupée par les peptidases (Rawlings, 2013). Actuellement, cette sous-classe est composée de 19 sous-sous-classes réparties entre exopeptidases (EC 3.4.11-19) et endopeptidases (EC 3.4.21-24 et EC 3.4.99) (Białkowska *et al.*, 2016; Tavano, 2017; IUBMB, 2018).

Les exopeptidases agissent seulement aux extrémités des chaînes polypeptidiques. Alors que les exopeptidases agissent sur l'extrémité N-terminale libérant un seul résidu aminé

(aminopeptidases, EC 3.4.11), un dipeptide ou un tripeptide (dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-peptidases, EC 3.4.14) se distinguent de celles agissant sur l'extrémité carboxy-terminale, libérant un seul résidu aminé (carboxypeptidases, EC 3.4.16-18) ou un dipeptide (peptidyl-dipeptidases, EC 3.4.15).

Les carboxypeptidases sont divisées sur la base de leurs mécanismes catalytiques en sérine-carboxypeptidases (EC 3.4.16), métallo-carboxypeptidases (EC 3.4.17) et en cystéine-carboxypeptidases (EC 3.4.18). D'autres exopeptidases sont spécifiques aux dipeptides (dipeptidases, EC 3.4.13), ou aux résidus terminaux qui sont substitués, cyclisés ou liés par des liaisons isopeptides (liaisons autres que celles entre groupements α -carboxyl et α -amino) (oméga peptidases, EC 3.4.19).

Les endopeptidases sont divisées sur la base de leurs mécanismes catalytiques en sérine-endopeptidases (EC 3.4.21), cystéine-endopeptidases (EC 3.4.22), aspartate-endopeptidases (EC 3.4.23), métallo-endopeptidases (EC 3.4.24) et en thréonine-endopeptidases (EC 3.4.25). Les endopeptidases n'ayant pas été assignées à l'une de ces sous-sous-classes sont groupées en EC 3.4.99 (IUBMB, 2018).

Une autre classification évolutionniste a été proposée. Elle est basée sur l'homologie entre les séquences et les structures 3D des enzymes protéolytiques ainsi que sur leurs mécanismes catalytiques. Cette classification répartie les peptidases en Aspartate (A), Cystéine (C), Glutamate (G), Métallo (M), Asparagine (N), mixtes (P), Sérine (S) et Thréonine (T) peptidases, et en peptidases aux mécanismes catalytiques inconnus ou non-hydrolytiques (U) (Rawlings et Barrett, 1993; Białkowska *et al.*, 2016; Contesini *et al.*, 2017). Chacun de ces groupes est divisé en familles, sous-familles et en clans selon le degré d'homologies.

La banque de données MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) utilise cette classification pour répertorier les données liées à plus de 9000 peptidases réparties en 268 familles et 62 clans (Rawlings *et al.*, 2018).

Les protéases sont très sensibles aux variations de pH du milieu réactionnel. Elles sont classées selon leurs pH optimaux d'activité en protéases acides (pH [2,0-6,0]), neutres ([6,0-8,0]) et alcalines ([8,0-13,0]) (Tavano, 2017).

3. Mécanismes catalytiques

Les molécules de peptidases les plus simples possèdent deux sous-domaines séparés par le site actif (Figure 6). Généralement, des paires ou des triplets (parfois même des quadruplets) de résidus aminés à l'intérieur du site actif constituent le site de liaison en

permettant à un seul acide aminé du substrat de se fixer. La nature des acides aminés capables de se fixer au site de liaison détermine la spécificité de la peptidase (Rawlings, 2013).

La composition en acides aminés du site de liaison varie selon la famille de peptidases. Ainsi, ce site est constitué d'un triplet de sérine chez les sérine-peptidases alors que les thréonine-peptidases incluent une thréonine dans leur structure, les cystéine-peptidases ont une paire de cystéine/histidine. Le site de liaison est constitué par deux aspartates chez les aspartate-peptidases ou par une paire glutamate/glutamine (ou aspartate) chez les glutamate-peptidases. Enfin, la structure du site actif des métallopeptidases est plus hétérogène, mais inclue des ions métalliques catalytiquement actives (Salleh *et al.*, 2006; Rawlings, 2013; Tavano, 2017).

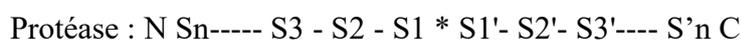
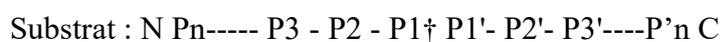


Figure 6. Structure typique d'une peptidase. Le site catalytique est flanqué par des sous-sites spécifiques (numérotés S1...Sn et S1'...S'n à partir du site actif en allant vers le côté N- ou C-terminal, respectivement). Les résidus qu'ils accommodent sont numérotés P1...Pn, et P1'...Pn', respectivement. Dans cette représentation, le site catalytique de l'enzyme est marqué par un *. La liaison peptidique clivée (liaison scissile) est indiquée par le symbole † dans la formule structurale du substrat (Berger et Schechter, 1970; IUBMB, 2018).

4. Sources des protéases

En raison de leur importance biologique, les protéases peuvent être récupérées à partir de sources très variables, allant des cellules animales et végétales et jusqu'aux microorganismes les plus primitifs, y compris viraux (Tavano, 2017). Les protéases constituent environ 60% du marché mondial des enzymes industriels. En dehors de certaines protéases d'origine végétale (papaïne, bromelaïne) et animale (trypsine, chymotrypsine, pepsine), la plupart des enzymes protéolytiques utilisées dans des applications biotechnologiques sont d'origine microbienne (Sawant et Nagendran, 2014; Souza *et al.*, 2015; Sanchez et Demain, 2017). Ces enzymes, dominées par les sérine, cystéine et métallo-protéases, sont produites surtout à partir de moisissures et de bactéries aérobies formant-endospores (Banerjee et Ray, 2017; Contesini *et al.*, 2017; Rigoldi *et al.*, 2018). La préférence pour des sources microbiennes est due à plusieurs raisons, à savoir :

- la facilité de leur culture à grande échelle, à moindre coût de production avec un grand rendement (Devasena, 2010; Tavano *et al.*, 2018) ;

- la production extracellulaire des protéases par la majorité des microorganismes simplifie les méthodes d'extraction et de séparation des protéases du milieu après fermentation (Savitha *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2015) ;
- la grande diversité des caractéristiques physiques et chimiques des protéases microbiennes et leurs conditions réactionnelles avec la simplicité relative de leur manipulation génétique (Sawant et Nagendran, 2014; Chitte et Chaphalkar, 2017).

Comme toutes les enzymes thermostables, les protéases isolées à partir des procaryotes thermophiles offrent des avantages supplémentaires liés à leurs activités à haute température (Tavano, 2017; Barzkar *et al.*, 2018). Plusieurs de ces protéases, isolées à partir d'une grande biodiversité thermophile, ont trouvé des applications industrielles ou sont en cours d'étude et de développement (Tableau 5).

Tableau 5. Sources de quelques protéases thermostables.

Protéase	Thermophile producteur	Référence
Pyrolysine	<i>Pyrococcus furiosus</i>	(Eggen <i>et al.</i> , 1990)
Stetterlysine	<i>Thermococcus stetteri</i>	(Voorhorst, 1998)
Subtilisine	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Jacobs <i>et al.</i> , 1985)
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Ferrero <i>et al.</i> , 1996)
Thermitase	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	(Kleine, 1982)
Biolysine	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	(Mansfeld, 2013)
Thermolysine	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	(Feder et Schuck, 1970)
Aqualysine	<i>Thermus aquaticus</i>	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2008)
Thermomycolase	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>	(Ong et Gaucher, 1976)

5. Applications des protéases

Les protéases sont d'un très grand intérêt biotechnologique. Elles trouvent leurs applications en industrie, notamment dans celle des détergents et dans la transformation des produits alimentaires, mais également dans des applications analytiques et dans le domaine biomédical (Li *et al.*, 2013; Białkowska *et al.*, 2016; Tavano *et al.*, 2018).

5.1. En industrie agroalimentaire

La protéolyse est un puissant outil pour la modification des propriétés des protéines et des systèmes protéiques. Elle inclut des changements dans les propriétés de solubilité, de

gélation, d'émulsification et de moussage, ce qui en fait un procédé idéal pour des applications en industrie agroalimentaire. La modification protéolytique des aliments est accompagnée également par une amélioration de la valeur et des propriétés nutritionnelles, de la qualité sensorielle, de la digestibilité et des propriétés fonctionnelles (Panyam et Kilara, 1996; Van Boekel *et al.*, 2010; Tavano, 2013).

En industrie laitière, des préparations commerciales de protéases sont employées dans la coagulation du lait et dans la maturation de différents types de fromages (Reps *et al.*, 1998; Ardö *et al.*, 2017; Horne et Lucey, 2017). Les protéases sont également employées en brassage pour éviter la formation de brume dans la bière et la réduction de la turbidité des jus de fruits et des liqueurs. Elles sont utilisées pour l'attendrissage des viandes en dégradant partiellement les myofibrilles et les protéines des cellules stromales tout en développant leur saveur. En industrie boulangère, les protéases servent à l'hydrolyse partielle du gluten, nécessaire dans certaines formulations (Kumari *et al.*, 2012; Mehtani *et al.*, 2013; Barekat et Soltanizadeh, 2017; Tavano *et al.*, 2018). Certaines de ces enzymes (présures bovines et microbiennes, Alcalase, Flavourzyme) sont issues de mésophiles, alors que d'autres (Thermolysine, Thermitase) proviennent de microorganismes thermophiles (Souza, 2015; Tavano, 2017).

Les protéases sont également employées afin de produire des préparations commerciales d'hydrolysats protéiques de caséine, de céréales, de légumineuses, de viande et de produits de la pêche pouvant servir à l'élaboration d'aliments fonctionnels (Mehtani *et al.*, 2013; Fernandes, 2016). Des protéases thermostables sont également utilisées pour revaloriser la kératine issue de certaines productions animales (volailles, produits de mer, etc.) en la convertissant en concentrés protéiques destinés à la production de SCP (*Single Cell Proteins*) ou à la formulation d'aliments fonctionnels et de suppléments alimentaires destinés à l'alimentation animale et humaine (Synowiecki, 2010; Adedayo *et al.*, 2011). La Thermosine immobilisée de *Bacillus thermoproteolyticus* est encore utilisée dans la synthèse de l'ester méthylique de l'aspartyl-phénylalanine, connu sous le nom d'aspartame, un édulcorant très employé en industrie alimentaire (Birrane *et al.*, 2014).

Des essais d'application de protéases thermostables sont menés dans des produits alimentaires d'origine animale (produits laitiers) et végétale (soja) afin de réduire l'allergénicité de certaines protéines et de produire des peptides à activités antimicrobiennes et antioxydantes (Korhonen et Pihlanto, 2006; Singh *et al.*, 2014; Toldrá *et al.*, 2017; Tavano *et al.*, 2018).

5.2. Autres applications

Les protéases sont très employées dans les filières de production non alimentaires. Ainsi, les protéases alcalines, thermostables et résistantes à différents stress chimiques, issues des espèces de *Bacillus* telles que l'Alcalase et la Subtilisine sont incorporées avec d'autres hydrolases dans beaucoup de formulations de détergents pour l'élimination de tâches difficiles (Souza *et al.*, 2015; Białkowska *et al.*, 2016). Des protéases alcalines sont également employées dans l'industrie du textile et en tannerie pour la préparation des matières premières (peaux animales, soie, etc.) (Salleh *et al.*, 2006; Białkowska *et al.*, 2016).

Des protéases sont employées en synthèse organique pour la production de peptides et d'autres composés non protéiques tels que les esters. Elles sont également utilisées pour la récupération de l'argent contenu dans les déchets de films photographiques (Salleh *et al.*, 2006; Jian *et al.*, 2011; Białkowska *et al.*, 2016).

Dans le domaine biomédical, les protéases sont très utilisées en analyse pour le séquençage des protéines, en spectrométrie de masse, en biologie moléculaire pour la purification des acides nucléiques, en culture cellulaire pour la préparation des lignées cellulaires animales. Elles sont utilisées dans la recherche fondamentale pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de certaines maladies telles que les cancers, les maladies à prions et le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) et dans les essais de développement d'agents thérapeutiques contre ces maladies (Mótyán *et al.*, 2013; Sawant et Nagendran, 2014; Tavano *et al.*, 2018).

En pharmacologie et en cosmétologie, des élastases, gélatinases et kératinases ont été incorporées dans des produits cosmétiques afin d'hydrolyser les liaisons peptidiques des protéines de l'épiderme dans des buts esthétiques et thérapeutiques (Souza *et al.*, 2015; Chitte et Chaphalkar, 2017). Elles sont également mélangées aux solutions de désinfection, et utilisées pour la cicatrisation des tissus épidermiques (Mehtani *et al.*, 2013; Białkowska *et al.*, 2016; Contesini *et al.*, 2017).

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

Les sources chaudes terrestres ont été décrites dans la littérature comme étant des environnements indigènes d'une grande diversité de bactéries aérobies thermophiles. Ce groupe taxonomique possède un important potentiel biotechnologique, notamment pour la dégradation de polymères de diverses natures (Derekova *et al.*, 2008b; Arya *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2015).

Cette étude a deux principaux objectifs :

- Étudier la diversité de quelques environnements chauds algériens par méthodes culturelles et non-culturelles ;
- Prospecter l'activité protéolytique extracellulaire de souches thermophiles sélectionnées puis produire et caractériser les protéases extracellulaires des souches productrices les plus intéressantes.

1.1. Déroulement de l'expérimentation

Ce travail a été réalisé entre novembre 2012 et mars 2018. L'expérimentation a été réalisée dans différents laboratoires :

- l'isolement, la caractérisation phénotypique et les essais préliminaires de production ont été réalisés au niveau des laboratoires de recherche Alimentation, Nutrition et Santé (ALNUTS) et Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), localisés au niveau de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro- Alimentaires (INATAA) de l'Université Frères Mentouri Constantine 1;
- la caractérisation moléculaire des souches et l'étude métagénomique ont été menées au niveau du centre d'écologie microbienne et de génomique (CMEG) de l'Université de Pretoria, Afrique du Sud (février-mai 2015) ;
- un premier essai infructueux de purification et de caractérisation des protéases a été mené au niveau de l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) de l'Université Aix-Marseille, France (février-mai 2016) ;
- la purification et la caractérisation des protéases ont été effectuées au niveau du département de biologie cellulaire et moléculaire à l'Université de La Corogne, Espagne (mai-juillet 2017).

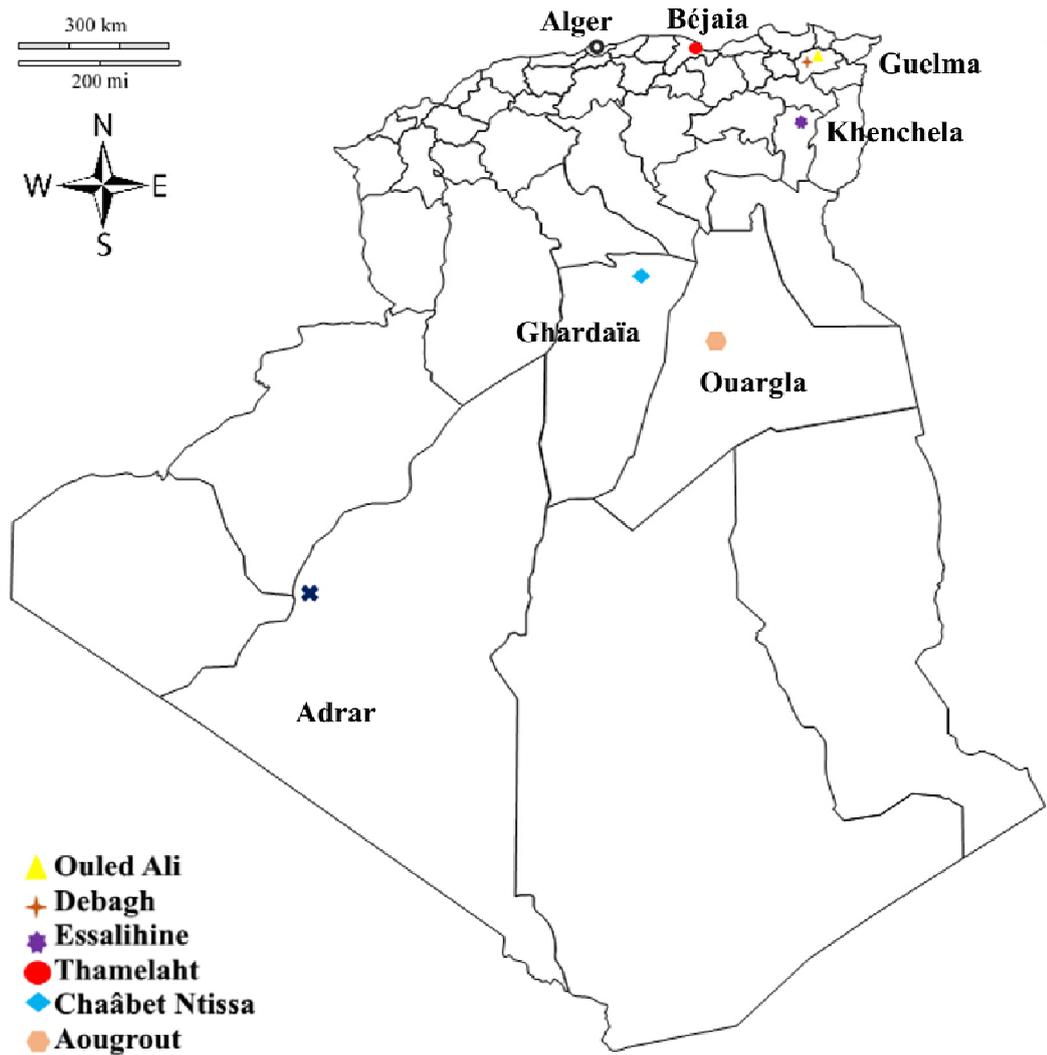


Figure 7. Carte montrant la répartition des sites étudiés.

Tableau 6. Répartition géographique des sites de prélèvement.

Site	Coordonnées		Wilaya
	Longitude ; Latitude*	Altitude* (m)	
Hammam Debagh	36° 27' N ; 7° 16' E	298	Guelma
Hammam Ouled Ali	36° 34' N ; 7° 23' E	256	Guelma
Hammam Essalihine	35° 25' N ; 7° 5' E	1128	Khenchela
Thamelah, Ait Smaïl	36° 32' N ; 5° 11' E	890	Béjaïa
Forage pétrolier de l'ENAFOR, Hassi Messaoud	30° 24' N ; 5° 23' E	213	Ouargla
Chaâbet Ntissa, Béni Isguen	32° 27' N ; 3° 40' E	625	Ghardaïa
Aougrout, Touat	28° 69' N ; 0° 31' E	280	Adrar

*Données récoltées depuis Google Earth Pro v7.3 (Octobre 2018) ; m : mètre ; N : Nord ; E : Est.

1.2. Échantillonnage

1.2.1. Description des sites étudiés

Afin de cibler des environnements chauds les plus variés possible, les sites de prélèvement sont répartis sur différentes zones géographiques du Nord est et du Sud algériens (Figure 7). Ces sites représentent des habitats variés du point de vue physico-chimique ce qui est susceptible de permettre une étude d'une assez large diversité bactérienne thermophile.

Le tableau 6 dresse la liste des zones géographiques ayant été choisies pour effectuer ces prélèvements :

- Hammam Debagh : appelé également Hammam Meskhoutine, le site comprend neuf sources d'eaux hyperthermales, les plus chaudes d'Algérie, atteignant jusqu'à 98 °C au point d'émergence de l'eau. Elles sont de nature saline, bicarbonatée calcique et chlorurée sodique, avec dégagement d'hydrogène sulfuré. Ces eaux sont exploitées par les stations thermales environnantes (Saibi, 2009; Amarouche-Yala *et al.*, 2015) ;
- Hammam Ouled Ali : Trois sources thermales alimentent les stations constituant le site. Le faciès chimique de ses eaux est chloruré calcique (Saibi, 2009; Bahri *et al.*, 2011) ;
- Hammam Essalihine : cette source thermale exploitée en thalassothérapie, possède des eaux dont le faciès chimique est chloruré calcique également (Boughlali, 2003; Amarouche-Yala *et al.*, 2015) ;
- Sebkha de Thamelah : sebkha non exploitée et exposée à un fort taux d'évaporation. La salinité durant la période de prélèvement a été mesurée au laboratoire en utilisant un réfractomètre portatif. Elle était autour de 5 ° Brix ;
- Forage pétrolier de l'entreprise nationale de forage (ENAFOR) : nous avons sollicité l'aide des techniciens de l'ENAFOR afin d'accéder à l'eau superficielle du forage. Pas d'informations sur sa nature chimique à signaler ;
- Régions de Chaâbet Ntissa et Aougrout. Il s'agit de deux régions désertiques des Wilayas de Ghardaïa et d'Adrar, respectivement. Les sols des deux sites sont légèrement salins avec une présence importante de carbonate de calcium et une texture sablo-limoneuse.

Les échantillons de ces 2 régions nous ont cordialement été fournis par l'équipe de Dr. Atika Meklat (Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), École Normale Supérieure de Kouba, Alger) qui a utilisé des échantillons faisant partie du même lot de prélèvements afin d'isoler des souches d'actinomycètes halophiles et thermophiles (Meklat *et al.*, 2014; Bouras *et al.*, 2015).

Matériel et Méthodes

Les données disponibles dans la bibliographie sur la caractérisation physico-chimique des eaux des environnements étudiés sont répertoriées dans le tableau 7.

Les différentes étapes de l'expérimentation menée afin d'atteindre les objectifs énoncés plus haut sont résumées dans la figure 8.

Tableau 7. Principaux caractères physico-chimiques des eaux des sources thermales étudiées. Données compilées de Bahri et Saibi (2011) et de Amarouche-Yala *et al.* (2014).

Site	Debagh 1	Debagh 2	Ouled Ali 1	Ouled Ali 2	Essalihine
pH	6,27	7,07	7,08	6,69	7,1
Conductivité (mS/cm)	2,01	0,806	1,503	1,347	3,41
TH (°F)	61	64	75	68	54
Ca ²⁺ (mg/L)	220	142	39	33	64
Mg ²⁺ (mg/L)	33	30	43	45	23
Na ⁺ (mg/L)	229	95	35	39	602
K ⁺ (mg/L)	25	4	6	8	18
HCO ³⁻ (mg/L)	366	354	366	378	297
Cl ⁻ (mg/L)	308	348	43	50	678
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	368	240	310	260	296
F ⁻ (mg/L)	2,7	0,19	0,152	0,09	0,52
DS (mg/L)	1,12	1,45	1,6	800	1,72

TH : titre hydrométrique ; DS : degré de salinité (solides dissous totaux). Le faciès chimique des eaux de tous les sites est de type Chloruré calcique.

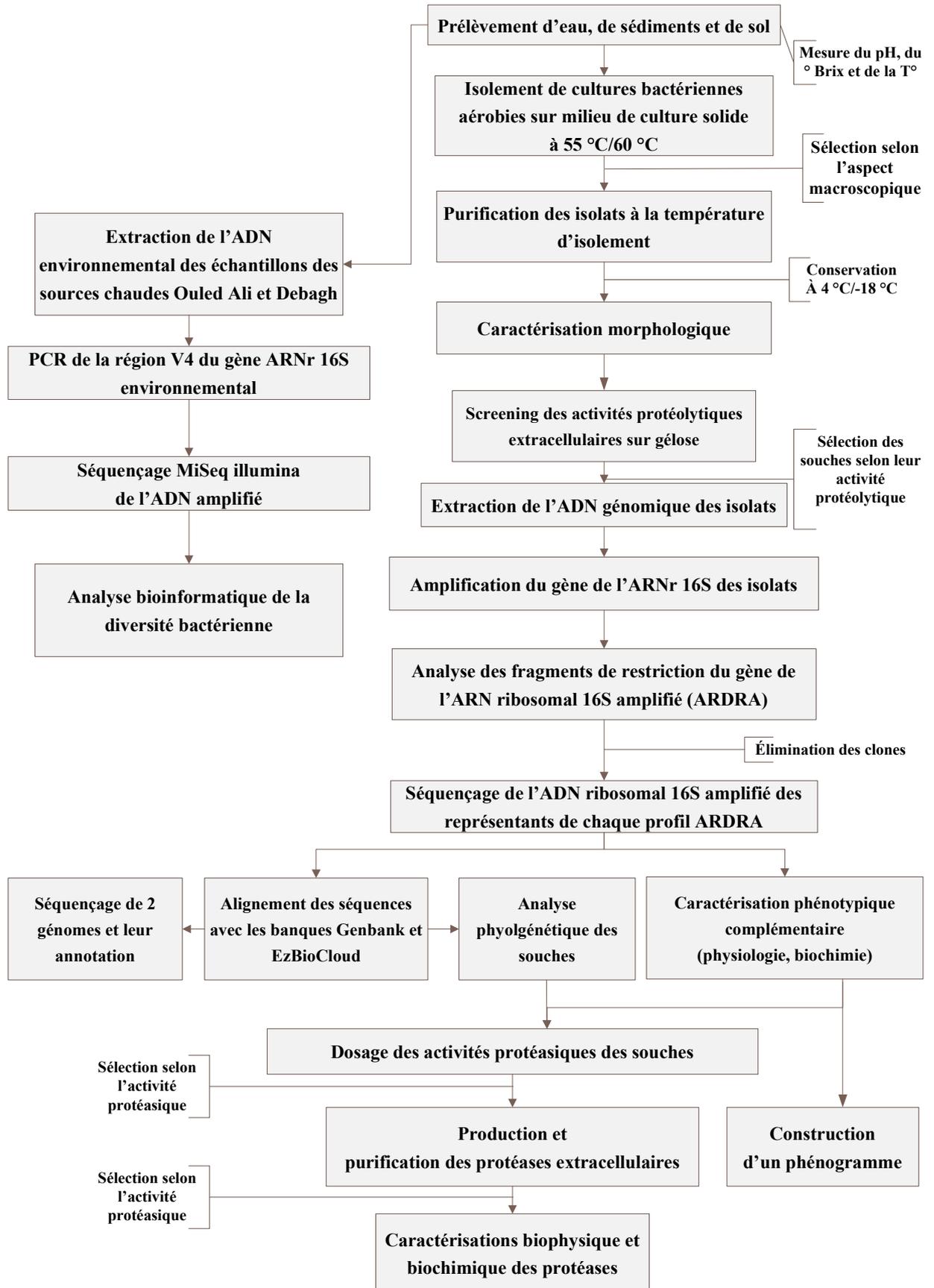


Figure 8. Schéma général de l'expérimentation.

Matériel et Méthodes

Tableau 8. Distribution des échantillons par site et par point de prélèvement.

Site	Code du point	Type d'échantillon	Date de prélèvement	Type d'étude	Nombre d'échantillons	
Debagh	Db1	Eau	21-04-2013	IS	1	
			09-01-2015	IS	1	
		Sédiments	21-04-2013	IS	1	
			09-01-2015	IS	1	
			10-02-2015	MG	8	
	Db2	Eau	21-04-2013	IS	1	
			09-01-2015	IS	1	
		Sédiments	21-04-2013	IS	1	
			09-01-2015	IS	1	
			10-02-2015	MG	5	
	Db3	Sédiments	21-04-2013	IS	1	
			09-01-2015	IS	1	
			10-02-2015	MG	4	
	Ouled Ali	OA	Eau	21-04-2013	IS	1
				09-01-2015	IS	1
Sédiments			21-04-2013	IS	1	
			09-01-2015	IS	1	
			10-02-2015	MG	6	
Essalihine	Sal	Eau	08-05-2013	IS	1	
Thamelaht	AS	Eau	15-06-2013	IS	1	
		Sédiments	15-06-2013	IS	2	
ENAFOR	ENAF	Eau	10-06-2013	IS	1	
Chaâbet Ntissa	Sah1	Sol	2012	IS	1	
Aougrout	Sah2	Sol	2012	IS	1	

IS : isolement de souches bactériennes ; MG : analyse métagénomique.

1.2.2. Prélèvement des échantillons

1.2.2.1. Isolement des souches

Les échantillons d'eaux et de sédiments ont été récupérés entre 2012 et 2015. Les points et le nombre de prélèvements sont représentés dans le tableau 8.

Les échantillons d'eau sont prélevés avec une louche désinfectée à 10-20 cm en dessous de la surface, puis sont passés à travers des filtres ronds à plat (Jeulin) afin d'éliminer les impuretés et sont ensuite récupérés dans des flacons stériles de 250 mL.

Pour les sédiments, le fond de chaque point de prélèvement (situé à une profondeur entre 20 et 50 cm) est raclé à l'aide d'une louche désinfectée. L'échantillon récupéré est transféré dans des flacons stériles de 50 mL (Rainey et Oren, 2006).

Des mesures *in situ* de la température et du pH de l'eau sont réalisées, respectivement à l'aide d'un thermomètre à immersion totale avec mercure et d'un pH-mètre portatif (Lutron pH-201). Tous les prélèvements sont transportés dans une glacière et conservés à 4 °C.

Au laboratoire, la mesure du pH de l'eau est revérifiée et celle des sédiments/sol est réalisée en mélangeant 10 g d'échantillon à 50 mL d'eau distillée (McLean, 1982). Un pH-mètre de marque Jenway modèle 3505 est utilisé pour cette analyse (Figure 9).

1.2.2.2. Analyse métagénomique

Les analyses métagénomiques concernent les sites de Debagh et de Ouled Ali (Tableau 8). Afin que l'étude soit représentative, 4 à 8 échantillons de sédiments d'environ 20 g sont prélevés de la même manière qu'en 1.2.2.1. à partir de chaque point dans le but de couvrir le maximum de superficie. Les échantillons sont récupérés dans des flacons stériles puis sont transportés dans une glacière et conservés à 4 °C jusqu'à manipulation.



Figure 9. Prélèvements destinés à l'étude. A: Db1 ; B: Db2 ; C: Db3 ; D: OA ; E: Sal ; F: AS ; G: Sah 1 (à gauche) et Sah 2 (à droite) ; H : Échantillons collectés pour analyse métagénomique (photos prises avec un appareil photo de marque Canon modèle PowerShot A2300).

2. Isolement, purification et sélection des souches bactériennes

Dans cette phase du travail, un maximum de souches est isolé sur différentes compositions de milieu de culture, purifié, caractérisé morphologiquement à l'échelle macroscopique et microscopique puis testé pour la présence d'activités protéolytiques extracellulaires en vue d'une sélection de souches d'intérêt.

2.1. Isolement et purification des souches bactériennes

L'isolement de bactéries thermophiles aérobies à partir d'échantillons d'environnement est réalisé sur des milieux de culture solides variés. Ces derniers ont déjà été utilisés pour l'isolement de représentants d'un grand nombre d'espèces bactériennes thermophiles aérobies hétérotrophes à partir de divers environnements chauds et tempérés (Trujillo, 2001; Logan *et al.*, 2009; Battista et Rainey, 2015; De Vos, 2015; De Vos *et al.*, 2015).

Ainsi, sur les 8 géloses utilisées, codées de M1 à M8, les milieux M1, M2, M3 et M4 ont été décrits pour l'isolement de thermophiles. Le milieu M5 a déjà été employé pour l'isolement d'actinomycètes thermophiles. Des bactéries thermo-halotolérantes ont été isolées sur le milieu M6 et des bactéries aérobies thermophiles productrices de protéases ont été criblées, isolées et sélectionnées sur les milieux M7 et M8.

La composition de ces milieux de culture solides est rapportée dans le tableau 9. Pour la composition du milieu de culture M6, une solution saline à 30% (p/v) est préparée : 23,4% NaCl ; 4,2% MgCl₂. 6H₂O ; 6% MgSO₄.7H₂O ; 0,1% CaCl₂. 2H₂O ; 0,6% KCl, 0,02% NaHCO₃, 0,07% NaBr, 0,0005% FeCl₃ (Subov, 1931).

Tous les milieux de culture sont ajustés à pH 7,2 ± 0,2 puis autoclavés à 120 °C pendant 20 minutes avant utilisation. Les références des réactifs employés durant l'expérimentation sont rapportées dans le tableau 10 (Annexe 1).

Matériel et Méthodes

Tableau 9. Composition des milieux de culture solide utilisés pour l'isolement et/ou la culture des souches de l'étude.

Milieux de culture		Composition (% p/v)	Référence
Code	Nom		
M1	Gélose <i>Thermus</i>	3 agar ; 0,8 peptone ; 0,4 extrait de levures ; 0,2 NaCl	(Atlas, 2005)
M2	Gélose 256	3 agar ; 0,5 peptone ; 0,1 extrait de levures ; 0,1 amidon soluble	
M3	Gélose nutritive (Sigma)	3 agar ; 0,5 peptone ; 0,25 extrait de levures ; 0,1 extrait de viande ; 0,5 NaCl	(Atlas, 2006)
M4	Gélose PCA (Sigma)	3 agar ; 0,5 tryptone ; 0,25 extrait de levures ; 0,1 dextrose	
M5	Gélose <i>Actinomycetes</i> (Difco)	3 Agar; 0,2 caséinate de sodium; 0,01 asparagine ; 0,04 propionate de sodium ; 0,05 K ₂ HPO ₄ ; 0,01 MgSO ₄ ; 0,1 FeSO ₄	(Hirsch et Christensen, 1983)
M6	Gélose pour halophiles	3 agar ; 0,5 peptone ; 0,5 extrait de levures ; 0,1 glucose, ajoutés à une solution saline à 7,5%	(Torreblanca <i>et al.</i> , 1986)
M7	Gélose à la caséine	3 agar ; 0,4 peptone ; 0,2 extrait de levures ; 1 caséine	(Atlas, 2006)
M8	Gélose à la gélatine	3 agar ; 0,4 peptone ; 0,2 extrait de levures ; 0,4 gélatine	

PCA: Plate Counting Agar.

D'après la littérature, la charge microbienne des environnements étudiés est très variable (Rainey et Oren, 2006), l'ensemencement des milieux de culture solides est donc réalisé par 3 méthodes afin de varier les concentrations de cellules microbiennes inoculées au départ :

- en ensemençant en surface 0,1 mL d'un bouillon d'enrichissement, obtenu par l'incubation de 1 g de sédiments/sol ou de 1 mL d'échantillon d'eau dans 9 mL de milieu de culture M1 liquide incubé en deux séries à 55 °C et à 60 °C pendant 24 heures ;
- en ensemençant directement 0,1 mL d'échantillon d'eau ;
- en ensemençant 0,1 mL des dilutions décimales 10⁻¹ ; 10⁻² ; 10⁻³ préparées dans de l'eau physiologique stérile à partir des échantillons d'eau comme solutions mères.

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées en deux séries à 55 °C et à 60 °C pendant 48 heures ou jusqu'à apparition de colonies.

Les deux températures choisies permettent d'isoler la majorité des représentants des espèces bactériennes thermophiles aérobies hétérotrophes. 2 à 3 colonies sont sélectionnées de chaque boîte de Pétri en se basant sur leur aspect ou sur la présence d'un halo dans le cas des milieux de culture solides M7 et M8 puis purifiées par repiquage en stries d'épuisement au minimum 2 fois sur milieu de culture M1. Ce milieu non spécifique a permis une bonne croissance pour l'ensemble isolats et l'incubation est faite à la température d'isolement.

2.2. Conservation des isolats

La conservation des isolats est faite sur la gélose M1 à 4 °C avec repiquage régulier, ou à -18 °C sur bouillon M1 additionné de 20% (v/v) de glycérol.

2.3. Caractérisation morphologique des isolats

Tous les tests phénotypiques utilisés dans ce travail sont recommandés par le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Logan et Vos, 2015c), et sont proposés parmi les standards minimums pour la description de bactéries formant-endospores (Logan *et al.*, 2009) ou pour la description de nouvelles espèces procaryotes (Tindall *et al.*, 2010).

Les caractères morphologiques cultureux et cellulaires de tous les isolats sont déterminés sur le milieu de culture solide M1 (pH 7,2 ± 0,2) à la température d'isolement :

- l'aspect macroscopique des colonies (forme, pigmentation, taille, etc.), cultivées pendant 24 heures, est observé à l'œil nu et sous une loupe binoculaire à agrandissement × 10 ;
- le Gram, la forme des cellules et leur mode de groupement sont étudiés après coloration différentielle de Gram (Gram, 1884). Les frottis sont préparés à partir de cultures jeunes de 24 heures (Annexe 1) ;
- la présence, la forme et la position des endospores sont révélées par la méthode de coloration différentielle décrite par Schaeffer et Fulton (1933). Les frottis sont préparés à partir de cultures âgées de 48 heures (Annexe 1).

L'observation microscopique a été réalisée en utilisant un premier microscope photonique de marque Motic modèle 18-28 et un second de marque Leica modèle DM 1000 LED muni d'une caméra numérique Leica EC3 à des agrandissements (x 1000).

La cryo-microscopie électronique à balayage (Cryo-MEB) a été réalisée au niveau du laboratoire de microscopie et de microanalyse de l'Université de Pretoria. Les cellules sont d'abord fixées avec une solution à 2,5% (v/v) de glutaraldéhyde/formaldéhyde [1 mL de formaldéhyde à 25% (v/v), 1 mL de glutaraldéhyde à 25% (p/v), 5 mL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) à 0,15M et 3 mL d'eau distillée] pendant 2 heures. Elles sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS (voir composition en Annexe 1) pendant 15 minutes puis incubées dans une solution à 1% (p/v) de tétraoxyde d'osmium (OsO₄) pendant 1 heure. Enfin, l'échantillon est déshydraté avec 30%, 50%, 70%, 90% puis 3 fois 100% (v/v) d'éthanol pendant 15 minutes pour chaque solution (Sambrook et Russell, 2001; Huang et Yeung, 2015). Le spécimen est enrobé dans de la résine puis examiné dans un microscope électronique à balayage de marque JEOL modèle 840.

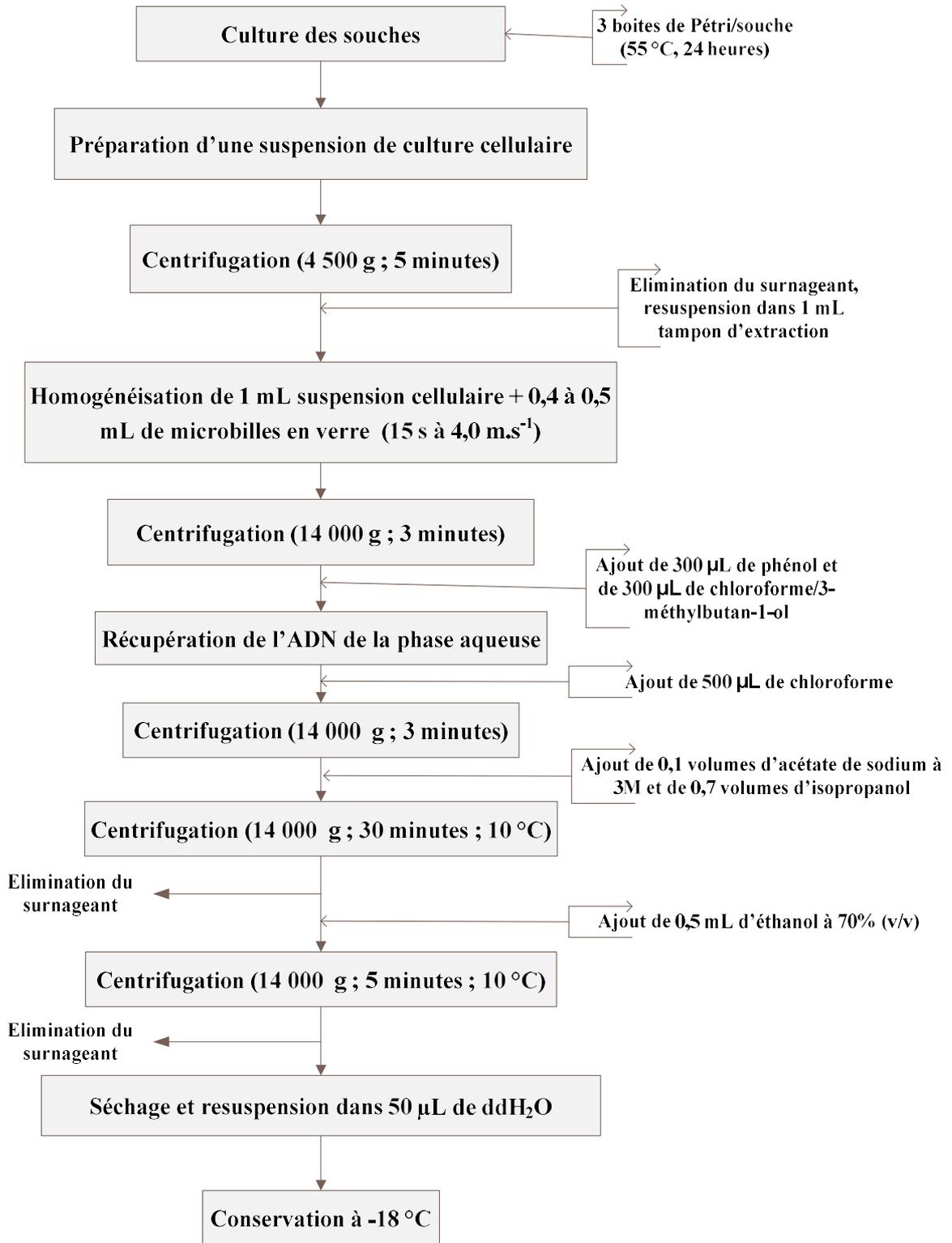


Figure 10. Protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir d'une culture bactérienne (Miller *et al.*, 1999).

2.4. Screening des activités protéolytiques extracellulaires

Les isolats sont prospectés pour la présence d'activités protéolytiques extracellulaires sur une gélose de base (p/v : 3,0% agar ; 0,2% peptone ; 0,1% extrait de levures ; 0,1% NaCl), à la température d'isolement, à pH $7,2 \pm 0,2$, modifiée en présence de caséine ou de gélatine (Demirjian *et al.*, 1999). Les activités des isolats obtenus sur les géloses M7 et M8 sont également confirmées contre les deux substrats. Chaque test est répété deux fois pour vérification. Cette étape permet de constituer une collection de souches productrices de protéases extracellulaires pour la suite de ce travail.

2.4.1. Dégradation de la gélatine

L'ensemencement est fait par touches sur la gélose de base contenant 0,4% (p/v) de gélatine. Après incubation pendant 48 heures, l'hydrolyse est révélée par addition de 1 à 2 mL du réactif de Frazier (15 g d'HgCl₂, 20 mL d'HCl concentrés et complétés à 100 mL avec de l'eau distillée).

L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par l'apparition de zones claires autour des touches (Frazier, 1926).

2.4.2. Dégradation de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur la gélose de base contenant 1% (p/v) de caséines déshydratées. L'ensemencement est fait en surface par touches puis les boîtes de Pétri sont incubées pendant 48 heures.

La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies (Priest *et al.*, 1988).

3. Caractérisation moléculaire des isolats

Les isolats sélectionnés sur la base de leur capacité de produire des protéases extracellulaires sont soumis à une caractérisation moléculaire basée sur l'amplification, et l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S.

À noter que l'eau utilisée pour l'analyse moléculaire et pour la purification des protéines est une eau ultra pure (ddH₂O) (obtenue via système millipore), filtrée (filtre 0,2 µm) et autoclavée.

3.1. Extraction de l'ADN génomique

Le protocole d'extraction de l'ADN génomique des cultures est adapté de la méthode décrite par Miller *et al.* (1999) (Figure 10).

Chaque souche est cultivée sur 3 boîtes de Pétri contenant la gélose M1 puis incubées à 55 °C pendant 24 heures. Les colonies des 3 boîtes de Pétri sont collectées dans 30 mL de tampon d'extraction [50 mM NaCl ; 50 mM Tris-HCl à pH 7,6 ; 50 mM Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) ; 5% (p/v) dodécylsulfate de sodium (SDS)], lesquels sont agités au vortex pendant 30 secondes. Après une centrifugation des suspensions bactériennes pendant 5 minutes à 4 500 g (centrifugeuse Eppendorf modèle 5824R), le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 1 mL de tampon d'extraction. La suspension obtenue est transférée dans un tube de centrifugation stérile contenant 0,4 à 0,5 mL de microbilles en verre (diamètre de 0,10 à 0,11 mm), le tout est mis sous agitation à l'aide d'un homogénéisateur (MO BIO modèle PowerLyzer 24) pendant 15 secondes à 4,0 m.s⁻¹ suivie par une centrifugation pendant 3 minutes à 14 000 g.

Par la suite, 300 µL de phénol et 300 µL de chloroforme/3-méthylbutan-1-ol (24:1) sont ajoutés et la suspension est vortexée jusqu'à la formation d'une émulsion blanchâtre. Les tubes sont alors centrifugés pendant 5 minutes à 14 000 g jusqu'à séparation des deux phases liquides. La phase supérieure, aqueuse contenant l'ADN est transférée dans un nouveau tube de centrifugation dans lequel sont rajoutés 500 µL de chloroforme. Une centrifugation pendant 3 minutes à 14 000 g est alors effectuée après laquelle la phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 mL.

À la phase aqueuse sont ensuite ajoutés 0,1 volume d'acétate de sodium à 3 M et 0,7 volume d'isopropanol. Le mélange est homogénéisé manuellement pendant quelques secondes après quoi l'ADN est précipité par centrifugation à 14 000 g pendant 30 minutes à 10 °C. Le surnageant est alors éliminé et la pelote d'ADN est lavée avec 0,5 mL d'éthanol à 70% (v/v) suivie par une centrifugation à 14 000 g pendant 5 minutes à 10 °C et l'élimination du surnageant. La pelote est laissée sécher à l'air pendant 5 minutes. Enfin, elle est resuspendue dans 50 µL de ddH₂O, et est homogénéisée manuellement jusqu'à sa dissolution totale. L'ADN extrait est conservé à -18 °C jusqu'à manipulation.

3.2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution

La qualité et la concentration de l'ADN génomique extrait sont mesurées automatiquement en utilisant un spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientific modèle Nanodrop 2000). La mesure de la densité optique à 280 nm permet de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines. La pureté de la solution est estimée automatiquement par le calcul des rapports des absorbances suivants (Parfait et Vidaud, 2002; Desjardins et Conklin, 2010):

- A_{260}/A_{280} , un rapport compris entre 1,8 et 2,0 suggère une pureté élevée de l'ADN en solution. Un rapport inférieur à 1,8 indique une contamination protéique et phénolique alors qu'un rapport supérieur à 2 suggère une contamination significative par l'ARN ;
- A_{260}/A_{230} , un rapport compris entre 1,8 et 2,2 indique une faible présence de contaminants organiques, solvants et sels et une bonne pureté de l'ADN extrait.

Pour la quantification de l'ADN, l'équation de Beer-Lambert est modifiée afin d'utiliser un facteur d'unités de ng.cm par μL . L'équation utilisée pour le calcul des concentrations de l'ADN est la suivante (Kocsis *et al.*, 2006):

$$c = (A \cdot \epsilon) / b$$

c: concentration d'ADN (ng/ μL)

A: absorbance

ϵ : coefficient d'extinction indépendant de la longueur d'onde (ng.cm/ μL)

b: longueur du trajet traversé par le faisceau monochromatique en cm

3.3. Réaction de polymérisation en chaîne des gènes de l'ARNr 16S

La technique de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'obtention d'une grande quantité de matériel nucléique à partir d'une séquence d'ADN dont on ne possède que des quantités infimes. Elle consiste en une amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN située entre deux oligonucléotides ou amorces grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable (Parfait et Vidaud, 2002).

Les gènes de l'ARNr 16S des isolats sont amplifiés par PCR dans un thermocycleur BIORAD modèle T100, en utilisant les amorces bactériennes universelles sens E9F (*forward*) (GAGTTTGATCCTGGCTCA) (Farrelly *et al.*, 1995) et anti-sens U1510R (*reverse*) (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Reysenbach et Pace, 1995). La composition d'un mélange réactionnel pour une PCR est montrée dans le Tableau 11.

Matériel et Méthodes

Tableau 11. Composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification des gènes de l'ARNr 16S des isolats de l'étude.

Composé	Concentration finale	Volume (µL)
Amorce sens E95F	1 µM	5
Amorce anti-sens U1510R	1 µM	5
dNTP (Thermo Fisher Scientific)	200 µM	5
Tampon DreamTaq (Thermo Fisher Scientific)	1X	5
BSA (Thermo Fisher Scientific)	1% (p/v)	2
DreamTaq Polymérase (Thermo Fisher Scientific)	1,25 U	0,25
ADN génomique	10-100 ng/µL	1
ddH ₂ O		26,75
Volume final		50

dNTP: désoxyribonucléotides triphosphatés ; BSA: *bovine serum albumin* ; ddH₂O : eau ultra pure.

Les étapes du cycle employé pour cette PCR étaient comme suit:

- i. Prédénaturation à 95 °C pendant 3 minutes ;
- ii. 30 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, d'hybridation à 52 °C pendant 30 secondes et d'élongation à 72 °C pendant 85 secondes;
- iii. Incubation finale à 72 °C pendant 5 minutes.

3.4. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR

Afin de vérifier la qualité et la spécificité de l'amplification, une électrophorèse des amplicons est effectuée sur un gel d'agarose à 1% (p/v) préparé dans un tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) à 1X [dilué à partir d'une solution mère 50X (pH 8,0) constituée de (p/v ou v/v) : 24,22% Tris-HCl ; 5,71% acétate ; 10% EDTA à 0,5 M]. Les produits de PCR sont additionnés de 0,5 µg/mL GelRed (Thermo Fisher Scientific), mélangés à une solution standard de dépôt 1X [préparée à partir d'une solution mère 6X contenant 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) ; 0,03% (p/v) de bleu de bromophénol, 0,03% (v/v) xylène cyanol FF, 60% (v/v) glycérol et 60 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific)] afin de suivre la visualisation. La migration est faite dans un tampon TAE 1X, sous une tension de 90 volts.

L'électrophorèse est suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur ou « *ladder* » (Thermo Scientific *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* de 10 000 à 250 pb). Le gel est visualisé et photographié sous illumination ultraviolette en utilisant un système numérisé d'imagerie BIORAD modèle Molecular Imager Gel Doc™ XR.

3.5. Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié

Afin d'éviter le séquençage de clones redondants, les profils électrophorétiques sur gel d'agarose des amplicons après digestions séparées par les enzymes de restriction AluI et HaeIII FD (*fast digest*) (Thermo Fisher Scientific) sont étudiés par Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié ou ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Cette technique permet de discriminer les régions conservées du gène de l'ARNr 16S, et d'obtenir des profils représentatifs des souches analysées.

Les profils obtenus à partir de plusieurs enzymes de restriction peuvent être utilisés pour caractériser phylogénétiquement les communautés procaryotes étudiées (Heyndrickx *et al.*, 1996).

La composition des milieux réactionnels pour les 2 enzymes de restriction ainsi que les conditions de la réaction sont montrées en tableau 12.

Les produits de restriction additionnés de 0,5 µg/mL GelRed et mélangés à une solution standard de dépôt 1X ont été chargés dans un gel d'agarose à 2,5% (p/v) et la migration est faite dans un tampon TAE 1X, sous une tension de 90 volts pendant 90 minutes.

La taille des fragments de restriction est estimée en déposant dans un puits séparé du même gel un marqueur de 1000 à 100 pb (Thermo Fisher Scientific *GeneRuler 100 bp DNA Ladder*). Le gel est visualisé comme précédemment décrit.

Tableau 12. Conditions réactionnelles de la digestion des amplicons du gène de l'ARNr 16S des isolats par les enzymes de restriction AluI et HaeIII FD.

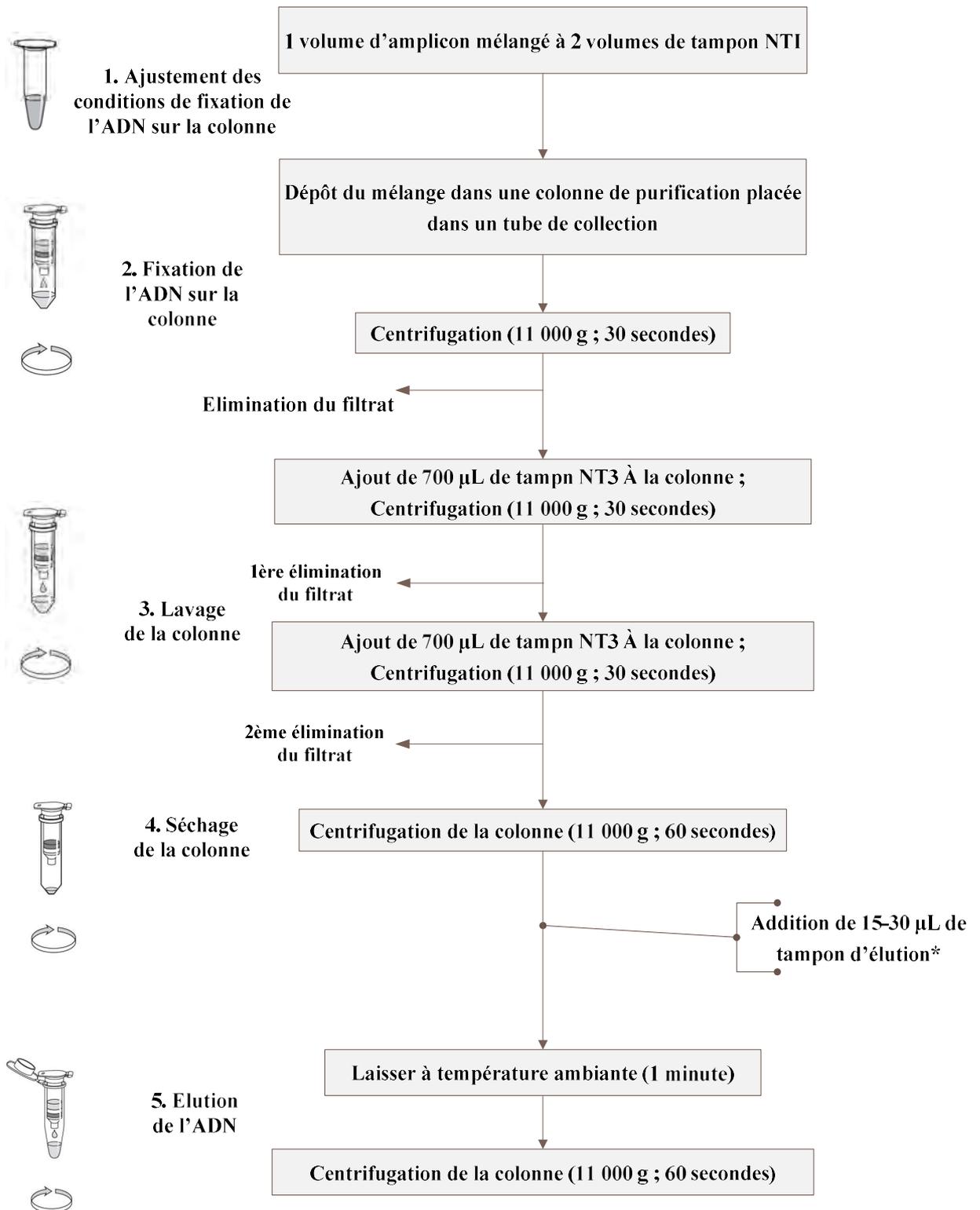
Composé	Concentration finale	AluI	HaeIII FD
		Volume (µL)	Volume (µL)
Tampon Tango* (Thermo Fisher Scientific)	1X	0,67	0
Tampon FD** (Thermo Fisher Scientific)	1X	0	0,67
Enzyme de restriction	10 U/µL	0,33	0,33
Amplicon du gène ARNr 16S	> 100 ng/µL	3,33	3,33
ddH₂O	/	5,67	5,67
Volume final		10	10
Incubation (T °C ; t minutes)		37 ; 180	37 ; 5
Inactivation (T °C ; t minutes)		65 ; 20	Aucune

ddH₂O : eau ultra pure ; FD : *Fast Digest* ; T : température ; t : temps.

* : composition : 33 mM Tris-acétate (pH 7,9 à 37°C), 10 mM d'acétate de magnésium, 66 mM d'acétate de potassium, 0,1 mg/ml de BSA.

** : composition non divulguée par le fabricant.

Matériel et Méthodes



NTI: Tampon de liaison
NT3: Tampon de lavage
*: Tris HCl 5 mM, pH 8,5

Figure 11. Protocole de purification des produits PCR (kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up).

Les profils électrophorétiques de chaque amplicon sont comparés en identifiant les fragments de tailles identiques dans la même réaction de digestion. Les fragments dont la taille est inférieure à 100 pb ne sont pas inclus dans l'analyse.

Des comparaisons par paires des modèles de bandes électrophorétiques sont réalisées et les similarités entre les profils de digestion sont appréciées en calculant le coefficient de similarité SM (*Simple Matching*) (Sokal, 1958). Une matrice de similarité est construite sur la base de laquelle les isolats ont été regroupés par la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Gower, 1971). Le calcul et la construction du dendrogramme sont réalisés avec le logiciel NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) version 2.02i (Rohlf, 1998).

3.6. Purification des produits PCR

Des amplicons sont sélectionnés sur la base des résultats de l'analyse ARDRA et des caractères morphologiques des isolats. Les produits PCR choisis sont purifiés avant d'être envoyés au séquençage.

Le protocole de purification vise à éliminer les solvants et les protéines résiduelles provenant des manipulations antérieures et de concentrer les aliquotes d'ADN.

Pour la purification, les colonnes du kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) sont utilisées selon les instructions du fabricant (Figure 11).

La qualité et la quantité de l'ADN purifié sont vérifiées en utilisant un spectrophotomètre Thermo Fisher Scientific modèle Nanodrop 2000.

3.7. Séquençage des produits PCR

Les amplicons du gène de l'ARNr 16S purifiés appartenant aux isolats sélectionnés sur la base des critères énoncés en 3.6. sont séquencés selon une modification de la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), en utilisant les amorces E9F et U1510R.

La Taq polymérase réalise la synthèse d'un nouveau brin en présence d'un oligonucléotide, de dNTPs et de didéoxynucléotides marqués (ddNTPs). Les ddNTPs sont incorporés dans la chaîne d'ADN en croissance entraînant un arrêt de la synthèse de la chaîne. À la fin de la réaction, une collection de fragments d'ADN de tailles différentes est obtenue avec une extrémité 5' commune (l'oligonucléotide) et une extrémité 3' variable se terminant par un ddNTP (Parfait et Vidaud, 2002).

Le séquençage est effectué au niveau du Centre de Séquençage d'ADN de l'Université de Stellenbosch (Afrique du Sud) selon le protocole Applied Biosystems sur le séquenceur capillaire automatique ABI Modèle 3730XL.

3.8. Analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S

L'analyse des séquences du gène de l'acide ribonucléique ribosomal 16S passe par plusieurs étapes, de la préparation et de la sélection des séquences analysées et jusqu'à la construction et la vérification de la fiabilité des arbres phylogénétiques (Darlu et Tassy, 1993).

3.8.1. Alignement avec les séquences nucléotidiques des banques de données biologiques

L'un des premiers pas dans l'identification et la description de nouvelles espèces (ou souches) est d'aligner la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche d'intérêt (appelée séquence requête) avec celles déposées dans les banques de séquences nucléiques. Le but est d'identifier l'espèce (ou la souche) dont la séquence a le pourcentage d'identité le plus élevé avec la séquence requête (Logan *et al.*, 2009).

Pour l'identification moléculaire, les séquences appartenant à nos isolats sont alignées avec celles des banques de séquences nucléiques universelles ENA (*European Nucleotide Archive*)/Genbank/DDBJ (*DNA Database of Japan*) version 10-2018 en utilisant l'outil nucléotide BLAST version 2.8.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang *et al.*, 2000). Le résultat est confirmé par un alignement avec la banque EzBioCloud version 10-2018 (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) avec l'outil BLAST intégré au site (Yoon *et al.*, 2017). Cette base de données contient exclusivement des séquences de gènes d'ARNr 16S de souches procaryotes de référence (Chun *et al.*, 2007).

Le choix de ces banques est fait sur la base des recommandations énoncées par Logan *et al.* (2009) ; Kämpfer et Glaeser (2013) et Kim et Chun (2014).

3.8.2. Étude phylogénétique

Les liens phylogénétiques entre les isolats de l'étude et les souches décrites proches sont étudiés en se basant sur les séquences des gènes de l'ARNr 16S.

L'alignement multiple des séquences est effectué avec l'outil ClustalW (*Cluster Analysis*) du logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) version 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016b). L'arbre phylogénétique basé sur le gène de l'ARNr 16S est construit sous le logiciel MEGA, avec la méthode du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1986), employant les modèles de vraisemblance maximum composite prenant en considération les substitutions par transversion et par transition, et éliminant les insertions-délétions de l'alignement multiple (Tamura *et al.*, 2004).

La robustesse de l'arbre est vérifiée avec un test de *Bootstrap* impliquant 1000 répliquions (Felsenstein, 1985). La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche type *Sulfobacillus acidophilus* DSM 10332^T est utilisée comme groupe externe pour la construction de l'arbre.

3.8.3. Numéros d'accèsion des séquences nucléiques

Les séquences nucléiques déterminées durant ce travail ont été déposées dans les 3 banques de données biologiques ENA/Genbank/DDBJ sous les numéros d'accèsion KU942442 ; MF136820 à MF136840 ; et MH397347 à MH397352.

3.9. Analyse génomique

Afin d'évaluer leur potentiel biotechnologique et de compléter leur identification, deux souches de l'étude ont été sélectionnées pour le séquençage et l'analyse de leurs génomes. Le choix de ces bactéries a été fait sur la base de la capacité de leurs groupes taxonomiques respectifs à produire des protéases thermostables prometteuses, mais encore peu exploitées et en raison du manque de données bibliographiques sur leurs génomes.

3.9.1. Préparation des échantillons

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée selon le protocole décrit précédemment (section 3.1). La qualité et la quantité de l'ADN extrait sont vérifiées par un spectrophotomètre Thermo Fisher Scientific modèle Nanodrop 2000.

3.9.2. Séquençage MiSeq Illumina

Le séquençage des échantillons de l'ADN génomique ainsi que l'annotation des séquences obtenues ont été réalisés au niveau du laboratoire MR DNA (Shallowater, Texas, États-Unis) dans un séquenceur MiSeq (Illumina, Inc.).

Cette technologie utilise l'amplification clonale et le séquençage par synthèse (SBS, *Sequencing By Synthesis*). Le processus permet d'identifier simultanément les nucléotides de l'ADN lorsqu'ils sont incorporés dans la chaîne d'acide nucléique. Chaque nucléotide émet un signal de fluorescence unique lorsqu'il est ajouté au brin en cours de synthèse, ceci est utilisé pour déterminer la séquence d'ADN. La méthode utilisée génère des bibliothèques de séquences appariées de taille 2×300 pb.

3.9.3. Traitement bioinformatique

La qualité et la longueur des séquences appariées brutes obtenues sont contrôlées avec le logiciel fastx tools (hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) pour un score de qualité phred ≥ 20 (Ewing *et al.*, 1998). Les séquences recoupées et vérifiées sont alors assemblées avec les

logiciels SPAdes version 3.5.0 (Bankevich *et al.*, 2012) pour le premier génome et SeqMan Pro NGen version juillet 2015 (DNASTar, Inc.) pour le deuxième génome.

L'annotation des génomes, organisés en contigs, est réalisée sur le serveur RAST (*Rapid Annotations Using Subsystems Technology*, <http://rast.theseed.org>) (Overbeek *et al.*, 2013) en utilisant les outils du pipeline d'annotation des génomes procaryotes du portail NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) (Tatusova *et al.*, 2016).

Les génomes sont comparés à plusieurs banques spécialisées afin de prédire la fonction des gènes codants des protéines ou CDS (*Coding DNA Sequences*) et leurs implications dans les voies métaboliques cellulaires :

- la banque KEGG Pathway (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <https://www.genome.jp/kegg/>) a été utilisée afin de déterminer les grandes voies métaboliques présentes (Kanehisa *et al.*, 2017) ;
- la banque Pfam (*Protein families*, <https://pfam.xfam.org/>) a été employée afin de prédire les structures protéiques correspondant aux séquences codées par les gènes CDS (Finn *et al.*, 2015) ;
- la banque COGs (*Clusters of Orthologous Groups*, <https://omictools.com/cogs-tool>) a été utilisée afin de répartir les gènes CDS sur les 26 catégories (codées par les 26 lettres de l'alphabet) de fonctions protéiques connues, allant de l'expression de l'ADN jusqu'à la mobilité cellulaire (Tatusov *et al.*, 2000; Galperin *et al.*, 2017) ;
- la recherche de gènes codant pour des protéases sur les deux génomes est réalisée par alignement de ces deux derniers avec la banque MEROPS en utilisant l'outil pBlast version 2.8.0 (Rawlings *et al.*, 2018) ;
- la prédiction des voies de sécrétion extracellulaire, classique et non classique, des protéases est effectuée par alignement des gènes codant pour des protéases annotées contre les serveurs SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen, 2017) et SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (Bendtsen *et al.*, 2004), respectivement ;
- la présence d'ADN phagique est prédite par alignement avec le serveur PHAST (*Phage Search Tool*) (Zhou *et al.*, 2011).

Les deux projets génomiques sont inscrits sur la plateforme BioProject (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>) (Barrett *et al.*, 2011) sous les numéros d'accèsion PRJNA298658 et PRJNA312744. Les génomes sont déposés au niveau des 3 banques biologiques ENA/Genbank/DDBJ sous les numéros d'accèsion LSVF00000000 et LLKS01000000 et dans la banque de génomes GOLD (*Genomes OnLine Database*,

<https://gold.jgi.doe.gov/>) (Mukherjee *et al.*, 2016) sous les numéros d'accèsion Go0118976 et Gs0118400.

Les données détaillées de l'annotation sont consultables sur le portail IMG/M (*Integrated Microbial Genomes and Microbiomes*, <https://img.jgi.doe.gov/>) (Chen *et al.*, 2016) sous les numéros d'accèsion 2645727548 et 2667527709.

4. Analyse métagénomique

4.1. Extraction de l'ADN environnemental

Le protocole d'extraction de l'ADN environnemental à partir des échantillons de sédiments de Debagh et de Ouled Ali est présenté dans la figure 12 (Miller *et al.*, 1999). Les sédiments ont été préférés à l'eau en raison de la densité plus importante de l'ADN qu'ils contiennent (Turner *et al.*, 2015).

L'ADN environnemental de chaque point de prélèvement est collecté à partir de 4 à 8 échantillons selon le point de prélèvement. Une quantité de 10 g de sédiments a d'abord été ajoutée à 10 mL de ddH₂O et le mélange est homogénéisé au vortex pendant 10 secondes. Dans un tube de centrifugation de 2 mL, 0,8 mL d'échantillon dissous sont ajoutés à 1 mL du même tampon d'extraction décrit dans la section 3.1, 0,4 à 0,5 mL de microbilles en verre (diamètre de 0,10 à 0,11 mm) et 1 µL de dithiothréitol 1M comme agent réducteur des acides humiques. Le tout est agité par vortex pendant 2 à 3 secondes puis à l'aide d'un homogénéisateur (MO BIO modèle PowerLyzer 24) pendant 30 secondes à 5,5 m.s⁻¹ suivie par une centrifugation pendant 3 minutes à 14 000 g.

Par la suite, 450 µL de phénol et 450 µL de chloroforme/3-méthylbutan-1-ol (24:1) sont ajoutés aux 900 µL de surnageant et l'ensemble est vortexé jusqu'à la formation d'une émulsion blanchâtre. Les tubes sont alors centrifugés pendant 5 minutes à 14 000 g jusqu'à séparation des deux phases liquides. La phase supérieure, aqueuse contenant l'ADN est transférée dans un nouveau tube de centrifugation dans lequel sont rajoutés 500 µL de chloroforme. Une centrifugation pendant 3 minutes à 14 000 g est alors effectuée après laquelle la phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube Eppendorf.

La phase aqueuse subit par la suite les mêmes étapes d'extraction décrites pour l'ADN génomique (**voir 3.1.**).

4.2. Purification de l'ADN environnemental extrait

Le protocole de purification vise à éliminer les acides humiques et les protéines résiduelles provenant des échantillons de sédiments et de concentrer les aliquotes d'ADN (Miller *et al.*, 1999).

Matériel et Méthodes

Pour la purification, des colonnes du kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) sont utilisées selon les instructions du fabricant.

La colonne de purification est placée dans un tube de centrifugation de 2 mL. Un volume de 300 μL de solution stérile de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) à 10% (p/v) est ajouté à la colonne. Cette solution est filtrée par la colonne lors d'une centrifugation à 14 000 g pendant 1 minute et l'opération est répétée une deuxième fois.

Le volume initial de l'extrait d'ADN environnemental est complété jusqu'à 100 μL avec du ddH₂O puis est ajouté à la colonne. L'ensemble est centrifugé à 14 000 g pendant 1 minute. Le tube de centrifugation est ensuite vidé et l'étape est répétée une deuxième fois.

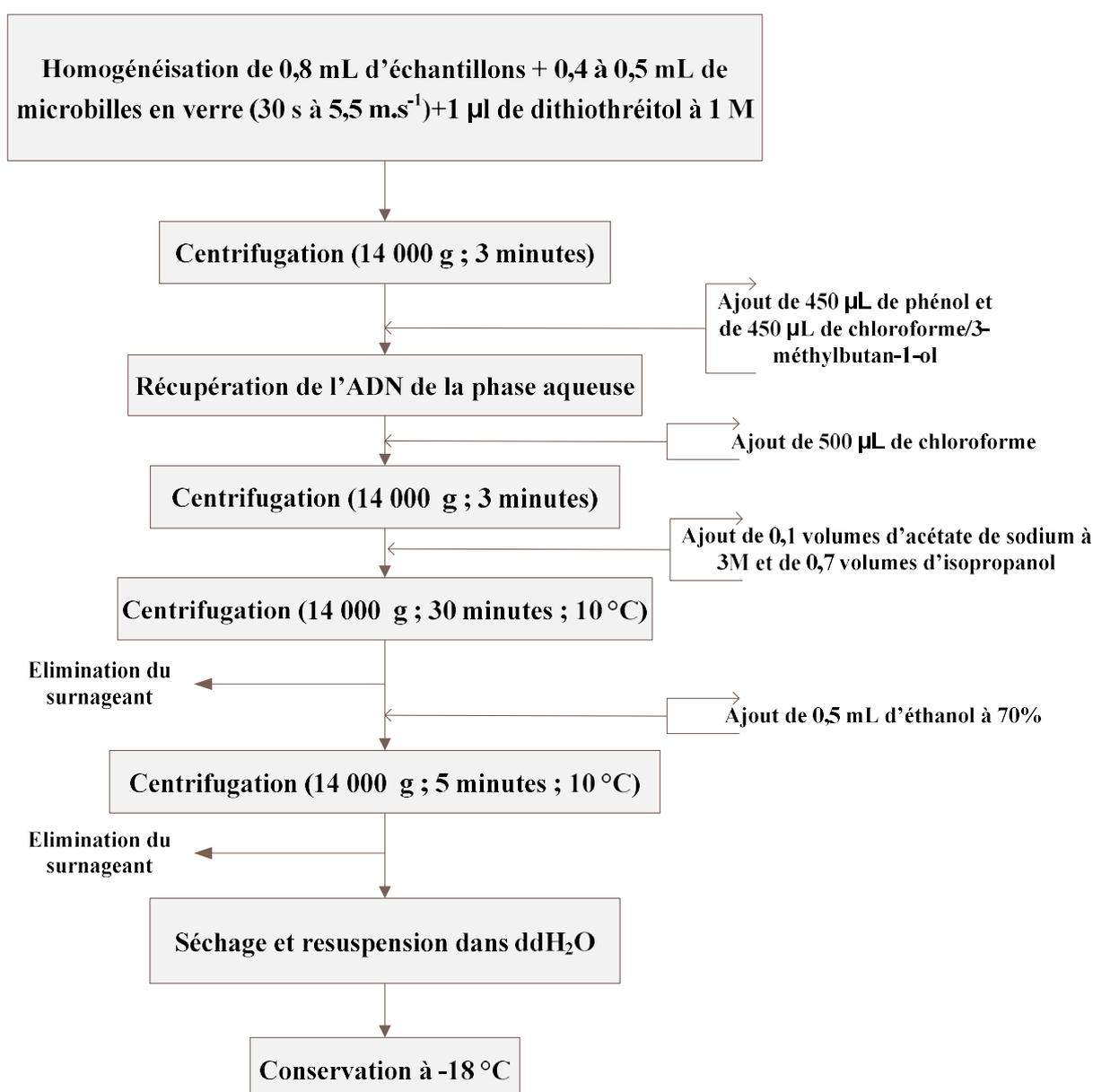


Figure 12. Protocole d'extraction de l'ADN environnemental (Miller *et al.*, 1999).

Tableau 13. Séquences codes-barres employées dans le séquençage MiSeq pour marquer l'ADN amplifié de chaque échantillon environnemental.

Origine des échantillons	Code échantillon	Nom de la séquence barre-code	Séquence barre-code
Db1	Db11	515Fbar1	GAGAGTGT
	Db12	515Fbar2	GAGATCAG
	Db13	515Fbar3	GAGATCTC
	Db14	515Fbar4	GAGATGAC
	Db15	515Fbar5	GAGATGTG
	Db16	515Fbar6	GAGTACAG
	Db17	515Fbar7	GAGTACTC
	Db18	515Fbar8	GAGTAGAC
Db2	Db21	515Fbar9	GAGTAGTG
	Db22	515Fbar10	GAGTCACT
	Db23	515Fbar11	GAGTCAGA
	Db24	515Fbar12	GAGTCTCA
	Db25	515Fbar13	GAGTCTGT
Db3	Db31	515Fbar14	GAGTGACA
	Db32	515Fbar15	GAGTGAGT
	Db33	515Fbar16	GAGTGTCT
	Db34	515Fbar17	GAGTGTGA
OA	OA41	515Fbar18	GAGTTCAC
	OA42	515Fbar19	GAGTTCTG
	OA43	515Fbar20	GAGTTGAG
	OA44	515Fbar21	GAGTTGTC
	OA45	515Fbar22	GATCACCA
	OA46	515Fbar23	GATCACGT

Db : Debagh ; OA : Ouled Ali.

4.3. Séquençage MiSeq Illumina

Le séquençage et la constitution de bibliothèques d'ADN métagénomique est réalisé au niveau du laboratoire MR DNA dans un séquenceur MiSeq (Illumina, Inc.), en utilisant un niveau d'analyse de 15 000 à 20 000 lectures par essai.

Les amorces 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') code-barrée et 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') (Bates *et al.*, 2010), amplifiant la région hypervariable V4 du gène de l'ARNr 16S sont employées dans une PCR de 30 cycles. La PCR a été réalisée en utilisant le kit HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen) sous les conditions suivantes : 94 °C pendant 3 minutes; suivie par 28 cycles à 94 °C pendant 30 secondes, 53 °C pendant 40 secondes et 72 °C pendant 1 minute, et s'achève par une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 5 minutes. Les séquences des codes barres utilisées avec l'amorce 515F afin d'identifier l'ADN amplifié de chaque échantillon sont rapportées en tableau 13.

Après amplification, les produits PCR sont vérifiés dans un gel d'agarose à 2% (p/v). Les amplicons sont ensuite groupés selon leurs poids moléculaires et leurs concentrations en ADN puis purifiés en utilisant des billes calibrées Ampure XP. Les amplicons purifiés sont utilisés pour préparer une bibliothèque d'ADN selon le protocole Illumina TruSeq.

4.4. Traitement bioinformatique

Les séquences ont été analysées en utilisant le pipeline de MR DNA analysis. Les séquences sont traitées, les codes-barres, les séquences ayant une taille inférieure à 200 pb et les séquences ayant des nucléotides ambigus sont éliminées. Elles sont ensuite vérifiées et les séquences chimériques sont supprimées en utilisant l'outil UCHIME (Edgar *et al.*, 2011).

Des unités taxonomiques opérationnelles (UTO) sont générées à un degré de divergence de 3%. Les UTO sont classées taxonomiquement en utilisant l'outil nBLAST version 2.8.0 contre les banques de données GreenGenes, RDPII (*Ribosomal Database Project II*) et Genbank (DeSantis *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2014; Benson *et al.*, 2018).

La diversité des bactéries aérobies thermophiles au niveau de chaque point de prélèvement est exprimée en pourcentages du nombre des séquences des UTO de chaque groupe taxonomique rapporté au total des séquences bactériennes de ce point. Cette diversité est estimée à l'échelle des phyla, des familles et des genres.

Les séquences brutes générées par cette analyse ont été déposées sur le portail NCBI sous le numéro d'accès BioProject PRJNA480948 et sur la banque de séquences métagénomiques SRA (*Sequence Read Archive*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) (Leinonen *et al.*, 2011) sous le numéro d'accès SRP153378.

5. Caractérisation phénotypique des isolats

Les souches sélectionnées après étude culturale et microscopique, prospection des activités protéolytiques et caractérisation moléculaire sont soumises à un ensemble de tests de mise en évidence de leurs caractères physiologiques et biochimiques dans le but de compléter leur caractérisation taxonomique.

5.1. Caractérisation physiologique

5.1.1. Détermination des intervalles limites et des optima de croissance

Les limites de croissance sur des valeurs variées de température, de pH et de concentrations en NaCl sont déterminées sur la gélose M1 en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants. La croissance est contrôlée périodiquement entre 24 et 72 heures d'incubation (Nazina *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2015). Chaque test est répété au moins deux fois pour confirmation.

Pour les tests de température, le milieu de culture solide M1 additionné par le tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M/ KH_2PO_4 0,2 M) (Tableau 14-Annexe 1) à pH 7,2 est ensemencé puis incubé à 10 ; 20 ; 25 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70 ; 75 et 80 °C.

L'intervalle de pH permettant la croissance est déterminé en le variant de 5 à 11 sur milieu de culture M1 tamponné par : citrate 0,5 M/ Na_2HPO_4 0,5 M pH [5,0 et 8,0] ; glycine 0,2 M /NaOH 0,2 M pH [8,5-11,0] (Tableaux 15 et 16-Annexe 1).

La tolérance au NaCl est étudiée aux concentrations suivantes : 0 ; 0,5 ; 1 ; 3 ; 3,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 et 15% (p/v), le milieu de culture M1 est ajusté à pH 7,2 par le tampon phosphate.

Les conditions optimales de croissance sont déterminées sur les valeurs de température, de pH et de concentration de NaCl ayant visuellement donné le meilleur développement des colonies. Ainsi, la croissance optimale de chaque souche est déterminée sur plusieurs valeurs de température (45 °C ; 50 °C ; 55 °C et 60 °C à pH 7,2 et de concentration NaCl à 0,5% p/v), de pH [6,5 ; 7,0 ; 7,5 et 8,0 à T_{opt} (température optimale de croissance) et de concentration NaCl à 0,5% p/v] et de pourcentage de NaCl (p/v) [0 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 3% à T_{opt} et à pH optimal (pH_{opt})] en variant un seul paramètre à la fois. 1 mL de bouillon M1 tamponné par $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M/ KH_2PO_4 0,2 M est ensemencé (Tindall *et al.*, 2007). La croissance est appréciée après incubation de 24 heures par turbidimétrie à 660 nm en utilisant un spectrophotomètre Mecasys modèle Optizen Pop.

5.1.2. Utilisation des substrats carbonés comme unique source de carbone, d'azote et d'énergie

L'utilisation de substrats tests comme unique source de carbone, d'énergie et/ou d'azote est testée sur un milieu de culture solide dépourvu de toute autre source organique, additionné de NH_4Cl (0,5 g/L), et de Na_2HPO_4 (0,005 g/L). Alors que 0,05% (p/v) de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont ajoutés pour le milieu à l'amidon. Le pH du milieu est ajusté à pH optimal.

Les sucres sont ajustés à 1% (p/v), les acides organiques, les alcools et les acides aminés à 0,1% (p/v ou v/v). L'incubation est faite à T_{opt} pendant 24 à 48 heures (Gordon *et al.*, 1973; Tindall *et al.*, 2007).

Les substrats testés sont : D(+)-glucose, D(+)-fructose, D(+)-galactose, D(+)-mélibiose, D(+)-mannose, D(+)-lactose, D(+)-saccharose, mannitol, D(+)-maltose, dextrine, amidon, pectine, propionate, lactate, succinate, acétate, glycérol, éthanol, méthanol, L-acide glutamique, L-lysine, L-thréonine, L-glycine et L-tyrosine.

5.1.3. Détermination de la croissance en anaérobiose

La croissance des souches en absence d' O_2 est déterminée sur gélose viande-foie (VF) coulée en longs tubes et préalablement régénérée (à pH_{opt}),ensemencée en surfusion par 1 mL de chaque préculture préparée sur bouillon M1 et incubée pendant 24 heures à T_{opt} . Après incubation dans les mêmes conditions, la présence de colonies dans le fond du tube indique une croissance en anaérobiose (Tindall *et al.*, 2007).

5.2. Caractérisation biochimique

Une série de tests biochimiques est réalisée selon les techniques décrites par Joffin et Leyral (2006a) ; Joffin et Leyral (2006b) ; Tindall *et al.* (2007) et Krieg et Padgett (2011). Chaque test se fait en double et en présence d'un témoin négatif quand c'est nécessaire. Les milieux de culture sont ajustés à pH_{opt} et concentration en NaCl optimale (NaCl_{opt}). L'incubation est réalisée à T_{opt} pendant 24 heures quand c'est indiqué. La composition des milieux et des réactifs utilisés pour la galerie biochimique est rapportée en tableau 17-Annexe 1.

La galerie biochimique inclut :

- i. la production de cytochrome oxydase sur disques « ox » (Sigma). Un test positif est interprété par l'apparition d'une couleur violette sur le disque après dépôt d'une colonie avec une pipette Pasteur boutonnée ;

Matériel et Méthodes

- ii. la production de catalase en présence d'eau oxygénée (d' H_2O_2) à 10 volumes. La réaction est positive si une effervescence apparaît dans la goutte d'eau oxygénée après dépôt d'une colonie avec une pipette Pasteur boutonnée ;
- iii. la production de β -galactosidase à l'aide de disques ONPG (2-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside) (Fluka) mis en contact avec une suspension d'une culture préparée dans 3 mL d'eau physiologique contenus dans un tube à essai stérile. Le test est considéré positif s'il y a apparition d'une couleur jaune dans la solution après une heure d'incubation à T_{opt} ;
- iv. la réduction des nitrates sur bouillon nitraté. Après incubation, la présence d'une nitrate réductase est traduite par l'apparition d'une couleur rouge après addition de quelques gouttes du réactif de Griess ou de la persistance de la couleur jaune après confirmation par addition de poudre de zinc ;
- v. la production d'uréase sur la gélose inclinée de Christensen. L'utilisation de l'urée est indiquée par un virage de couleur du milieu vers le violet foncé après incubation ;
- vi. la production d'indole à partir de tryptophane sur eau peptonée exempte d'indole. L'activité de la tryptophanase est mise en évidence par l'apparition d'un halo rouge après addition du réactif de Kovacs (diméthyl-amino-4-benzaldéhyde) dans le bouillon incubé ;
- vii. la production d'acides mixtes sur le milieu de Clarck et Lubs. Un test positif est interprété par l'apparition d'une couleur rouge dans le bouillon incubé après addition de quelques gouttes du rouge de méthyle (RM) ;
- viii. la production d'acétoïne sur le milieu de Clarck et Lubs. La lecture sur le bouillon incubé se fait par la réaction de Voges-Proskauer (VP) entre l' α -naphthol (VPI) et l'acétoïne en conditions alcalines (par l'addition d'hydroxyde de potassium ou VP II). Une réaction positive donne une couleur rose au mélange ;
- ix. la mobilité et la fermentation du mannitol sur la gélose Mannitol-Mobilité. L'utilisation du mannitol est appréciée par un virage au jaune du milieu de culture alors que la mobilité cellulaire est révélée par la présence de trouble de part et d'autre de la pique centrale d'ensemencement ;
- x. la fermentation anaérobie du glucose sur la gélose inclinée *Triple Sugar Iron* (TSI). Un virage au jaune du culot indique l'utilisation du glucose, alors que l'apparition de bulles et de taches noires dans ce même culot indique la production de CO_2 et de H_2S , respectivement ;
- xi. l'utilisation du citrate sur la gélose inclinée de Simmons. Une réaction positive est révélée par un virage au bleu du milieu de culture ;

xii. la production d'acides à partir de sucres. Les essais sont menés sur un milieu de base (p/v) (0,5% peptone ; 0,1% NaCl ; 0,15% HN_2PO_4 ; 0,075% H_2KPO_4 ; pH 7,0) supplémenté par 0,003% (p/v) de rouge de phénol et 1% (p/v) de substrat-test ;

La production d'acide est appréciée par un virage de couleur au jaune après incubation (Tindall *et al.*, 2007). Les substrats utilisés sont : D(+)-fructose, D(+)-galactose, D(+)-mannose, D(+)-mélitiose, D(+)-saccharose, D(+)-lactose, D(+)-maltose et dextrine ;

xiii. la dégradation de polymères par les souches est étudiée sur une gélose de base (voir composition en tableau 17-Annexe 1) modifiée en présence du polymère-test (Demirjian *et al.*, 1999). L'ensemencement se fait par touches et les polymères utilisés sont :

- ❖ l'amidon soluble à 1% (p/v). Après incubation de 72 heures, les boîtes de Pétri sont inondées avec une solution de lugol (composition en Annexe 1). La présence de zones claires autour des zones d'ensemencement témoigne de la dégradation de l'amidon (Gordon *et al.*, 1973) ;

- ❖ la carboxyméthylcellulose à 0,5% (p/v). Après incubation pendant 72 heures, les boîtes de Pétri sont remplies d'une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v) et placées pendant 15 à 30 minutes à T_{opt} . La solution de rouge Congo est remplacée par une solution à 1 M de NaCl et les boîtes sont laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante ;

L'hydrolyse de la carboxyméthylcellulose est appréciée par l'apparition d'un halo clair sur le pourtour de la touche (Bragger *et al.*, 1989) ;

- ❖ la pectine à 1% (p/v). Après incubation pendant 72 heures, les boîtes de Pétri sont remplies d'une solution de diode et d'iodure de potassium. L'utilisation du substrat est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies ensemencées par touches (Soares *et al.*, 1999) ;

- ❖ les tweens 20 et 80 à 1% (v/v). Les boîtes de Pétri contenant la gélose au Tween 20 ou au Tween 80 est ensemencée et incubée pendant 48 heures. Un résultat positif de dégradation est apprécié par la présence d'un halo clair autour des touches (Khyami-Horani, 1996).

5.3. Construction de phénogramme

Les liens de parenté basés sur les traits phénotypiques des souches sont étudiés en construisant un phénogramme (dendrogramme) avec le logiciel NTSYS-pc version 2.02i.

L'analyse numérique des données est effectuée après codification des résultats de 128 caractères phénotypiques : 1 pour « positif ou présent », 0 pour « négatif ou absent ».

Le degré de similitudes entre souches est apprécié par le calcul du coefficient de similarité SM (*Simple Matching*) (Sokal, 1958). La matrice des similarités SM est utilisée pour le regroupement des isolats par la méthode de classification ascendante hiérarchique UPGMA.

Dans cette méthode les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité et la construction de l'arbre représentant ces liens de similarités se fait pas à pas grâce à cet ordre (Perrière et Brochier-Armanet, 2010).

6. Caractérisation des activités protéasiques extracellulaires des souches

6.1. Dosage de l'activité protéasique

Au début de l'expérimentation, 3 méthodes largement utilisées pour le dosage des activités protéasiques sont testées. Ces méthodes utilisent comme substrats l'azocaséine, la caséine et la caséine BODIPY FL, respectivement. La méthode ayant présentée la plus grande fiabilité statistique (voir section 6.8) et expérimentale est adoptée pour la suite du travail.

La protéinase K (Sigma), une sérine-protéase thermoactive et stable dans des conditions expérimentales proches de celles de cette étude est utilisée comme témoin positive (Ebeling *et al.*, 1974; Bajorath *et al.*, 1988). La solution enzymatique est préparée selon les instructions du fabricant, à une concentration de 30 µg/mL de ddH₂O en présence de 5 mM de CaCl₂.2H₂O.

6.1.1. Dosage de l'activité protéasique à l'azocaséine

Pour le dosage de l'activité protéasique en utilisant l'azocaséine (sulfanilamide azocaséine) comme substrat, le protocole utilisé est adapté de ceux décrits par Lee *et al.* (2005) et Guendouze *et al.* (2017). L'activité protéasique est déterminée en utilisant l'azocaséine comme substrat.

La réaction est réalisée dans une solution de PBS 50 mM à pH 7,5 avec 50 µL d'azocaséine (30 mg/mL de ddH₂O) et 50 µL de solution enzymatique pour un volume final de 750 µL. Un contrôle positif est préparé en remplaçant la solution enzymatique par la Protéinase K.

Le mélange réactionnel est incubé à T_{opt} de croissance de la souche, à l'abri de la lumière, pendant 1 heure et la réaction est arrêtée par l'ajout de 125 µL d'acide trichloroacétique (TCA) à 20% (p/v). Un blanc est préparé en remplaçant la solution enzymatique par le solvant de la solution enzymatique. Après centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes, l'absorbance de 200 µL du surnageant est mesurée à 366 nm contre le blanc dans un lecteur hybride multimode de microplaques modèle Synergy H1 (BioTek).

Une unité d'activité protéasique est définie comme étant la quantité requise pour produire suffisamment de résidus acido-solubles à partir de la caséine pour donner une absorbance de 0,01 à 366 nm après 1 heure d'incubation. Tous les essais sont répétés 3 fois.

6.1.2. Dosage de l'activité protéasique à la caséine

Le dosage de l'activité protéasique contre la caséine est réalisé en utilisant une modification du protocole cité par Gessesse et Gashe (1997) et Gessesse *et al.* (2003).

Dans un tube stérile, le mélange réactionnel, d'un volume total de 1,5 mL, est composé de 1 mL d'une solution à 1% (p/v) de caséine (Sigma) préparée par dissolution de la caséine dans du PBS 50 mM à pH 7,5 et de 0,5 mL de la solution enzymatique. Un contrôle positif est préparé chaque fois en remplaçant la solution enzymatique par la Protéinase K.

Le mélange est incubé à T_{opt} de croissance de la souche pendant 1 heure puis la réaction est interrompue par ajout d'un volume équivalent d'une solution à 10% (p/v) de TCA. Après une centrifugation à 15 000 g pendant 5 minutes, 0,375 mL du surnageant sont ajoutés à 0,5 mL de Na_2CO_3 0,5 M et 0,125 mL du réactif de Folin-Ciocalteu phéniqué 1N. Après incubation du mélange à 30 °C pendant 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance de 200 μL de la solution est mesurée à 660 nm contre un blanc [contenant 0,5 mL de Na_2CO_3 0,5 M ; 0,125 mL du réactif de Folin-Ciocalteu phéniqué 1N et 0,375 mL de solution enzymatique précipitée avec du TCA à 10% (p/v)].

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme libérant 1 μg de L-tyrosine par mL dans les mêmes conditions. La conversion de l'absorbance en unité protéolytique est faite en suivant une courbe d'étalonnage préalablement établie (Annexe 1). Tous les essais ont été répétés 3 fois.

6.1.3. Dosage par fluorescence à la caséine BODIPY FL

L'activité protéasique est dosée par méthode fluorescente en utilisant le kit EnzChek™ (Molecular Probes) selon les instructions du fabricant.

Le kit utilise une caséine marquée par le BODIPY FL, un agent fluorescent permettant la quantification des peptides libérés après hydrolyse enzymatique (Zeng et Cohen, 2000).

Une solution de travail est d'abord préparée en mélangeant 0,2 mL d'une solution A contenant 200 μg de caséine BODIPY FL avec 19,8 mL d'une solution B (2,5 mL de tampon de digestion X20 préparé dans du PBS ajusté à 50 mL avec du ddH_2O) pour une concentration finale de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en caséine BODIPY FL. L'activité enzymatique est ensuite dosée sur une plaque noire à 384 puits. D'abord, 10 μL du surnageant de la solution enzymatique y sont déposés, suivis par 10 μL de la solution de travail. 10 μL de Protéinase K sont utilisés comme

contrôle positif contre 10 μ L de la solution de travail, le solvant de la solution enzymatique est utilisé de la même manière comme contrôle négatif.

La plaque est incubée à l'abri de la lumière pendant 1 heure à T_{opt} et la lecture est effectuée à un couple excitation:émission de 485:538 nm en utilisant un lecteur hybride multimode de microplaques BioTek modèle Synergy H1.

Une unité d'activité protéasique est définie comme étant une augmentation de 100 unités du signal fluorescent en comparaison avec le contrôle négatif. Tous les essais sont répétés 3 fois.

6.2. Sélection de souches productrices de protéases extracellulaires

Les souches possédant une activité protéasique sur milieu de culture solide ayant été caractérisées phénotypiquement et par des approches moléculaires (voir section 5) ont été cultivées à T_{opt} pendant 24 heures dans 1,5 mL d'un milieu de culture contenant (p/v): 1% caséine ; 0,4% peptone ; 0,2% extrait de levures ; 0,2% glucose ; $NaCl_{opt}$; 0,01% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et à pH_{opt} (Gessesse et Gashe, 1997).

Après centrifugation à 4000 g pendant 15 minutes, l'activité protéasique totale du surnageant de chaque culture est déterminée contre la caséine, la caséine BODIPY FL et l'azocaséine. Les isolats ayant les activités statistiquement les plus importantes parmi les groupes taxonomiques les plus intéressants sont retenus pour les essais de production.

6.3. Mesure de la croissance en conditions de fermentation

Afin de confirmer les optima de croissance et étudier leur influence sur la croissance en conditions de fermentation des souches sélectionnées en section 6.2, les taux de croissance des souches productrices de protéases extracellulaires sont estimés à différentes valeurs de températures, de pH et de concentrations de NaCl en variant à chaque fois un seul paramètre. Le tableau 18 montre les différentes combinaisons de valeurs de température, de pH et de salinité utilisées. Le choix de ces valeurs découle des résultats en section 5.1.1.

Pour la préparation de la préculture, 20 mL du bouillon M1 sont inoculés par la souche productrice de protéase et incubés durant la nuit à T_{opt} . La préculture est ensuite transférée dans une fiole Erlenmeyer stérile de 500 mL contenant 100 mL du bouillon M1 de manière à donner une absorbance initiale de 0,1 à 660 nm. Les cultures ainsi préparées sont incubées en conditions aérobies dans un shaker à agitation orbitale Thermo Scientific modèle MaxQ 4000 à 120 tours par minute (tpm) pendant 24 heures. La turbidité des cultures est déterminée chaque deux heures en mesurant l'augmentation de la densité optique à 660 nm à l'aide d'un lecteur hybride multimode de microplaques BioTek modèle Synergy H1. Au minimum 10 mesures sont prises en compte.

Matériel et Méthodes

Afin d'estimer statistiquement la valeur optimale de chaque paramètre, le taux de croissance horaire a été calculé selon la formule suivante (Petit et Tagger, 1976):

$$R = \frac{DO_t - DO_{t_0}}{t}$$

R : taux de croissance par heure (h^{-1}) DO : densité optique de la culture à 660 nm ; t : en heure ; t_0 : début de l'expérimentation.

Tableau 18. Valeurs de température, de pH et de concentrations de NaCl utilisées pour l'estimation des taux de croissance.

Essai Paramètre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T (°C)	50	55									60
pH*	pH _{opt}	7,0	6,5	7,0	7,5	8,0	pH _{opt}	pH _{opt}	pH _{opt}	pH _{opt}	
[NaCl] (% p/v)	[NaCl] _{opt}	0					1	2	3	[NaCl] _{opt}	

* Tampon phosphate (0,2 M) est utilisé afin d'ajuster les valeurs de pH ; Opt: valeur optimale.

6.4. Production des protéases extracellulaires

Pour la production des protéases extracellulaires par les souches sélectionnées, 2 milieux de culture différents sont utilisés :

- le milieu de culture à la caséine (MC) (% p/v): 0,8 caséine ; 0,3 peptone ; 0,2 extrait de levures ; 0,2 glucose ; NaCl_{opt} ; 0,01 CaCl₂.2H₂O ; 0,02 MgSO₄.7H₂O ; 0,1 KH₂PO₄, ajusté à pH_{opt} (Gessesse *et al.*, 2003) ;

- le milieu de culture au lait écrémé (ME) (% p/v): 0,8 poudre de lait écrémé ; 0,3 peptone ; 0,2 extrait de levures ; 0,2 glucose ; NaCl_{opt} ; 0,01 CaCl₂.2H₂O ; 0,02 MgSO₄.7H₂O ; 0,672 KH₂PO₄ ; 3,863 NaHPO₄, ajusté à pH_{opt} (Wang *et al.*, 2012).

50 mL de préculture de chaque souche sont préparés comme décrit précédemment et utilisés pour ensemer 250 mL des milieux MC ou ME contenus dans des fioles Erlenmeyer stériles de 2000 mL. Les cultures sont incubées à température optimale en double, dans des conditions aérobies à 120 tpm. La turbidité des cultures et l'activité protéasique sont déterminées sur un flacon, chaque 4 heures et pendant 64 heures. La croissance sur l'autre flacon est interrompue après 48 heures de culture et le contenu est utilisé pour l'extraction des protéases extracellulaires.

Les surnageants des cultures sont récupérés par centrifugation à 22 000 g pendant 30 minutes à 4 °C dans une centrifugeuse de marque Beckman modèle J2-MC puis utilisés comme solutions enzymatiques brutes.

La solution enzymatique ayant présentée l'activité protéasique la plus élevée est sélectionnée pour purification.

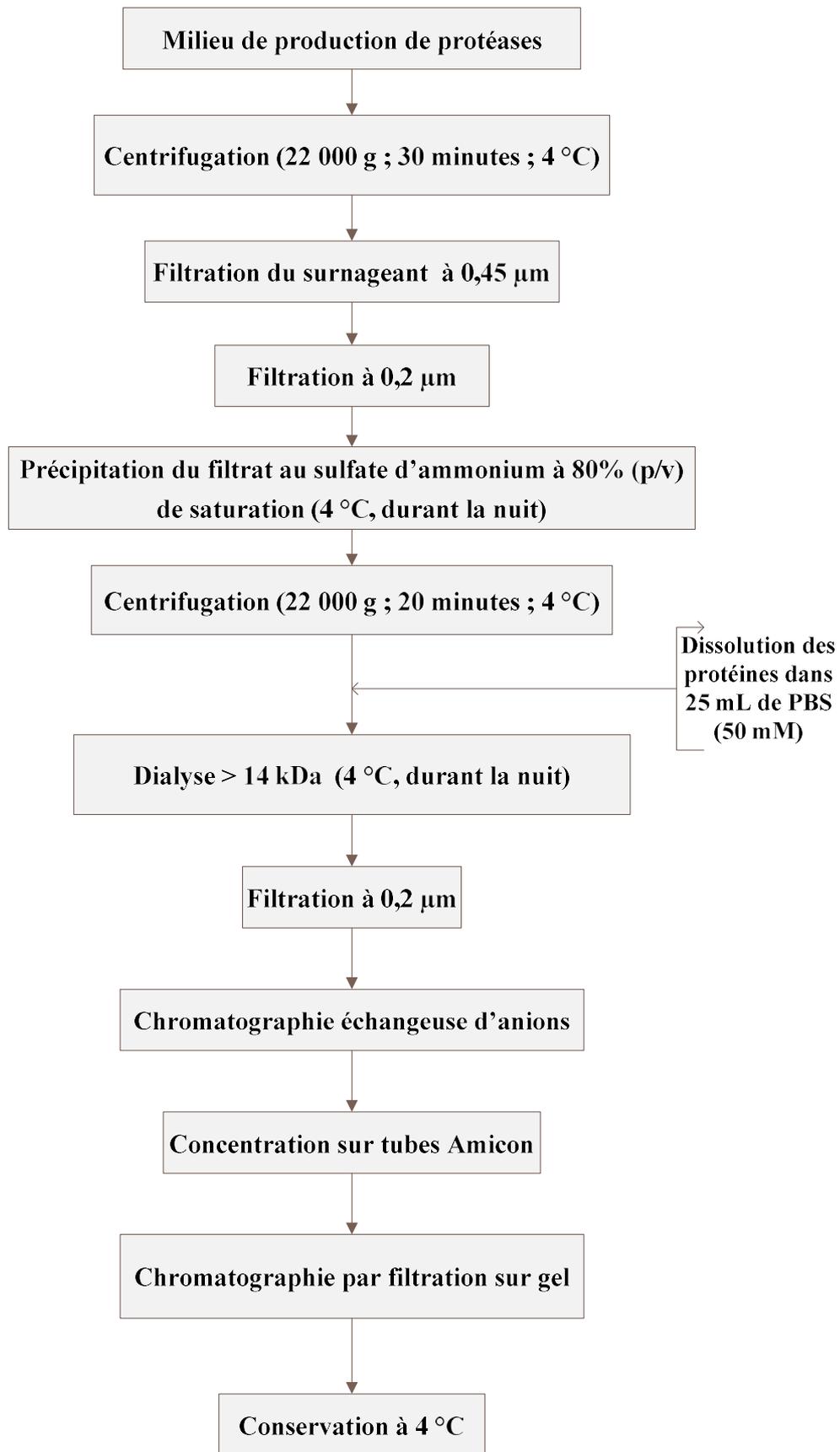


Figure 13. Schéma général des étapes d'extraction et de purification des protéases à partir des cultures des souches sélectionnées.

6.5. Purification des protéases extracellulaires

La solution enzymatique a subi une série d'étapes d'extraction et de purification et l'activité protéasique est mesurée après chaque étape.

Le schéma général des étapes d'extraction et de purification des protéases est montré dans la figure 13.

6.5.1. Étapes d'extraction

La solution enzymatique brute est filtrée à travers des filtres à membrane en nitrate de cellulose stériles quadrillés (Sartorius), d'abord à 0,45 μm puis le filtrat récupéré est encore soumis à une filtration à 0,2 μm .

Les protéines de la solution filtrée sont précipitées au sulfate d'ammonium à une concentration finale de saturation à 80% (p/v) puis la suspension est maintenue sous agitation douce à 4 °C durant la nuit. Les protéines précipitées sont récupérées par centrifugation à 22 000 g pendant 20 minutes à 4 °C puis dissoutes dans 25 mL de tampon PBS à 50 mM.

La solution enzymatique est ensuite dialysée durant la nuit, à 4 °C, en utilisant une tubulure à membrane de dialyse en cellulose à un seuil de rétention de 14 kDa (Sigma) (préparée selon les instructions du fabricant: placée pendant 2 minutes dans de l'eau distillée à 60 °C, puis pendant 1 minute dans de l'eau distillée à température ambiante). Cette dialyse est effectuée contre 500 mL de tampon PBS à 50 mM remplacé 4 fois toutes les 2 heures.

La solution obtenue est filtrée à travers un filtre stérile pour seringue à membrane de 0,2 μm (Sartorius).

6.5.2. Purification par méthodes chromatographiques

La purification des protéases par méthodes chromatographiques est réalisée en deux étapes dans un système de chromatographie liquide rapide de protéines (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*) GE Healthcare modèle ÄKTA Prime Plus préparé selon les instructions du fabricant.

Toutes les solutions de lavage et d'élution utilisées durant l'expérimentation sont préparées dans du ddH₂O. Elles sont filtrées à 0,2 μm puis dégazifiées dans un sonicateur Sonics modèle VCX 130 pendant 5 minutes en utilisant un cycle de 30 secondes de marche à 100% d'impulsion et de 30 secondes d'arrêt.

La sonication permet d'éliminer les bulles d'air microscopiques qui pourraient perturber la migration des protéines.

6.5.2.1. Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions

La première étape de purification a consisté en une chromatographie à échange d'anions. C'est une des techniques les plus utilisées et les plus adaptées pour la purification des protéines ayant des points isoélectriques entre 6,0 et 7,6. Son principe est de solubiliser les protéines dans un tampon à faible pouvoir ionisant et de passer la solution à travers une colonne afin de lier ces protéines à une matrice chargée positivement (Salem, 2001).

Cette étape a été réalisée sur une colonne GE Healthcare modèle HiTrap Q HP 5 mL (25 mm x 16 mm), employant un support en Q-Sepharose dont le groupement actif est un ammonium quaternaire ($-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Cette colonne est utilisée pour la purification de protéines à haute résolution selon leurs pH isoélectriques suivant un gradient de force ionique.

La colonne est équilibrée à 3 mL/min avec 50 mL d'un tampon PBS à 50 mM et à pH 7,5 (tampon A) et la solution enzymatique dialysée et filtrée est chargée sur la colonne pendant 2 heures à un débit de 4,5 mL/min. Les protéines liées sont éluées en appliquant un gradient linéaire (0-1 M) de NaCl dans le tampon A à un débit de 0,5 mL/min. Le fractionnement est apprécié par la mesure de la densité optique à 280 nm et les fractions sont collectées à 1 mL.

6.5.2.2. Purification et concentration sur système Amicon

Les fractions contenant une activité enzymatique sont collectées puis concentrées en utilisant un système de purification en tubes Amicon avec un seuil d'exclusion à 10 kDa (Millipore) par centrifugation à 4 500 g pendant 20 minutes à 4 °C dans une centrifugeuse Eppendorf modèle 5804.

Les tubes Amicon sont préalablement lavés avec 20 mL de PBS à 50 mM dans les mêmes conditions de centrifugation.

6.5.2.3. Fractionnement par filtration sur gel

Les fractions actives et concentrées issues de la première étape de chromatographie subissent une deuxième étape de purification chromatographique, par exclusion selon le poids moléculaire [10 kDa-600 kDa], en utilisant une colonne de filtration sur gel GE Healthcare HiLoad Superdex 200 prepgrade (60 cm x 16 cm).

La filtration sur gel étant recommandée comme étape de purification complémentaire sur des protéines préalablement purifiées (Salem, 2001).

Un volume de 800 µL est chargé dans la colonne pendant 2 heures et l'éluion est réalisée dans un tampon PBS à 50 mM PBS, pH 7,5 à un débit de 0,1 mL/min. Le fractionnement est apprécié par la mesure de la densité optique à 280 nm et les fractions sont collectées à 1 mL.

6.6. Dosage des protéines totales et expression de l'activité enzymatique

La quantification des protéines totales des surnageants et de la solution enzymatique après chaque étape d'extraction et de purification est réalisée par la méthode de Bradford (1976). C'est une méthode colorimétrique permettant la mesure de la fixation du bleu de Coomassie G-250 sur les liaisons peptidiques en milieu acide.

Le réactif de Bradford (Bio-Rad) est rouge-brun à l'état libre et lié aux protéines, il prend une teinte bleue avec un coefficient d'extinction molaire élevé à 595 nm qui rend le dosage protéique très sensible. L'intensité de la coloration est ainsi proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. La mesure de la DO à 595 nm est effectuée en triplicata à l'aide d'un lecteur hybride multimode de microplaques BioTek modèle Synergy H1.

Une gamme d'étalonnage de 0 à 0,50 mg/mL est réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA). La courbe d'étalonnage est tracée avec un tableur et les absorbances ont été rapportées sur la courbe d'étalonnage pour la détermination des concentrations.

L'activité enzymatique est exprimée en activité protéasique spécifique (U/mg de protéines totales). Le rendement (en pourcentage) et le facteur de purification après chaque étape d'extraction et de purification sont calculés selon les formules (Berg *et al.*, 2015):

$$\text{Rendement} = \left(\frac{\text{Activité protéasique totale}}{\text{Activité protéasique totale de l'extrait brut}} \right) \times 100$$

$$\text{Facteur de purification} = \frac{\text{Activité protéasique spécifique}}{\text{Activité protéasique spécifique de l'extrait brut}}$$

6.7. Caractérisation des protéases

Les fractions protéasiques obtenues après filtration sur gel sont étudiées sur les plans physique et chimique.

6.7.1. Détermination du poids moléculaire et zymographie

6.7.1.1. Électrophorèse SDS-PAGE

Le poids moléculaire des fractions protéasiques est déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) selon la méthode décrite par Laemmli (1970).

Cette technique consiste à faire migrer des protéines dans des conditions dénaturantes générées par l'effet combiné d'un chauffage, du SDS et du β -mércaptoéthanol, dans un gel constitué par la copolymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide en présence du N,N,N',N'-TétraMéthylEthylèneDiamine (TEMED) et du persulfate d'ammonium (APS) comme catalyseurs de la réaction, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation (Ortiz *et al.*, 2011).

Les gels utilisés pour séparer les protéines par électrophorèse sont en général discontinus. Ils sont composés d'un gel dense appelé gel de séparation (*resolving*), à pourcentage élevé en acrylamide, permettant la séparation suivant la taille, qui est précédé d'un gel appelé gel de concentration (*stacking*), permettant au préalable de déposer dans des puits créés par un peigne et de concentrer les échantillons, avant d'entrer dans la partie de séparation. Cette méthode permet d'avoir des bandes de protéines bien focalisées et donc bien résolues (Ortiz *et al.*, 2011).

Pour ce travail, le gel de concentration à 6% (p/v) d'acrylamide a été placé au-dessus du gel de séparation à 10% (p/v) d'acrylamide (Tableau 19).

Un volume de 5 μ L d'échantillon protéique est préalablement coloré avec 15 μ L d'un tampon de chargement 2X (composition pour 1 mL : 400 μ L de SDS à 10% (p/v) ; 200 μ L de glycérol ; 120 μ L de Tris-HCl 1M à pH 6,8; 20 μ L de bleu de bromophénol à 0,1% (p/v); 160 μ L de ddH₂O ; 100 μ L de β -mércaptoéthanol), permettant de suivre le front de migration.

Les 20 μ L du mélange sont chauffés à 95 °C pendant 10 minutes. Les puits sont remplis par 10 μ L d'échantillons protéiques préparés et un puits est réservé au dépôt de 2,5 μ L d'un marqueur moléculaire.

Le marqueur moléculaire utilisé (NZY *Colour Protein Marker II*), est constitué de protéines de référence de différents poids moléculaires : 245 kDa, 180 kDa, 135 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 17 kDa et 11 kDa.

Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode, et leur structure primaire permet leur migration à travers le gel d'acrylamide. Elles se séparent selon leur poids moléculaire : les protéines de grandes tailles auront des difficultés à traverser les « mailles » du gel d'acrylamide.

L'ensemble est mis dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration [0,3% (p/v) de Tris ; 1,44% (p/v) de Glycine ; 0,1% (p/v) de SDS préparée dans du ddH₂O].

La migration est effectuée à 150 V pendant 2 heures, et à température ambiante. Après séparation des protéines, le gel d'acrylamide est démoulé et le gel de concentration est éliminé.

Afin de mettre en évidence les protéines séparées, une coloration au bleu de Coomassie R-250 est réalisée. Le gel de séparation démoulé est immergé dans une solution de coloration (90 mL ddH₂O ; 10 mL acide acétique ; 25 mg bleu de Coomassie R-250). L'ensemble est d'abord chauffé dans un four à microonde pendant 20 secondes à 400 watts puis laissé à température ambiante pendant 20 minutes sous agitation douce.

Lors de cette coloration, le bleu de Coomassie R-250 se fixe aux acides aminés basiques et aromatiques. Le gel est ensuite décoloré avec la même solution ayant servi à la fixation des protéines, mais exempte de bleu de Coomassie R-250.

6.7.1.2. Zymographie

La zymographie ou zymogramme électrophorétique est une technique qui permet l'observation de l'activité enzymatique en présence de son substrat.

La zymographie est réalisée dans un gel de polyacrylamide, et contrairement à l'électrophorèse SDS-PAGE, la migration électrophorétique est menée dans des conditions douces (sans agents réducteurs) pour prévenir la perte d'activité des enzymes étudiées. L'activité protéasique est révélée dans un gel polymérisé préparé dans une solution de lait écrémé (Leber et Balkwill, 1997).

Le gel destiné à l'analyse zymographique est constitué d'un gel de concentration à 6% (p/v) et d'un gel de séparation à 10% (p/v) contenant 0,5% (p/v) de lait écrémé (Tableau 19).

Un gel SDS-PAGE des mêmes échantillons est préparé comme décrit précédemment et est lancé en parallèle dans les mêmes conditions de migration.

Les échantillons protéasiques destinés à la zymographie ne sont pas chauffés avant l'électrophorèse et le tampon de chargement ne contient pas de β -mércaptoéthanol. Les échantillons sont chargés dans les 2 gels en présence du marqueur moléculaire dans des puits séparés, et l'électrophorèse des deux gels est menée à 150 V pendant 2 heures à température ambiante.

Le gel de zymographie est lavé dans une solution à 2,5% (v/v) de Triton X-100 pendant 1 heure afin d'éliminer le SDS puis placé pendant 15 minutes dans le tampon Tris-HCl à 50 mM pH 7,5 afin de rééquilibrer les conditions du milieu. Il est ensuite incubé à 50 °C durant une nuit dans une solution de PBS à 50 mM pH 7,5 contenant 1% (p/v) de caséine (préparée par dissolution de la caséine dans le PBS à 60 °C sous agitation).

Le gel est enfin coloré avec une solution de bleu de Coomassie R-250 (0,2%, p/v) pendant 1 heure puis décoloré dans un mélange eau distillé/acide acétique (80:20).

Matériel et Méthodes

Les bandes contenant l'activité protéasique apparaissent en zones claires entourées par la couleur bleue du gel.

Tableau 19. Composition des gels utilisés pour l'électrophorèse SDS-PAGE et la zymographie.

Constituant*	Gel de concentration (6%, p/v)	Gel de séparation SDS-PAGE (10%, p/v)	Gel de séparation Zymographie (10%, p/v)
ddH ₂ O	3,67	5,1	0
Acrylamide 40% (p/v)	0,623	2,670	1,335
Tris 1,5 M pH 8,8	0	2,500	1,25
Tris 1,5 M pH 6,8	0,63	0	0
SDS 20% (p/v)	0,025	0,05	0,025
APS 10% (p/v)	0,05	0,1	0,05
TEMED	0,005	0,004	0,002
Lait écrémé 0,5% (p/v)	0	0	2,55
Volume Total	5,003	10,424	5,212

* Tous les volumes sont en mL. ddH₂O : eau ultra pure ; SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* ; APS : persulfate d'ammonium ; TEMED : N,N,N',N'-TétraMéthylEthylèneDiamine.

6.7.1.3. Lecture des gels et détermination du poids moléculaire

Les gels sont visualisés et photographiés sous lumière blanche en utilisant un système numérisé d'imagerie BIORAD modèle Molecular Imager Gel DocTM XR.

Les distances de migration parcourues par les protéines de référence sur le gel sont mesurées en mm permettant de tracer la droite-étalon représentant le logarithme du poids moléculaire de celles-ci en fonction de leur mobilité. Le poids moléculaire de la protéase correspond à celui de la bande positive sur le gel de zymographie ayant la même distance frontale sur le gel SDS-PAGE.

6.7.2. Détermination de la température optimale de l'activité protéasique

La température optimale de l'activité des protéases purifiées est déterminée en mesurant l'activité enzymatique comme décrite en section (6.1) à 30 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70 et 80 °C. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité relative contre l'activité maximale obtenue, considérée comme 100%.

6.7.3. Effet du chauffage à température optimale sur l'activité protéasique

La stabilité des enzymes est mesurée comme décrit précédemment après incubation des enzymes pendant 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180 et 240 minutes à température optimale. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité relative contre la meilleure activité obtenue, considérée comme 100%.

6.7.4. Détermination du pH optimal de l'activité protéasique

Le pH optimal des enzymes est déterminé à la température optimale de réaction sur un intervalle de 4 à 11 contre l'azocaséine en utilisant différentes solutions tampons : Na₂HPO₄ 0,2 M-Acide citrique 0,1 M pour l'intervalle 4,0-7,0 ; Tris-HCl pour l'intervalle 8,0-9,0 et Glycine 0,2 M-NaOH 0,2 sur l'intervalle 10,0-11,0 (Tableau 20-Annexe 1). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'activité relative et une valeur de 100% a été attribuée au pH présentant une activité maximale.

6.7.5. Effet des métaux lourds sur l'activité protéasique

L'effet de différents ions métalliques sur l'activité enzymatique est étudié en incubant les enzymes purifiées pendant 1 heure dans un tampon PBS 50 mM pH 7,5 contenant 2,5 mM des ions métalliques Mg²⁺, Li²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, ou Ca²⁺. L'activité protéasique sans ions métalliques sert comme contrôle, et est considérée comme étant 100% d'activité.

6.7.6. Effet des solvants sur l'activité protéasique

L'effet de l'éthanol, du méthanol et de l'acétone sur l'activité protéasique est mesuré en incubant les enzymes purifiées pendant 1 heure en présence de 1% (v/v) de chacun des solvants cités. L'activité protéasique sans solvant sert comme contrôle et est considérée comme étant 100% d'activité.

6.7.7. Effet des détergents et des inhibiteurs sur l'activité protéasique

Les effets des surfactants: SDS ; Tween-20 ; Tween-80 ; Triton X-100, des chélateurs d'ions métalliques: Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) et DiThioThrétol (DTT), ainsi que des inhibiteurs de protéases: Fluorure de PhénylméthylSulfonyle (PMSF) ; pepstatine A ; inhibiteur de trypsine; Diméthylsulfoxyde (DMSO) sont étudiés en incubant l'enzyme purifiée pendant 1 heure avec 1% (p/v ou v/v) de chaque agent chimique cité, à l'exception de l'EDTA, de l'inhibiteur de trypsine et de pepstatine A qui sont à une concentration de 1 mM. L'activité protéasique sans agent chimique sert comme contrôle et a été considérée comme étant 100% d'activité.

6.8. Analyse statistique

La comparaison entre les moyennes des essais en triplicata et la détermination des optima de croissance est réalisée avec le test de Student à un seuil de significativité $p < 0,05$. La comparaison entre les résultats du dosage de l'activité protéasique avec les trois méthodes décrites est effectuée par le test de l'Analyse de la Variance (ANOVA) ($p < 0,05$). L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel STATISTICA version 12 (StatSoft, 2013).

RÉSULTATS
ET
DISCUSSION

Ce présent travail avait pour objectifs initiaux d'étudier la diversité de la flore bactérienne aérobie thermophile de quelques environnements chauds localisés sur le sol algérien, par approches culturelles et non-culturelles, de prospector le potentiel de production de protéases extracellulaires d'une sélection de souches et de caractériser leurs protéases les plus intéressantes.

Afin d'atteindre ces objectifs, des souches aérobies thermophiles ont d'abord été isolées et purifiées à partir de plusieurs échantillons d'environnement puis ont été sélectionnées selon des critères morphologiques, sur la base de leur aptitude à produire des protéases extracellulaires puis sur la base de leurs caractères moléculaires. Ensuite, certains de ces environnements ont été analysés métagénomiquement. Enfin, une évaluation des activités protéasiques extracellulaires des souches de la sélection a été réalisée par méthodes biochimiques, mais également génomiques.

1. Caractéristiques physico-chimiques des sites de l'étude

Un total de 44 échantillons variés d'eau, de sédiments et de sol ont été collectés à partir de 9 points de prélèvements répartis sur 6 sites géographiques différents constituant des environnements chauds très variés : trois sources thermales, une sebkha, un forage pétrolier géochauffé et deux sols sahariens. Ces échantillons ont été destinés à l'isolement de bactéries thermophiles aérobies ou à l'analyse de la diversité par méthode métagénomique.

Le choix de ces sites avait pour but de collecter des échantillons à une large gamme de températures et de composition minérale. Les résultats des mesures de la température et de pH de l'eau réalisées lors des prélèvements sont montrés en tableau 21.

La température des sites visités variait entre $42\text{ °C} \pm 1$ à Thamelah, $50\text{ °C} \pm 1$ pour l'eau collectée au niveau du forage de l'ENAFOR à Hassi Messaoud, et de 54 °C à 96 °C pour les trois sources thermales étudiées. Les températures les plus élevées sont enregistrées à Hammam Debagh, documentée pour être la source géothermale la plus chaude en Algérie (Ouali *et al.*, 2007; Ouali, 2015). À noter que les températures des eaux thermales prélevées au niveau des points d'émergence OA, Db1 et Db2 étaient stables sur un intervalle de 3 échantillonnages réalisés sur 3 ans. Par contre, la température du point Db3 fluctuait de manière significative, la raison étant que ce point se situe au niveau des bassins de collecte et de refroidissement des eaux thermales.

À noter qu'au niveau des sites d'Ouled Ali et d'Essalihine, une présence de végétation autour des bassins et d'algues macroscopiques indique une biodiversité et une disponibilité de matière organique plus abondante pour une utilisation hétérotrophe.

Les valeurs de pH des eaux étudiées étaient neutres en général et fluctuaient d'un point à un autre. Ainsi, elles étaient plus acides à Debagh, et plus alcalines à Hammam Essalihine, à Thamelah et au niveau du forage de l'ENAFOR. En revanche, la mesure des pH des sédiments de Debagh, Ouled Ali et Thamelah indiquait des valeurs plus élevées. Notamment pour les points de prélèvement de Debagh où l'écart est significatif. Cette différence peut s'expliquer par les dépôts importants de minéraux au niveau des couches sédimenteuses, essentiellement de nature calcaire, qui tendent à faire augmenter le pH des sédiments par rapport à celui de l'eau (McLean, 1982).

Les données rapportées en bibliographie concernant la composition des eaux des 3 sources thermales indiquent des propriétés communes entre ces eaux thermales : pH proches de la neutralité, avec une importante minéralisation et un faciès chimique caractérisé par la dominance du chlorure de sodium, un contenu important en sulfate de calcium, ainsi que d'importantes émissions de dioxyde de carbone et de nitrogène. Ces caractéristiques ont été rapportées pour un nombre important de sources thermales du Nord de l'Algérie (Saibi, 2009; Bahri *et al.*, 2011; Amarouche-Yala *et al.*, 2015; Ouali, 2015; Foued *et al.*, 2017; Gueroui *et al.*, 2018).

Concernant la sebkha de Thamelah, un pH alcalin et un taux de matière sèche de 5 °Brix indiquent une forte minéralisation du sol. Toutefois, des données supplémentaires concernant la composition chimique de l'eau ne sont pas disponibles. Cette dernière peut être fortement influencée par le taux d'évaporation et de précipitation qui varient de manière significative au cours de l'année.

La région de Hassi Messaoud, avec ses forages pétroliers et hydrauliques, fait partie de la nappe du Complexe Terminal du Sahara Septentrionale qui s'étend sur une superficie de l'ordre de 350 000 km². Cette nappe, appartenant au réservoir continu albien a une profondeur relativement faible, allant de 100 à 400 m (Ouali, 2018). Ses eaux possèdent un caractère thermal avec des températures maximales dépassant les 60 °C dans cette région. La salinité de cette nappe est modérée (entre 1,5 et 3 g/L). Le pH est entre 7,2 et 8,5 sur presque la totalité de la nappe. Le faciès chimique dominant de cette eau est sulfaté magnésien (Tabouche et Achour, 2004; Mébrouk, 2014; Ouali, 2015).

Concernant les échantillons de sols sahariens d'Aougrou et de Chaâbet Ntissa, leurs pH présentaient des valeurs de 7,60 ($\pm 0,07$) et de 7,91 ($\pm 0,11$), respectivement. Les données physico-chimiques fournies par Dr. Meklat concernant ces sols indiquaient un pH alcalin de 8, une composition de 0,66% (p/p) en carbone, de 0,08% (p/p) en azote et de 10% (p/p) en CaCO₃ avec une conductivité électrique de 1,9 mS/cm pour la région Chaâbet Ntissa et une

Résultats et Discussion

minéralisation de 8% (p/p) en CaCO₃ et un pH de 7,7 pour la région de Aougrou (données non publiées).

Les paramètres physico-chimiques de l'environnement, notamment la température et le pH, influencent grandement la structure et l'abondance des communautés microbiennes thermophiles (Dartnell, 2011).

Tableau 21. Valeurs moyennes de température et de pH des eaux et des sédiments des sites de l'étude.

Point de prélèvement		Date de prélèvement	T (°C) ± ET	Échantillon	pH ± ET
Debagh	Db ₁	21-04-2013	91 ± 0,5	Eau	6,55 ± 0,02
		09-01-2015	91 ± 0,0	Eau	6,61 ± 0,05
		10-02-2015	92 ± 0,0	Eau	6,51 ± 0,09
			-	Sédiments	7,41 ± 0,03
	Db ₂	21-04-2013	95 ± 0,5	Eau	6,79 ± 0,08
		09-01-2015	94 ± 0,0	Eau	6,85 ± 0,01
		10-02-2015	96 ± 0,0	Eau	6,69 ± 0,04
			-	Sédiments	7,25 ± 0,06
	Db ₃	21-04-2013	56 ± 1,0	Eau	6,80 ± 0,10
		09-01-2015	64 ± 1,0	Eau	6,56 ± 0,08
		10-02-2015	75 ± 0,0	Eau	6,45 ± 0,02
			-	Sédiments	7,11 ± 0,05
Ouled Ali	OA	21-04-2013	54 ± 1,0	Eau	7,01 ± 0,05
		09-01-2015	55 ± 0,5	Eau	7,12 ± 0,12
		10-02-2015	54 ± 0,0	Eau	6,98 ± 0,05
			-	Sédiments	7,13 ± 0,07
Essalihine	Sal	08-05-2013	58 ± 0,0	Eau	7,80 ± 0,03
Thamelaht	AS	15-06-2013	42 ± 1,0	Eau	7,60 ± 0,07
			-	Sédiments	7,85 ± 0,05
ENAFOR	ENAFOR	10-06-2013	50 ± 0,0	Eau	7,78 ± 0,03
Chaâbet Ntissa	Sah1	2012	-	Sol	7,91 ± 0,11
Aougrou	Sah2	2012	-	Sol	7,60 ± 0,07

T : température de l'eau à l'émergence ; ET: écart type ; pH est mesuré à température ambiante ; - : non déterminé.

Tableau 22. Données de l'isolement des cultures bactériennes de l'étude.

Code isolat	Site	Point prél.	Échantillon	M iso.	Date iso.	Code isolat	Site	Point prél.	Échantillon	M iso.	Date iso.
Db12	Debagh	Db1	Sédiments	M2	25/04/2013	Db25	Debagh	Db2	Eau	M4	27/04/2013
Db17	Debagh	Db1	Sédiments	M3	27/04/2013	Db26	Debagh	Db2	Eau	M4	27/04/2013
Db18	Debagh	Db1	Sédiments	M3	25/04/2013	Db27	Debagh	Db2	Eau	M4	27/04/2013
Db38	Debagh	Db1	Eau	M1	27/04/2013	Db32	Debagh	Db2	Eau	M3	27/04/2013
Db40	Debagh	Db1	Eau	M1	27/04/2013	Db33	Debagh	Db2	Eau	M2	27/04/2013
Db41	Debagh	Db1	Eau	M1	27/04/2013	Db34	Debagh	Db2	Eau	M2	27/04/2013
Db42	Debagh	Db1	Eau	M1	27/04/2013	Db37	Debagh	Db2	Sédiments	M2	27/04/2013
Db46	Debagh	Db1	Eau	M2	27/04/2013	Db39	Debagh	Db2	Eau	M1	27/04/2013
Db47	Debagh	Db1	Eau	M2	27/04/2013	Db44	Debagh	Db2	Sédiments	M3	27/04/2013
Db55	Debagh	Db1	Eau	M3	27/04/2013	Db45	Debagh	Db2	Sédiments	M3	27/04/2013
Db56	Debagh	Db1	Eau	M3	27/04/2013	Db49	Debagh	Db2	Sédiments	M3	27/04/2013
Db60	Debagh	Db1	Eau	M3	30/04/2013	Db5	Debagh	Db2	Sédiments	M1	25/04/2013
Db75	Debagh	Db1	Sédiments	M2	27/04/2013	Db50	Debagh	Db2	Sédiments	M3	27/04/2013
Db8	Debagh	Db1	Sédiments	M1	25/04/2013	Db51	Debagh	Db2	Sédiments	M3	27/04/2013
Db9	Debagh	Db1	Sédiments	M1	27/04/2013	Db52	Debagh	Db2	Sédiments	M3	27/04/2013
Db101	Debagh	Db1	Sédiments	M3	09/01/2015	Db59	Debagh	Db2	Eau	M3	30/04/2013
Db109	Debagh	Db1	Sédiments	M1	09/01/2015	Db6	Debagh	Db2	Sédiments	M1	27/04/2013
Db110	Debagh	Db1	Sédiments	M2	09/01/2015	Db7	Debagh	Db2	Sédiments	M1	27/04/2013
Db114	Debagh	Db1	Sédiments	M2	09/01/2015	Db144*	Debagh	Db2	Sédiments	M5	31/03/2015
Db115	Debagh	Db1	Sédiments	M1	09/01/2015	Db147*	Debagh	Db2	Sédiments	M4	31/03/2015
Db116	Debagh	Db1	Sédiments	M3	09/01/2015	Db149*	Debagh	Db2	Sédiments	M3	30/03/2015
Db120	Debagh	Db1	Sédiments	M2	09/01/2015	Db150*	Debagh	Db2	Sédiments	M1	30/03/2015
Db134*	Debagh	Db1	Sédiments	M5	01/04/2015	Db3	Debagh	Db3	Sédiments	M1	27/04/2013
Db154*	Debagh	Db1	Sédiments	M1	30/03/2015	Db4	Debagh	Db3	Sédiments	M1	25/04/2013
Db159*	Debagh	Db1	Eau	M4	02/04/2015	Db48	Debagh	Db3	Sédiments	M2	27/04/2013
Db1	Debagh	Db2	Sédiments	M1	25/04/2013	Db151*	Debagh	Db3	Sédiments	M3	30/03/2015
Db10	Debagh	Db2	Sédiments	M1	27/04/2013	Db152*	Debagh	Db3	Sédiments	M4	30/03/2015
Db11	Debagh	Db2	Sédiments	M1	25/04/2013	Db153*	Debagh	Db3	Sédiments	M1	30/03/2015
Db2	Debagh	Db2	Sédiments	M1	27/04/2013	Db53	Debagh	Db3	Sédiments	M3	27/04/2013
OA14	Ouled Ali	OA	Sédiments	M2	25/04/2013	OA108	Ouled Ali	OA	Eau	M2	09/01/2015
OA15	Ouled Ali	OA	Sédiments	M2	27/04/2013	OA111	Ouled Ali	OA	Eau	M1	09/01/2015
OA16	Ouled Ali	OA	Sédiments	M2	27/04/2013	OA112	Ouled Ali	OA	Eau	M3	09/01/2015
OA20	Ouled Ali	OA	Eau	M1	25/04/2013	OA113	Ouled Ali	OA	Eau	M2	09/01/2015
OA21	Ouled Ali	OA	Eau	M2	25/04/2013	OA117	Ouled Ali	OA	Sédiments	M2	09/01/2015
OA22	Ouled Ali	OA	Sédiments	M1	27/04/2013	OA118	Ouled Ali	OA	Sédiments	M1	09/01/2015
OA23	Ouled Ali	OA	Sédiments	M1	27/04/2013	OA119	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	09/01/2015
OA24	Ouled Ali	OA	Sédiments	M1	25/04/2013	OA121	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	09/01/2015
OA28	Ouled Ali	OA	Eau	M4	27/04/2013	OA122	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	09/01/2015
OA29	Ouled Ali	OA	Eau	M4	27/04/2013	OA123	Ouled Ali	OA	Sédiments	M2	09/01/2015

prél.: prélèvement ; M : milieu de culture d'isolement ; iso. : isolement ; T : température ; * : isolée à 60 °C.

2. Isolement, purification et sélection des souches

Les échantillons d'eau, de sédiments et de sol des 9 points de prélèvements ont été utilisés pour l'isolement de bactéries aérobies thermophiles sur 8 différents milieux de culture solides. Après incubation des boîtes de Pétri à 55 °C ou à 60 °C, deux à trois colonies représentatives de la variabilité morphologique (ou l'apparition de halo clair sur les géloses M7 et M8) de chaque boîte ont été sélectionnées et purifiées au moins deux fois sur la gélose M1 par un repiquage en stries d'épuisement et incubées à la même température d'isolement. Le choix de ces températures d'isolement est justifié par le fait que la plupart des bactéries thermophiles aérobies hétérotrophes possèdent des températures optimales de croissance entre 50 °C et 60 °C (De Vos, 2015).

Au total, une collection de 138 isolats a été constituée (Tableau 22). Le code de chaque isolat est composé du code du point de prélèvement et d'un chiffre indiquant l'ordre d'isolement.

La figure 14 montre la distribution des isolats selon les conditions de leur isolement et de leur origine. Ainsi, la plupart des cultures purifiées ont été obtenues à partir des points de prélèvement des sources thermales de Debagh (58 isolats) et de Ouled Ali (49 isolats) alors que les autres points ont fourni le reste des cultures (31 isolats). Cette différence est due à l'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons de ces deux sources.

Parmi les milieux de culture solides utilisés, les milieux M1 (gélose *Thermus*), M2 (gélose 256) et M3 (gélose nutritive) ont permis d'isoler 118 des 138 cultures de cette collection.

En dépit de leur très large diversité taxonomique, un grand nombre de bactéries thermophiles possédant un métabolisme chimioorganotrophe aérobie, notamment celles formant-endospores ont tendance à avoir une bonne croissance sur des milieux de culture ordinaire avec une composition nutritive basique tels que la gélose nutritive, la gélose trypticase soja et les géloses peptonnées (Logan et Allan, 2008).

En étudiant la nature des échantillons à l'origine de ces isolats, il s'avère que 50,73% des souches proviennent des sédiments contre 41,30% souches obtenues à partir des échantillons d'eau et 7,97% à partir des échantillons de sols.

Dans des travaux s'intéressant à la diversité microbienne des sources géothermales, il a été constaté que l'abondance des communautés microbiennes au niveau des dépôts de sédiments est souvent plus élevée que celle de l'eau. Plusieurs facteurs influenceraient cette différence, notamment l'importance du gradient existant entre les températures et les pH des eaux et des sédiments des sources thermales. Le temps de résidence des eaux au niveau des bassins géothermaux a une conséquence directe sur les taux de minéralisation et de

Tableau 22. Données de l'isolement des cultures bactériennes de l'étude (suite).

Code isolat	Site	Point prél.	Échantillon	M iso.	Date iso.	Code isolat	Site	Point prél.	Échantillon	M iso.	Date iso.
OA30	Ouled Ali	OA	Eau	M4	27/04/2013	OA124	Ouled Ali	OA	Sédiments	M2	09/01/2015
OA31	Ouled Ali	OA	Eau	M4	27/04/2013	OA125	Ouled Ali	OA	Sédiments	M2	09/01/2015
OA36	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	27/04/2013	OA126	Ouled Ali	OA	Sédiments	M1	09/01/2015
OA43	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	27/04/2013	OA127	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	09/01/2015
OA54	Ouled Ali	OA	Eau	M3	27/04/2013	OA128	Ouled Ali	OA	Eau	M2	17/01/2015
OA57	Ouled Ali	OA	Eau	M3	30/04/2013	OA129	Ouled Ali	OA	Eau	M1	17/01/2015
OA58	Ouled Ali	OA	Eau	M3	30/04/2013	OA130	Ouled Ali	OA	Eau	M1	17/01/2015
OA77	Ouled Ali	OA	Eau	M1	30/04/2013	OA131	Ouled Ali	OA	Eau	M3	17/01/2015
OA78	Ouled Ali	OA	Eau	M1	30/04/2013	OA132	Ouled Ali	OA	Eau	M3	17/01/2015
OA102	Ouled Ali	OA	Eau	M2	09/01/2015	OA140*	Ouled Ali	OA	Sédiments	M5	31/03/2015
OA103	Ouled Ali	OA	Sédiments	M1	09/01/2015	OA142*	Ouled Ali	OA	Sédiments	M4	31/03/2015
OA104	Ouled Ali	OA	Eau	M3	09/01/2015	OA155*	Ouled Ali	OA	Sédiments	M1	30/03/2015
OA105	Ouled Ali	OA	Eau	M1	09/01/2015	OA156*	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	30/03/2015
OA106	Ouled Ali	OA	Eau	M2	09/01/2015	OA157*	Ouled Ali	OA	Sédiments	M3	02/04/2015
OA107	Ouled Ali	OA	Eau	M2	09/01/2015	Sal82	Essalihine	Sal	Eau	M3	17/05/2013
Sal76	Essalihine	Sal	Eau	M4	17/05/2013	Sal83	Essalihine	Sal	Eau	M4	17/05/2013
Sal77	Essalihine	Sal	Eau	M3	17/05/2013	Sal84	Essalihine	Sal	Eau	M2	17/05/2013
Sal78	Essalihine	Sal	Eau	M2	17/05/2013	Sal85	Essalihine	Sal	Eau	M1	17/05/2013
Sal79	Essalihine	Sal	Eau	M2	17/05/2013	Sal86	Essalihine	Sal	Eau	M1	17/05/2013
Sal80	Essalihine	Sal	Eau	M1	17/05/2013	Sal87	Essalihine	Sal	Eau	M1	17/05/2013
AS88*	Thamelaht	AS	Sédiments	M2	25/06/2013	AS92	Thamelaht	AS	Sédiments	M6	25/06/2013
AS89*	Thamelaht	AS	Sédiments	M2	25/06/2013	AS94	Thamelaht	AS	Sédiments	M7	25/06/2013
AS90	Thamelaht	AS	Sédiments	M8	25/06/2013	AS95	Thamelaht	AS	Eau	M1	25/06/2013
AS91*	Thamelaht	AS	Sédiments	M2	25/06/2013	AS96	Thamelaht	AS	Eau	M1	25/06/2013
ENAF93	ENAFOR	ENAFOR	Eau	M7	25/06/2013	Sah64	Aougrou	Sah2	Sol	M1	02/05/2013
Sah68	Chaâbet Ntissa	Sah1	Sol	M1	02/05/2013	Sah65	Aougrou	Sah2	Sol	M1	02/05/2013
Sah69	Chaâbet Ntissa	Sah1	Sol	M3	02/05/2013	Sah66	Aougrou	Sah2	Sol	M2	02/05/2013
Sah72	Chaâbet Ntissa	Sah1	Sol	M1	02/05/2013	Sah67	Aougrou	Sah2	Sol	M3	02/05/2013
Sah73	Chaâbet Ntissa	Sah1	Sol	M2	02/05/2013	Sah70	Aougrou	Sah2	Sol	M1	02/05/2013
Sah74	Chaâbet Ntissa	Sah1	Sol	M2	02/05/2013	Sah71	Aougrou	Sah2	Sol	M1	02/05/2013

prél.: prélèvement ; M : milieu de culture d'isolement ; iso. : isolement ; T : température ; * : isolée à 60 °C.

Résultats et Discussion

carbone des sédiments et donc sur leur biodiversité (Jiang *et al.*, 2006a; Dodsworth *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013; Kambura *et al.*, 2016).

Les sols sahariens ne favorisent pas la présence des communautés bactériennes en raison de la faible activité d'eau et de la pauvreté nutritive de ces environnements. C'est pourquoi on y retrouve essentiellement des formes résistantes de microorganismes telles que les bactéries xérophiles, les bactéries sporulantes et les actinomycètes en plus des levures et des moisissures (Makhalanyane *et al.*, 2015).

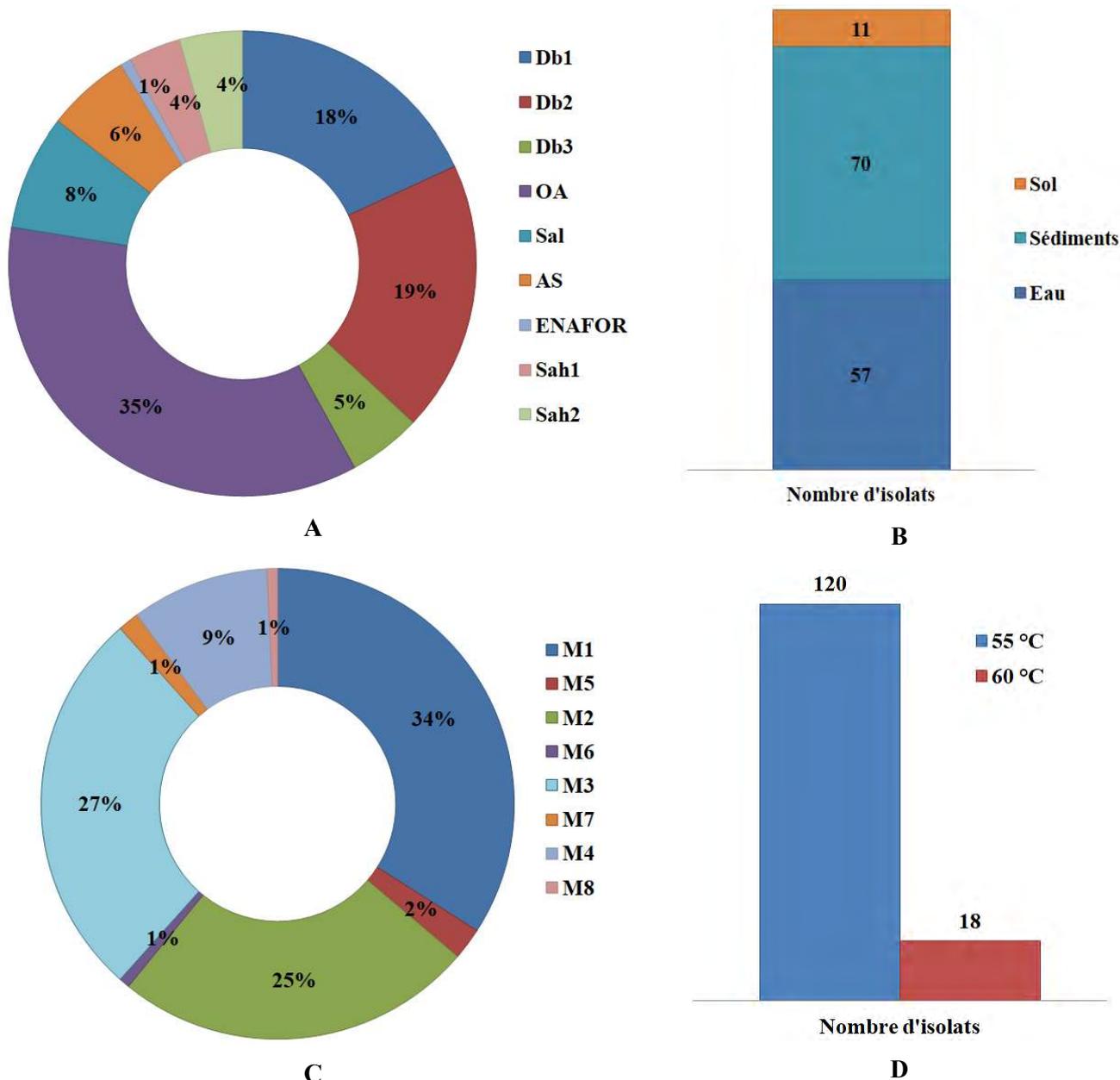


Figure 14. Distribution des cultures de l'étude selon les conditions d'isolement et l'origine des échantillons: A. Répartition par point de prélèvement ; B. Répartition par échantillon d'origine ; C. Répartition par milieu de culture d'isolement ; D. Répartition par température d'isolement.

Tableau 23. Caractères cultureux et microscopiques des isolats.

Caractères cultureux							Caractères microscopiques						
Isolat	Aspect colonies	Pigmentation	Gram	Forme cellulaire	Mode de groupement	Position des endospores	Isolat	Aspect colonies	Pigmentation	Gram	Forme cellulaire	Mode de groupement	Position des endospores
Db12	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Db25	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db17	L	Crème	-	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db26	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db18	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Db27	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db38	M	Transparente	-	Coccus	Isolé	N.O.	Db32	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db40	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db33	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db41	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	N.O.	Db34	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db42	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db37	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db46	M	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Db39	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db47	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db44	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db55	M	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db45	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db56	M	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Db49	M	Jaune	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db60	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db5	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db75	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db50	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db8	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db51	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db9	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	Terminale	Db52	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db101	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Db59	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
Db109	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db6	M	Transparente	+	Coccus	Grappe	Terminale
Db110	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db7	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db114	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db144	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	N.O.
Db115	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	N.O.	Db147	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db116	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db149	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db120	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db150	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	Subterminale
Db134	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db3	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db154	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db4	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db159	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db48	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Db1	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db151	M	Transparente	+	Coccus	Grappe	Subterminale
Db10	M	Jaune	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Db152	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db11	L	Transparente	+	Coccus	Grappe	Subterminale	Db153	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Db2	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Db53	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
OA14	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	OA108	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA15	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA111	L	Crème	-	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA16	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	OA112	L	Crème	-	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA20	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA113	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
OA21	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA117	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
OA22	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA118	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA23	M	Jaune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA119	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.

L : type lisse ; M : type muqueux ; R : type rugueux ; + : Gram positif ; - : Gram négatif ; N.O. : non observée.

Enfin, la majorité des cultures ont été isolées à 55 °C. Cette température semble être favorable à l'isolement de cultures avec une plus grande variabilité culturelle qu'à 60 °C.

2.1. Caractères morphologiques des isolats

Les caractères cultureux et microscopiques de tous les isolats de la collection ont été déterminés. Les résultats de cette caractérisation sont présentés dans le tableau 23.

2.1.1. Caractères cultureux

L'observation macroscopique des isolats sur la gélose M1 a permis de noter trois aspects différents de colonies (Figure 15) :

- colonies de type lisse (L) : ce type culturel a été observé chez 96 isolats. Il est caractérisé par des colonies de formes ombiliquées, de consistance crémeuse ou brune, translucide à opaque à la lumière, voire transparente dans le cas de l'isolat Db11. Les colonies de certains isolats sont pigmentées en jaune. Leur surface est lisse, bombée et les bords sont réguliers. Parfois envahissantes, la taille de ces colonies varie entre 1 mm et 20 mm ;
- colonies de type muqueux (M) : observé chez 40 isolats, ce type culturel présente des colonies muqueuses et bombées, translucides, voire transparentes, à bords réguliers ou ondulés. Certains isolats présentent des colonies crémeuses ou pigmentées en jaunes. Parfois envahissantes, les colonies ont un diamètre variant entre 1 mm et 10 mm ;
- colonies de type rugueux (R) : 2 souches isolées depuis la sebkha de Thamelahit présentent ce type de formation. Les colonies ont une surface rugueuse, lobée, à bords dentelés ou filamenteux, de consistance sèche, opaque à la lumière. Elles présentent un mycélium aérien abondant après 24 heures d'incubation à 55 °C, de couleur blanche poudreuse, détachable au toucher et un mycélium de substrat de la même couleur. L'observation sous une loupe binoculaire révèle des structures filamenteuses touffues. Les colonies ont un diamètre variant de 1 mm à 10 mm.

Tableau 23. Caractères cultureux et microscopiques des isolats (suite).

Isolat	Caractères cultureux		Caractères microscopiques				Isolat	Caractères cultureux		Caractères microscopiques			
	Aspect colonies	Pigmentation	Gram	Forme cellulaire	Mode de groupement	Position des endospores		Aspect colonies	Pigmentation	Gram	Forme cellulaire	Mode de groupement	Position des endospores
OA24	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA121	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA28	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	OA122	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA29	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA123	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainettes	Terminale
OA30	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	OA124	L	Crème	-	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA31	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA125	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA36	L	Jaune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA126	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	NO
OA43	M	Jaune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA127	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	N-O
OA54	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	OA128	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N-O
OA57	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	OA129	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
OA58	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA130	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminal
OA77	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	OA131	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA78	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	OA132	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA102	L	Crème	-	Bâtonnet	Isolé	N.O.	OA140	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
OA103	L	Crème	-	Bâtonnet	Isolé	N.O.	OA142	L	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	Terminale
OA104	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	OA155	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.
OA105	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	OA156	M	Transparente	+	Coccus	Isolé	N.O.
OA106	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	OA157	L	Jaune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
OA107	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Sal82	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Sal76	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Sal83	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Sal77	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Sal84	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Sal78	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Sal85	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Sal79	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Sal86	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Sal80	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Sal87	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
AS88	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	AS92	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
AS89	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	AS94	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
AS90	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	AS95	R	Blanche	+	Filamenteuse	Mycélium	Sur sporophore non ramifiée
AS91	L	Brune	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	AS96	R	Blanche	+	Filamenteuse	Mycélium	Sur sporophore non ramifiée
ENAF93	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Sah64	L	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Sah68	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Sah65	M	Crème	+	Bâtonnet	Chainette	Terminale
Sah69	M	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale	Sah66	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Sah72	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale	Sah67	M	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale
Sah73	M	Transparente	+	Bâtonnet	Isolé	N.O.	Sah70	M	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Subterminale
Sah74	M	Transparente	+	Bâtonnet	Chainette	Subterminale	Sah71	M	Crème	+	Bâtonnet	Isolé	Terminale

L : type lisse ; M : type muqueux ; R : type rugueux ; +: Gram positif ; -: Gram négatif ; N.O. : non observée.

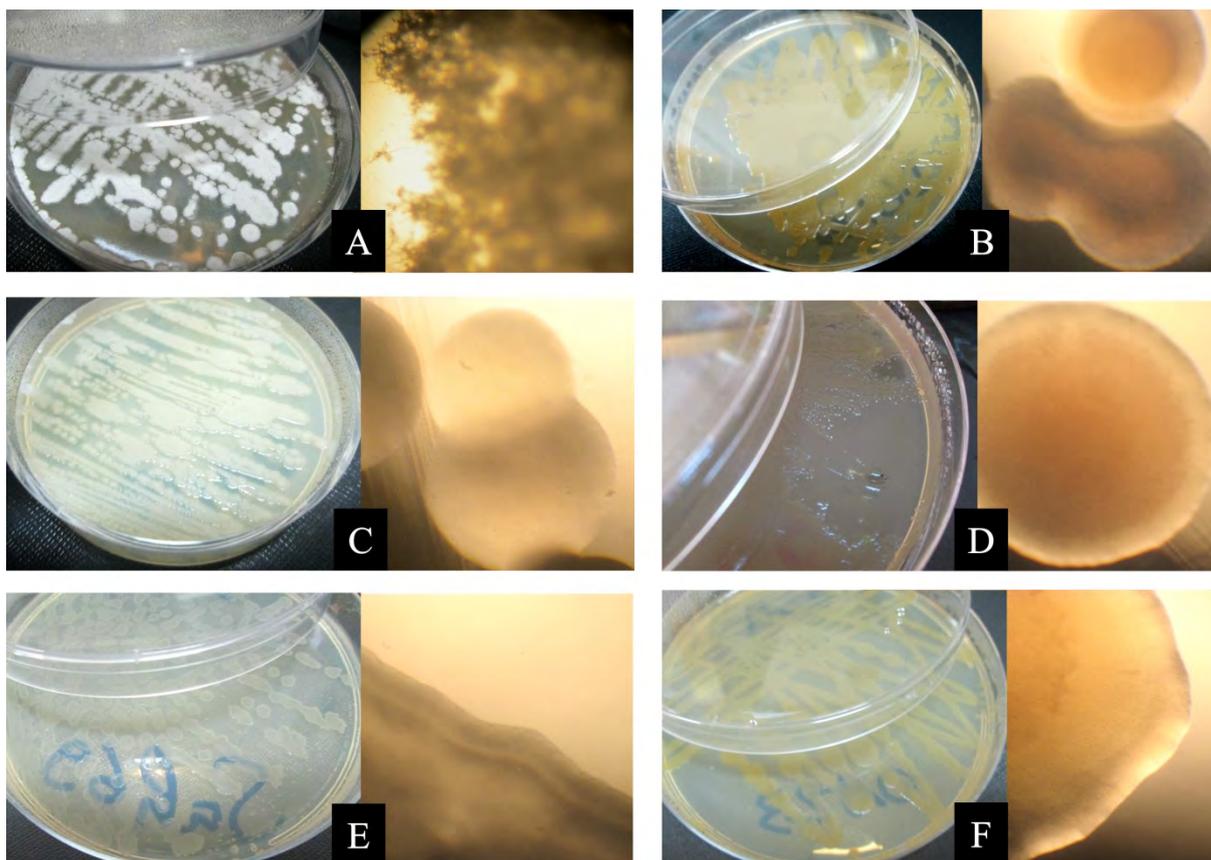


Figure 15. Aspect cultural à l'œil nu (à gauche) et sous agrandissement 10x (à droite) de quelques isolats de l'étude. Type R: A. AS95. Type L: B. Db120; C. OA117; D. Sal85. Type M: E. Sah69 ; F. OA23.

2.1.2. Caractères microscopiques

L'observation microscopique a permis de déterminer quelques caractères morphologiques des cellules bactériennes après colorations différentielles de Gram et de Schaeffer et Fulton (Figure 16).

❖ Souches à Gram positif

La coloration de Gram, effectuée sur des cultures jeunes cultivées sur gélose M1, a révélé que 131 souches sont à Gram positif. Les formes cellulaires observées sous microscopie photonique sont les suivantes :

- des bâtonnets de tailles variables qui sont soit isolés soit regroupés en chaînettes selon les isolats. L'observation de la présence d'endospores sur les cultures âgées de ces isolats a permis de révéler sa présence dans 96 cas. Ces endospores étaient déformantes ou non déformantes, présentes dans les cellules en position terminale ou subterminale.

Ce type cellulaire a été observé avec les souches formant des colonies de types L ou M. Ces caractères morphologiques sont caractéristiques, entre autres, des bacilles aérobies de l'ordre des *Bacillales* (De Vos, 2015) ;

Résultats et Discussion

- des cocci avec un mode de formation en grappe (3 isolats) ou isolé (2 isolats) ;
- l'observation microscopique des mycéliums aériens des 2 souches de type R a révélé des structures filamenteuses non arborescentes, avec présence de sporophores non ramifiées. L'observation des structures cellulaires de l'isolat AS95 par cryomicroscopie électronique a confirmé ce constat (Figure 17). L'aspect morphologique de ces deux souches correspond aux caractères morphologiques décrits pour les espèces appartenant à la famille des *Thermoactinomycetaceae*, retrouvées dans des environnements chauds et tempérés (Goodfellow et Jones, 2015a).

❖ Souches à Gram négatif

Sept isolats sont à Gram négatif qui se présentent sous forme de bâtonnets isolés.

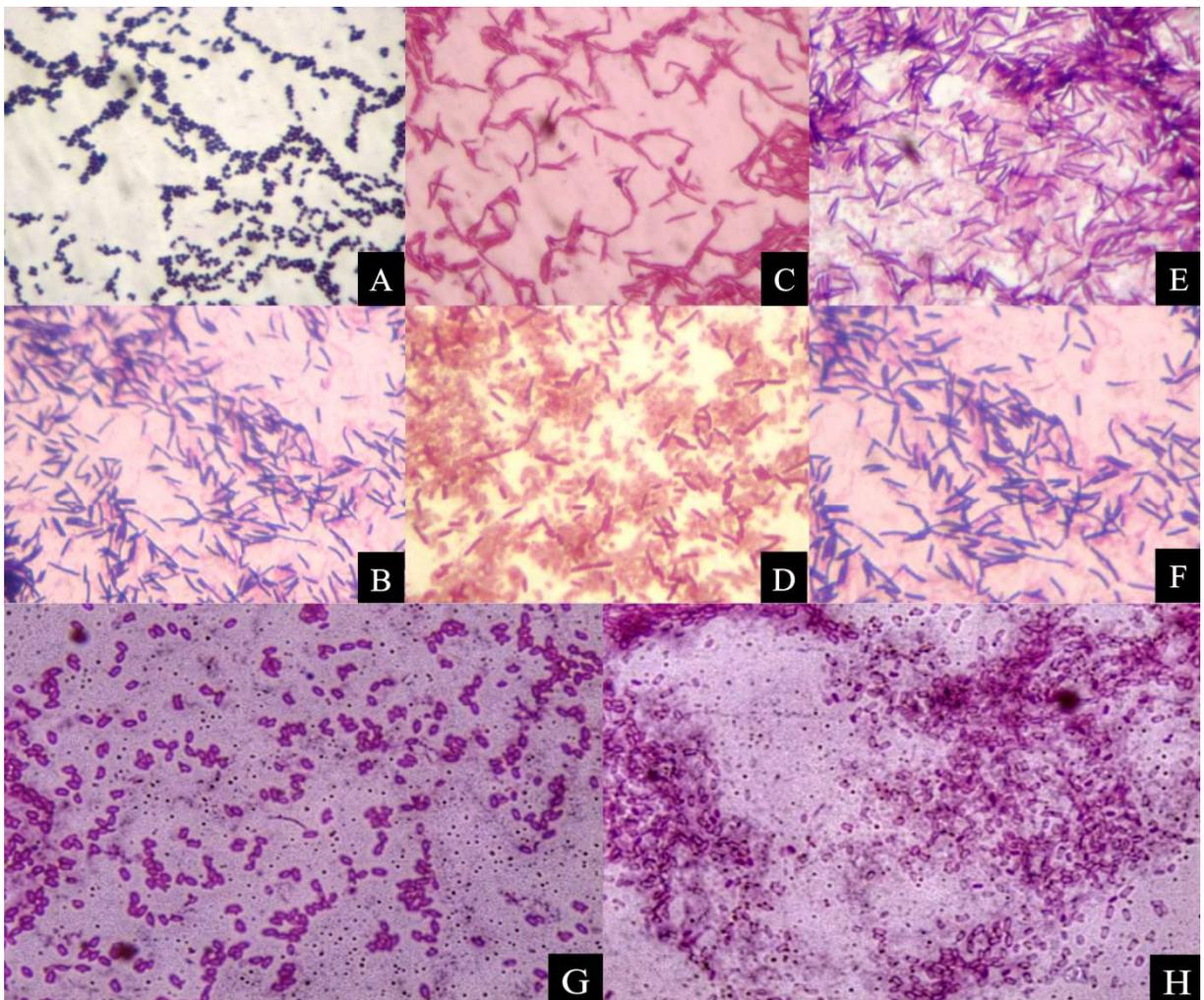


Figure 16. Aspect microscopique de quelques isolats de l'étude sous agrandissement 1000x après coloration de Gram. À: Db6 ; B: ENAF93 ; C: OA123 ; D: OA103 ; E: Db25 ; F: Sah70 (images prises sous un microscope Motic 18-28); G: OA30 ; H: Sah69 (images prises avec un microscope Leica DM 1000 LED).

Tableau 24. Résultats du screening des activités protéolytiques des isolats de l'étude.

Isolat	Caséinases	Gélatinases	Isolat	Caséinases	Gélatinases	Isolat	Caséinases	Gélatinases	Isolat	Caséinases	Gélatinases
Db12	-	-	OA23	-	+	Db26	-	-	OA121	+	-
Db17	-	-	OA24	-	-	Db27	+	+	OA122	+	-
Db18	-	-	OA28	+	-	Db32	+	-	OA123	+	-
Db38	-	-	OA29	+	-	Db33	+	+	OA124	-	+
Db40	-	-	OA30	+	+	Db34	-	-	OA125	+	-
Db41	-	-	OA31	-	+	Db37	-	-	OA126	+	-
Db42	-	-	OA36	-	-	Db39	-	-	OA127	-	+
Db46	-	-	OA43	-	-	Db44	-	-	OA128	+	-
Db47	-	-	OA54	-	-	Db45	-	-	OA129	+	-
Db55	-	-	OA57	-	-	Db49	-	-	OA130	+	+
Db56	-	-	OA58	-	-	Db5	-	-	OA131	-	+
Db60	-	-	OA77	-	-	Db50	-	-	OA132	+	+
Db75	-	-	OA78	-	-	Db51	-	-	OA140	-	+
Db8	-	-	OA102	+	+	Db52	-	-	OA142	-	-
Db9	-	-	OA103	+	+	Db59	-	+	OA155	-	-
Db101	-	+	OA104	+	+	Db6	-	-	OA156	-	-
Db109	+	-	OA105	+	-	Db7	-	-	OA157	-	-
Db110	+	-	OA106	-	+	Db144	-	-	Sal82	-	-
Db114	+	-	OA107	+	-	Db147	-	-	Sal83	-	-
Db115	+	-	Sal76	-	-	Db149	-	-	Sal84	-	-
Db116	-	+	Sal77	-	-	Db150	-	-	Sal85	-	-
Db120	+	-	Sal78	-	-	Db3	-	-	Sal86	-	-
Db134	+	-	Sal79	-	-	Db4	-	-	Sal87	-	-
Db154	-	-	Sal80	-	-	Db48	-	-	AS92	-	-
Db159	+	-	AS88	-	+	Db151	-	-	AS94	-	-
Db1	-	-	AS89	+	-	Db152	-	-	AS95	-	+
Db10	-	-	AS90	+	-	Db153	-	-	AS96	-	-
Db11	-	-	AS91	-	+	Db53	-	-	Sah64	-	-
Db2	-	-	ENAF93	+	-	OA108	-	+	Sah65	-	-
OA14	-	-	Sah68	-	-	OA111	+	+	Sah66	-	+
OA15	-	-	Sah69	+	+	OA112	+	-	Sah67	-	-
OA16	-	-	Sah72	-	-	OA113	+	-	Sah70	-	-
OA20	-	-	Sah73	-	-	OA117	-	+	Sah71	-	-
OA21	+	+	Sah74	-	-	OA118	-	+			
OA22	-	-	Db25	+	-	OA119	+	-			

+ : présence de l'activité ; - : absence de l'activité. Les isolats mentionnés en **gras** ont été utilisés pour la caractérisation moléculaire.

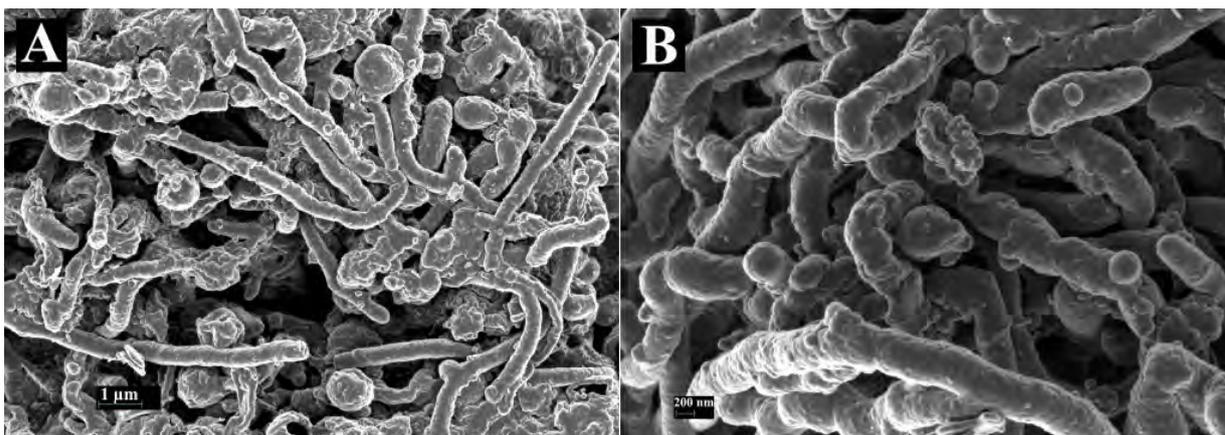


Figure 17. Photomicrographies sur des sections de la souche AS95 par Cryo-MEB. A : Barre 1 µm ; B : Barre 200 nm.

2.2. Activités protéolytiques extracellulaires des isolats

Les résultats du screening des activités protéolytiques extracellulaires sur milieux de culture gélosés additionnés de caséine ou de gélatine sont présentés dans le tableau 24. Sur les 138 isolats, 53 ont montré une activité hydrolytique envers au moins un des substrats testés. La caséine a été la plus dégradée avec 37 résultats positifs, alors que la gélatine a été dégradée par 26 isolats avec la présence des deux activités caséinolytique et gélatinolytique chez 9 de ces isolats.

Ces activités ont été les plus observées chez des isolats issus de Ouled Ali (31 souches). 26 des isolats possédant une activité protéolytique extracellulaire ont été obtenus à partir d'échantillons d'eau, contre 24 issus des sédiments et 2 issus des sols sahariens. La température relativement basse en comparaison avec les autres sources thermales et la nature du milieu d'origine semblent avoir une influence sur la capacité des isolats à dégrader ces polymères. Ce qui pourrait être expliqué par l'abondance de la matière organique dans cet environnement favorable au développement d'une plus grande diversité d'organismes vivants (Georges, 2010; Lee *et al.*, 2010).

Les 53 isolats possédant une activité protéolytique extracellulaire ont donc été sélectionnés pour la suite de ce travail. Leur liste est indiquée dans le tableau 24.

3. Caractérisation moléculaire des isolats par analyse des gènes de l'ARNr 16S

3.1. Amplification des gènes de l'ARNr 16S

L'ADN des 53 isolats a été extrait et le gène de l'ARNr 16S mesurant environ 1500 pb a été amplifié par PCR (Weisburg *et al.*, 1991). Afin de vérifier la réussite de la réaction, la présence de bandes électrophorétiques correspondant à la taille du gène est visualisée en faisant migrer des échantillons des amplicons produits sur un gel d'agarose à 1% (p/v) comme le montre la figure 18.

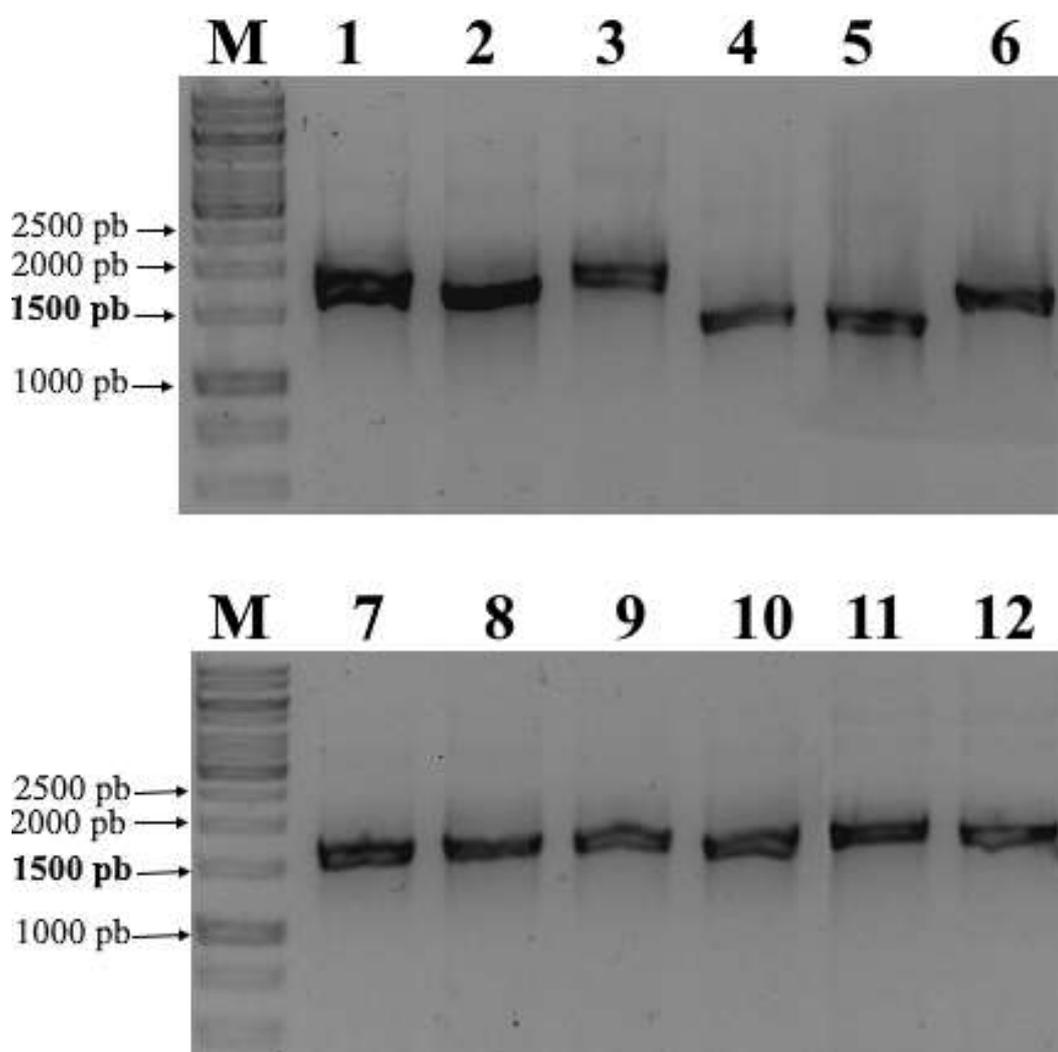


Figure 18. Produits d'amplification PCR du gène d'ARNr 16S de quelques isolats sur gel d'agarose à 1,5 % (p/v). Puits M: marqueur moléculaire Gene Ruler 1 kb ; puits 1 à 12 ; 1: OA28 ; 2: Db32 ; 3: OA23 ; 4: OA21 ; 5: OA30 ; 6: ENAF93 ; 7: Db59 ; 8: Db27 ; 9: Db25 ; 10: Db33 ; 11: OA31 ; 12: Sah69.

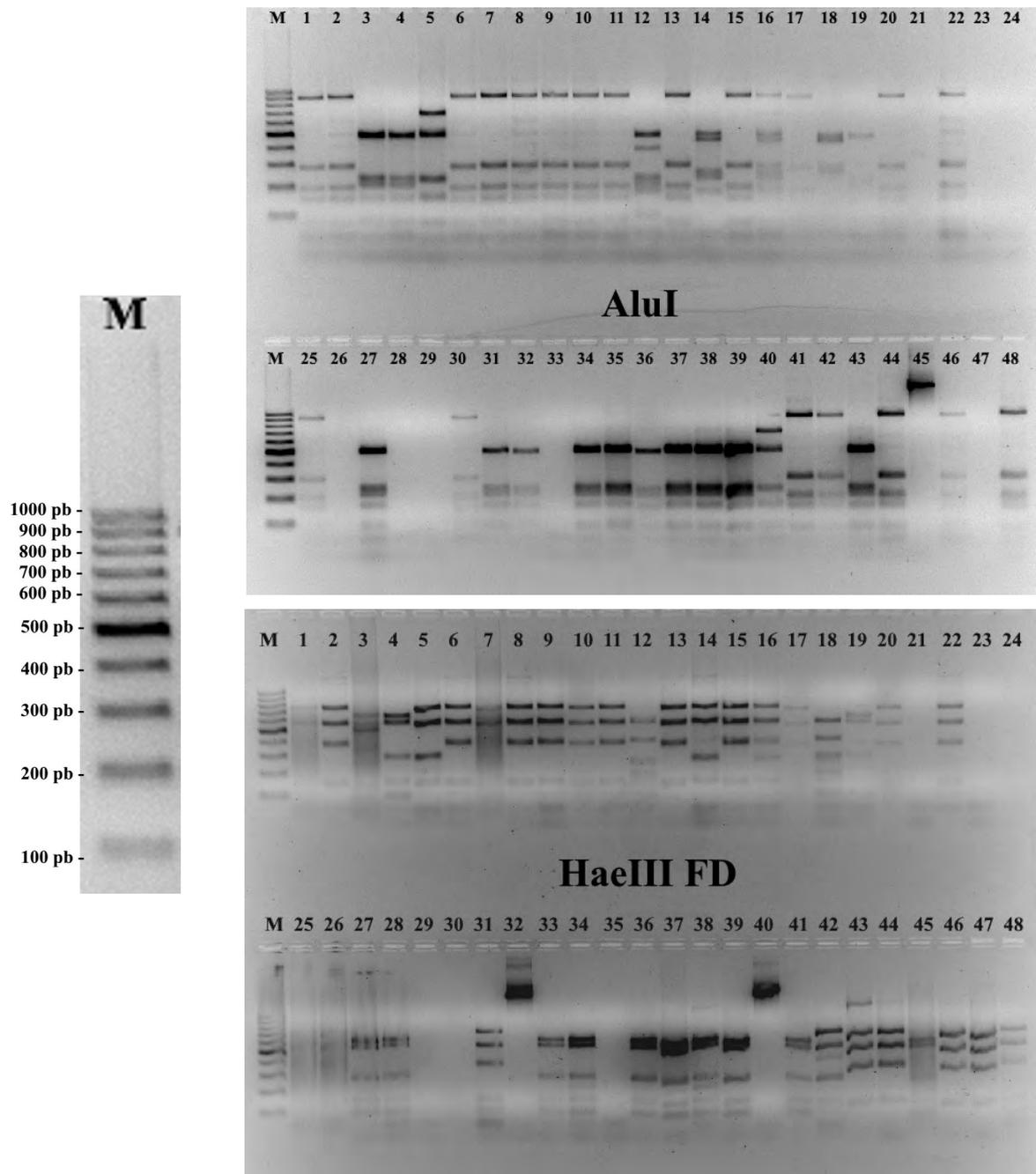


Figure 19. Profils de restriction après digestion par AluI et HaeIII FD des amplicons du gène de l'ARNr 16S de 48 isolats sur gel d'agarose à 2,5 % (p/v).

Puits M: marqueur moléculaire Gene Ruler 100 pb ; puits 1 à 48 : 1: OA28; 2: Db32; 3: OA23; 4: OA21; 5: OA30; 6: ENAF93; 7: Db59; 8: Db27; 9: Db25; 10: Db33; 11: OA31; 12: Sah69; 13: Sah66; 14: AS88; 15: AS89; 16: AS90; 17: AS91; 18: AS95; 19: Db101; 20: OA102; 21: OA103; 22: OA104; 23: OA105; 24: OA106; 25: OA107; 26: OA108; 27: Db109; 28: Db110; 29: OA111; 30: OA112; 31: OA113; 32: Db114; 33: Db115; 34: Db116; 35: OA117; 36: OA118; 37: OA119; 38: Db120; 39: OA121; 40: OA122; 41: OA123; 42: OA124; 43: OA125; 44: OA126; 45: OA127; 46: OA128; 47: OA129; 48: OA130.

3.2. Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié

Afin d'éviter le séquençage d'ADN appartenant à des clones et d'étudier la variabilité du polymorphisme du gène de l'ARNr 16S, les produits de PCR ont été digérés avec deux enzymes de restriction, AluI et HaeIII FD. Ces deux endonucléases sont souvent utilisées dans l'analyse ARDRA des gènes issus de bactéries aérobies formant-endospores (McMullan *et al.*, 2004; Kuisiene *et al.*, 2007; Cihan *et al.*, 2012). En effet, elles permettent d'obtenir un nombre de fragments de restriction élevé (Blanc *et al.*, 1997).

Les résultats de la digestion des amplicons des 53 isolats ont été observés après migration dans un gel d'agarose à 2,5% (p/v). Un exemple de gel est présenté dans la figure 19.

Au total, 23 différentes bandes électrophorétiques avec une taille comprise entre 100 et 1000 pb ont été observées chez les amplicons des isolats après digestion par les deux enzymes de restriction.

La présence et l'absence de chaque bande ont été traduites en code binaire 1/0 (voir tableau 25-Annexe 2) et la variabilité des profils de digestion chez les isolats a été analysée par le calcul du coefficient de similarité SM. Le dendrogramme construit avec la méthode UPGMA à partir de la matrice de similarité résultante est présenté en figure 20.

Tous les amplicons ont été digérés par au moins une des enzymes de restriction. Sur la base de leurs profils de restriction, l'analyse a permis de diviser les isolats en 5 groupes composés de 34 clusters à un taux de similarité de 72% (groupe V), 80% (groupes II et III), 85% (groupe IV) et 92% (groupe I). Avec la souche de type actinomycétal AS95 qui se positionne en groupe externe.

Les résultats ont été comparés avec les caractères phénotypiques des isolats de sorte à choisir au sein du même groupe ARDRA des représentants de chaque profil de restriction. Suite à quoi 28 souches bactériennes ont été sélectionnées pour la suite de l'étude. La liste de ces souches est indiquée en gras dans la figure 20.

L'analyse ARDRA peut constituer un outil intéressant pour la prospection et l'identification de nouvelles souches de bactéries thermophiles aérobies formant-endospores. L'application de cette technique dans des études s'intéressant à la variabilité génétique des bacilles a révélé sa capacité à déceler rapidement des liens phylogénétiques au niveau des espèces. Cependant, elle présente un taux d'erreur significatif à l'échelle des genres (Kumar *et al.*, 2014; Tiwari et Thakur, 2014; Jain *et al.*, 2017). La diversité de ces groupes taxonomiques peut être très faible au niveau des sources chaudes et l'ARDRA pourrait aider à éliminer des clones redondants au cours du processus de bioprospection (Blanc *et al.*, 1997; Brock, 2012).

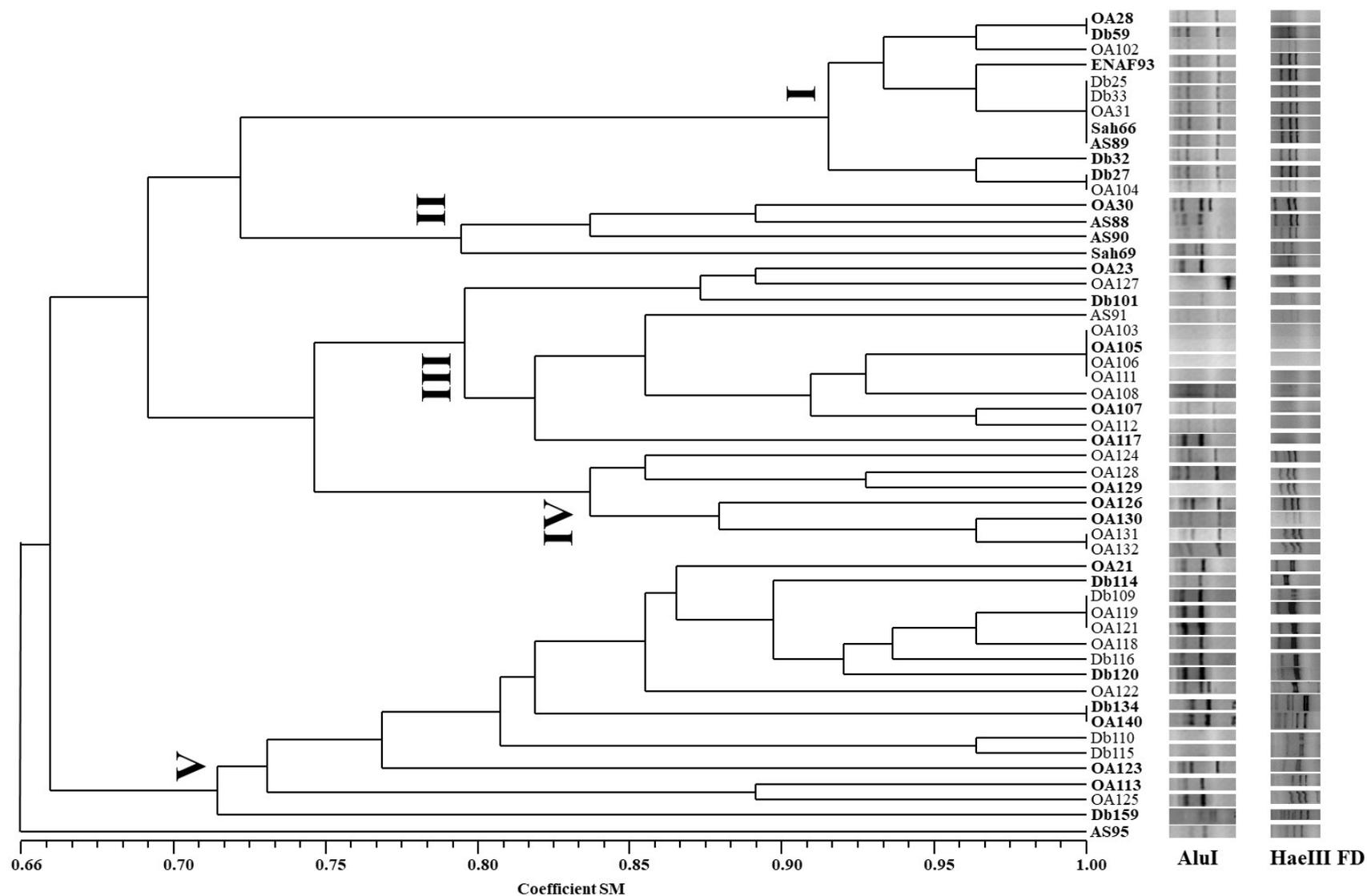


Figure 20. Dendrogramme basé sur l'analyse ARDRA des profils de restrictions par AluI et HaeIII FD des amplicons des 53 isolats répartis en 5 groupes ; I à V. Les isolats indiqués en **gras** ont été sélectionnés pour le séquençage de leurs gènes ARNr 16S.

Tableau 26. Résultats des alignements des séquences des gènes de l'ARNr 16S des souches de l'étude avec les banques ENA/Genbank/DBJ et EzBioCloud (version 10-2018).

Souche	NA	Taille séquence (pb)	Résultat le plus proche sur ENA/Genbank/DBJ	NA	% sim.	% de couv.	Résultat le plus proche sur EzBioCloud	NA	% sim.	% de couv.
AS95	KU942442	1539	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> VTT E-062992	EU430570	100	98	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> KCTC 9076 ^T	AF138739	100	100
OA28	MF136820	1393	<i>Bacillus licheniformis</i> 14ADL4	CP026673	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
Db32	MF136821	1391	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
OA23	MF136822	1287	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	98	100
OA21	MF136823	1486	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100
OA30	MF136824	1489	<i>Brevibacillus thermoruber</i> DSM 7064 ^T	NR112213	99	99	<i>Brevibacillus thermoruber</i> DSM 7064 ^T	Z26921	99	100
Db59	MF136825	1520	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
Db27	MF136826	1375	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
Db101	MF136827	1439	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G ^T	CP012152	99	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	100	100
OA105	MF136828	1378	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
OA107	MF136829	1411	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	CP000002.3	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
OA113	MF136830	1382	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	96	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234 ^T	AYTN01000016	97	100
Db114	MF136831	1366	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100
OA117	MF136832	1409	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> subsp. <i>yunnanensis</i> E13 ^T	NR117774	99	100	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> subsp. <i>yunnanensis</i> E13 ^T	AVGH01000041	99	100
Db120	MF136833	1361	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100
OA123	MF136834	1247	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100
OA126	MF136835	1378	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
OA129	MF136836	1381	<i>Bacillus licheniformis</i> P4	KY886240	98	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	98	100
OA130	MF136837	1535	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
Db134	MF136838	1423	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i> DSM 22626 ^T	LT835102	99	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100
OA140	MF136839	1358	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Lhs-17	MH368151	99	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	CP012152	99	100
Db159	MF136840	1371	<i>Geobacillus kaustophilus</i> WSUCF-020D	MF965142	99	97	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> KCTC 3570 ^T	CP014335	98	100
ENAF93	MH397347	1414	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	98	100	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99	100
Sah69	MH397348	1344	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> BGSC 9A20 ^T	NR115284.2	99	100	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NBRC 12550 ^T	AB271757	98	100
Sah66	MH397349	1401	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	KX785171	99	94	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	95	100
AS88	MH397350	1420	<i>Brevibacillus agri</i> DSM 6348 ^T	NR040983	98	100	<i>Brevibacillus agri</i> NRRL NRS-1219 ^T	D78454	97	96
AS89	MH397351	1405	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	CP000002.3	95	99	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	96	100
AS90	MH397352	1348	<i>Brevibacillus agri</i> NBRC 15538 ^T	NR113767	96	100	<i>Brevibacillus formosus</i> DSM 9885 ^T	LDCN01000015	95	100

NA: numéro d'accèsion ; pb : paires de bases ; sim.: similarité ; couv.: couverture ; ENA : European Nucleotide Archive ; DBJ : DNA Data Bank of Japan ; DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ; ATCC : American Type Culture Collection ; BGSC : Bacillus Genetic Stock Center ; NBRC : Biological Resource Center, NITE (National Institute of Technology and Evaluation) ; KCTC: Korean Collection for Type Cultures ; T : souche type.

3.3. Séquençage et analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S

Les amplicons des 28 souches retenues ont été purifiés puis séquencés. Les séquences obtenues ont des tailles allant de 1200 pb à 1500 pb et ont été déposées sur les banques ENA/Genbank/DDBJ.

3.3.1. Alignement avec les séquences nucléotidiques des banques de données biologiques

Les résultats de l'alignement des 28 séquences des gènes codant l'ARNr 16S avec les banques de données biologiques ENA/Genbank/DDBJ version 31-10-2018, et EzBioCloud version 22-10-2018 incluant tous les taxa validés et publiés par l'IJSEM (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*) avant le 2 octobre 2018, sont présentés dans le tableau 26.

Le résultat le plus proche de l'alignement avec ENA/Genbank/DDBJ représente la souche cultivée ayant le pourcentage de similarité le plus élevé avec la séquence requête, alors que le résultat sur EzBioCloud indique la souche type de l'espèce décrite ayant le maximum de similarité.

Pour la majorité des souches, les résultats des alignements contre les deux banques ont donné les mêmes espèces. Ces résultats ont indiqué des taux d'identités allant de 95% à 100% entre nos souches et celles des banques des données biologiques. Les taux de couverture des séquences requêtes par les alignements sont supérieurs à 94% ce qui reflète une bonne qualité des séquences obtenues (Benson *et al.*, 2018).

Le nombre de souches répertoriées et décrites correspondant à nos souches est relativement bas. Ces isolats sont affiliés aux espèces bactériennes suivantes : *Anoxybacillus flavithermus* (Pikuta *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2011), *Anoxybacillus gonensis* (Belduz *et al.*, 2003), *Anoxybacillus salavatliensis* (Cihan *et al.*, 2011), *Bacillus licheniformis* (Weigmann, 1898), *Bacillus sonorensis* (Palmisano *et al.*, 2001), *Brevibacillus agri* (Laubach, 1916; Shida *et al.*, 1996), *Brevibacillus formosus* (Heigener, 1935; Shida *et al.*, 1996), *Brevibacillus thermoruber* (Manachini *et al.*, 1985a; Shida *et al.*, 1996), *Geobacillus kaustophilus* (Priest *et al.*, 1988; Nazina *et al.*, 2001), *Geobacillus stearothermophilus* (Donk, 1920; Nazina *et al.*, 2001), *Geobacillus thermoleovorans* (Nazina *et al.*, 2001) et *Thermoactinomyces vulgaris* (Tsilinsky, 1899). Toutes ces espèces sont décrites comme thermophiles, aérobies, formant-endospores et appartenant à des groupes taxonomiques liés au genre *Bacillus*. Elles ont été isolées à partir d'environnements chauds et tempérés très variables : sols tempérés et désertiques, sédiments, sources thermales, eau de mer, déchets agricoles, etc.

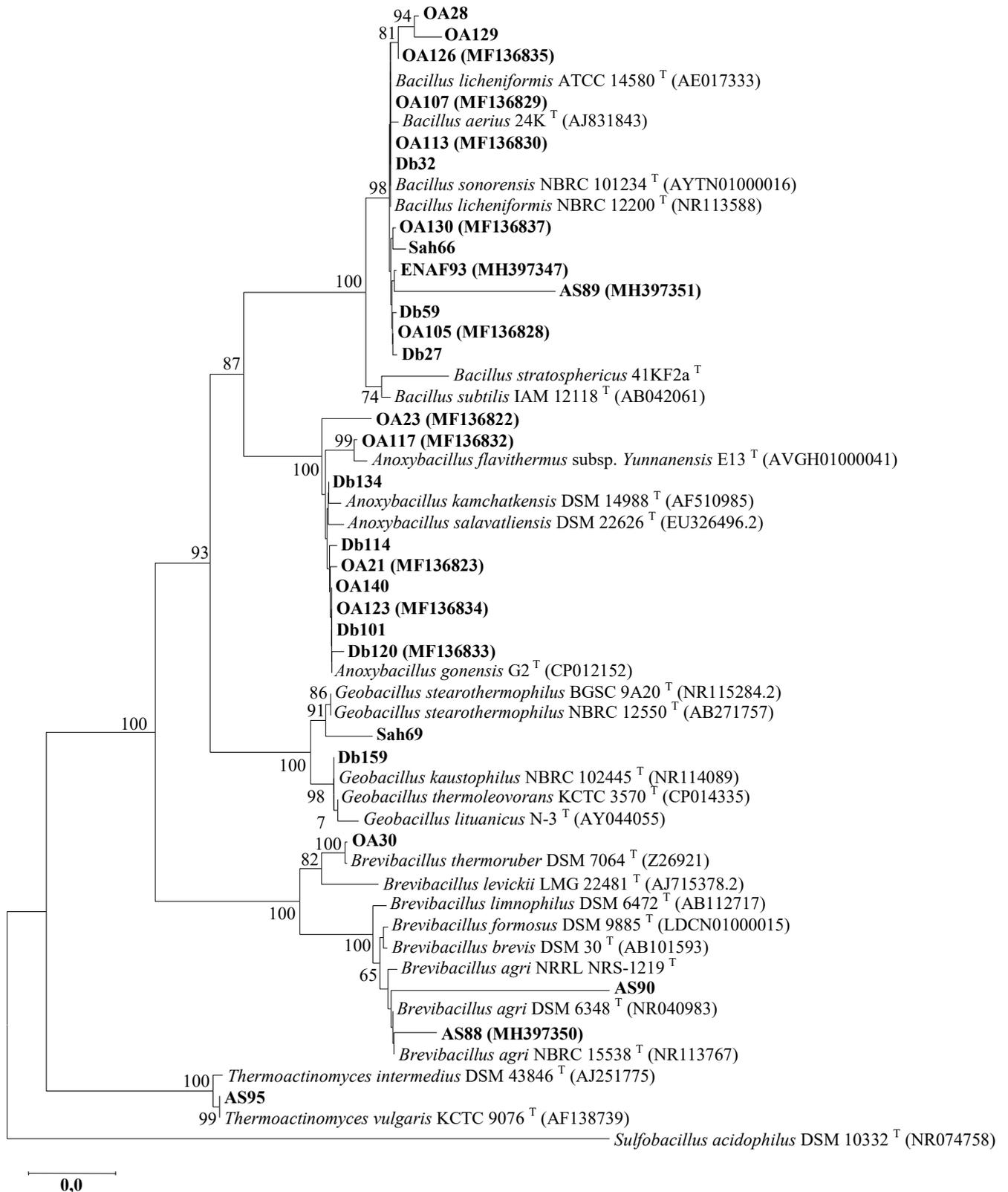


Figure 21. Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des 28 souches de l'étude (marquées en **gras**) et de 26 souches types proches. Les numéros d'accèsion des séquences sur ENA/Genbank/DDBJ sont notés entre parenthèses. Les valeurs du bootstrap supérieures à 60% sont montrées sur les nœuds correspondants.

Ces espèces incluent des souches ayant été décrites pour leur capacité à dégrader la caséine et/ou la gélatine et à produire des protéases extracellulaires de différents types et de fonctions diverses (Kleine, 1982; Manachini *et al.*, 1988; Ferrero *et al.*, 1996; Iqbal *et al.*, 2015; Logan et Vos, 2015c; Logan et Vos, 2015b; Logan *et al.*, 2015; Pikuta, 2015).

3.3.2. Liens phylogénétiques

L'analyse phylogénétique des liens de parenté entre les souches de l'étude et les souches types des espèces les plus proches d'après les résultats citées en 3.2.1 sont montrées dans la figure 21.

Cette analyse est basée sur la distance évolutive calculée sur la base du modèle de vraisemblance maximum composite corrigeant la distance observée entre les séquences du gène de l'ARNr 16S des UTO de la sélection. Toutes les positions avec des insertions-délétions ont été éliminées des séquences et au final, 1100 positions ont été prises en considération. L'arbre a été construit par la méthode du *Neighbor Joining* et vérifié par le test du *Bootstrap*. La souche *Sulfobacillus acidophilus* DSM 10332^T est utilisée comme groupe externe.

Les 28 souches sont affiliées à des genres appartenant à 3 familles de l'ordre des *Bacillales* (De Vos, 2015): les *Bacillaceae* (Logan et Vos, 2015c), les *Paenibacillaceae* (De Vos *et al.*, 2015) et les *Thermoactinomycetaceae* (Goodfellow et Jones, 2015a). Ces souches sont liées essentiellement à 5 genres : *Bacillus*, *Anoxybacillus* et *Geobacillus* (*Bacillaceae*), *Brevibacillus* (*Paenibacillaceae*), et *Thermoactinomyces* (*Thermoactinomycetaceae*) avec une prédominance de *Bacillus* (13 souches) et d'*Anoxybacillus* (9 souches). Ces deux genres ont été les plus isolés à partir des sources thermales de Guelma. La fiabilité élevée des valeurs du test du *Bootstrap* (> 95% au niveau des nœuds représentant le genre) permet de valider ce résultat. En comparaison, l'étude de la diversité culturelle en espèces de *Bacilli* au niveau des eaux de la source thermale de Debagh, réalisée par Arab *et al.* (2018) a noté la présence de souches appartenant à 4 genres : *Aeribacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus* et *Hydrogenophilus*.

Les espèces thermophiles de bactéries aérobies formant-endospores ont la capacité de coloniser des écosystèmes très divers. En effet, leurs besoins relativement restreints en nutriments, leur thermophilie et leur capacité à produire des spores très résistantes à plusieurs facteurs physico-chimiques de l'environnement leur permettent de se développer dans différentes niches écologiques chaudes et d'être présentes dans des biotopes tempérés (Logan et Halket, 2011; Müller *et al.*, 2014).

Ainsi, de nombreuses études ont rapporté l'isolement de représentants d'espèces thermophiles sporulantes de *Bacillales* par méthodes culturales à partir d'environnements très variés et géographiquement distincts (Mehta et Satyanarayana, 2013). Par exemple, des représentants de plusieurs espèces de *Geobacillus*, de *Anoxybacillus*, de *Bacillus*, de *Brevibacillus* et de *Thermoactinomyces* ont été isolés de sources géothermales en Arménie (Panosyan, 2017), en Bulgarie (Derekova *et al.*, 2008a; Kambourova, 2018); en Chine (Song *et al.*, 2013), au Maroc (Aanniz *et al.*, 2015), en Tunisie (Sayeh *et al.*, 2010), en Turquie (Adiguzel *et al.*, 2009) et en Russie (Foti *et al.*, 2008). Ils ont également été isolés à partir de sols désertiques, salins et tempérés, en Argentine (Cavello *et al.*, 2018), en Chine (Wang *et al.*, 2006), en Érythrée (Ghilamical *et al.*, 2018), aux États-Unis d'Amérique (Powell *et al.*, 2015), au Kuwait (Sorkhoh *et al.*, 1993) et en Égypte (Soliman *et al.*, 2007).

Les bactéries formant-endospores proviennent également d'échantillons d'eau et de sédiments prélevés à partir de réservoirs pétroliers en Allemagne (Yakimov *et al.*, 1995), au Brésil (Da Cunha *et al.*, 2006), et en Chine (Nazina *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2011).

Cependant, la difficulté rencontrée dans l'isolement de certains groupes taxonomiques expliquerait l'abondance de certains genres isolés par méthodes culturales aux dépens d'autres. La modification des conditions d'isolement peut augmenter les chances d'avoir une plus grande variabilité culturale. Ces conditions peuvent être notamment le remplacement de l'agar-agar par d'autres agents gélifiants plus résistants tels que la Gelrite et la nanofibre de cellulose, mais également l'emploi de gamme variée de nutriments, de pH, de temps et de températures d'incubation (Techtmann *et al.*, 2009; Tsudome *et al.*, 2009).

Toutefois, l'impossibilité de cultiver beaucoup d'espèces thermophiles peut être liée à d'autres facteurs : des taux de croissance naturellement très lents, une inhibition par les substances antimicrobiennes d'autres cellules de la population, ou par manque de détection de quorum ou d'interactions bénéfiques et de signaux communautaires au sein de la même population (Vartoukian *et al.*, 2010; Pham et Kim, 2012; Stewart, 2012).

Les 28 souches ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique plus poussée avant que leurs activités protéolytiques ne soient étudiées. Deux de ces souches ont également été sélectionnées pour une caractérisation moléculaire détaillée de la totalité de leurs génomes.

4. Caractérisation des génomes

Deux souches thermophiles strictes appartenant à des genres ayant déjà été décrits pour leur capacité à produire des protéases extracellulaires ont été sélectionnées pour le séquençage et la caractérisation de leurs génomes. Il s'agissait de *Geobacillus* sp. Sah69 et de *Thermoactinomyces* sp. AS95. Une présentation générale des deux projets de séquençage est donnée en tableau 27.

Tableau 27. Informations générales sur les projets de séquençage des génomes de *Geobacillus* sp. Sah69 et de *Thermoactinomyces* sp. AS95.

Propriété	Description	
	<i>Geobacillus</i> sp. Sah69	<i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95
Qualité finale	Séquences génomiques brouillonnes “Draft” de haute qualité	
Bibliothèques utilisées	Séquences appariées 300 pb	
Plateforme de séquençage	Illumina Miseq	
Facteur de couverture	20x	40x
Outil d'assemblage	NGen version juillet 2015	SPAdes 3.5.0
Méthode d'annotation des gènes	Pipeline d'annotation des génomes procaryotes NCBI	
NA Genbank	LLKS01000000	LSVF00000000
Date de publication sur Genbank	24/12/2015	04/04/2016
NA BIOPROJECT	PRJNA298658	PRJNA312744
NA GOLD	Go0118976	Gs0118400
NA IMG/M	2645727548	2667527709

NA: numéro d'accèsion ; pb : paires de base ; GOLD: *Genomes OnLine Database* ; NCBI: *National Center for Biotechnology Information* ; IMG/M : *Integrated Microbial Genomes and Microbiomes*.

4.1. Souche *Geobacillus* sp. Sah69

Le génome de la souche *Geobacillus* sp. Sah69 est composé de 2991498 paires de bases avec 52,59% en contenu G+C et comprend 73 séquences contigs (Tableau 28).

Il contient un total de 3159 gènes, dont 2781 codent pour des protéines, 272 pseudogènes et 126 gènes exprimant de l'ARN non codant. Plus de 57% des gènes codant des protéines ont été assignés à des fonctions putatives et 78,95% des gènes appartiennent à une des familles des protéines classées dans la banque de données Pfam. La distribution des gènes sur les catégories fonctionnelles de la banque COGs est présentée dans le tableau 29, où 22% des gènes CDS codent pour des protéines contenant des hélices transmembranaires, ce qui pourrait indiquer une localisation extracellulaire de ces protéines (Reeb *et al.*, 2015).

Résultats et Discussion

Environ 3% des protéines contiendraient un peptide signal N terminal, indiquant qu'elles peuvent intégrer une voie de sécrétion extracellulaire (von Heijne, 1990).

Tableau 28. Statistiques relatives au génome de la souche *Geobacillus* sp. Sah69.

Attribut	Valeur	% du Total*
Taille du génome	2991498 pb	100,00
Région codante de l'ADN	2564078 pb	85,71
Contenu en G+C	1573316 pb	52,59
Contigs	73	/
Gènes totaux	3159	100,00
Gènes codant pour des protéines	2781	96,20
Gènes à ARN non codant :	126	3,80
ARNr	29	0,87
ARNt	79	2,38
Autres ARN	18	0,54
Pseudogènes	272	8,61
Gènes en cluster internes	672	20,27
Gènes avec fonctions prédites	2068	77,05
Gènes avec domaines Pfam	2618	78,95
Gènes répertoriés dans KEGG pathways	921	27,77
Gènes assignés à des COGs	1916	57,78
Gènes avec peptides de signal	95	2,86
Gènes avec hélices transmembranaires	732	22,07
Répétitions CRISPR	1	ND

*: Calcul du pourcentage total est basé soit sur la taille du génome en paires de bases ou sur le nombre total de gènes codants dans le génome annoté.

ND: Non déterminé; COG: *Clusters of Orthologous Groups*; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Pfam: *Protein family*; CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; pb: paire de bases; G: guanine; C: cytosine; /: absence.

L'annotation du génome de *Geobacillus* sp. Sah69 contre la banque KEGG Pathway montre que 27% des gènes CDS appartiennent à une des catégories de la banque. L'annotation révèle un métabolisme aérobie, avec la capacité de réduire le nitrate. Le métabolisme est prototrophe pour les acides aminés : L-alanine, L-aspartate, L-glutamate, glycine, L-asparagine, L-cystéine, L-glutamine et L-méthionine. Il est auxotrophe pour les acides aminés : L-Lysine, L-

Résultats et Discussion

phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-histidine, L-leucine et L-sérine. La souche possède les voies métaboliques pour l'utilisation du glucose, du fructose et du saccharose.

Tableau 29. Répartition des gènes du génome de *Geobacillus* sp. Sah69 sur les catégories fonctionnelles de la banque de données COG.

Code	Valeur	% du Total*	Description
J	192	9,01	Traduction, structure ribosomale et biogenèse
K	132	6,19	Transcription
L	89	4,18	Réplication, recombinaison et réparation
X	67	3,14	Mobilome: prophages, transposons
D	47	2,21	Contrôle du cycle cellulaire, division cellulaire et partitionnement du chromosome
V	39	1,83	Mécanismes de défense
T	98	4,6	Mécanismes de transduction de signal
M	95	4,46	Biogenèse de la membrane/paroi cellulaire
N	55	2,58	Mobilité cellulaire
W	10	0,47	Structures extracellulaires
U	31	1,45	Sécrétion et échange intracellulaires
O	93	4,36	Modification post-traductionnelle, renouvellement des protéines, protéines chaperons
C	110	5,16	Production et conversion d'énergie
G	115	5,40	Transport et métabolisme des glucides
E	209	9,81	Transport et métabolisme des acides aminés
F	79	3,71	Transport et métabolisme des nucléotides
H	142	6,66	Transport et métabolisme des coenzymes
I	61	2,86	Transport et métabolisme des lipides
P	124	5,82	Transport et métabolisme des ions inorganiques
Q	29	1,36	Biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires
R	169	7,93	Fonction générale prédite uniquement
S	145	6,80	Fonction inconnue
-	1400	42,22	Non présents sur la banque

*: Calcul du pourcentage total est basé soit sur la taille du génome en paires de bases ou sur le nombre total de gènes codants dans le génome annoté.

L'annotation du génome de *Geobacillus* sp. Sah69 contre le serveur PHAST a révélé la présence de 2 génomes prophagiques intacts et de 5 génomes prophagiques incomplets. La présence de prophages dans les génomes des espèces de *Geobacillus* est bien documentée (Liu *et al.*, 2009; Marks et Hamilton, 2014; Hussein *et al.*, 2015).

Les bactériophages des bactéries thermophiles sont responsables de phénomènes de transferts horizontaux des gènes et sont étudiés afin de comprendre les mécanismes d'adaptation et de variabilité au sein des communautés microbiennes des environnements chauds. Ils peuvent également être une source d'enzymes d'intérêt biotechnologiques, notamment des protéases (Canchaya *et al.*, 2003; Brumm *et al.*, 2015).

Le génome contient également une seule série de répétitions CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) avec la présence des éléments appartenant aux familles Csn1, Cas1, et Cas2. Ces gènes sont essentiels pour l'acquisition de résistance contre les éléments génétiques étrangers en permettant l'excision et l'intégration de fragments génomiques depuis l'ADN envahisseur, conférant ainsi une résistance aux phages et aux plasmides par exemple (Sander et Joung, 2014). Le transfert horizontal de deux gènes putatifs (codant pour une protéine chaperon CopZ de transport de Cu²⁺ et une protéine flagelline-apparentée) a été mis en évidence. Ces gènes proviendraient probablement de membres des *Clostridia*. Un autre gène putatif (codant pour une protéine à fonction non déterminée) est prédit comme ayant été transféré à partir d'une origine virale, mais aucun plasmide n'a été détecté. Chez le genre *Geobacillus*, il a été démontré que parmi les rôles adaptatifs du transfert horizontal des gènes figurait surtout l'accélération du métabolisme notamment durant le processus de sporulation (Esin *et al.*, 2018).

L'alignement blastp entre le génome de *Geobacillus* sp. Sah69 et la banque de données sur les protéases MEROPS a révélé qu'au total, 48 gènes codant des protéines (1,5% du nombre total de gènes) ont été prédits comme partageant une homologie avec des catégories variées de protéases (Tableau 30). Ces prédictions indiquaient que 8 gènes codent pour des protéines putatives sécrétées grâce à des voies classiques, tandis que 35 gènes codent pour des protéines sécrétées par des voies non classiques et 5 gènes codent pour des protéases cellulaires.

Les protéines sécrétées par voies classiques portent un peptide signal N terminal (PS) à leur extrémité N-terminale et la séquence conservée du peptide permet sa reconnaissance par l'emploi de méthodes bio-informatiques (Nielsen, 2017).

Chez les procaryotes, le PS sera clivé lors de la translocation de la protéine à travers la membrane cytoplasmique. Toutefois, la présence du PS n'implique pas forcément que la protéine soit extracellulaire, mais qu'elle rentre dans la voie de sécrétion (von Heijne, 1988).

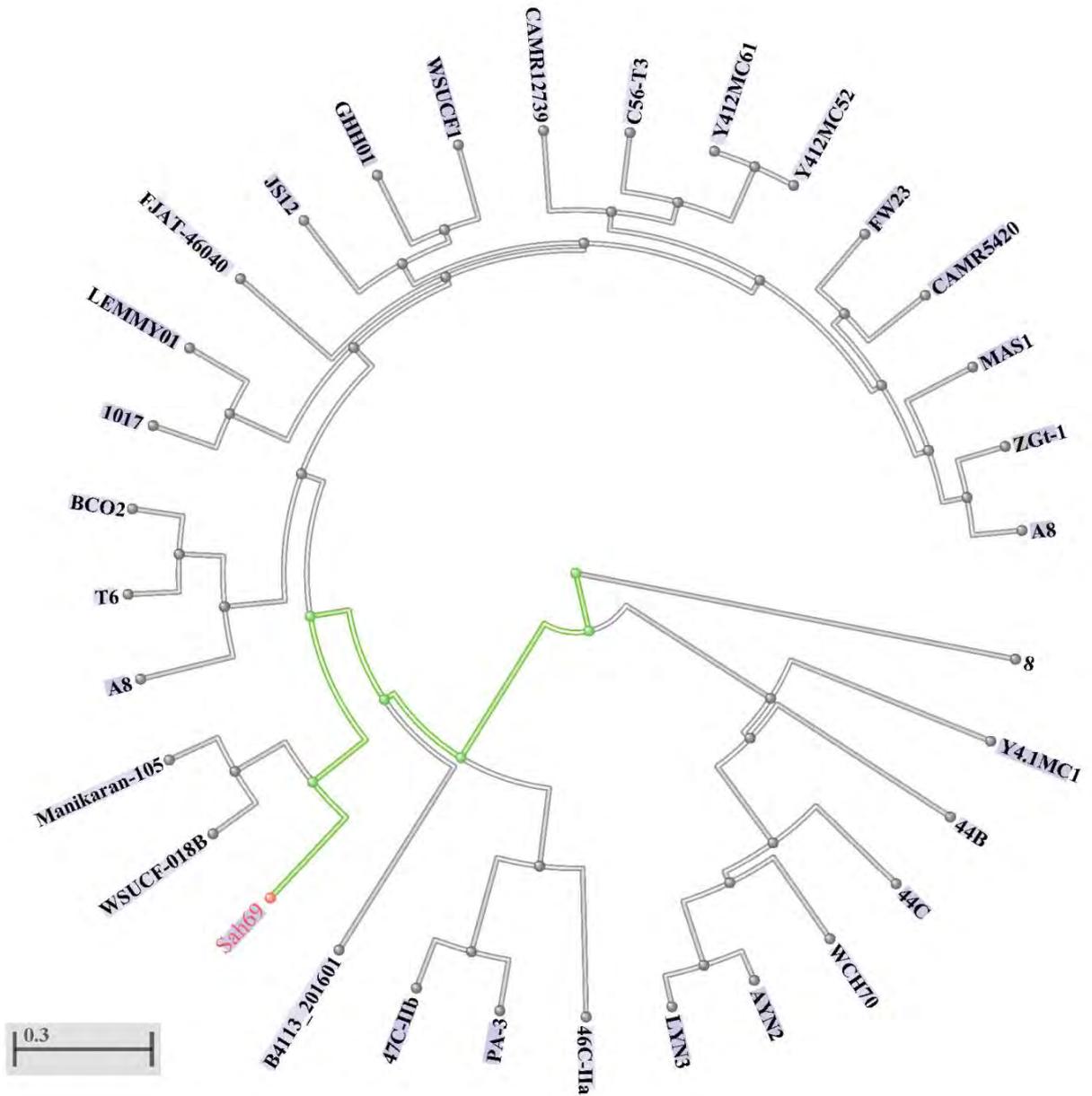


Figure 22. Dendrogramme basé sur les valeurs du Blast génomique entre le génome de la souche Sah69 et les génomes annotés des membres du genre *Geobacillus* présents dans la banque Genome. Cette représentation est générée automatiquement par la banque sous le numéro d'accèsion 11015. Taille totale moyenne des génomes (Mpb): 3,49212 ; nombre moyen de gènes codants protéines: 3288 ; contenu moyen en GC%: 52,1. La barre représente l'identité symétrique (source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11015>).

Résultats et Discussion

Alors que 4 gènes codant des protéines partageaient des similarités séquentielles avec les familles de protéases non assignées à la banque MEROPS, les gènes codant pour les métalloprotéases et les sérine-protéases étaient les plus présents en comparaison avec les autres protéases sur le génome. Ces deux groupes de protéases étant les plus présents dans les génomes procaryotes et eucaryotes (Page et Di Cera, 2008; Contesini *et al.*, 2017).

En décembre 2018, sur les 912290 protéases répertoriées sur la banque MEROPS, 32,66% (298031 séquences) étaient des métalloprotéases tandis que 36,62% (334149 séquences) étaient des sérine-protéases (Rawlings *et al.*, 2018). Cette abondance pourrait s'expliquer par l'adaptabilité évolutionniste plus importante de ces deux types d'enzymes pour les besoins de fonctionnement cellulaire (Di Cera, 2009).

Parmi les protéases d'intérêt biotechnologique qui sont codées par le génome de *Geobacillus* sp. Sah69 figurent la sortase A, une cystéine-protéase utilisée en biologie moléculaire pour le marquage et la modification de protéines (Parthasarathy *et al.*, 2007; Levary *et al.*, 2011), et la thermolysine, une métalloprotéase exploitée dans la synthèse de l'aspartame et dans l'analyse de la stabilité des structures tertiaires des protéines (Heinrikson, 1977; Matthews, 2011) (Tableau 31-Annexe 2).

Concernant les autres activités hydrolytiques envers des composés polymériques, la souche *Geobacillus* sp. Sah69 possède 4 gènes putatifs codant pour des hydrolases des esters carboxyliques (EC:3.1.1.), et 6 gènes de glycoside hydrolases (EC:3.2.1.) extracellulaires dont une α -amylase, une cellulase et une pullulanase.

Tableau 30. Principaux types de protéases prédites dans le génome de *Geobacillus* sp. Sah69 et leurs voies de sécrétion.

Voie de sécrétion Type de protéase	Classique (SignalP)	Non-classique (SécrétomeP)	Non sécrétée	Total
Aspartique (A)	0	3	0	3
Cystéine (C)	1	1	0	2
Métallo (M)	2	16	1	19
Sérine (S)	4	11	3	18
Thréonine (T)	0	2	0	2
Non assignées (U)	1	2	1	4
Total	8	35	5	48

La comparaison phylogénétique entre le génome de *Geobacillus* sp. Sah69 et les 34 génomes appartenant au genre *Geobacillus* séquencés et annotés disponibles sur la banque Genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome> ; identifiant : 11015) est présentée en figure 22. Elle est basée sur le calcul du pourcentage d'identité symétrique, définie comme étant le nombre de gènes partagés par les UTOs, et la similarité entre les séquences génomiques.

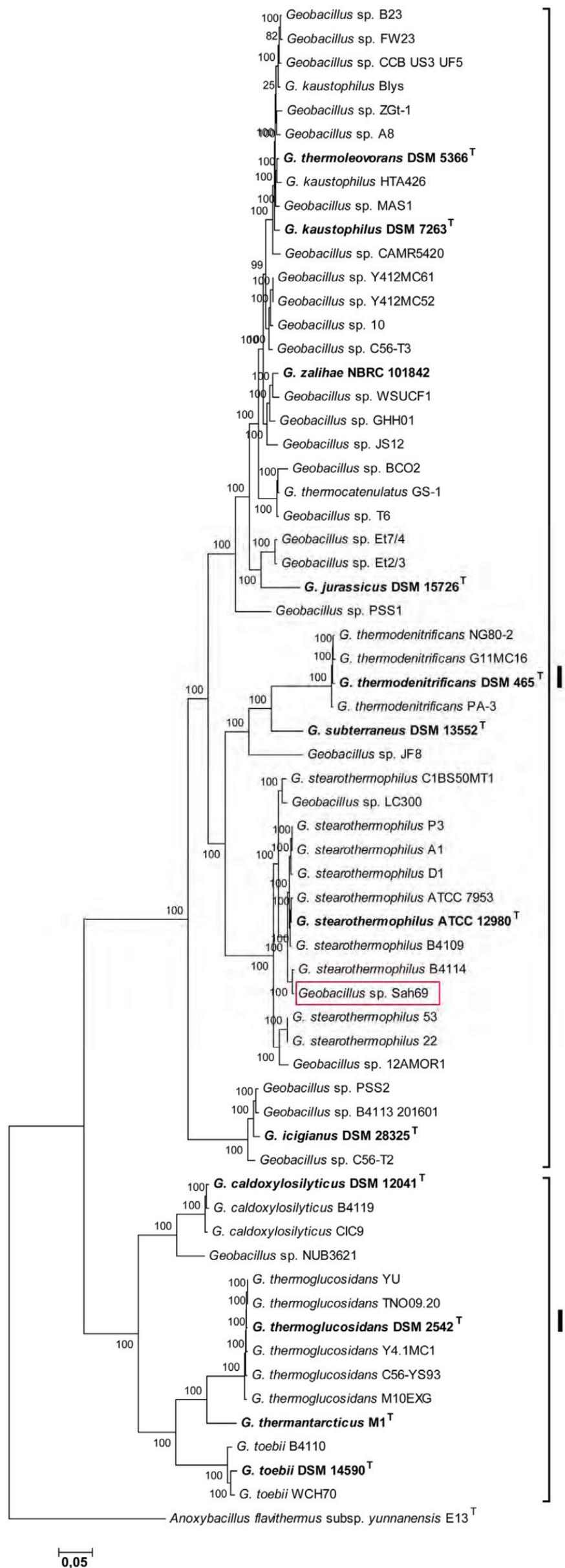


Figure 23. Arbre phylogénomique du genre *Geobacillus*. L'arbre a été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance sur la base de l'alignement de 1048 gènes présents chez 63 souches de *Geobacillus* et la souche *Anoxybacillus flavithermus E13^T* (utilisée comme groupe externe). Les valeurs des nœuds indiquent le pourcentage du test du *bootstrap* résultant de 1000 répliques. L'échelle de l'arbre représente 0,05 substitution par site. La souche Sah69 est encadrée en rouge (Aliyu *et al.*, 2016).

L'analyse montre que les UTOs les plus proches de *Geobacillus* sp. Sah69 sont les génomes des souches *Geobacillus* sp. Manikaran-105 (75,92% d'identité symétrique ; 95,92% de similarité) et *Geobacillus* sp. WSUCF-018B (75,71% d'identité symétrique ; 95,96% de similarité), isolées à partir d'une source géothermale de la région de Manikaran en Inde, et à partir de l'unité de compostage de l'université de Washington State aux États-Unis d'Amérique, respectivement (Tableau 32-Annexe 2).

De manière générale, le génome de *Geobacillus* sp. Sah69 est plus court que la taille moyenne des génomes du genre *Gebacillus* (3,5 Mpb) avec la présence de moins de gènes codant des protéines que la moyenne qui est de 3288 gènes.

L'analyse phylogénomique de 63 souches du genre *Geobacillus* réalisée par Aliyu *et al.* (2016); Aliyu *et al.* (2018) confirme l'appartenance de la souche Sah69 à l'espèce *Geobacillus stearothermophilus* (Figure 23). Ce résultat est en accord avec les travaux de Burgess *et al.* (2017).

Les membres du genre *Geobacillus* sont bien connus pour avoir une grande diversité écologique, physiologique et génétique (Zeigler, 2014; Studholme, 2015; Suzuki, 2018). Afin d'étudier l'effet de l'environnement sur leur structure, 29 génomes de souches appartenant au genre *Geobacillus* (12 génomes complets et 17 drafts) isolées de niches écologiques différentes, ont été comparés à celui de la souche *Geobacillus* sp. Sah69 (Bezuidt *et al.*, 2016). Les résultats de cette analyse pangénomique ont montré qu'un cœur génomique constitué de 5% de gènes du pangéome est hautement conservé. Ce cœur est constitué essentiellement de gènes impliqués dans la régulation et l'expression du matériel génétique (gènes de transcription et de structures ribosomales, traduction et modification des protéines). Ce résultat est confirmé par Lebre *et al.* (2018). En revanche, les 95% restants du pangéome montrent une plus grande flexibilité évolutionniste avec des gènes impliqués dans diverses voies métaboliques. Ces gènes montrent des preuves d'une variabilité relative à un phénomène marqué de transfert horizontal de gènes (THG). Ce qui suggère un rôle important du THG dans la diversité des membres de *Geobacillus* (Figure 24).

La comparaison du pangéome de *Geobacillus* avec des génomes de souches appartenant aux genres *Bacillus* et *Anoxybacillus* a montré une grande similarité avec les structures géniques d'*Anoxybacillus* (Figure 25). Elle a montré également des preuves de l'évolution de *Geobacillus* depuis le genre *Bacillus* sous l'influence de la pression environnementale et adaptative avec des liens phylogénétiques forts, notamment dans la partie cœur du pangéome.

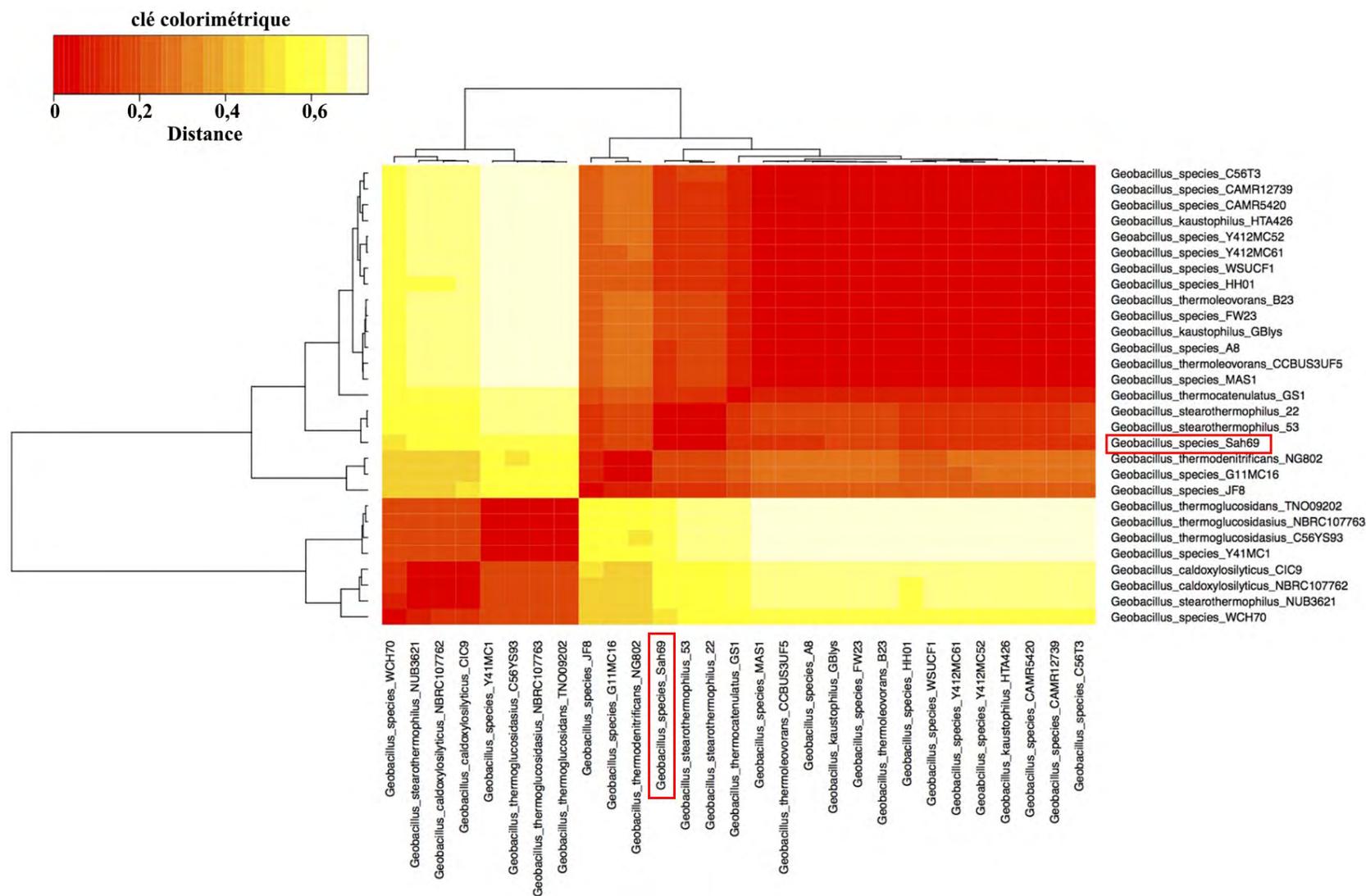


Figure 24. Carte thermique (*Heatmap*) représentant le degré de similarité de 29 génomes de *Geobacillus* basée sur l'identité moyenne des séquences nucléotidiques codantes. L'orange foncé indique une grande similarité, le jaune indique une faible similarité. La souche Sah69 est encadrée en rouge (Bezuidt *et al.*, 2016).

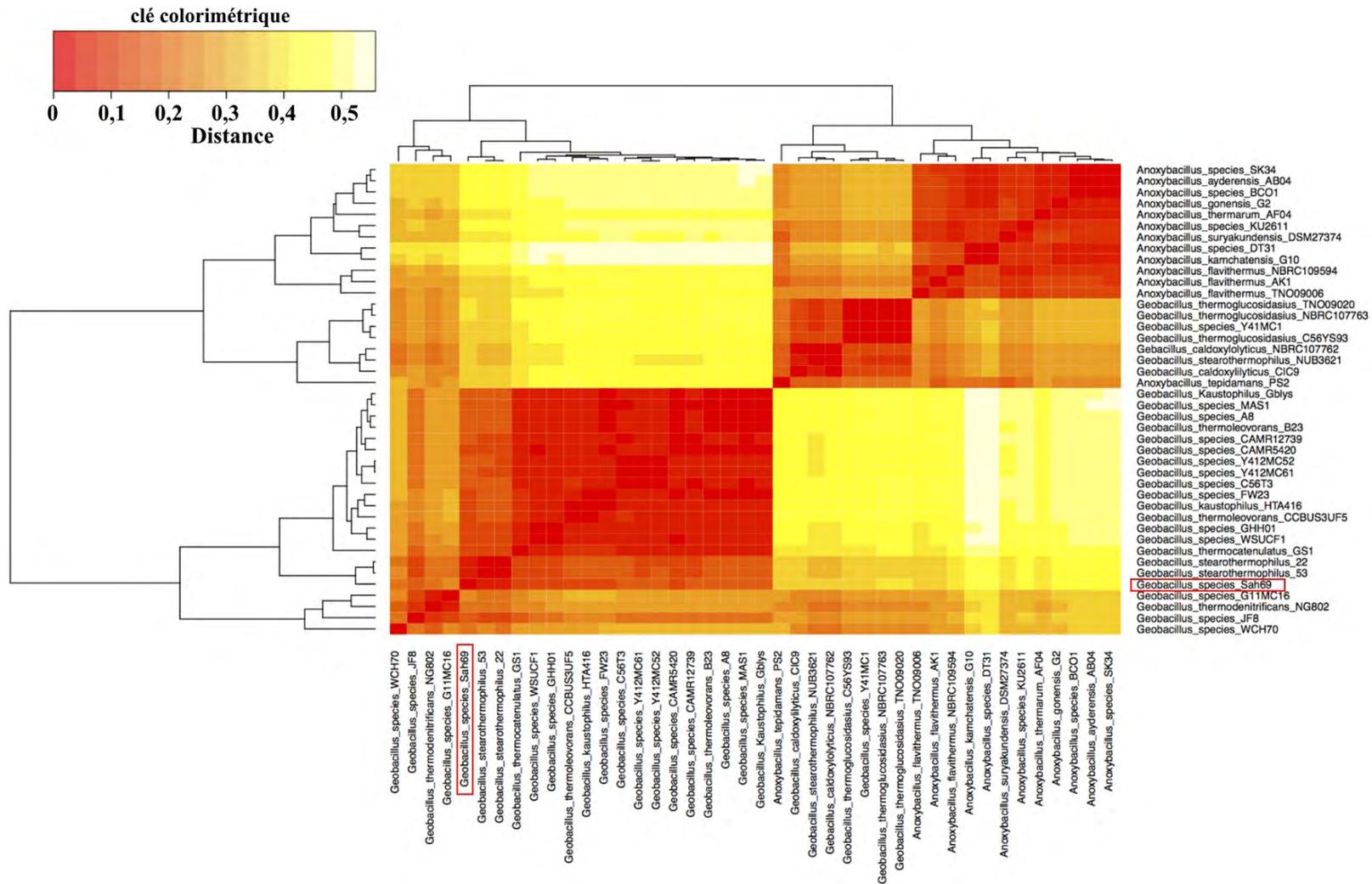


Figure 25. Carte thermique (*Heatmap*) représentant le degré de similarité entre les génomes de *Geobacillus* et d'*Anoxybacillus* basée sur identité moyenne des séquences nucléotidiques codantes. L'orange foncé indique une grande similarité, le jaune indique une faible similarité. La souche Sah69 est encadrée en rouge (Bezuidt *et al.*, 2016).

Résultats et Discussion

Tableau 33. Statistiques relatives au génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95.

Attribut	Valeur	% du Total*
Taille du génome	2558690 pb	100,00
Région codante de l'ADN	2214681 pb	86,56
Contenu en G+C	1226817 pb	47,95
Contigs	11	/
Gènes totaux	2649	100,00
Gènes codant pour des protéines	2550	96,26
Gènes à ARN non codant :	60	2,26
ARNr	8	0,30
ARNt	50	1,86
Autres ARN	9	0,34
Pseudogènes	39	1,47
Gènes en cluster internes	506	18,85
Gènes avec fonctions prédites	1296	50,82
Gènes avec domaines Pfam	2001	78,47
Gènes répertoriés dans KEGG pathways	868	32,34
Gènes assignés à des COGs	1924	75,45
Gènes avec peptides de signal	164	6,43
Gènes avec hélices transmembranaires	655	25,69
Répétitions CRISPR	2	ND

*: Calcul du pourcentage total est basé soit sur la taille du génome en paires de bases ou sur le nombre total de gènes codants dans le génome annoté.

ND: Non déterminé; COG: *Clusters of Orthologous Groups*; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Pfam: *protein family*; CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; pb: paires de bases; G: guanine; C: cytosine; /: absence.

4.2. Souche *Thermoactinomyces* sp. AS95

Le génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 est composé de 2558690 paires de bases avec un pourcentage de 47,95% en contenu G+C et comprend 11 séquences contigs (Tableau 33). Il contient un total de 2649 gènes, dont 2550 codent pour des protéines, 39 pseudogènes et 60 gènes codant pour de l'ARN non codant.

La majorité des gènes codant des protéines (75,45%) ont été assignés à des fonctions putatives alors que le reste des gènes ont été annotés comme hypothétiques. 78,47% des gènes appartiennent à une des familles de domaines protéiques répertoriées dans la banque Pfam. La distribution des gènes sur les catégories fonctionnelles de la banque COGs est présentée dans le tableau 34. 25% des gènes CDS codent pour des protéines contenant une structure hélicoïdale transmembranaire et 6% des protéines possèdent un peptide signal N terminal.

Sur l'ensemble des gènes CDS, 32% codent pour des protéines des voies métaboliques répertoriées dans la banque KEGG Pathways. Les résultats de l'annotation du génome de *Thermoactinomyces* sp. AS95 montrent un métabolisme aérobie où les voies métaboliques prédites sont prototrophes pour les acides aminés L-alanine, L-aspartate, L-glutamate, glycine, L-asparagine, L-cystéine, L-glutamine. Tandis qu'elles sont auxotrophes pour les acides aminés L-Lysine, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-histidine, L-leucine, L-proline et L-sérine. La souche est capable de métaboliser le xylose.

L'annotation du même génome contre le serveur PHAST a révélé la présence de 3 génomes prophagiques incomplets. La présence de prophages dans le génome de *Thermoactinomyces vulgaris* a déjà été décrite dans la littérature (Kurup et Heinzen, 1978; Kretschmer, 1982).

Le génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 contient également deux séries de répétitions CRISPR. Les transferts horizontaux de deux gènes putatifs à partir de membres des *Cyanobacteria* et d'un gène à partir des *Chloroflexi* ont été prédits. Aucune séquence plasmidique n'a été détectée.

Les mécanismes de transfert horizontal de gènes chez les bactéries constituent des outils d'adaptation à leur environnement (García-Aljaro *et al.*, 2017). Chez les thermophiles, ces échanges géniques permettent l'acquisition de capacités de survie sélectives, par exemple aux températures élevées et à l'acquisition de nutriments (Rhodes *et al.*, 2011; Fuchsman *et al.*, 2017).

Résultats et Discussion

Tableau 34. Répartition des gènes du génome de *Thermoactinomyces* sp. AS95 sur les catégories fonctionnelles de la banque de données COG.

Code	Valeur	% du Total*	Description
J	154	9,96	Traduction, structure ribosomale et biogenèse
K	145	5,68	Transcription
L	100	3,92	Réplication, recombinaison et réparation
X	3	0,15	Mobilome: prophages, transposons
D	27	1,05	Contrôle du cycle cellulaire, division cellulaire et partitionnement du chromosome
V	32	1,25	Mécanismes de défense
T	71	2,78	Mécanismes de transduction de signal
M	99	3,88	Biogenèse de la membrane/paroi cellulaire
N	8	0,31	Mobilité cellulaire
W	3	0,15	Structures extracellulaires
Z	0	0,03	Cytosquelette
U	33	1,29	Sécrétion et échange intracellulaires
O	85	3,33	Modification post-traductionnelle, renouvellement des protéines, protéines chaperons
C	135	5,29	Production et conversion d'énergie
G	122	4,78	Transport et métabolisme des glucides
E	213	8,35	Transport et métabolisme des acides aminés
F	70	2,74	Transport et métabolisme des nucléotides
H	108	4,23	Transport et métabolisme des coenzymes
I	109	4,27	Transport et métabolisme des lipides
P	101	3,96	Transport et métabolisme des ions inorganiques
Q	53	2,07	Biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires
R	249	9,76	Fonction générale prédite uniquement
S	196	7,68	Fonction inconnue
-	626	24,54	Non présents sur la banque

*: Calcul du pourcentage total est basé soit sur la taille du génome en paires de bases ou sur le nombre total de gènes codants dans le génome annoté.

Résultats et Discussion

L'alignement blastp entre le génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 et la banque de données sur les protéases MEROPS a révélé qu'au total, 45 gènes codant des protéines (1,7% du nombre total de gènes) ont été prédits comme partageant une homologie avec des catégories variées de protéases (Tableau 35). En raison de leur importance métabolique et physiologique, un génome typique contiendrait entre 1% et 5% de gènes codant pour des enzymes protéolytiques (Puente *et al.*, 2005). Les prédictions ont indiqué que 8 gènes codent pour des protéines putatives sécrétées grâce à des voies classiques, tandis que 23 gènes codent pour des protéines sécrétées par des voies non classiques. 6 gènes coderaient pour des protéases cellulaires.

Des voies de sécrétion des protéines dans l'espace extracellulaire alternatives à la voie du peptide signal N terminal ont été mises en évidence. Les mécanismes de ces voies non-classiques ou non-dirigées sont basés sur la formation de structures temporaires au niveau de la membrane cytoplasmique, facilitant ainsi le passage de protéines (Rabouille, 2017). Ces mécanismes semblent être liés à des structures protéiques primaires et secondaires particulières et à la présence de régions désordonnées au sein des protéines sécrétées en comparaison avec les protéines cellulaires (Bendtsen *et al.*, 2005). Ces différences peuvent être révélées par méthodes bioinformatiques (Bendtsen *et al.*, 2004).

Les gènes des sérine-protéases sont les plus présents sur le génome (21 gènes), suivis par ceux des métalloprotéases (16 gènes). La présence de plusieurs gènes de protéases d'intérêt biotechnologique a été notée. Ainsi, la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 possède une thermitase qui est une sérine-protéase utilisée pour l'hydrolyse des protéines animales comme le collagène (Brömme et Kleine, 1984). Elle possède également le gène codant pour la subtilisine, une sérine protéase prospectée pour plusieurs applications dans l'agroalimentaire et la formulation des détergents et des produits cosmétiques (Kim *et al.*, 2017) (Tableau 36-Annexe 2).

Tableau 35. Principaux types de protéases prédites dans le génome de *Thermoactinomyces* sp. AS95 et leurs voies de sécrétion.

Voie de sécrétion Type de protéase	Classique (SignalP)	Non-classique (SécrétomeP)	Non sécrétée	Total
Aspartique (A)	0	1	3	4
Cystéine (C)	0	1	1	2
Métallo (M)	1	12	3	16
Sérine (S)	7	8	6	21
Thréonine (T)	0	1	1	2
Total	8	23	14	45

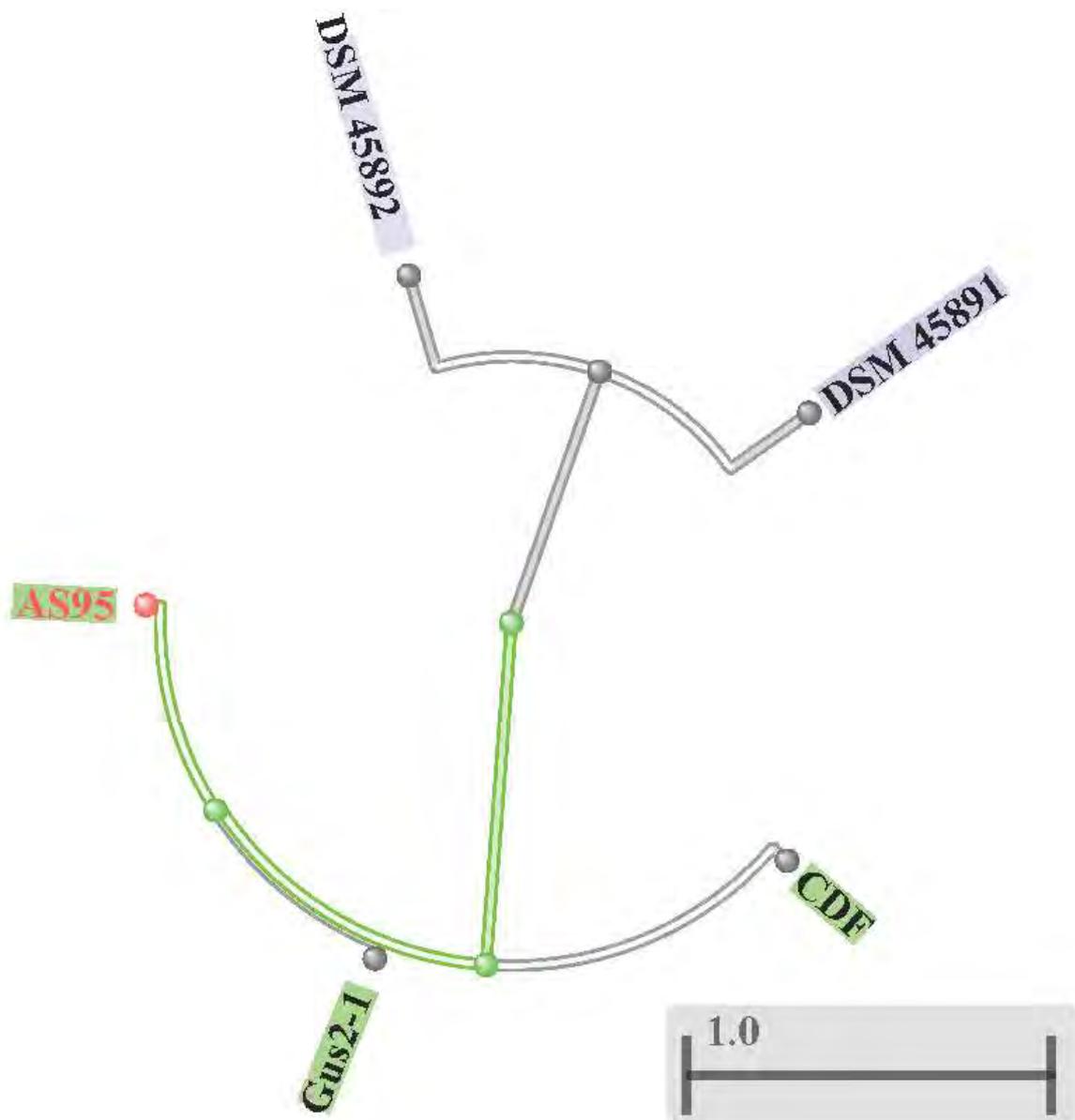


Figure 26. Dendrogramme basé sur les valeurs du Blast génomique entre le génome de la souche AS95 et les génomes annotés des membres du genre *Thermoactinomyces* présents dans la banque Genome. Cette représentation est générée automatiquement par la banque Genome sous le numéro d'accèsion 33847. Taille totale moyenne des génomes (Mpb): 2,62331 ; nombre moyen de gènes codants protéines: 2570 ; contenu moyen en GC%: 47,9. La barre représente l'identité symétrique (source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/33847>).

D'autres gènes codant pour des hydrolases ont également été prédits dans le génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 tels que les 2 gènes putatifs d'hydrolases des esters carboxyliques (EC:3.1.1.), et 7 autres gènes de glycoside hydrolases (EC:3.2.1.) extracellulaires dont deux cellulases et une β -glucosidase.

L'arbre phylogénétique comparative généré automatiquement par la banque Genome (identifiant : 33847), entre le génome de la souche AS95 et 4 génomes appartenant au genre *Thermoactinomyces* est présenté dans la figure 26. Le génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 présente le maximum d'identité avec celui de la souche *Thermoactinomyces vulgaris* Gus2-1 (96,09% d'identité symétrique ; 99,61% de similarité), isolée de sédiments d'une source géothermale de la vallée de Barguzin en Russie (Rozanov *et al.*, 2017b) (Tableau 37-Annexe 2). Ce résultat confirme celui de l'analyse phylogénétique qui place la souche dans l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*.

Le génome de la souche AS95 est relativement proche de la taille moyenne des génomes du genre *Thermoactinomyces* (2,6 Mpb) avec la présence d'un nombre plus important de gènes codant des protéines que la moyenne (2570 gènes).

Il est important de signaler que l'approche génomique est actuellement employée comme outil complémentaire pour la description de nouvelles espèces procaryotes. L'*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* inclue désormais l'utilisation de données génomiques dans les standards de la taxonomie des procaryotes (Chun *et al.*, 2018).

Le nombre des espèces décrites de *Thermoactinomyces* est faible et peu de leurs génomes ont été caractérisés (Yao *et al.*, 2015). Ces espèces sont abondantes dans les déchets agricoles tels que les fourrages, les composts, le foin, dans les sols et l'eau, etc. Leur présence et leur sporulation sont favorisées dans les écosystèmes chauds. Leurs endospores sont souvent aéroportées et elles produisent plusieurs types d'hydrolases d'intérêt telles que les amylases, les lipases et les protéases (Goodfellow et Jones, 2015a).

Résultats et Discussion

Tableau 38. Résultats du séquençage MiSeq de la région V4 du gène de l'ARNr 16S.

Échantillon	Nombre total des séquences obtenues	Nombre de séquences < 200 pb	Nombre de séquences ambiguës	Nombre de séquences chimériques	Nombre total des séquences éliminées	Nombre de séquences retenues pour analyse	Taille moyenne (pb)
Db11	186805	27	5619	58	5704	181101	272
Db12	109716	16	3962	27	4005	105711	272
Db13	99011	8	1893	22	1923	97088	272
Db14	100333	22	4212	26	4260	96073	273
Db15	111920	17	3872	34	3923	107997	272
Db16	73754	14	2499	23	2536	71218	273
Db17	90638	14	2573	23	2610	88028	273
Db18	144752	18	4892	32	4942	139810	273
Db21	110077	8	8950	27	8985	101092	273
Db22	138637	9	5163	37	5209	133428	273
Db23	73452	3	7282	22	7307	66145	274
Db24	135986	12	9232	34	9278	126708	275
Db25	88619	5	4013	18	4036	84583	273
Db31	136765	19	4563	27	4609	132156	272
Db32	84666	13	3595	19	3627	81039	273
Db33	83889	6	4967	26	4999	78890	272
Db34	69814	8	1979	11	1998	67816	272
OA41	55068	11	4722	14	4747	50321	273
OA42	83871	17	5714	38	5769	78102	273
OA43	1196	0	88	0	88	1108	273
OA44	54039	4	3617	9	3630	50409	273
OA45	169907	34	11270	50	11354	158553	273
OA46	154054	28	12900	40	12968	141086	273
Total	2356969	313	117577	617	118507	2238462	Moyenne = 273

5. Analyse métagénomique

Une des grandes applications des nouvelles techniques de séquençage nouvelle génération (NGS) en écologie microbienne est l'estimation de la diversité des espèces procaryotes et eucaryotes. Ces méthodes offrent une estimation plus précise des groupes taxonomiques constitutifs des communautés microbiennes en comparaison avec les méthodes classiques culturelles basées sur le clonage. Le gène de l'ARN ribosomal 16S est le marqueur moléculaire le plus utilisé pour la taxonomie et l'étude phylogénétique des procaryotes (Urbietta *et al.*, 2015). La description de nouveaux taxa procaryotes est en effet centrée sur l'étude comparative de sa séquence (Tindall *et al.*, 2010; De Vos *et al.*, 2017).

À noter que les études de la diversité microbienne des environnements chauds algériens par méthodes non culturelles sont très rares. À titre indicatif, un seul travail a été mené sur la diversité des cyanobactéries des eaux thermales de Debagh (Amarouche-Yala *et al.*, 2014).

Afin d'avoir une estimation de la diversité procaryote des environnements choisis pour cette étude, 23 échantillons de sédiments des sites de Debagh et de Ouled Ali ont été prélevés et les séquences de la région V4 du gène de l'ARNr 16S de l'ADN environnemental extrait ont été obtenues par la méthode de séquençage MiSeq. Cette méthode est caractérisée par un faible taux d'erreur de lecture en comparaison avec des méthodes basées sur le séquençage Sanger ou le pyroséquençage 454, et est largement utilisée pour des études de diversité similaires (Bartram *et al.*, 2011; Loman *et al.*, 2012; Jünemann *et al.*, 2013).

La région hypervariable V4 a une taille supérieure à 200 pb et permet d'avoir une résolution phylogénétique élevée et une identification taxonomique plus précise (Caporaso *et al.*, 2012; Werner *et al.*, 2012).

Les résultats quantitatifs du séquençage sont montrés dans le tableau 38. 39,63% des séquences analysées provenaient des 8 échantillons du point de prélèvement Db1, 22,87% des 5 échantillons de Db2, 16,08% des 4 échantillons de Db3 et 21,42% des 6 échantillons de Ouled Ali. Le nombre des échantillons est proportionnel à la superficie totale de chaque point de prélèvement et les surfaces de ces derniers variaient entre 10 m² et 25 m² environ.

L'identification des UTO représentatifs des séquences par alignement contre les banques de séquences RDPII (*The Ribosomal Database Project*), Greengenes et Genbank a indiqué que sur les 2238462 séquences retenues par l'analyse, 91,47% appartenaient au domaine *Bacteria*, contre 8,22% appartenant au domaine *Archaea*.

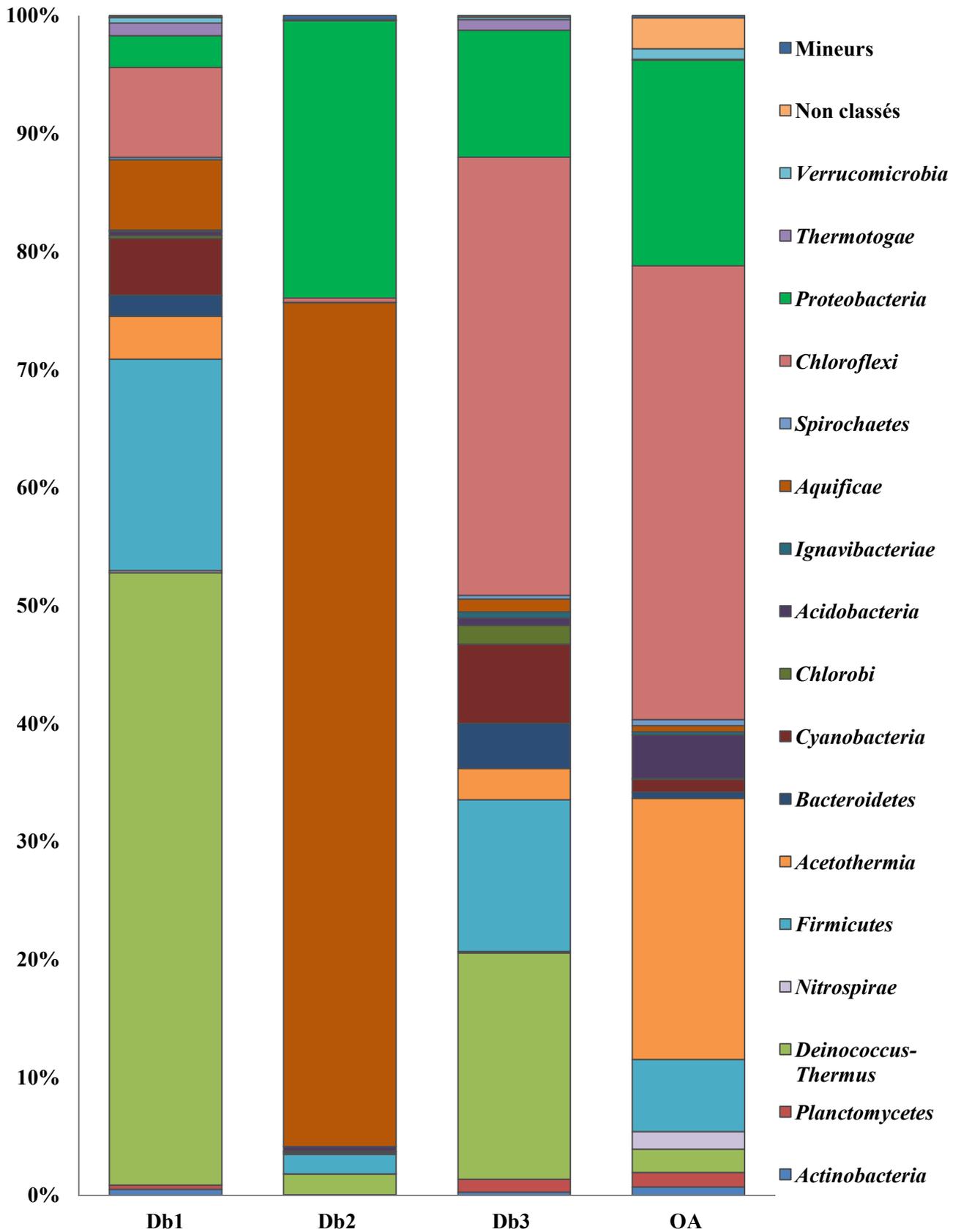


Figure 27. Pourcentages des phyla bactériens dominants au niveau de chaque point de prélèvement (le pourcentage minimum est supérieur à 0,5%).

L'étude de l'abondance des communautés bactériennes par phyla a révélé que les séquences appartenaient à 30 phyla (Tableau 39-Annexe 2), et que les bactéries aérobies thermophiles dominaient les échantillons prélevés des points de prélèvement Db1, Db2, Db3 et OA (Figure 27). Ainsi, les *Deinococcus-Thermus* (Battista, 2016) dominaient à Db1 (51,90% des séquences bactériennes), les *Aquificae* (Reysenbach *et al.*, 2001) sont les plus abondants à Db2 (71,55%), alors que le phylum de bactéries photohétérotrophes des *Chloroflexi* (Castenholz, 2001) avait la prévalence la plus élevée des séquences au niveau du point Db3 (37,13%) et à Ouled Ali (38,47%). Il semblerait que la température du point d'émergence soit un facteur discriminant dans la composition des communautés bactériennes. Avec une dominance des flores photosynthétiques lorsque la température est relativement basse à Ouled Ali et dans les sédiments de Db3, et une forte présence des communautés bactériennes chimiohétérotrophes (*Deinococcus-Thermus* et *Aquificae*) et chimiolithotrophes (*Aquificae*) une fois que la température dépasse les 90 °C (échantillons de Db1 et Db2).

La présence des bactéries aérobies thermophiles formant-endospores appartenant aux *Firmicutes* a été recensée afin qu'elle soit comparée avec les résultats de l'isolement par méthodes culturales. Ce phylum est présent de façon mineure dans les 4 points de prélèvement. Sa prévalence fluctuait entre 1,66% à Db2, 6,13% à OA, 12,86% à Db3 et 17,92% à Db1.

Au rang des 33 familles affiliées aux *Firmicutes* présentes dans les deux sources thermales (Tableau 40-Annexe 2), ce sont les bactéries aérobies formant-endospores qui dominaient les 4 points de prélèvement (Figure 28). En effet, la présence de 3 familles majeures de bacilles thermophiles aérobies formant-endospores a été observée: les *Planococcaceae* (Shivaji *et al.*, 2014), les *Bacillaceae* et les *Paenibacillaceae*. Ces familles sont très dominantes au sein du phylum aux points de prélèvements Db1 (63,30%) et Db3 (52,68%) alors que les *Bacillaceae* dominaient au niveau du point Db2 (53,95%).

À noter que les *Clostridiaceae* (Wiegel, 2015b), les *Thermoanaerobacteraceae* (Wiegel, 2015a) et les *Peptococcaceae* (Ezaki, 2015) constituent les familles de bactéries anaérobies les plus notables au sein du phylum, essentiellement dans les sédiments de Ouled Ali.

Au rang du genre, les bacilles thermophiles aérobies formant-endospores appartiennent aux genres *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993), *Psychrobacillus* (Krishnamurthi *et al.*, 2010) et *Sporosarcina* (Yoon *et al.*, 2001) présents avec au moins 1% du nombre total de séquences bactériennes chacun (Tableau 41).

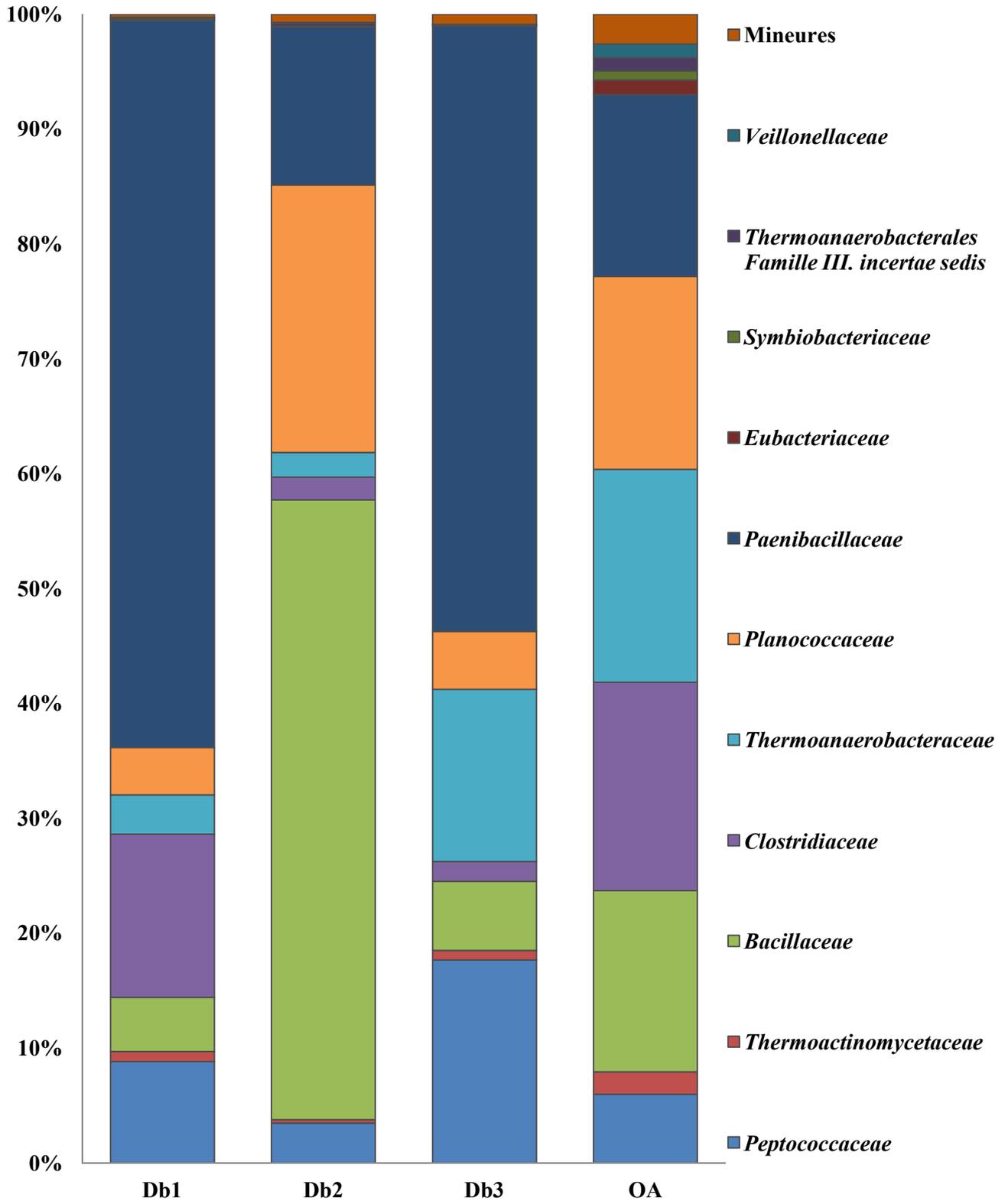


Figure 28. Pourcentages des familles dominantes au sein du phylum des *Firmicutes* au niveau de chaque point de prélèvement (le pourcentage minimum est supérieur à 0,5%).

Dans d'autres études employant les mêmes conditions expérimentales (séquences V4 obtenues par Miseq-Illumina) et analysant des échantillons d'eau et de sédiments de sources géothermales aux conditions physico-chimiques proches, la présence de certains phyla bactériens aérobies thermophiles était relativement similaire, avec des proportions variables. Ainsi, l'analyse de la diversité bactérienne des sources chaudes du Manikaran en Inde (40 °C-96 °C ; pH 7,5-8,0), a révélé une dominance de trois phyla : les *Firmicutes* (28 à 84%), les *Aquificae* (2 à 64%) et le groupe des *Deinococcus-Thermus* (1 à 18%) (Bhatia *et al.*, 2015). Alors que les *Firmicutes* (61,60%), les *Chloroflexi* (21,37%), et les *Cyanobacteria* (12,96%) dominaient les autres phyla bactériens dans la source thermale de Jakrem en Inde (46 °C ; pH 9,0) (Panda *et al.*, 2015). Les *Firmicutes* représentaient 7,5% de la diversité microbienne totale dans les sources thermales de Eryuan en Chine (65 °C ; pH 7,0) (Menzel *et al.*, 2015), et 6,1% à 21,5% dans les sources thermales de Ma'in en Jordanie (48 °C-59 °C ; 7,44-7,76) (Hussein *et al.*, 2017). Ce phylum est dominant dans les eaux analysées de la source chaude de SungaiKlah en Malaisie (75 °C-85 °C ; pH 8,0) avec 37,15% de la diversité bactérienne totale (Chan *et al.*, 2015). En revanche, les *Chloroflexi* dominaient les communautés bactériennes des sources chaudes de Murtazaabad au Pakistan (60°C-98 °C ; pH 6,2-9,4) avec 29% des séquences totales, tandis que les *Firmicutes* étaient notablement présents (10 %) (Amin *et al.*, 2017).

Les phyla photosynthétiques des *Cyanobacteria*, des *Chloroflexi* et des *Chlorobi* étaient également dominants dans la source chaude de Garga en Russie (55 °C-71 °C ; pH 8,1) avec un total de 40 à 70% de la diversité microbienne totale. Les *Firmicutes* représentaient jusqu'à 21,9% des UTOs dans la même source (Rozanov *et al.*, 2017a).

Les genres auxquels appartiennent nos isolats, à savoir *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus* et *Thermoactinomyces* étaient quant à eux, très minoritaires (moins de 1%) dans les échantillons de sédiments des 4 points de prélèvement. La faible prévalence de ces espèces dans les sources chaudes terrestres et la fréquence élevée de leur isolement a déjà été signalée par des travaux précédents. Par exemple, *Anoxybacillus* et *Geobacillus* ont été les genres les plus isolés à partir de sources géothermales situées en Malaisie alors qu'ils ne représentaient qu'une fraction minoritaire des communautés microbiennes totales révélées par l'analyse métagénomique des régions V3-V4 du gène de l'ARNr 16S (Chan *et al.*, 2015). Ce même constat a été observé lors d'études menées par méthodes culturales et non culturales pour les genres *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus* et *Bacillus* dans des sources chaudes bulgariennes (Derekova *et al.*, 2008a), indiennes (Kikani *et al.*, 2015) et tunisiennes (Sayeh *et al.*, 2010).

Résultats et Discussion

Tableau 41. Pourcentages des genres aérobies thermophiles formant-endospores au sein des communautés bactériennes de chaque point de prélèvement.

Famille	Genre	Point de prélèvement			
		Db1	Db2	Db3	OA
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	11,016	0,177	7,549	0,957
	<i>Brevibacillus</i>	0,006	0,004	0,006	0,005
	<i>Thermobacillus</i>	0,014	0,000	0,046	0,001
	<i>Ammoniphilus</i>	0,003	0,001	0,001	0,003
	<i>Oxalophagus</i>	0,001	0,000	0,000	0,024
<i>Bacillaceae</i>	<i>Psychrobacillus</i>	1,175	0,522	0,388	0,174
	<i>Anoxybacillus</i>	0,031	0,017	0,150	0,063
	<i>Bacillus</i>	0,064	0,216	0,293	0,161
	<i>Geobacillus</i>	0,003	0,003	0,024	0,042
	<i>Oceanobacillus</i>	0,000	0,000	0,000	0,001
	<i>Filobacillus</i>	0,003	0,000	0,002	0,000
	<i>Hydrogenibacillus</i>	0,005	0,002	0,007	0,414
	<i>Virgibacillus</i>	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Calditerricola</i>	0,044	0,001	0,042	0,020	
<i>Thermoactinomycetaceae</i>	<i>Thermoflavimicrobium</i>	0,000	0,000	0,000	0,002
	<i>Thermoactinomyces</i>	0,001	0,000	0,010	0,029
	<i>Laceyella</i>	0,001	0,000	0,000	0,003
	<i>Melghirimyces</i>	0,103	0,003	0,073	0,066
	<i>Hazenella</i>	0,000	0,000	0,000	0,003
	<i>Lihuaxuella</i>	0,008	0,000	0,001	0,001
	<i>Marininema</i>	0,000	0,000	0,000	0,001
	<i>Planifilum</i>	0,000	0,000	0,000	0,009
<i>Planococcaceae</i>	<i>Sporosarcina</i>	1,116	0,619	0,856	1,079
	<i>Paenisporosarcina</i>	0,001	0,000	0,001	0,001
<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>Effusibacillus</i>	0,000	0,001	0,000	0,000
	<i>Tumebacillus</i>	0,000	0,000	0,001	0,000
<i>Pasteuriaceae</i>	<i>Pasteuria</i>	0,001	0,001	0,045	0,025

La facilitée relative d'isolement de ces genres et l'impossibilité de cultiver d'autres groupes taxonomiques peuvent expliquer cette différence (Urbieta *et al.*, 2015).

D'autre part, les conditions physico-chimiques de l'environnement sont un facteur décisif de la diversité des communautés microbiennes. Ainsi, il a été constaté que l'augmentation de la température s'accompagnait d'une réduction de la diversité bactérienne (Gómez et Parro, 2012). La profondeur des bassins thermaux est un autre facteur modifiant significativement la composition des communautés bactériennes. Des bassins peu profonds (50 centimètres à 1 mètre) peuvent favoriser la présence de groupes phylogénétiques aérobies. Il est en effet connu que la teneur en O₂ dissoute est plus importante au niveau de l'eau superficielle qu'en profondeur (Hayashi et Rosenberry, 2002).

Les conditions extrêmes de température et de pH créent une pression environnementale ayant pour conséquence un nombre limité d'espèces capables de s'adapter à l'environnement relativement hostile. Des fluctuations dans la température de ces sources chaudes sont très communes, et peuvent atteindre les 10 °C de différence dans un intervalle de temps de 6 heures comme ça a été constaté dans plusieurs sources chaudes, en Islande et aux États-Unis d'Amérique. Ce type de perturbations périodiques pourrait contribuer à maintenir une structure stable des communautés microbiennes. En effet, les périodes dans lesquelles les températures baissent mènent à des phases de croissance rapide de la biomasse des communautés microbiennes présentes. Alors que les périodes de hautes températures provoquent la mort et la décomposition de la même biomasse ce qui permet de rendre disponible une source abondante de nutriments pour les organismes hétérotrophes les plus thermophiles (Hreggvidsson *et al.*, 2012).

Les niveaux de pH des sources thermales sont déterminés par l'origine et la quantité de l'eau disponible et de la quantité de gaz volcaniques disponible, comme le H₂S. Dans les zones où la température est suffisamment élevée, le H₂S est oxydé en H₂SO₄. Dans les sources chaudes riches en H₂SO₄ le pH se stabilise généralement autour de 6. Par contre, dans les sources chaudes alcalines où le contenu en H₂S est très faible, les composés chimiques régissant les valeurs de pH sont le couple HCO₃⁻/CO₃²⁻ et le SiO₂. Dans ce cas les valeurs de pH tendent à être dans l'intervalle neutre à alcalin [7-10] (Hreggvidsson *et al.*, 2012).

D'autres facteurs environnementaux divers comme l'activité d'eau, le contenu en gaz, en oxygène dissous, en sels minéraux et en composés chimiques variés et l'exposition à la lumière peuvent s'ajouter aux éléments pouvant influencer la présence de la vie dans ces environnements (Hreggvidsson *et al.*, 2012).

Résultats et Discussion

Tableau 42. Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats de la sélection et des souches types les plus proches.

Souche	OA117	1	Db101	Db114	Db120	Db134	OA123	OA140	OA21	OA23	2	OA113	3	AS88	4	AS90	5
Aspect des colonies	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Pigmentation	Crème	Jaune	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Jaune	Crème	Crème	V	Crème	Transparente	Crème	Crème
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forme cellulaire	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet
Mode de groupement	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Chainette	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	V	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé
Position des endospores	Terminale	Terminale	Subterminale	Terminale	Terminale	N.O.	Terminale	Terminale	Terminale	Terminale	Terminale	Subterminale	Subterminale	N.O.	Subterminale	Terminale	Subterminale
Mobilité cellulaire	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Croissance aérobie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance anaérobie	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Conditions de croissance:																	
Température	30-70	30-66	35-65	35-65	35-65	35-65	35-65	35-60	30-60	45-65	40-70	25-70	15-55	25-70	15-40	25-75	10-45
Température optimale	60	60	60	55	55	50	55	60	60	55	55-60	50	ND	55	28	55	30
pH	6,5-8,0	5,5-10,0	6,5-8,0	6,5-8,5	6,5-8,0	6,5-8,0	6,5-8,0	6,5-8,0	6,5-8,0	5,5-8,0	6,0-10,0	6,5-8,5	5,0-7,0	6,5-8,5	5,5-9,0	6,5-8,0	5,5-8,0
pH optimal	7,0	7,0-7,5	7,5	7,0	7,5	7,0	7,0	7,0	7,5	7,5	7,5-8,0	6,5	N.D.	7,5	N.D.	7,5	N.D.
NaCl % (p/v)	0-3	0-3,5	0-3	0-3	0-3	0-3	0-5	0-3	0-3	0-3	0-4	0-3	0-3	0-5	0-2	0-3	0-1
NaCl % (p/v) optimal	1	0,3	0	1	0,5	2	2	2	1	1	2	1	N.D.	3	N.D.	1	N.D.
Utilisation de:																	
D(+)-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N.D.	-	+	-	+
D(+)-Fructose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	N.D.	-	+	-	+
D(+)-Galactose	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	-	-	-
D(+)-Mélitiose	-	N.D.	-	-	-	-	+	-	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
D(+)-Mannose	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
D(+)-Saccharose	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	+
D(+)-Maltose	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	+
D(+)-Lactose	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	N.D.	-	-	-	-
L-Tyrosine	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-	+
L-Glutamate	+	N.D.	-	-	-	-	-	+	-	+	N.D.	+	N.D.	-	+	-	N.D.
L-Glycine	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
L-Thréonine	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
L-Lysine	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	N.D.	-	N.D.	-	V	-	N.D.
Lactate	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	-
Acétate	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	V
Citrate	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	+	-	-	-	-
Propionate	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	+	-	V	-	N.D.
Succinate	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	+
Mannitol	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	N.D.	-	+	-	+
Glycérol	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	+
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Méthanol	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Dextrine	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Pectine	-	N.D.	-	-	-	-	-	+	-	-	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Amidon	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	N.D.	+	N.D.

L : type lisse ; M : type muqueux ; R : type rugueux ; + : résultat positif ; - : résultat négatif ; N.O. : non observé ; N.D. : non déterminé ; V : variable ; 1: *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* ; 2: *Anoxybacillus gonensis* ; 3: *Bacillus sonorensis* ; 4: *Brevibacillus agri* ; 5: *Brevibacillus formosus*.

Les sols des déserts chauds et arides comme ceux du Sahara peuvent être considérés comme un paradigme des conditions extrêmes à la vie avec l'eau comme facteur limitant. D'autres facteurs viennent jouer également une barrière limite à la biodiversité de ces environnements: les écarts très importants de températures entre le jour et la nuit, l'érosion des sols causée par le vent et le faible contenu organique des sols (Heulin *et al.*, 2017).

Il est également important de mentionner que dans les études basées sur des approches non culturelles, l'abondance des groupes de bactéries formant-endospores appartenant au phylum des *Firmicutes* est souvent sous-estimée. Ceci est dû probablement à la difficulté rencontrée dans la lyse cellulaire lors de manipulations ayant pour but l'extraction, la purification et l'amplification de l'ADN environnemental. Ce qui induirait des résultats quantitativement biaisés (De Vos, 2011).

Les méthodes basées sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S de l'ADN environnemental permettent de bien étudier l'information phylogénétique à l'échelle du genre, mais donnent peu d'informations sur les interactions fonctionnelles des communautés procaryotes. À l'inverse, les méthodes classiques basées sur l'isolement de représentants de ces communautés, même si elles sont limitées d'un point de vue phylogénétique, permettent de cerner les facteurs environnementaux favorisant et sélectionnant des groupes taxonomiques particuliers et peuvent constituer des indicateurs potentiels de fonctionnement des écosystèmes procaryotes. C'est pourquoi des approches combinées permettraient de non seulement caractériser la présence ou l'absence de groupes phylogénétiques, mais seraient également capables d'établir plus clairement les liens entre diversité, structure des communautés microbiennes et fonctionnement des écosystèmes (Mandic-Mulec et Prosser, 2011; Nelson *et al.*, 2014).

6. Caractérisation phénotypique des souches

Les résultats de la caractérisation phénotypique des 28 souches sont présentés dans le Tableau 42. Les données des espèces décrites les plus proches d'après l'étude phylogénétique ont été récupérées depuis la littérature et sont présentées dans le même tableau.

Ces données phénotypiques convergeaient vers le sens des résultats de la caractérisation moléculaire. Les 28 souches appartiendraient aux groupes taxonomiques suivants:

Tableau 42. Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats de la sélection et des souches types les plus proches (suite).

Souche	OA30	6	Sah69	7	Db159	8	AS95	9
Aspect des colonies	L	L	L	L	L	L	R	R
Pigmentation	Crème	Rouge	Crème	Crème	Crème	Crème	Blanche	Blanche
Gram	+	+	+	V	+	V	+	+
Forme cellulaire	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Filamenteuse	Filamenteuse
Mode de groupement	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé/chainette	Isolé	Isolé	Mycélium	Mycélium
Position des endospores	Subterminale	Terminale/Subterminale	Terminale	Terminale/Subterminale	Terminale	Terminale/Subterminale	Sur sporophores non ramifiées	Sur sporophores non ramifiées
Mobilité cellulaire	+	+	-	+	-	-	-	-
Croissance aérobie	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance anaérobie	+	-	+	-	+	-	+	N.D.
Conditions de croissance:								
Température	25-75	35-60	25-75	30-75	30-70	45-70	40-65	35-60
Température optimale	55	50	55	N.D.	50	55-65	55	55
pH	6,5-8,5	N.D.	6,0-8,5	6,0-8,0	6,5-8,0	6,0-7,5	6,5-8,5	N.D.
pH optimal	7,0	N.D.	7,0	N.D.	7,5	N.D.	6,5	N.D.
NaCl % (p/v)	0-3,5	0-5	0-10	0-5	0-3	N.D.	0-3	0-5
NaCl % (p/v) optimal	1	N.D.	0	N.D.	2	N.D.	1	N.D.
Utilisation de:								
D(+)-Glucose	+	+	+	+	+	+	-	+
D(+)-Fructose	+	+	-	N.D.	+	N.D.	-	N.D.
D(+)-Galactose	+	N.D.	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.
D(+)-Mélubiose	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
D(+)-Mannose	-	N.D.	-	N.D.	+	N.D.	-	N.D.
D(+)-Saccharose	+	N.D.	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.
D(+)-Maltose	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
D(+)-Lactose	-	N.D.	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.
L-Tyrosine	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	-
L-Glutamate	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
L-Glycine	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
L-Thréonine	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
L-Lysine	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	+	N.D.
Lactate	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-	N.D.
Acétate	-	+	-	+	-	+	-	N.D.
Citrate	-	N.D.	-	-	-	+	-	N.D.
Propionate	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Succinate	-	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Mannitol	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Glycérol	+	+	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Ethanol	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Méthanol	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Dextrine	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Pectine	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
Amidon	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	-

L : type lisse ; M : type muqueux ; R : type rugueux ; + : résultat positif ; - : résultat négatif ; N.O. : non observé ; N.D. : non déterminé ; V : variable ; 6: *Brevibacillus thermoruber* ; 7: *Geobacillus stearothermophilus* ; 8: *Geobacillus thermoleovorans* ; 9: *Thermoactinomyces vulgaris*.

i. *Anoxybacillus* spp. Les espèces du genre *Anoxybacillus* sont des bacilles à Gram positif, très répandues dans les environnements chauds notamment terrestres. Mobiles ou non mobiles, leurs cellules forment des endospores subterminales ou terminales. Les membres du genre *Anoxybacillus* sont également classés comme thermophiles modérés, alcaliphiles/alcalotolérants ou neutrophiles. Ils sont aéro/anaérobies facultatifs, chimioorganotrophes avec un métabolisme respiratoire aérobie ou fermentaire, et ont la capacité de dégrader plusieurs types de polymères (Pikuta, 2015).

Quant à nos 9 souches membres du genre *Anoxybacillus*, elles sont capables de croître à des températures allant de 30 °C à 70 °C avec des optima situés entre 50 °C et 60 °C. Catalase et/ou oxydase positives, anaérobies facultatives à l'exception de la souche OA140, elles sont neutrophiles et ne peuvent pas croître à une salinité supérieure à 2% (p/v). Les 9 souches sont capables d'utiliser et de fermenter certains sucres sans production de gaz. Certaines d'entre elles peuvent dégrader l'amidon et la pectine.

ii. *Bacillus* spp. Les membres des espèces *Bacillus licheniformis* et *Bacillus sonorensis* sont des bacilles à Gram positif incluant des souches thermophiles modérées. Mobiles avec formation d'une endospore par cellule en position centrale ou subterminale. Les deux espèces sont aéro/anaérobies facultatifs, chimioorganotrophes avec un métabolisme respiratoire aérobie ou fermentaire. Elles sont connues pour leur capacité à produire des hydrolases, notamment des protéases extracellulaires thermoactives (Logan et Vos, 2015c).

Les souches de la sélection liées à ces espèces sont halotolérantes, neutrophiles et peuvent croître sur un intervalle de température de 25 °C à 70 °C avec des optima entre 50 °C et 55 °C. Elles sont anaérobies facultatives pour la plupart, possédant une catalase et une oxydase, et peuvent utiliser quelques sucres comme unique source de carbone et d'énergie, mais les fermentent faiblement. Parmi les 13 souches, 9 sont capables de dégrader l'amidon.

iii. *Brevibacillus* spp. Isolées principalement à partir du sol, ces espèces sont des bacilles à Gram positif, négatif ou variable. Sporulantes et mobiles, généralement aérobies strictes et neutrophiles, elles sont souvent mésophiles avec des souches rapportées thermotolérantes, mais quelques espèces comme *Brevibacillus thermoruber* sont thermophiles modérées et capables de dégrader des substrats protéiques (Logan et Vos, 2015b).

Nos souches AS88, AS90 et OA30, affiliées au genre *Brevibacillus* sont thermophiles modérées avec un optimum de croissance à 55 °C, elles sont neutrophiles avec une faible tolérance au NaCl. Catalase et oxydase positives, aérobies strictes, à l'exception de la souche OA30. Les 3 souches utilisent peu les substrats testés comme source d'énergie, de carbone et/ou d'azote, mais sont capables de fermenter le glucose et de dégrader l'amidon.

Résultats et Discussion

Tableau 42. Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats de la sélection et des souches types les plus proches (suite).

Souche	AS89	Db27	Db32	Db59	ENAF93	OA105	OA107	OA126	OA129	OA130	OA28	Sah66	10
Aspect des colonies	L	M	M	M	M	M	M	M	L	L	M	M	V
Pigmentation	Crème	Transparente	Crème	Crème	Transparente	Transparente	V						
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forme cellulaire	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet
Mode de groupement	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé	Isolé/paire
Position des endospores	N.O.	Subterminale	Subterminale	N.O.	Subterminale	Subterminale	Subterminale	N.O.	Subterminale	Terminale	Subterminale	Terminale	V
Mobilité cellulaire	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Croissance aérobie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance anaérobie	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Conditions de croissance:													
Température	35-65	25-60	30-60	25-70	25-60	35-70	25-70	30-70	25-70	25-70	35-65	35-70	15-68
Température optimale	55	50	50	55	55	55	50	55	55	55	50	55	50
pH	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,0	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	5,0-9,0	5,5-8,0	6,5-8,0	6,0-8,0
pH optimal	7,0	7,0	7,0	7,5	7,5	7,0	7,0	7,0	6,5	7,0	7,0	7,0	N.D.
NaCl % (p/v)	0-10	0-10	0-10	0-5	0-1	0-2	0-3	0-3	0-1	0-10	0-3	0-10	0-7
NaCl % (p/v) optimal	3	2	3	0,5	0	0	0,5	1	0	0	0,5	0,5	N.D.
Utilisation de:													
D(+)-Glucose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Fructose	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Galactose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	N.D.
D(+)-Mélibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	N.D.
D(+)-Mannose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
D(+)-Saccharose	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	N.D.
D(+)-Maltose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	N.D.
D(+)-Lactose	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	N.D.
L-Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
L-Glutamate	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	N.D.
L-Glycine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
L-Thréonine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
L-Lysine	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	N.D.
Lactate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Acétate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Succinate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Mannitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	N.D.
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Méthanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Dextrine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	N.D.
Pectine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Amidon	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

L : type lisse ; M : type muqueux ; R : type rugueux ; +: résultat positif ; -: résultat négatif ; N.O. : non observé ; N.D. : non déterminé ; V : variable ; 10: *Bacillus licheniformis*.

iv. *Geobacillus* spp. Bacilles thermophiles obligatoires à Gram positif, elles sont souvent présentes dans les sols et dans les sources thermales. Mobiles ou non mobiles, leurs endospores sont terminales ou subterminales. Généralement, les membres de *Geobacillus* sont aéro/anaérobies facultatifs, neutrophiles avec des optima de croissance à 50-65 °C. Ils sont capables de dégrader les polysaccharides et leur capacité à produire des protéases extracellulaires a déjà été rapportée (Coorevits *et al.*, 2012; Logan *et al.*, 2015).

Les souches Sah69 et Db159 affiliées au genre *Geobacillus* peuvent croître sur de larges intervalles de températures avec des optima à 55 °C et à 50 °C, respectivement. Elles sont neutrophiles, halotolérantes, anaérobies facultatives, possédant une catalase ou une oxydase, et utilisent et fermentent le glucose, le fructose et le saccharose. La souche Sah69 est capable de dégrader l'amidon.

v. *Thermoactinomyces* spp. Espèces aérobies à Gram positif, elles sont caractérisées par la production d'un mycélium aérien très abondant de couleur blanche et un mycélium de substrat bien développé et ramifié. Leurs endospores sont sessiles sur des hyphes aériens ou de substrat ou sur de courts sporophores non ramifiés. Les membres du genre *Thermoactinomyces* sont thermophiles modérés et chimioorganotrophes. Ils sont capables de dégrader la caséine et la gélatine (Goodfellow et Jones, 2015b).

L'unique souche AS95 membre du genre *Thermoactinomyces* croît entre 40 °C et 65 °C avec une croissance optimale à 55 °C, à pH 6,5 et en présence de 1% (p/v) de NaCl. Elle est catalase et oxydase positives, anaérobie facultative, et fermente le glucose en produisant des acides mixtes. Elle dégrade uniquement la gélatine sur un milieu de culture gélifié.

6.1. Liens de parenté phénotypiques

La variabilité phénotypique des 28 souches a été analysée par la construction d'un phénogramme par méthode UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*).

Tableau 42. Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats de la sélection et des souches types les plus proches (suite).

Souche	OA117	1	Db101	Db114	Db120	Db134	OA123	OA140	OA21	OA23	2	OA113	3	AS88	4	AS90	5	OA30	6	Sah69	7	Db159	8	AS95	9	
Catalase	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	V	+	+	+	N.D.	
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	N.D.	+	-	+	-	+	N.D.	+	V	-	N.D.	+	N.D.	
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	N.D.	
β-galactosidase	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	+	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.	
Nitrate réductase	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V	+	+	-	-	
Tryptophanase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	
Production de :																										
CO₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	+	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	
Acides mixtes (RM)	+	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	+	V	-	N.D.	+	N.D.	
Acétoïne (VP)	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	+	-	N.D.	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	V	-	-	-	N.D.	
Production d'acides à partir de:																										
D(+)-Glucose	-	N.D.	-	-	+	+	+	+	+	+	N.D.	+	+	-	+	+	V	-	N.D.	+	+	-	+	+	N.D.	
D(+)-Fructose	-	N.D.	-	-	-	+	+	+	+	+	N.D.	+	N.D.	-	+	-	V	-	N.D.	+	+	+	+	-	N.D.	
D(+)-Galactose	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	-	-	+	-	N.D.	
D(+)-Lactose	-	N.D.	-	-	+	+	+	+	+	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	-	+	-	-	N.D.	
D(+)-Saccharose	-	N.D.	-	-	-	+	+	-	-	-	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	+	+	+	+	-	N.D.	
D(+)-Maltose	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	-	-	N.D.	-	+	-	+	-	N.D.	
D(+)-Dextrine	-	N.D.	-	-	-	-	-	+	-	-	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	
D(+)-Mélibiose	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	+	+	+	-	N.D.	
D(+)-Mannitol	-	N.D.	-	-	-	+	-	+	-	-	N.D.	+	+	-	+	-	-	-	N.D.	-	V	+	+	-	N.D.	
D(+)-Mannose	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	V	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	+	-	N.D.	
Hydrolyse de:																										
Amidon	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	
Pectine	+	N.D.	-	-	+	-	+	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	
Tween 20	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	+	
Tween 80	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	+	
Carboxyméthylcellulose	-	N.D.	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	-	
Caséine	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-	+	
Gélatine	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	N.D.	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	

RM: rouge de méthyle ; VP: Voges-Proskauer ; +: résultat positif ; -: résultat négatif ; N.D. : non déterminé ; V : variable ; 1: *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* ; 2: *Anoxybacillus gonensis* ; 3: *Bacillus sonorensis* ; 4: *Brevibacillus agri* ; 5: *Brevibacillus formosus* ; 6: *Bacillus thermoruber* ; 7: *Geobacillus stearothermophilus* ; 8: *Geobacillus thermoleovorans* ; 9: *Thermoactinomyces vulgaris*.

Tableau 42. Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats de la sélection et des souches types les plus proches (suite).

Souche	AS89	Db27	Db32	Db59	ENAF93	OA105	OA107	OA126	OA129	OA130	OA28	Sah66	10
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
β-galactosidase	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Tryptophanase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Production de :													
CO₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acides mixtes (RM)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	V
Acétoïne (VP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Production d'acides à partir de:													
D(+)-Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
D(+)-Fructose	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
D(+)-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D(+)-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D(+)-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
D(+)-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D(+)-Dextrine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	N.D.
D(+)-Mélitriose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D(+)-Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D(+)-Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hydrolyse de:													
Amidon	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Pectine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Tween 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
Tween 80	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	N.D.
Carboxyméthylcellulose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Caséine	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Gélatine	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+

RM: rouge de méthyle ; VP: Voges-Proskauer ; +: résultat positif ; - : résultat négatif ; N.D. : non déterminé ; V : variable.

- 1 : *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* (Dai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Pikuta, 2015) ;
 2 : *Anoxybacillus gonensis* (Belduz *et al.*, 2003; Dulger *et al.*, 2004; Pikuta, 2015) ;
 3 : *Bacillus sonorensis* (Palmisano *et al.*, 2001; Logan et Vos, 2015c) ;
 4 : *Brevibacillus agri* (Shida *et al.*, 1996; Logan et Vos, 2015b) ;
 5 : *Brevibacillus formosus* (Shida *et al.*, 1996; Logan et Vos, 2015b) ;
 6 : *Brevibacillus thermoruber* (Manachini *et al.*, 1985b; Shida *et al.*, 1996; Logan et Vos, 2015b) ;
 7 : *Geobacillus stearothermophilus* (Nazina *et al.*, 2001; Logan *et al.*, 2015) ;
 8 : *Geobacillus thermoleovorans* (Nazina *et al.*, 2001; Logan *et al.*, 2015) ;
 9 : *Thermoactinomyces vulgaris* (Goodfellow et Jones, 2015b; Goodfellow et Jones, 2015a) ;
 10 : *Bacillus licheniformis* (Llarch *et al.*, 1997; Logan et Vos, 2015c).

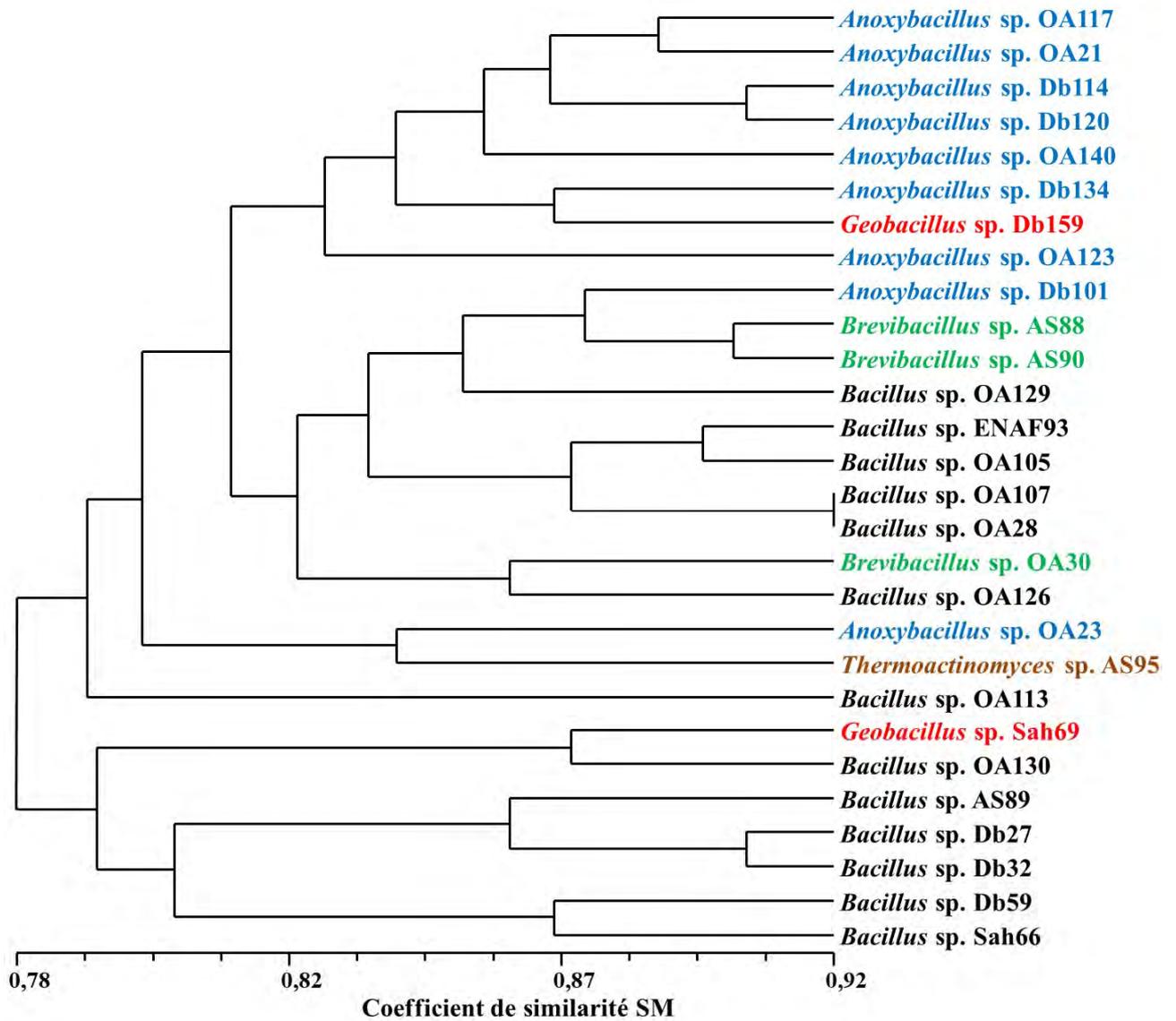


Figure 29. Phénogramme basé sur la similarité de 128 caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des 28 souches de l'étude.

Cet arbre phénotypique est basé sur le calcul du coefficient SM de la similarité de 128 caractères phénotypiques (morphologiques, physiologiques et biochimiques) des isolats (Tableau 43-Annexe 2). Le résultat de l'analyse est montré dans la figure 29.

De manière générale, la clustérisation des souches indique une variabilité phénotypique relativement faible. En effet, les 26 clades sont formés à des pourcentages de similarité entre 78% et 92%. Les genres les plus proches taxonomiquement sont regroupés sous le même cluster et l'origine des souches ne semble pas être un caractère distinctif. En effet, certains caractères généraux de l'ordre des *Bacillales* sont partagés par les souches de la collection, à savoir la capacité à former des endospores, le Gram positif, et une variabilité physiologique et biochimique assez faible : thermophiles modérés, neutrophiles, halotolérants, chimioorganotrophes avec un métabolisme respiratoire aérobie (De Vos, 2015).

L'analyse phénotypique effectuée lors de cette étude confirme globalement l'analyse phylogénétique même si la discrimination intraspécifique n'est pas concluante. Des travaux employant les deux approches pour l'étude des bactéries thermophiles formant-endospores isolées à partir d'environnements similaires ont relevé cette relative disparité entre les caractères phénotypiques d'UTOs appartenant aux mêmes groupes taxonomiques (Derekova *et al.*, 2008a; Adiguzel *et al.*, 2009; Cihan *et al.*, 2012; Arya *et al.*, 2015; Arab *et al.*, 2018).

La physiologie des bactéries formant-endospores est influencée par des conditions complexes multifactorielles liées à leur environnement. La température de ce dernier n'est donc pas le seul paramètre discriminant dans la variation des caractères phénotypiques de ces microorganismes. D'autres paramètres tels que le pH, l'activité d'eau, le potentiel d'oxydoréduction et la disponibilité des nutriments influencent grandement les profils phénotypiques de ces bactéries (Carlin, 2011).

Les changements génotypiques se produisent constamment dans les organismes indépendamment des variations phénotypiques. En d'autres termes, l'évolution moléculaire est quasi-indépendante des caractères phénotypiques. Toutefois, ces caractères ne peuvent être ignorés. En plus, la régulation de l'expression des gènes peut réduire les dépenses énergétiques. Ainsi, les changements physiologiques chez les bactéries peuvent être expliqués sur la base de la disponibilité des nutriments dans l'environnement, conduisant à des changements dans l'expression phénotypique ou l'acquisition des adaptations héritées par transfert horizontal de gènes ou par pression de sélection. Ces adaptations écologiques peuvent se produire sur de très courtes périodes au niveau de populations taxonomiquement très proches (Cohan et Perry, 2007; Lima-Bittencourt *et al.*, 2007; Bhatt et Singh, 2016).

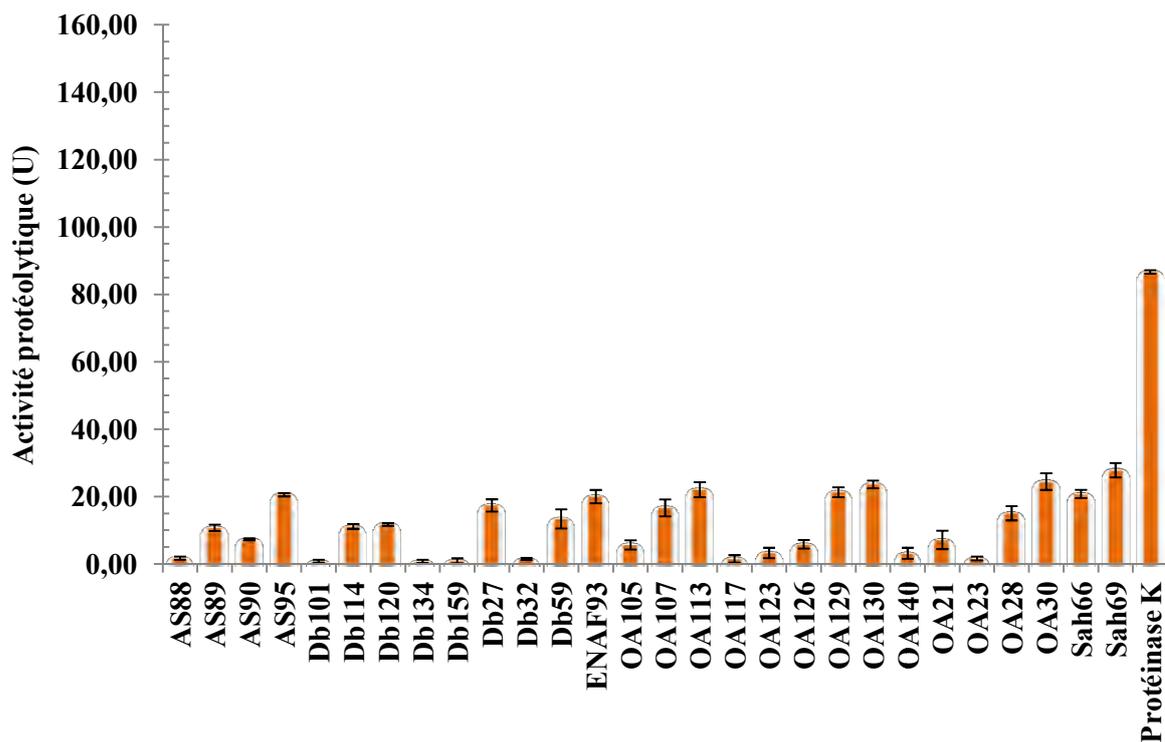


Figure 30. Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre l'azocaséine.

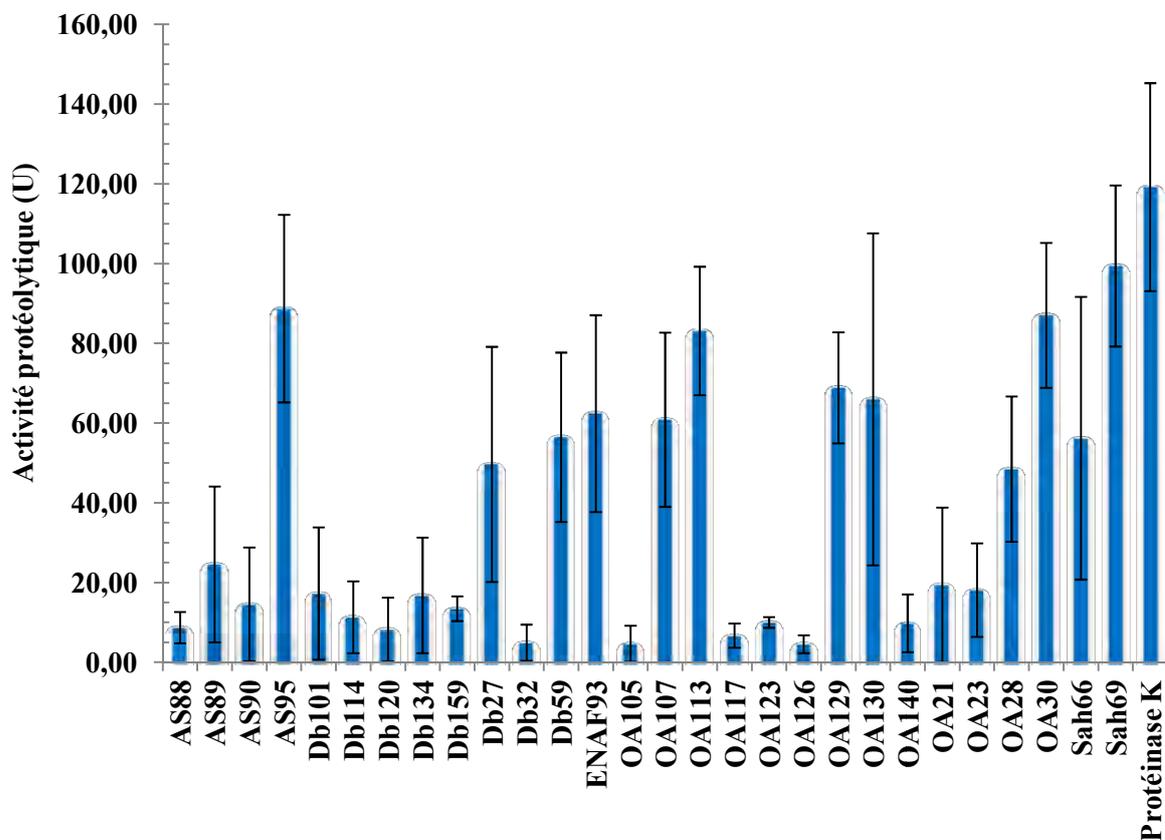


Figure 31. Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre la caséine.

7. Caractérisation des activités protéasiques extracellulaires des souches

Les souches dotées de caséinases et/ou de gélétinases ont été caractérisées et leurs activités protéolytiques ont été dosées par 3 méthodes : contre l'azocaséine, la caséine et la caséine BODIPY FL. Les souches les plus intéressantes ont été sélectionnées pour la production et la caractérisation de leurs protéases extracellulaires par fermentation sur milieu de culture liquide.

7.1. Sélection de souches productrices de protéases extracellulaires

Les résultats du dosage contre l'azocaséine, la caséine et la caséine BODIPY FL sont montrés dans les figures 30, 31 et 32, respectivement. Les valeurs détaillées pour le dosage selon les 3 méthodes sont montrées en Annexe 2 (Tableaux 44, 45 et 46). La protéinase K a été utilisée comme témoin positif.

Une activité protéasique envers le substrat a été considérée comme statistiquement significative lorsqu'elle représentait au moins 10% de celle de la protéinase K. Ce qui correspond à l'activité minimale de la protéinase K dans un milieu exempt de Ca^{2+} (Bajorath *et al.*, 1988). La courbe d'étalonnage de L-Tyrosine est montrée en Annexe 2 (Figure 33 et Tableau 47).

Une analyse de la variance à un facteur a été réalisée afin d'estimer la marge d'erreur des trois méthodes de dosage employées à un seuil de signficativité de 0,05. Les résultats révèlent que les valeurs de triplicata obtenues par la méthode à la caséine étaient significativement différentes ($F = 0,232714536$, voir tableau 48 en Annexe 2). D'après ces résultats, cette méthode a été écartée pour la suite de cette étude. Plusieurs travaux avaient signalé que les résultats du dosage de l'activité protéasique par mesure de la quantité de tyrosine et de tryptophane dans le milieu pouvaient présenter une marge d'erreur importante (Kwan *et al.*, 1983; Christen, 1987; Wallace et Fox, 1998).

D'après les résultats de l'ANOVA, les essais de dosage par la méthode à la caséine BODIPY FL présentaient une différence non significative à $p < 0,05$ ($F = 0,003794167$, voir tableau 49 en Annexe 2), et donc une marge d'erreur relativement faible. Les méthodes basées sur la mesure du signal fluorescent représentent des méthodes simples et rapides pour la mesure de l'activité enzymatique avec des seuils de détectabilité assez bas, notamment dans le cas d'échantillons de grande taille. Toutefois, ces méthodes présentent des problèmes d'interférences dans la lecture du signal. En conséquence, les résultats pourraient donner parfois de faux positifs avec des problèmes de reproductibilité signalés dans la littérature (Kuznetsova *et al.*, 2005; Simeonov *et al.*, 2008; Busch *et al.*, 2013; Janzen, 2014).

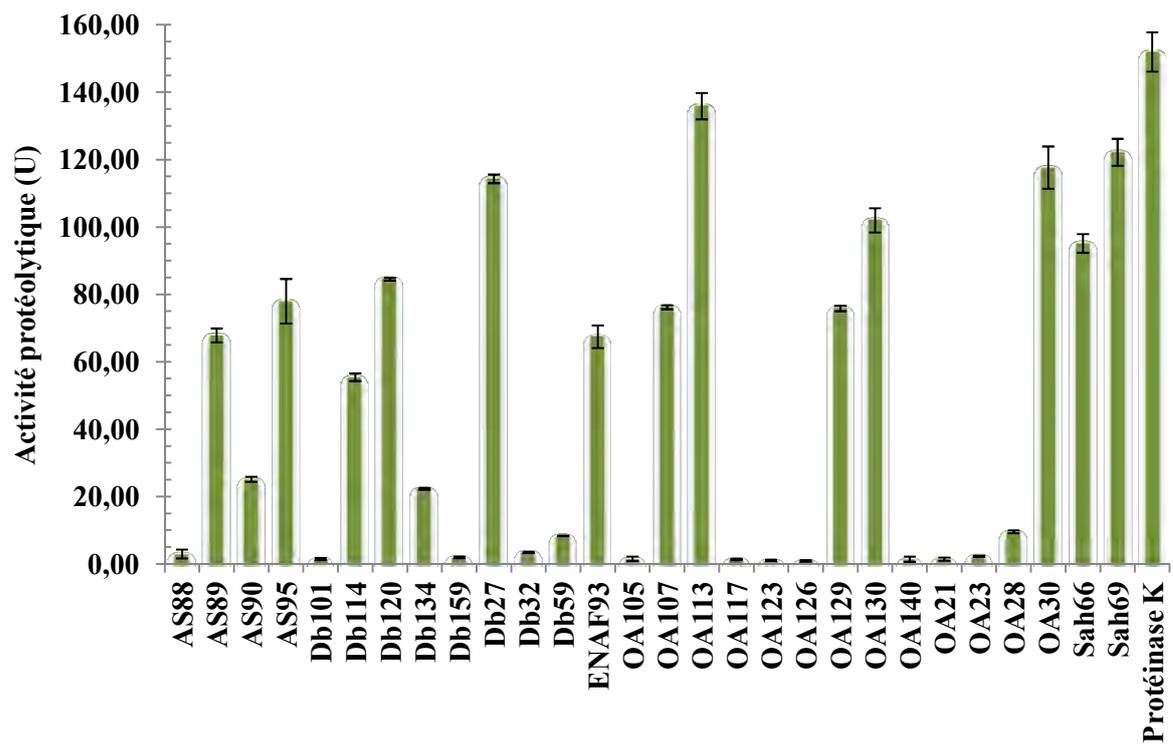


Figure 32. Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre la caséine BODIPY FL.

Les valeurs des essais de dosage contre l'azocaséine ont montré une différence non significative indiquant une marge d'erreur relativement faible à $p < 0,05$ ($F = 0,004111003$, voir tableau 50 en Annexe 2). Cette méthode colorimétrique est très utilisée dans le dosage des activités protéolytiques dans différentes applications *in vitro* pour sa fiabilité (Eid et Matty, 1989; Williams et Reed, 1990; Peyronel et Cantera, 1995; Bendicho *et al.*, 2002; Coêlho *et al.*, 2016).

La méthode à l'azocaséine a donc été privilégiée et choisie pour le dosage de l'activité protéasique pour la suite de l'expérimentation.

Le dosage a révélé que sur les 28 souches testées, 13 étaient faiblement productrices (activités inférieures à 10% de celle de la protéinase K). Ces souches sont les suivantes : AS88, AS90, Db32, Db101, Db134, Db159, OA105, OA117, OA123, OA126, OA140, OA21 et OA23. Elles ont été écartées.

À l'inverse, les 15 souches restantes avaient des activités importantes (supérieures à 10% de l'activité de la protéinase K). Parmi ces souches, Sah69, OA113 et OA30 ont présenté les activités les plus importantes.

Les souches appartenant à des espèces dont les protéases sont peu ou pas encore exploitées à l'échelle industrielle ont été privilégiées. C'est la raison pour laquelle les souches appartenant au genre *Bacillus* (AS89 ; Db27 ; Db59 ; ENAF93 ; OA107 ; OA113 ; OA129 ; OA130 ; OA28 et Sah66) ont été écartées.

Au final, 3 souches: *Geobacillus* sp. Sah69 ; *Brevibacillus* sp. OA30 et *Thermoactinomyces* sp. AS95, représentant 3 genres appartenant à trois familles différentes de l'ordre des *Bacillales* et isolées à partir de 3 environnements chauds distincts, sont présélectionnées pour des essais de production de leurs protéases sur milieu de culture liquide. À signaler que les souches *Anoxybacillus* sp. Db114 et Db120 n'ont pas été retenues parmi cette présélection en raison de leurs activités protéasiques, dont les valeurs étaient inférieures d'au moins 50% par rapport aux 3 souches retenues.

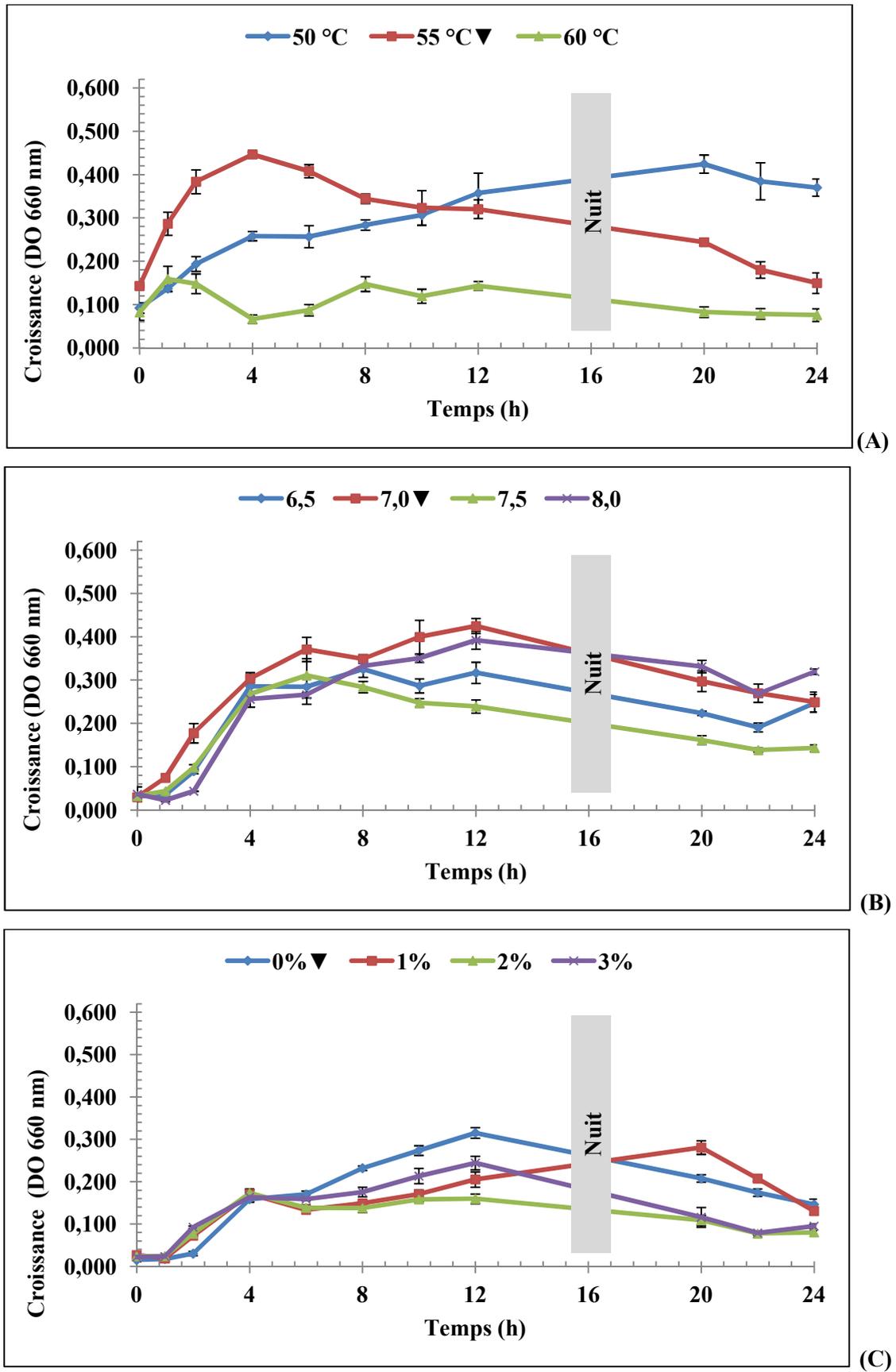


Figure 34. Suivi de la croissance de la souche *Geobacillus* sp. Sah69 sous différentes conditions physiologiques. A : Températures ; B : pH ; C : % NaCl. Symbole ▼ indique la valeur optimale.

7.2. Conditions optimales de croissance en milieu de culture liquide

Les souches *Geobacillus* sp. Sah69, *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 retenues pour la production de protéases extracellulaires sur milieu de culture liquide ont d'abord été cultivées à différentes valeurs de température, de pH, et de salinité afin de déterminer les conditions optimales de croissance en conditions de fermentation (Tableaux 51 et 52-Annexe 2).

En raison du grand nombre initial des souches, une première caractérisation des conditions optimales a été réalisée sur des microvolumes comme montré en section 6 (Palleroni, 1997). Si cette méthode reste fiable, Tindall *et al.* (2007) ont rapporté que des problèmes d'évaporation à températures élevées pourraient altérer les résultats. Il était donc judicieux de confirmer les résultats de caractérisation concernant les conditions optimales de croissances des souches choisies sur de plus grands volumes de culture dans des conditions expérimentales proches de celles utilisées pour la production des protéases.

En effet, la production des enzymes extracellulaires par les bactéries formant-endospores thermophiles est très corrélée avec les conditions de culture. Plusieurs travaux ont montré que leurs activités enzymatiques, notamment protéasiques, étaient meilleures dans les conditions optimales de croissance de l'organisme producteur (Zeikus, 1979; Teodoro et Martins, 2000; Souza et Martins, 2001; Olajuyigbe et Ajele, 2005; Silva *et al.*, 2007; Akhavan Sepahy et Jabalameli, 2011). Des valeurs de températures et de pH inférieures ou supérieures à l'optimum ralentiraient voire inhiberaient l'activité enzymatique. Il a également été rapporté que la croissance des microorganismes exigeait l'adjonction supplémentaire de nutriments lorsque la température du milieu augmentait, suggérant l'inactivation de certaines voies métaboliques (Campbell et Williams, 1953; Sürücü, 1999; Widowati *et al.*, 2017).

7.2.1. Conditions optimales de croissance de la souche *Geobacillus* sp. Sah69

Les résultats de la mesure des taux de croissance de la souche *Geobacillus* sp. Sah69 sont présentés dans la figure 34. Les valeurs de ces taux de croissance par heure (R) sont significativement plus importantes à 55 °C, à pH 7,0 et en absence de NaCl (Tableau 53-Annexe 2). Les valeurs R maximales sont de 0,144 h⁻¹ à 55 °C ; 0,074 h⁻¹ à pH 7,0 et de 0,036 à 0% (p/v) de NaCl. Ceci confirme les résultats obtenus en section 6. Deux souches de *Geobacillus stearothermophilus*, JT2 et DSM 5934, isolées d'environnements chauds terrestres ont montré une croissance optimale dans des conditions physico-chimiques similaires (Al-Qodah, 2006; Agüloğlu et Barış, 2014). Ces résultats confirment que la souche *Geobacillus* sp. Sah69 est thermophile modérée, neutrophile et halotolérante.

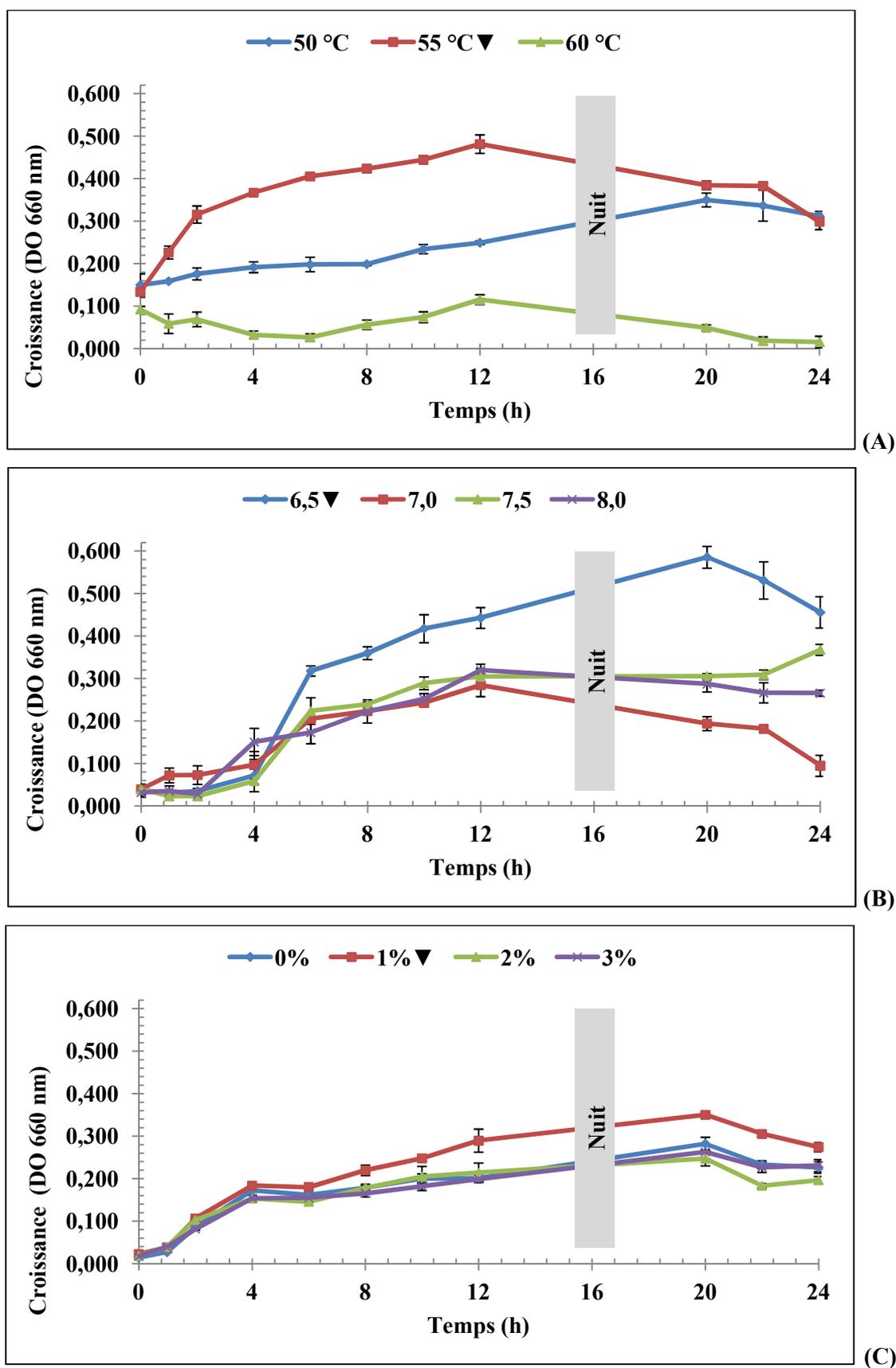


Figure 35. Suivi de la croissance de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 sous différentes conditions physiologiques. A : Températures ; B : pH ; C : % NaCl. Le symbole ▼ indique la valeur optimale.

7.2.2. Conditions optimales de croissance de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95

Le suivi de la croissance de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 en fonction du temps est présenté dans la figure 35. La croissance est meilleure de manière significative à 55 °C avec le taux de croissance horaire le plus élevé et un R maximal de 0,092 h⁻¹ à la même température (Tableau 54-Annexe 2). Ceci correspond au caractère de thermophilie des membres de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris* décrit par Goodfellow et Jones (2015b). La souche est légèrement acidophile et présente une croissance optimale à une valeur de pH de 6,5 ; elle est également halotolérante avec les meilleures valeurs de R en présence de 1% (p/v) de NaCl. Les valeurs R maximales sont de 0,047 h⁻¹ à pH 6,5 et de 0,042 à 1% (p/v) de NaCl.

La plupart des souches de *Thermoactinomyces* isolées à partir d'environnements chauds et exploitées dans la production de protéases extracellulaires sont décrites dans la littérature comme étant souvent halotolérantes et alcaliphiles, avec des optima supérieurs à pH 8,0 (Tsuchiya *et al.*, 1991; Petrova *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2014). La caractérisation phénétique de ce groupe taxonomique est de manière générale partiellement connue avec peu de données disponibles (Goodfellow et Jones, 2015a).

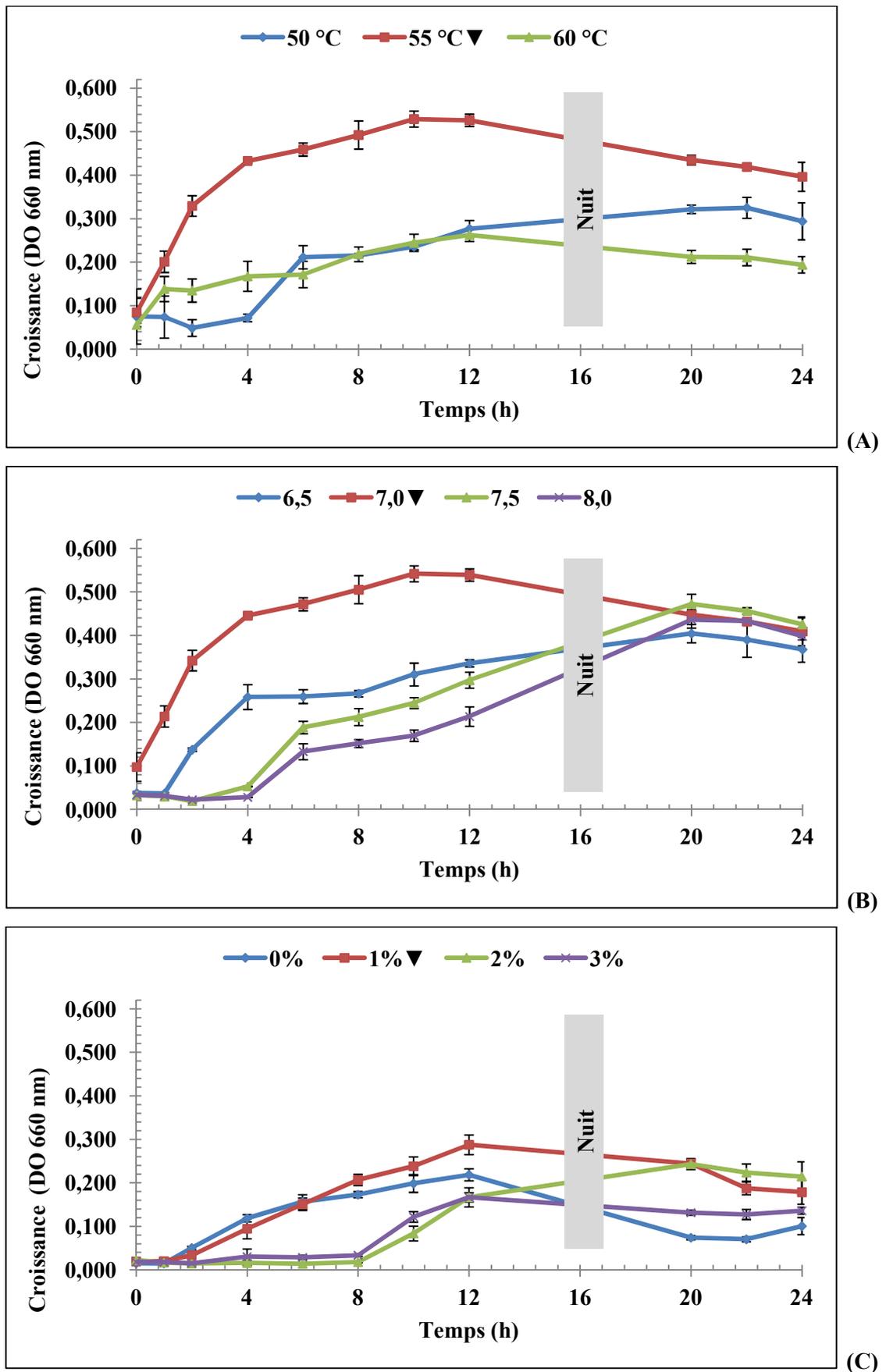


Figure 36. Suivi de la croissance de la souche *Brevibacillus* sp. OA30 sous différentes conditions physiologiques. A : Températures ; B : pH ; C : % NaCl. Le symbole ▼ indique la valeur optimale.

7.2.3. Conditions optimales de croissance de la souche *Brevibacillus* sp. OA30

Le suivi de la croissance de la souche *Brevibacillus* sp. OA30 en fonction du temps sur différentes valeurs de température, de pH et de concentration en NaCl est présentée dans la figure 36. Les résultats confirment les données rapportées en section 6. La souche *Brevibacillus* sp. OA30 est thermophile modérée avec un optimum à 55 °C. Elle est également neutrophile avec un pH optimum de croissance de 7,0 et halotolérante avec une concentration optimale en NaCl de 1% (p/v). Ces résultats sont confirmés par des valeurs de R des cultures de *Brevibacillus* sp. OA30. Les valeurs R maximales sont de 0,122 h⁻¹ à 55 °C ; 0,122 h⁻¹ à pH 7,0 et de 0,023 à 1% (p/v) de NaCl (Tableau 55-Annexe 2). Le *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* rapporte des optima entre 45 et 48 °C et un pH de 8,0 à 9,0 pour les membres de l'espèce *Brevibacillus thermoruber* (Logan et Vos, 2015b). La souche *Brevibacillus thermoruber* 423, isolée à partir d'une source chaude terrestre en Bulgarie (température de l'eau *in situ* 59 °C; pH 6,5), présente des valeurs optimales de croissance similaires (optima à 55 °C et à pH 7,0) (Yildiz *et al.*, 2015). Deux autres souches, *Brevibacillus thermoruber* LII et Yas-1, isolées de sources chaudes en Indonésie et au Japon respectivement, se développaient de manière optimale à 55 °C, et à pH 7,0 (Suzuki *et al.*, 2009; Seswita Zilda *et al.*, 2012b).

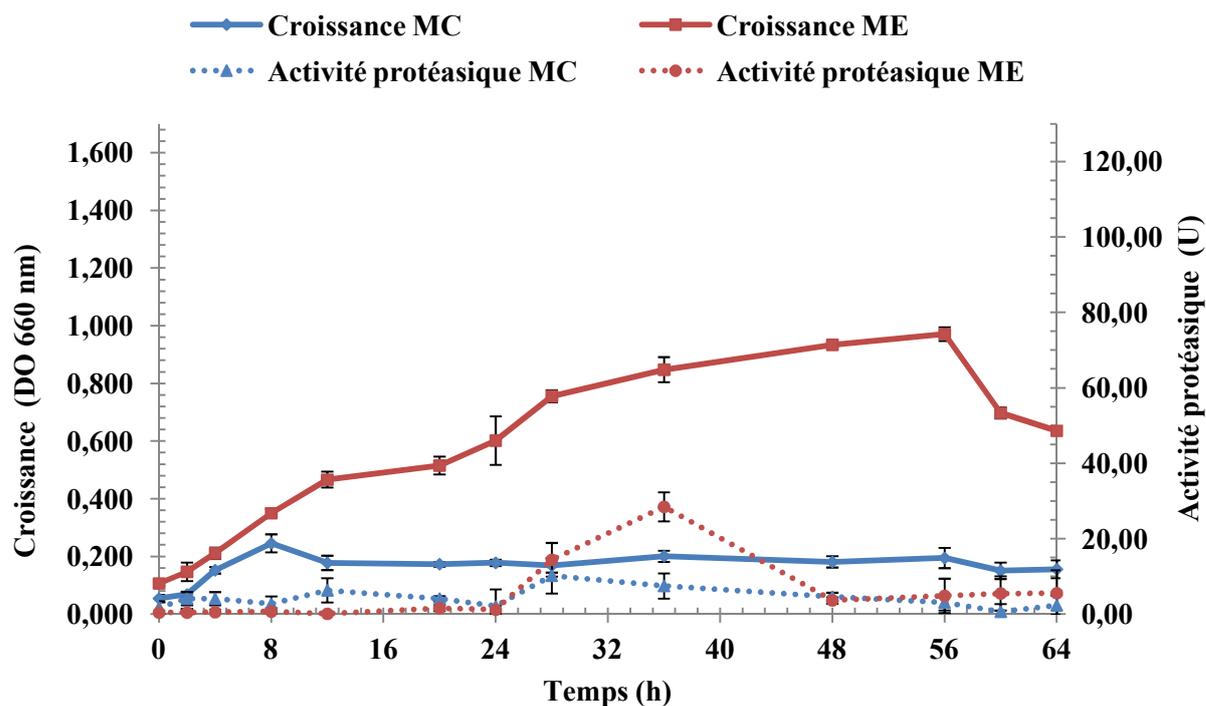


Figure 37. Cinétiques de croissance et de production de protéases extracellulaires par la souche *Geobacillus sp. Sah69* sur les milieux de culture à la caséine (MC) et au lait écrémé (ME).

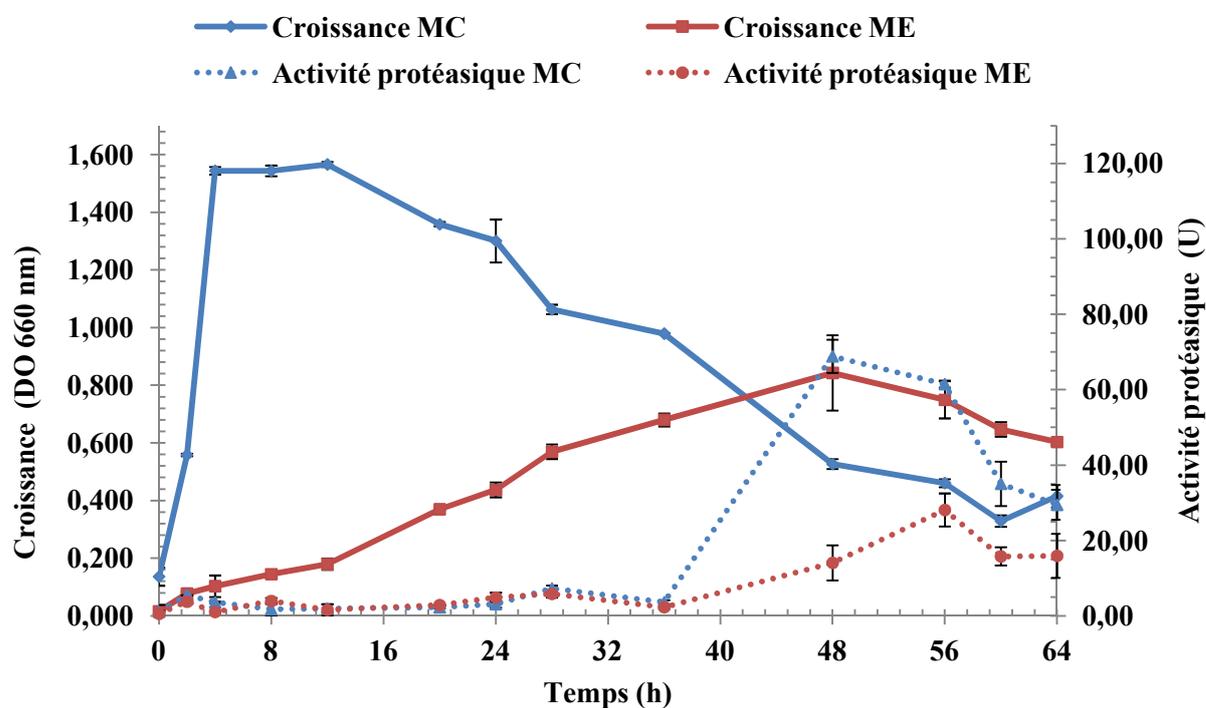


Figure 38. Cinétiques de croissance et de production de protéases extracellulaires par la souche *Thermoactinomyces sp. AS95* sur les milieux de culture à la caséine (MC) et au lait écrémé (ME).

7.3. Production des protéases extracellulaires

Des essais de production des protéases extracellulaires des souches *Geobacillus* sp. Sah69, *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 ont été menés en double dans des conditions de croissance optimales, sous agitation et en présence de deux sources de substrat : la caséine pour le milieu de culture MC et le lait écrémé pour le milieu de culture ME (Tableau 56-Annexe 2).

7.3.1. Production de protéases extracellulaires par la souche *Geobacillus* sp. Sah69

La cinétique de production de protéases extracellulaires par la souche *Geobacillus* sp. Sah69 est montrée dans la figure 37. La meilleure croissance a été constatée sur le milieu de culture ME avec l'apparition de la première activité protéasique après 28 heures d'incubation avec un pic enregistré à 36 heures situé dans la phase de croissance exponentielle. En revanche, la croissance a été très faible sur le milieu de culture MC avec une activité protéasique quasi absente.

Le rendement faible de la culture a été vérifié avec deux nouveaux essais de productions sur des milieux de culture avec des compositions modifiées en concentration de caséine, de glucose et de peptone, mais sans succès (données non publiées dans cette étude). En raison des difficultés rencontrées dans l'induction de la production de ses activités protéolytiques, la souche *Geobacillus* sp. Sah69 a donc été écartée pour la suite du travail.

Cependant, des travaux adoptant des méthodologies similaires ont été menés avec succès. Par exemple, les souches de *Geobacillus stearothermophilus* AP4 (Dhandapani et Vijayaragavan, 1994), *Geobacillus stearothermophilus* F1 (Rahman *et al.*, 1994), *Geobacillus stearothermophilus* TLS33 (Sookkheo *et al.*, 2000) et *Geobacillus stearothermophilus* RM-67 (Chopra et Mathur, 1985), isolées à partir d'environnements chauds et tempérés, présentaient de bonnes activités protéasiques sur des milieux de culture à la caséine et au lait écrémé. Les meilleures activités protéolytiques ont été envers la caséine qu'envers d'autres protéines (gélatine, albumine, hémoglobine, etc.). De même, des protéases thermolysine-like ont été produites et caractérisées à partir des souches de *Geobacillus stearothermophilus* KP 1236 (Takii *et al.*, 1987) et *Geobacillus stearothermophilus* CU21 (Takagi *et al.*, 1985) dans des conditions comparables.

La production de protéases chez *Bacillus*, un genre proche de *Geobacillus*, est dépendante d'un certain nombre de facteurs comme l'espèce, le type d'enzyme et la composition du milieu de culture (Marathe *et al.*, 2018). Ainsi, cette production est induite par la caséine, substrat non spécifique de la plupart des protéases extracellulaires microbiennes (Razak *et al.*,

1994; Nurkasanah et Widodo, 2015). À l'opposé, elle est sujette à une répression catabolique en présence de concentrations élevées en glucose et en sources d'azote comme les peptones, les peptides et certains acides aminés (Vermelho *et al.*, 1996; Stülke et Hillen, 1999; Dutt *et al.*, 2008). Toutefois, l'ajout de ces nutriments en concentrations limitées permet d'améliorer les taux de croissance et les rendements en protéases extracellulaires produites souvent au cours de la phase exponentielle ou parfois en début de la phase stationnaire qui coïncide avec le début de la sporulation (Priest, 1977; Priest, 1987).

De nombreux éléments du milieu de production peuvent affecter l'activité enzymatique comme le pH, la concentration en phosphate, la présence d'ions métalliques, la température et la vitesse d'agitation (Castro *et al.*, 1991; Rahman *et al.*, 2003). Si les conditions expérimentales utilisées pour la souche *Geobacillus* sp. Sah69 sont comparables à celles employées pour la production de protéases par les souches de *Geobacillus* citées précédemment, la répression de l'activité protéasique par l'un de ces facteurs n'est pas à exclure.

7.3.2. Production de protéases extracellulaires par la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95

Les résultats des deux essais de production de protéases extracellulaires par la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 sont montrés dans la figure 38. La croissance sur milieu de culture MC a été très importante avec une phase exponentielle de moins de 8 heures suivie par un déclin rapide de l'absorbance de la culture. Durant cette phase, un pic d'activité protéasique a été enregistré à 48 heures ($68,833 \text{ U} \pm 4,405$) avec une perte de 57,19% de cette activité à 64 heures ($29,467 \text{ U} \pm 3,980$). La corrélation entre la croissance de la souche AS95 et la sécrétion de protéases correspond à ce qui a été rapporté pour des souches de *Thermoactinomyces* (Petrova *et al.*, 2006; Aksoy *et al.*, 2012) et de *Bacillus* (Sareen et Mishra, 2008; Rai et Mukherjee, 2009). La production de protéases chez les bactéries à Gram positif est partiellement inductible sous des conditions de croissance très variables (Porto *et al.*, 1996; Brar *et al.*, 2007).

Sur le milieu de culture ME, la croissance de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 est moins importante avec une phase exponentielle lente qui a duré environ 48 heures. L'activité enzymatique sur ce milieu de culture est détectée pour la première fois après 48 heures de fermentation avec un maximum enregistré après 56 heures d'incubation ($28,100 \text{ U} \pm 4,371$). Cette activité contre le lait écrémé a été significativement moins importante comparée à celle enregistrée sur le milieu de culture caséiné.

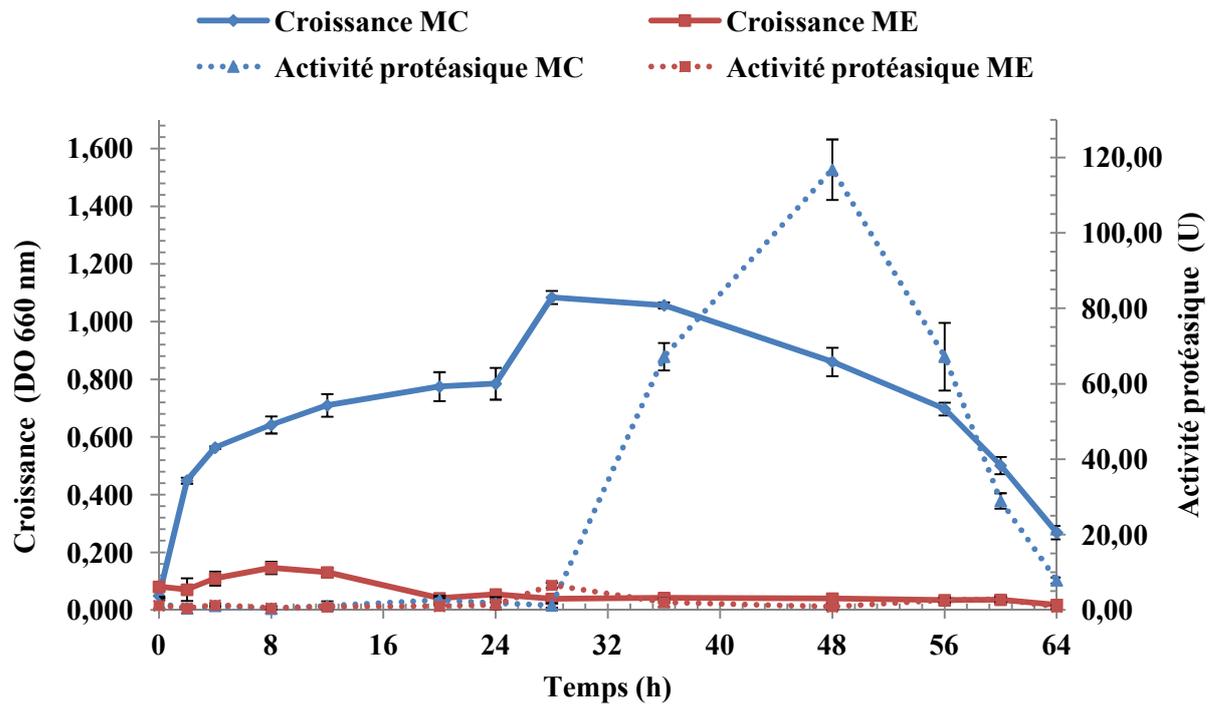


Figure 39. Cinétiques de croissance et de production de protéases extracellulaires par la souche *Brevibacillus* sp. OA30 sur les milieux de culture à la caséine (MC) et au lait écrémé (ME).

La composition en nutriments organiques et non organiques du lait écrémé pourrait être en cause de l'inhibition de l'activité protéasique (Dutt *et al.*, 2008).

Des sérine-protéases d'intérêt biotechnologique ont été produites comme principales protéines extracellulaires dans des conditions semblables par des souches de *Thermoactinomyces vulgaris* (Goodfellow et Jones, 2015a). Par exemple, pour la thermitase, le maximum de production est obtenu après 5 heures d'incubation à 50 °C et à pH 7,3 (Leuchtenberger et Ruttloff, 1983). Une autre souche produisait 3 sérine-protéases après 22 heures d'incubation (Kretschmer, 1982).

7.3.3. Production de protéases extracellulaires par la souche *Brevibacillus* sp. OA30

La figure 39 montre les résultats des essais de production des protéases extracellulaires par la souche *Brevibacillus* sp. OA30. Le milieu de culture ME n'est pas adapté à la croissance de la souche qui a montré une turbidité très basse (absorbance à 660 nm inférieure à 0,200) et absence de toute activité protéasique. En revanche, la croissance sur le milieu de culture caséiné MC a été appréciable avec une phase exponentielle de plus de 24 heures avec l'apparition de la première activité protéasique à 36 heures ($67,233 \text{ U} \pm 3,645$) et un pic enregistré à 48 heures ($116,833 \text{ U} \pm 8,009$). Cette activité diminue de manière rapide jusqu'à la perte de 93,23% de sa valeur à 64 heures ($7,900 \text{ U} \pm 0,781$). Ces résultats concordent avec les conditions de production des protéases extracellulaires décrites pour des souches de *Brevibacillus* (Maeda *et al.*, 2011; Rai et Mukherjee, 2011; Wang *et al.*, 2012; Mishra, 2016). Au vu des bonnes activités protéasiques montrées par *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 sur le milieu de culture à la caséine, ces deux souches ont été sélectionnées pour la purification de leurs extraits protéasiques.

7.4. Purification des protéases extracellulaires des souches *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30

Les cultures des souches *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 sur milieu de culture MC ont été utilisées pour l'extraction et la purification de leurs protéases extracellulaires.

7.4.1. Extraction des protéines extracellulaires

Les surnageants obtenus après centrifugation de chaque culture constituent les extraits enzymatiques bruts. Ces extraits sont soumis à une série d'étapes d'extraction allant de la filtration, la précipitation au sulfate d'ammonium et jusqu'à la dialyse. L'activité protéasique

Résultats et Discussion

Tableau 59. Résultats des étapes d'extraction pour la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95.

Étape d'extraction	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	93,66 ± 4,17	68,3 ± 4,4	0,73	100,00	1,00
Filtrat à 0,45 µm	79,50 ± 0,97	55 ± 6,9	0,69	80,53	0,95
Filtrat à 0,2 µm	77,04 ± 0,78	51,4 ± 4,4	0,67	75,26	0,92
Précipitat à 80% (p/v) de (NH ₄) ₂ SO ₄	24,55 ± 3,90	46,9 ± 0,3	1,91	68,67	2,62
Surnageant à 80% (p/v) de (NH ₄) ₂ SO ₄	2,54 ± 1,56	7,1 ± 0,7	2,79	10,40	/
Dialysat	3,86 ± 0,07	42 ± 0,4	10,87	61,49	14,91
Dialysat filtré à 0,2 µm	3,58 ± 0,05	40,5 ± 1,3	11,33	59,30	15,53

/ : valeur non calculée.

Tableau 60. Résultats des étapes d'extraction pour la souche *Brevibacillus* sp. OA30.

Étape d'extraction	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	131,78 ± 3,08	147,2 ± 1,7	1,12	100,00	1
Filtrat à 0,45 µm	117,39 ± 2,15	143,7 ± 2,2	1,22	97,62	1,10
Filtrat à 0,2 µm	104,20 ± 1,40	135,6 ± 6,9	1,30	92,12	1,17
Précipitat à 80% (p/v) de (NH ₄) ₂ SO ₄	32,09 ± 1,34	130,1 ± 3,3	4,05	88,38	3,63
Surnageant à 80% (p/v) de (NH ₄) ₂ SO ₄	4,20 ± 2,35	2,0 ± 0,1	0,48	1,36	/
Dialysat	11,90 ± 0,45	128,1 ± 1,7	10,76	87,02	9,64
Dialysat filtré à 0,2 µm	10,76 ± 0,74	123,4 ± 2,4	11,46	83,83	10,26

/ : valeur non calculée.

contre l'azocaséine et le contenu total en protéines sont mesurés après chaque étape (Tableau 57-Annexe 2). La courbe d'étalonnage de la concentration en BSA déterminée par la méthode de Bradford est présentée en annexe 2 (Tableau 58 et Figure 40).

Les résultats de l'extraction des extraits des souches *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 sont présentés dans les tableaux 59 et 60, respectivement.

Le rendement de l'extraction à partir de la culture *Thermoactinomyces* sp. AS95 était faible avec une perte de 41,70% de l'activité protéasique totale dont 10,40% dans le surnageant après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% (p/v). En revanche, une activité spécifique élevée (11,33 U/mg) est enregistrée avec un facteur de purification de 15,53 après filtration du dialysat.

Aksoy *et al.* (2012) ont obtenu un rendement de 66,53% après précipitation des extraits protéasiques au sulfate d'ammonium à 90% (p/v) d'une souche de *Thermoactinomyces* sp. L'extraction d'une protéase produite par une souche de *Thermoactinomyces* a été réalisée à 70% (p/v) de sulfate d'ammonium. Le rendement en activité protéasique était de 61,00% alors que le facteur de purification était de 18,71 (Petrova *et al.*, 2006).

Pour la culture de *Brevibacillus* sp. OA30, le rendement est très important. Il était de 83,83%, avec 16,17% de perte en activité uniquement, dont 1,36% sont retrouvés dans le surnageant après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% (p/v). Le facteur de purification à la fin des étapes d'extraction était de 10,26. L'activité protéasique spécifique était légèrement plus élevée que celle des extraits de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 (11,46 U/mg). Les extraits protéasiques issus d'une souche thermophile de *Brevibacillus* sp. ont donné après précipitation à 70% (p/v) de sulfate d'ammonium un rendement de 29,80% avec un facteur de purification de 16,00 (Maeda *et al.*, 2011). Jaouadi *et al.* (2013) ont obtenu un rendement de 80% et un facteur de purification de 8,24 après la même étape avec des extraits protéasiques d'une souche de *Brevibacillus brevis*.

L'extrait protéasique de la souche *Brevibacillus* sp. OA30 a été sélectionné pour l'étape de purification et de caractérisation en raison du rendement d'extraction plus important et de l'activité enzymatique spécifique élevée.

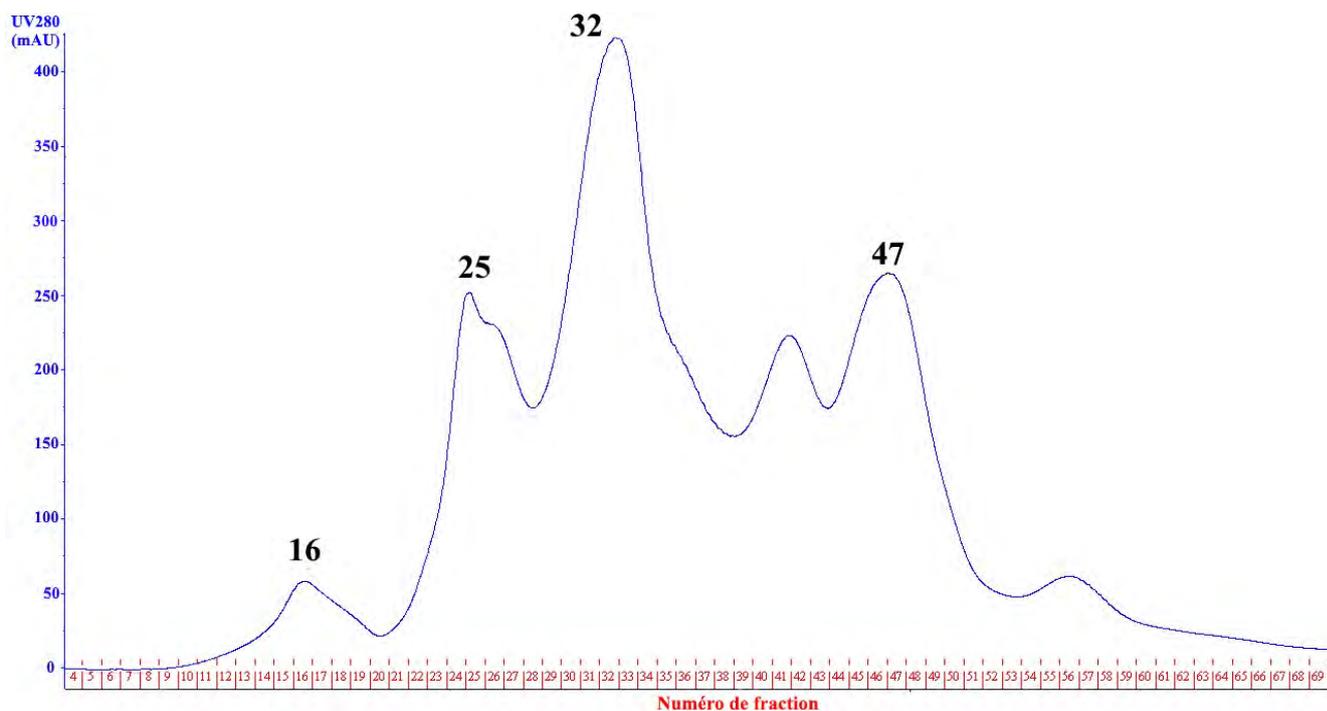


Figure 41. Chromatogramme de la purification de l'extrait protéasique de la culture *Brevibacillus* sp. OA30 sur colonne échangeuse d'anions. Les pics obtenus ayant révélé une activité protéasique sont codés par le numéro de la fraction correspondante.

Tableau 61. Résultats de la purification sur colonne échangeuse d'anions de la culture *Brevibacillus* sp. OA30.

Étape d'extraction	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	131,78 ± 3,08	147,2 ± 1,7	1,12	100,00	1
Pic 16	1,37 ± 0,19	20,2 ± 0,7	14,71	13,72	13,17
Pic 25	4,61 ± 0,09	16,8 ± 2,2	3,65	11,41	3,26
Pic 32	2,54 ± 0,04	30 ± 1,2	11,79	20,38	10,56
Pic 47	2,90 ± 0,09	11,9 ± 2,3	4,11	8,08	3,68
Résidus du flux continu	2,41 ± 0,02	24,7 ± 1,1	10,26	16,78	/

/ : valeur non calculée

Tableau 62. Résultats de la concentration sur système Amicon des fractions protéasiques de la culture *Brevibacillus* sp. OA30 obtenues par chromatographie échangeuse d'anions.

Étape d'extraction	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)
Pic 16	0,68 ± 0,04	122,6 ± 4,2	180,86
Pic 25	1,88 ± 0,08	91,0 ± 8,5	48,46
Pic 32	1,06 ± 0,02	113,9 ± 4,1	107,40
Pic 47	1,29 ± 0,04	43,3 ± 3,7	33,65

7.4.2. Purification des extraits protéasiques

Les extraits protéasiques produits par une culture de *Brevibacillus* sp. OA30 sur milieu de culture MC ont été purifiés par méthodes chromatographiques.

7.4.2.1. Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions

Le résultat de la purification partielle sur colonne échangeuse d'anions a révélé la présence de 6 pics comme le montre le chromatogramme en figure 41. L'activité protéasique contre l'azocaséine des fractions collectées a été testée et celles appartenant aux 4 pics nommés 16, 25, 32 et 47, respectivement, ont révélé la présence d'activités protéasiques (Tableau 61). Deux de ces fractions, 16 et 32, ont montré des activités protéasiques spécifiques notables de 14,71 U/mg (rendement de 13,72%, facteur de purification de 13,17) et de 11,79 U/mg (rendement de 20,38%, facteur de purification de 10,56), respectivement. Une activité relative équivalente à 16,78% de rendement de purification est observée dans le flux résiduel continu à la fin de la chromatographie. Ces 4 fractions ont été concentrées sur système Amicon et l'effet de cette concentration sur l'activité protéasique est montré dans le tableau 62.

La présence de plusieurs protéases extracellulaires chez les souches de *Brevibacillus* isolées à partir d'environnements similaires a été rapportée (Lee Tsay *et al.*, 2004; Sinsuwan *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2011). Dans le cas de la souche *Brevibacillus thermoruber* LII, le fractionnement des extraits protéasiques sur colonne échangeuse d'anions a révélé la présence dans la même fraction de plusieurs protéases. Le rendement était de 26,79% avec un facteur de purification de 8,63 (Zilda *et al.*, 2014).

Les espèces thermophiles de *Brevibacillus* sont bien connues pour être de bons producteurs de protéases extracellulaires (Sinsuwan *et al.*, 2006; Logan et Vos, 2015b; Tripathy *et al.*, 2016). Le séquençage des génomes de deux souches de *Brevibacillus thermoruber* PM1 et 423 isolées à partir de sources thermales a indiqué la présence de gènes codant pour la subtilisine, la lactocépine ainsi que plusieurs autres protéases putatives extracellulaires, essentiellement des sérines-protéases et des métaloprotéases (King, 2014; Yildiz *et al.*, 2015).

Les pics 16 et 32 ont montré les activités les plus importantes, leurs fractions ont donc été choisies pour poursuivre la purification par gel filtration.

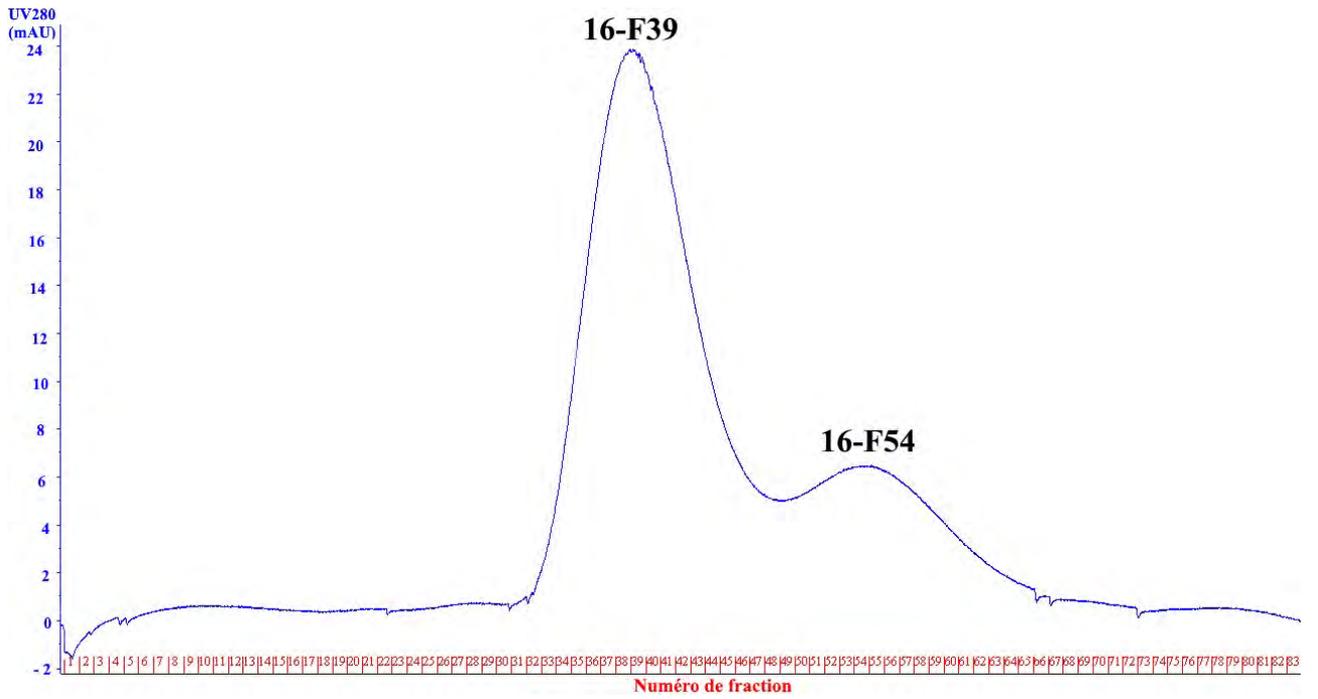


Figure 42. Chromatogramme de la purification de la fraction 16 de la culture *Brevibacillus* sp. OA30 par filtration sur gel.

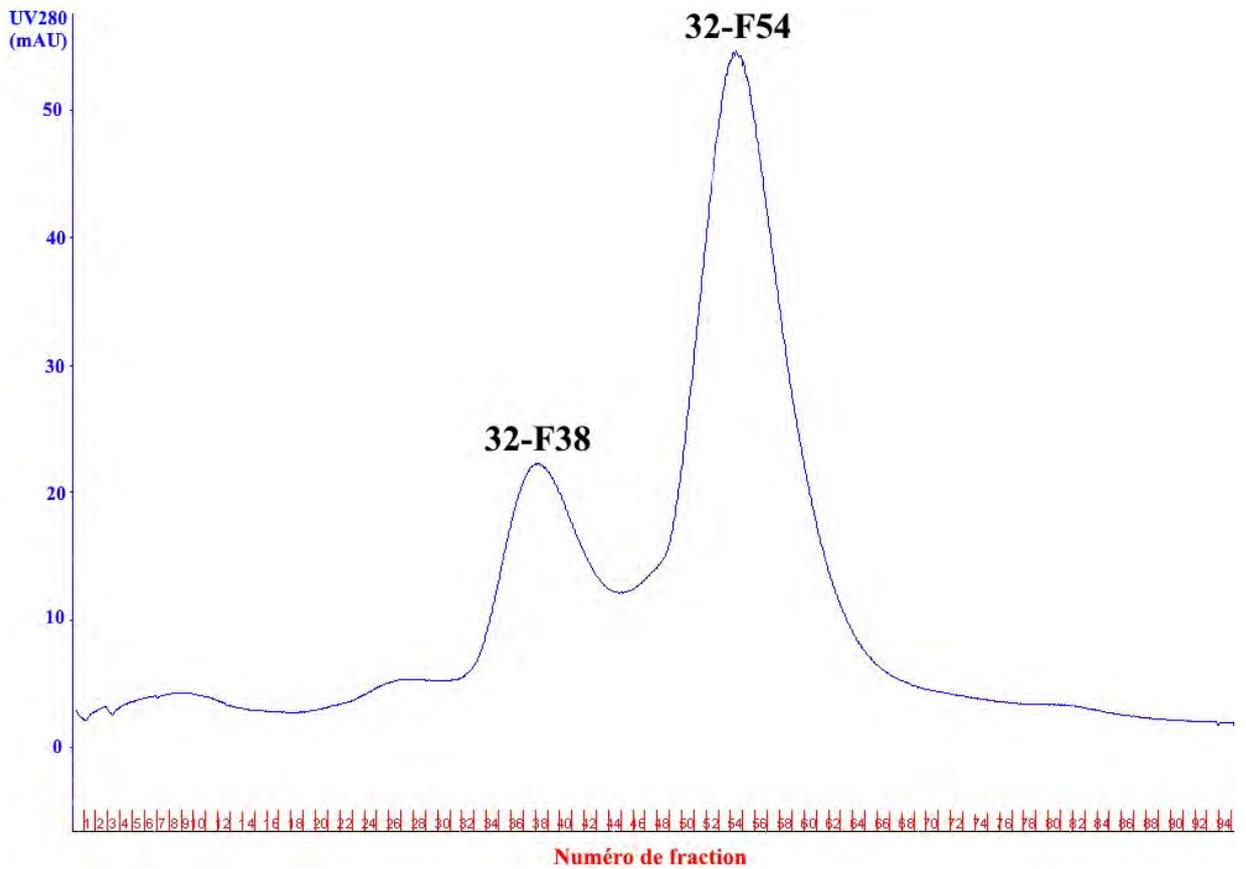


Figure 43. Chromatogramme de la purification de la fraction 32 de la culture *Brevibacillus* sp. OA30 par filtration sur gel.

7.4.2.2. Fractionnement par filtration sur gel

Les résultats de la purification des fractions 16 et 32 de la chromatographie échangeuse d'anions par filtration sur gel sont montrés dans les figures 42 et 43.

Dans les deux cas, les chromatogrammes ont révélé la présence de deux pics : 39 et 54 pour la fraction 16 ; 38 et 54 pour la fraction 32. Les deux pics 16-F54 et 32-F54 n'ont montré aucune activité protéasique contre l'azocaséine alors que les fractions 16-F39 et 32-F38 sont dotées d'activités protéasiques (tableau 63). Les rendements en activité des deux fractions sont de 16,51% et de 18,61% avec des facteurs de purification de 15,43 et de 14,60, respectivement. Zilda *et al.* (2014) ont obtenu un rendement de 3,19 et un facteur de purification de 26,79 pour la purification par filtration sur gel d'une fraction protéasique de *Brevibacillus thermoruber* LII obtenue sur colonne échangeuse d'anions.

Les valeurs détaillées des mesures de l'activité protéasique et de la concentration protéique sont montrées en Annexe 2-Tableau 64.

Tableau 63. Résultats de la purification sur colonne de filtration sur gel de la culture *Brevibacillus* sp. OA30 avant et après concentration sur système amicon.

Étape d'extraction		Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut		131,78 ± 3,08	147,2 ± 1,7	1,12	100,00	1
Avant concentration	Pic 16-F39	1,31 ± 0,20	24,3 ± 1,1	17,23	16,51	15,43
	Pic 32-F38	1,68 ± 0,06	27,4 ± 1,0	16,31	18,61	14,60
Après concentration	Pic 16-F39	1,37 ± 0,10	52,1 ± 2,6	38,16	/	/
	Pic 32-F38	1,69 ± 0,02	55,6 ± 2,9	32,99	/	/

/ : valeur non calculée.

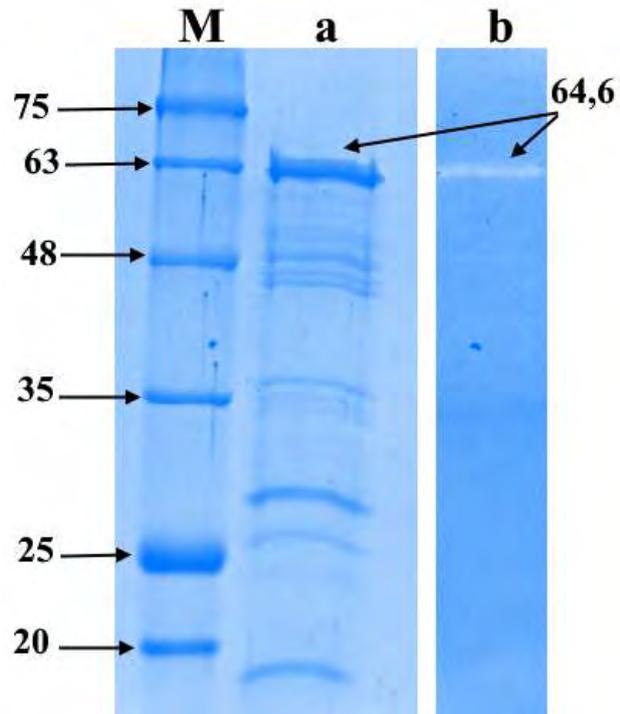


Figure 44. Purification et analyse électrophorétique de la protéase 32-F38. M : marqueurs protéiques (kDa) ; (a) : SDS-PAGE de la protéase partiellement purifiée par gel filtration (b) : confirmation de l'activité protéasique par zymographie.

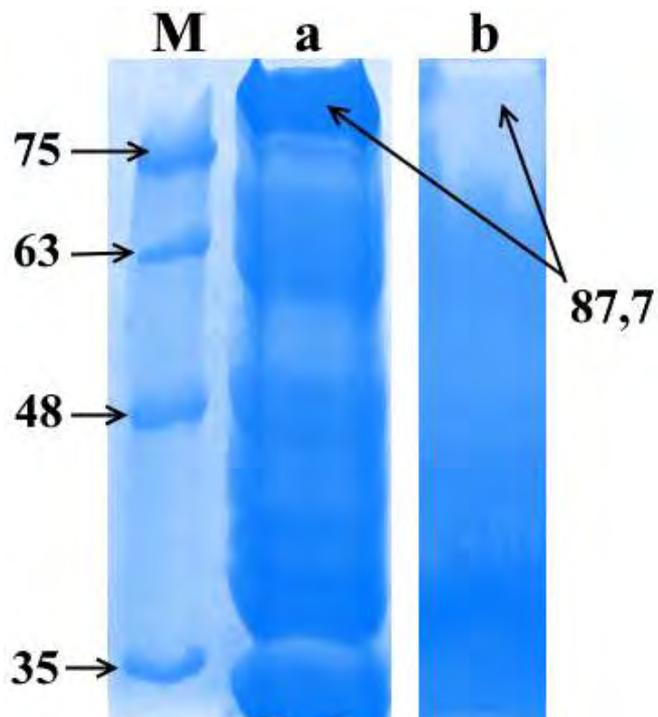


Figure 45. Purification et analyse électrophorétique de la protéase 16-F39. M : marqueurs protéiques (kDa) ; (a) : SDS-PAGE de la protéase partiellement purifiée par gel filtration (b) : confirmation de l'activité protéasique par zymographie.

7.5. Caractéristiques des protéases purifiées

Les fractions protéasiques 32-F38 et 16-F39 sont caractérisées biochimiquement et biophysiquement.

7.5.1. Poids moléculaire et zymogramme

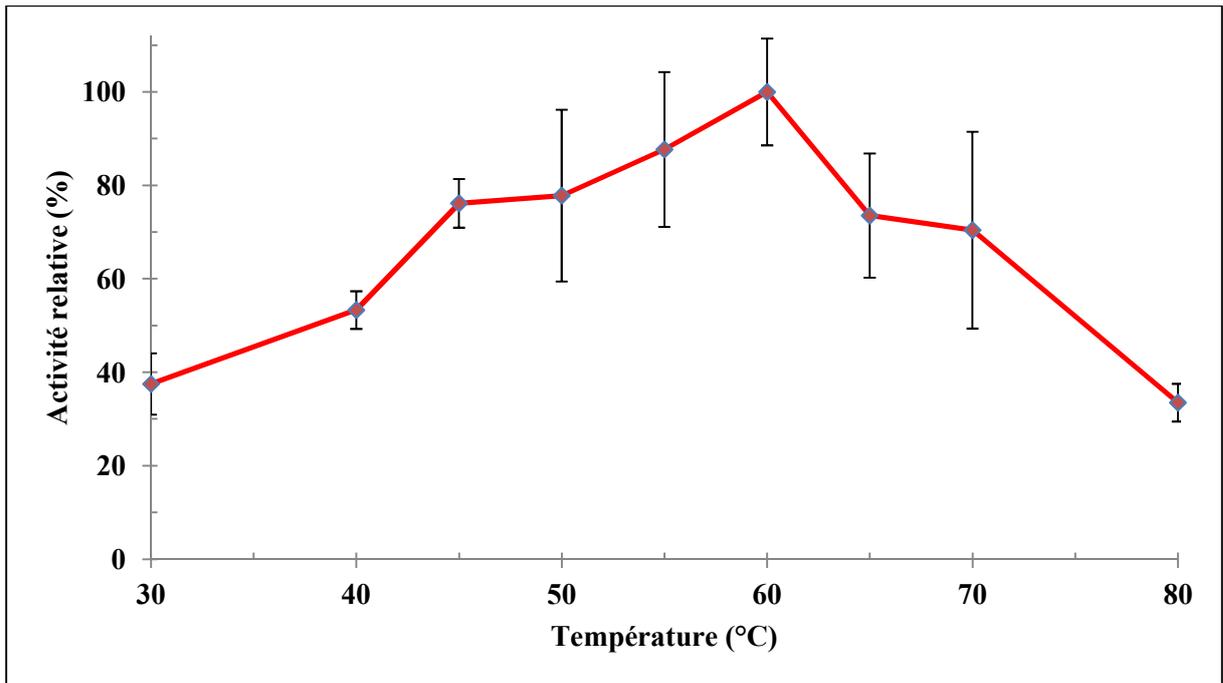
Une électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE et une zymographie en présence de substrat protéique ont été réalisées sur les fractions 32-F38 et 16-F39. D'après les résultats de l'analyse des deux gels, la fraction 32-F38 contient une seule bande avec une activité protéasique confirmée dont son poids moléculaire est estimé à 64,6 kDa (Figure 44).

La fraction 16-F39 contient elle aussi une seule bande à une hauteur d'environ 87,7 kDa avec une activité confirmée (Figure 45). La présence de la même bande en conditions dénaturantes et non dénaturantes indiquerait la présence de protéases monomériques (Lakshmi Bhargavi et Prakasham, 2013). Les deux protéases ont été baptisées 32-F38 et 16-F39, respectivement.

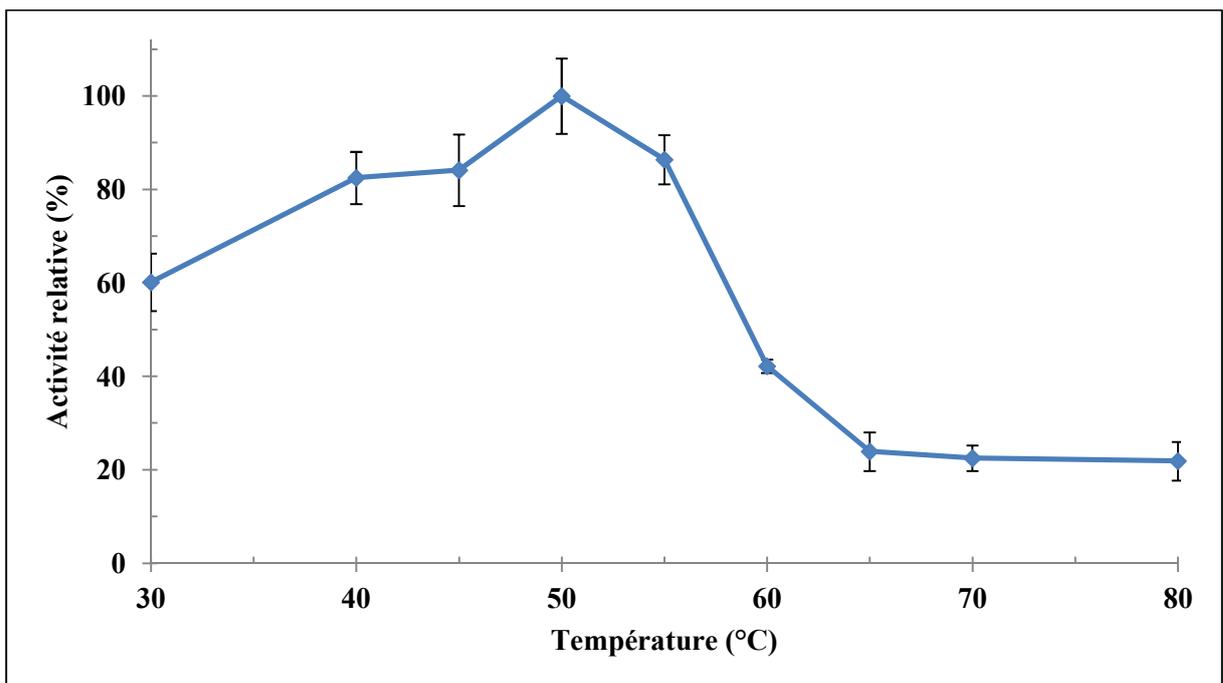
Les courbes étalons utilisées pour la détermination des poids moléculaires des protéases sont présentées en figure 46 (Annexe 2).

La purification des protéases monomériques avec des poids moléculaires entre 60 et 66 kDa à partir des espèces de *Brevibacillus* a déjà été rapportée dans la littérature (Seswita Zilda *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2012; Zilda *et al.*, 2014). Des protéases monomériques à haut poids moléculaire ont déjà été isolées à partir de membres de *Brevibacillus* : une Lon protéase de 88 kDa de *Brevibacillus thermoruber* WR-249 (Lee Tsay *et al.*, 2004) ; une sérine protéase de 97 kDa de *Brevibacillus thermoruber* LII (Seswita Zilda *et al.*, 2012b) ; une β -kératinase de 83,2 kDa de *Brevibacillus* sp. AS-S10-II (Rai et Mukherjee, 2011).

De manière générale, la production de protéases extracellulaires monomériques de poids moléculaires différents par des bactéries à Gram positif formant-endospores thermophiles et mésophiles a été signalée par de nombreux auteurs (Okamoto *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2006; Hrabák et Martínek, 2007; Ghosh *et al.*, 2008; Agrebi *et al.*, 2010).



(A)



(B)

Figure 47. Effet de la variation de température sur les activités des protéases. A : 16-F39 ; B : 32-F38.

7.5.2. Températures optimales des activités protéasiques

Les résultats du dosage des activités enzymatique contre l'azocaséine des protéases 16-F39 et 32-F38 à différentes températures sont présentés en figure 47.

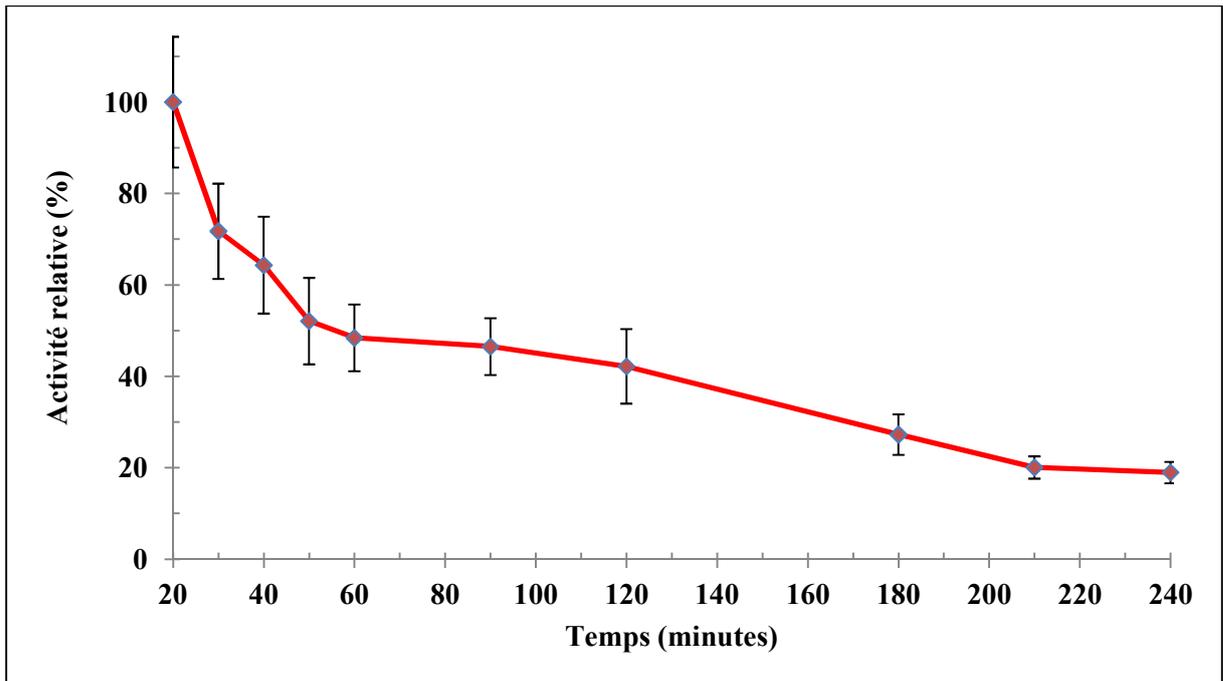
La protéase 16-F39 a montré une activité maximale à 60 °C. Des pertes de 24% d'activité par rapport à cette dernière à 45 °C et de 29% à 70 °C ont été enregistrées. À noter que l'écart type entre les triplicatas pour les températures 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C et à 70 °C étaient respectivement de 18,36 % ; 16,57% ; 11,43% ; 13,28% et 21,07% (voir Tableau 66-Annexe 2). Ceci pourrait indiquer une instabilité de l'enzyme à cet intervalle de température dans les conditions expérimentales.

Jaouadi *et al.* (2013) ont déjà signalé une augmentation des valeurs de l'écart type entre les essais de mesure de l'activité d'une kératinase appartenant à la souche *Brevibacillus brevis* US575 avec l'élévation de la température des essais. Ces écarts étaient surtout notés sur un intervalle entre 40 °C et 65 °C.

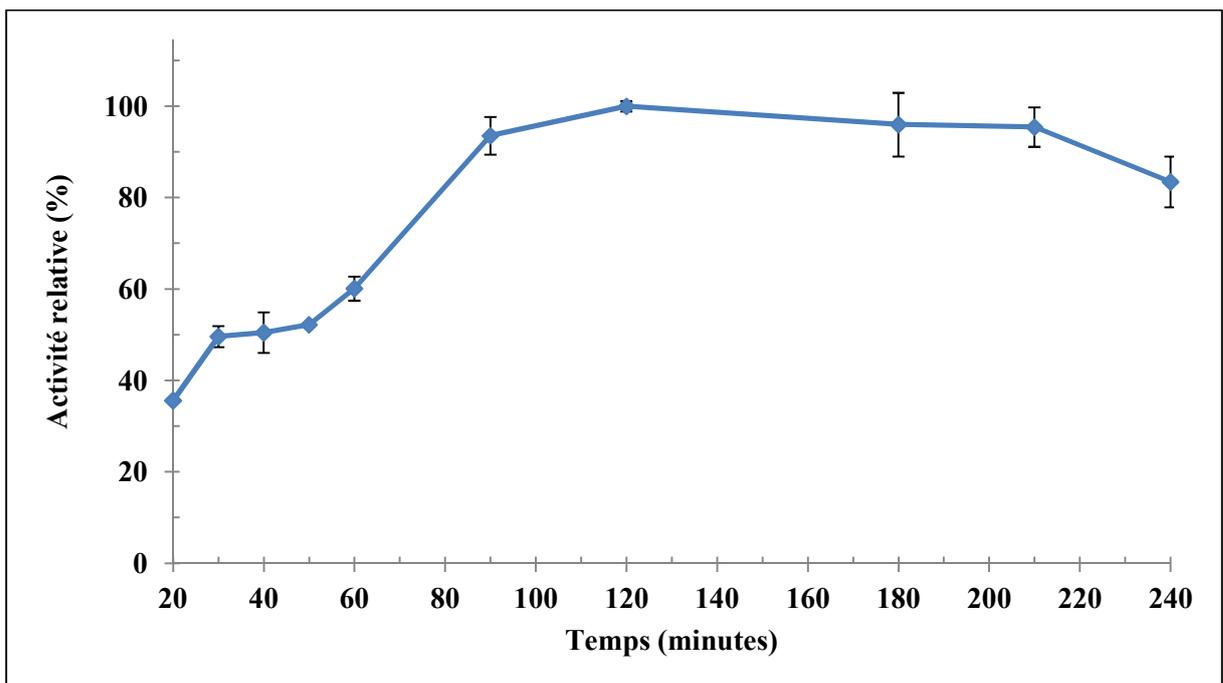
Si certaines enzymes thermoactives montrent une grande stabilité à températures élevées, d'autres enzymes sont instables dans des préparations pures et nécessitent la capacité de stabilisation des conditions cellulaires/membranaires. Les tests de thermoactivité et de thermostabilité sont compliqués à mener du fait de l'instabilité de certains composants de l'expérimentation comme les substrats, les tampons et les cofacteurs enzymatiques, mais aussi en raison de l'accélération du processus d'oxydation (Daniel et Danson, 2001; Illanes *et al.*, 2008; Bisswanger, 2014).

Pour ce qui est de la protéase 32-F38, elle a une activité maximale à 50 °C et garde 80% de cette activité à 40 °C et à 55 °C.

La brevicarnase, une kératinase purifiée à partir de *Brevibacillus* sp. AS-S10-II (croissance optimale à 45 °C) a montré un maximum d'activité à 45 °C (Rai et Mukherjee, 2011). Deux protéases de *Brevibacillus thermoruber* LII (optimum de croissance à 55 °C) présentaient des activités maximales à 50 °C et à 85 °C, respectivement (Seswita Zilda *et al.*, 2012a; Seswita Zilda *et al.*, 2012b; Zilda *et al.*, 2014). La protéase alcaline de *Brevibacillus* sp. PLI-1 (croissance optimale à 55 °C) a montré une meilleure activité à 70 °C (Wang *et al.*, 2012). Une autre protéase alcaline isolée à partir de *Brevibacillus brevis* (croissance optimale à 37 °C) avait un optimum d'activité à 60 °C (Banerjee *et al.*, 1999).



(A)



(B)

Figure 48. Stabilité des protéases à température optimale. A : 16-F39 à 60 °C ; B : 32-F38 à 50 °C.

Des travaux s'intéressant à l'influence de la température sur l'activité enzymatique des protéines thermoactives ont indiqué que l'effet de l'augmentation de la température n'était pas uniquement lié à la perte de la structure tertiaire qui avait un effet global sur l'enzyme, mais également à l'état du site actif. La stabilité de ce dernier avec l'augmentation de la température est le principal facteur déterminant le maximum d'activité d'une enzyme (Daniel *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2010; Daniel et Danson, 2013).

7.5.3. Stabilité des protéases à température optimale

L'effet sur les activités relatives des protéases 16-F39 et 32-F38 de l'incubation à leurs températures optimales respectives (60 °C et 50 °C) a été étudié sur des intervalles de préchauffage entre 20 minutes et 240 minutes. Les résultats sont représentés dans la figure 48. La protéase 16-F39 perd 28,24% de son activité relative après 30 minutes de chauffage et garde encore 18,97% de cette activité au bout de quatre heures.

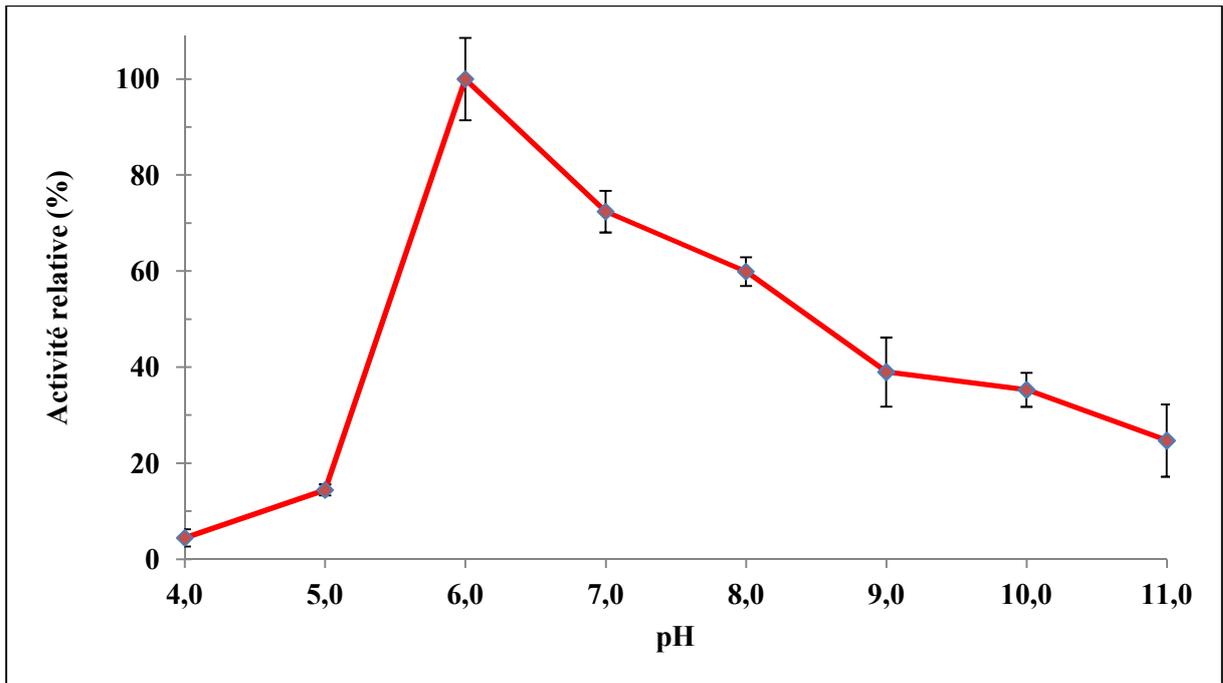
D'après les résultats de Wang *et al.* (2012), la protéase purifiée à partir de *Brevibacillus* sp. PLI-1 a perdu 20% de son activité relative à température optimale (60 °C) au bout de 30 minutes et a conservé uniquement 25% de son activité relative après 3 heures de chauffage à la même température.

Des protéases faiblement thermostables peuvent présenter un grand intérêt pour la fabrication des fromages. En effet, une température de chauffage du caillé plus élevée au cours de la fabrication permet de baisser les valeurs d'activité résiduelle des protéases et par conséquent d'obtenir des fromages avec le moins d'amertume possible (Cerning *et al.*, 1984).

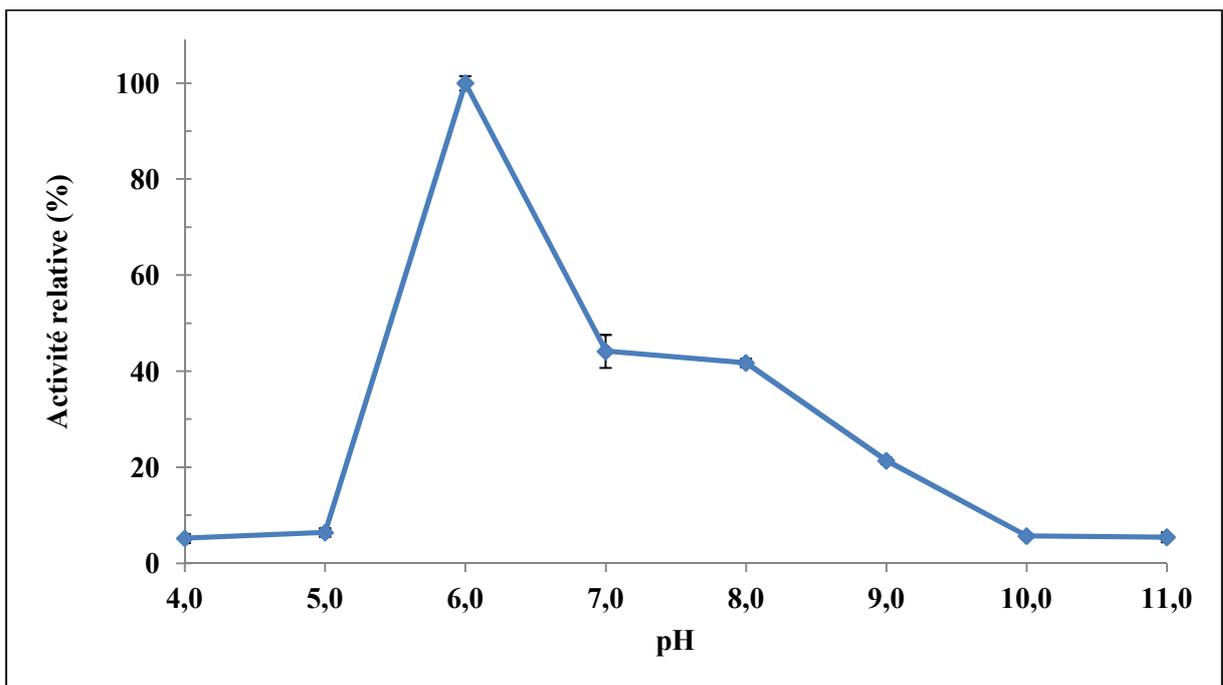
La protéase 32-F38 a montré une augmentation de son activité relative de 35,60% après 20 minutes de chauffage jusqu'à atteindre son maximum après deux heures de chauffage. Cette activité reste relativement stable et est égale à 83,46% après 4 heures de chauffage.

L'augmentation de l'activité enzymatique après un court temps de chauffage a déjà été rapportée pour des protéases isolées à partir de bactéries formant-endospores thermophiles (Kanekar *et al.*, 2002; Esakkiraj *et al.*, 2016). Ce comportement d'inactivation non linéaire en conditions expérimentales peut être dû à la formation de groupes enzymatiques avec différentes valeurs de stabilités thermiques ou à la présence d'isoenzymes stables/labiles (De Cordt *et al.*, 1992; Nath *et al.*, 1997).

La stabilité thermique élevée des protéases peut être recherchée pour certaines applications, notamment pour le traitement des matières premières d'origine animale, par exemple durant la dékératinisation des peaux, le déplumage ou dans l'attendrissage des viandes (Bekhit *et al.*, 2014).



(A)



(B)

Figure 49. Effet de la variation du pH sur les activités des protéases. A : 16-F39 ; B : 32-F38.

La température optimale de l'activité d'une enzyme donnée peut varier selon plusieurs facteurs expérimentaux. L'effet du chauffage à une hypothétique température optimale en conditions *in vitro* dépend du prétraitement que subit l'enzyme. L'activité sera beaucoup plus importante si l'essai est mené immédiatement que si elle est incubée durant une durée de temps donnée à la même température. Durant ce temps le processus de dénaturation sera enclenché (Danson et Hough, 2009; Bisswanger, 2014).

S'il est nécessaire de réaliser des tests comparatifs de la thermostabilité des protéases à d'autres valeurs de températures afin d'étudier l'effet du chauffage prolongé sur leur activité, nous n'avons pas pu réaliser ces tests en raison de limites pratiques.

7.5.4. pH optimaux des activités protéasiques

La figure 49 présente les résultats du dosage des activités protéasiques de 16-F39 et 32-F38 contre l'azocaséine dans différents tampons à pH allant de 4,0 à 11,0.

Les deux protéases sont légèrement acides, avec un pH d'activité maximale de 6,0 et une activité relative inférieure à 20% à pH 5,0. La protéase 16-F39 garde 72,39% de son activité à pH 7,0 et 59,91% d'activité à pH 8,0 alors qu'elle perd 75,30% de son activité à pH 11,0. En revanche, la protéase 32-F38 est plus sensible aux variations de pH avec une perte d'activité de 58,24% à pH 8 et de 78,63% à pH 9,0.

D'après la littérature, la majorité des protéases extracellulaires isolées à partir des membres de *Brevibacillus* sont alcalines, avec des valeurs optimales du pH autour de 8,0 (Nascimento et Martins, 2004; Rai et Mukherjee, 2011; Wang *et al.*, 2012; Jaouadi *et al.*, 2013; Zilda *et al.*, 2014). La caractérisation d'une protéase acide a été uniquement rapportée par Seswita Zilda *et al.* (2012b). Elle a été purifiée à partir de la souche thermophile *Brevibacillus thermoruber* LII, isolée à partir d'une source géothermale en Indonésie. Elle gardait au moins 80% de son activité relative entre pH 4,0 et 6,0 avec un pH optimum de 5,0. L'augmentation du pH provoquait une perte d'activité relative de 43% à pH 7,0 et de 62% à pH 8,0.

L'effet du pH sur l'activité enzymatique est régi par deux facteurs : l'état de protonation des fonctions des groupements aminés et des cofacteurs impliqués dans la réaction catalytique et l'état natif de la structure tertiaire de la protéine. Cet effet est fortement corrélé aux variations de température. Une augmentation de la température peut modifier le pH optimal (Illanes *et al.*, 2008; Bisswanger, 2014).

L'activité protéolytique à pH acide est favorable aux activités coagulantes (Chazarra *et al.*, 2007). C'est pour cette raison que toutes les coagulases du lait sont des protéases acides. Leur activité est généralement optimale aux valeurs de pH proches de 5,5 (Ramet et Scher, 1997).

Résultats et Discussion

Tableau 65. Valeurs moyennes de l'activité relative des protéases 16-F39 et 32-F38 en présence de différents agents chimiques.

Agent chimique	Concentration	Activité relative (%)	
		Protéase 16-F39	Protéase 32-F38
Mg²⁺	2,5 mM	139,09 ± 12,78	143,22 ± 7,61
Li²⁺	2,5 mM	130,27 ± 16,23	100,19 ± 7,39
Fe³⁺	2,5 mM	0,00	0,00
Cu²⁺	2,5 mM	26,54 ± 8,23	7,36 ± 0,34
Zn²⁺	2,5 mM	22,07 ± 8,65	0,00
Mn²⁺	2,5 mM	86,04 ± 16,79	113,18 ± 5,18
Ca²⁺	2,5 mM	46,88 ± 19,10	91,24 ± 6,71
Ethanol	1% (v/v)	89,60 ± 30,96	96,43 ± 2,11
Méthanol	1% (v/v)	11,96 ± 10,46	106,37 ± 2,77
Acétone	1% (v/v)	91,90 ± 23,24	103,74 ± 7,50
SDS	1% (p/v)	1405,93 ± 182,30	438,80 ± 9,69
Tween-20	1% (v/v)	109,89 ± 31,65	27,74 ± 3,93
Tween-80	1% (v/v)	127,24 ± 10,12	144,78 ± 11,03
Triton X-100	1% (v/v)	166,60 ± 33,29	144,43 ± 7,81
EDTA	1,0 mM	84,65 ± 11,74	0,87 ± 0,86
DTT	1% (p/v)	0,00	0,48 ± 0,82
PMSF	1% (p/v)	0,00	193,67 ± 2,86
Pepstatine A	1,0 mM	91,08 ± 16,27	111,24 ± 1,90
Inhibiteur de trypsine	1,0 mM	99,05 ± 25,81	186,48 ± 7,30
DMSO	1% (v/v)	81,07 ± 7,07	87,90 ± 8,27

7.5.5. Effet des agents chimiques sur l'activité protéasique

Les effets de l'addition de métaux lourds, de solvants, de détergents et d'inhibiteurs de protéases sur les activités relatives des protéases de 16-F39 et 32-F38 sont montrés dans le tableau 65. Les résultats détaillés de la caractérisation des protéases sont indiqués dans les tableaux 66 à 69 (Annexe 2).

D'après ces résultats, les ions métalliques Mg^{2+} et Mn^{2+} ont montré un effet significativement stimulant sur l'activité enzymatique de la protéase 32-F38. Les ions Li^{2+} n'avaient pas d'effet significatif sur l'activité et une légère inhibition a été notée en présence de Ca^{2+} . En revanche, l'activité protéasique a été complètement inhibée en présence des ions métalliques Zn^{2+} et de Cu^{2+} . D'autre part, l'activité de la protéase 16-F39 a été stimulée par les ions Mg^{2+} et Li^{2+} , mais légèrement inhibée par la présence des ions Mn^{2+} . Cette activité a été réduite de 53,12% en présence de Ca^{2+} , de 73,46% par le Cu^{2+} et de 77,93% par les ions Zn^{2+} . Des effets similaires ont été observés sur des sérine-protéases de la souche *Bacillus* sp. NPST-AK15 (Ibrahim *et al.*, 2015) et de *Bacillus caseinilyticus* (Mothe et Sultanpuram, 2016). Une inhibition totale a été causée par la présence des ions Fe^{3+} .

La stimulation de l'activité enzymatique par les ions Mg^{2+} , de Mn^{2+} et Li^{2+} a été signalée pour de nombreuses protéases de *Brevibacillus* spp. (Nascimento et Martins, 2004; Jaouadi *et al.*, 2013). Ces ions pourraient avoir un effet protecteur contre la dénaturation thermique des enzymes (Kumar et Takagi, 1999).

Quant à la réduction des activités des protéases thermostables de *Brevibacillus* par les ions métalliques Zn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} , elle pourrait s'expliquer par leurs interactions avec les groupements thiols des résidus cystéines en les convertissant en groupes mercaptides. Le même effet a été observé avec les résidus histidine et tryptophane. Les ions métalliques sont également connus pour être de puissants inhibiteurs du repliement protéique (Nascimento et Martins, 2004; Wang *et al.*, 2012; Zilda *et al.*, 2014).

Après une incubation en présence de 1% (p/v) du détergent ionique SDS, les deux protéases présentaient 4 à 14 fois plus d'activité qu'en son absence. Le SDS est connu comme étant un agent dénaturant des substrats protéiques comme la caséine et par conséquent augmenterait les taux de digestion protéasiques. La remarquable résistance des protéases 16-F39 et 32-F38 envers la dénaturation par le SDS a été observée avec d'autres protéases thermoactives telles que la Protéinase K et la Thermopsine. Cette résistance pourrait être liée à une modification de leur structure primaire par la présence d'un nombre élevé de résidus tyrosine (Bajorath *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1991; Liu et Guo, 2007).

La présence d'éthanol et d'acétone a légèrement fait baisser les valeurs relatives de l'activité protéasique de 16-F39 tandis que le méthanol a provoqué une perte de 88,04%. Au contraire, la présence des trois solvants n'a pas eu d'effet significatif sur la protéase 32-F38.

En présence de Tween-80 et de Triton X-100, les activités des deux protéases ont significativement augmenté. Le Tween-20 semble aussi activer la protéase 16-F39, quoiqu'à un degré moindre, tandis que celle de 32-F38 a été réduite de 72,26% par sa présence.

De manière générale, les enzymes issues de bactéries thermophiles montrent une bonne stabilité en présence de divers solvants et détergents. Le repliement plus important de ces protéines serait en grande partie responsable de cette stabilité. La composition et la position des acides aminés du site actif sont deux autres facteurs influençant l'effet des agents chimiques organiques sur les enzymes thermostables (Eijsink *et al.*, 2004; Chakravorty *et al.*, 2012).

L'activité de la protéase 16-F39 a complètement été inhibée par 1% (p/v) de PMSF, inhibiteur connu des sérine-protéase et par 1% (p/v) de DTT, agent réducteur de groupements souffrés. Ce qui suggère la présence de ponts disulfure au niveau de la structure secondaire de l'enzyme (Raval *et al.*, 2014). La présence d'EDTA a causé une baisse de 15,35% et celle du DMSO une réduction de 18,93%. Les mêmes effets de ces agents ont été observés sur des sérine-protéases purifiées à partir de *Brevibacillus* sp. AS-S10-II (Mukherjee *et al.*, 2011; Rai et Mukherjee, 2011), de *Brevibacillus laterosporus* G4 (Huang *et al.*, 2005) et de *Bacillus* sp. HS08 (Guangrong *et al.*, 2006). L'effet des autres agents inhibiteurs, la pepstatine A, un inhibiteur d'aspartyl-protéase et l'ovomucoïde, un inhibiteur de trypsine, sur l'activité n'a pas été significatif.

Au vu de ces résultats, il est probable que la protéase 16-F39 soit une sérine-protéase (Ibrahim *et al.*, 2015). L'effet partiellement réducteur de l'activité protéasique par l'EDTA couplé à la stimulation par les ions Mg^{2+} et Li^{2+} suggèrent des besoins en ions métalliques de cette protéase pour son activité maximale. Des observations similaires ont été signalées pour des sérines protéases de *Brevibacillus thermoruber* (Zilda *et al.*, 2014) et de *Bacillus licheniformis* (Jellouli *et al.*, 2011).

La présence de l'EDTA, qui est un inhibiteur des métalloprotéases, a causé une perte de la totalité de l'activité relative de la protéase 32-F38. Un constat identique a été relevé pour le DTT. La présence de 1% (v/v) de DMSO l'a réduite de 12,10%. D'autre part, la pepstain A qui est un inhibiteur d'aspartyl-protéases, l'inhibiteur de trypsine et le PMSF qui inhibent les sérine-protéases, ont augmenté significativement l'activité enzymatique. Ces résultats

indiqueraient que la protéase 32-F38 est probablement une métalloprotéase (Salleh *et al.*, 2006; Rawlings, 2013).

La protéase 16-F39 est une serine-protéase thermoactive d'environ 87,7 kDa, avec un pH optimal de 6,0 et son activité réduite par la présence de calcium. Ces caractéristiques sont en contraste avec celles de la plupart des sérine-protéases issues de bactéries aérobies formant-endospores. Ce dernier groupe de protéases appartient surtout à la famille des subtilases, qui sont généralement des protéases extracellulaires de faible poids moléculaire (10-30 kDa), neutres ou alcalines (pH optimal entre 7,0 et 11,0), et stimulées par la présence de calcium (Gupta *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2016b).

Les sérines-protéases sont les plus utilisées en industrie pour des applications impliquant la protéolyse. Les protéases acides peuvent trouver plusieurs utilisations dans la transformation des protéines d'origine animale. Ainsi, elles peuvent être employées comme kératinases pour la valorisation de plusieurs sous-produits tels que les plumes, la laine, le collagène, l'élastine, les cheveux, l'azokératine et les ongles permettant de produire des hydrolysats pouvant être utilisées entre autres, comme suppléments pour l'alimentation et comme fertilisants (Gupta et Ramnani, 2006; Fuke *et al.*, 2018; Kowalczyk *et al.*, 2018). Ces enzymes peuvent également être employées comme additifs dans les farines de blé, notamment en dégradant le gluten, améliorant ainsi ses propriétés technofonctionnelles (Deng *et al.*, 2016). Toutefois, la propriété la plus significative des protéases acides est leur capacité à coaguler les protéines, ce qui permet leurs utilisations dans l'industrie laitière pour la coagulation de la caséine dans le processus de fabrication des fromages (Sumantha *et al.*, 2006; Tavano, 2017).

La caractérisation de la protéase 32-F38 partiellement purifiée révèle des capacités intéressantes de l'enzyme en conditions acides, en présence de solvants et de détergents avec une grande thermostabilité à 50 °C. Cette métalloprotéase semble partager ses propriétés avec d'autres métalloprotéases telles que la Thermolysine (EC 3.4.24.27) et la Bacillolysine (EC 3.4.24.28) produites par plusieurs souches des genres aérobies thermophiles comme *Bacillus*, *Geobacillus* et *Brevibacillus*. Les protéases de la famille des Thermolysine-like possèdent de grandes potentialités d'application dans la dégradation de gélatine, de kératine et d'autres matériaux comme le son de blé, les écailles de poisson dans des procédés de revalorisation de ces produits (Hamza *et al.*, 2006; Panda *et al.*, 2014). Elles peuvent également agir en tant que peptide et ester synthétases et ainsi être utilisées pour la synthèse et la production de précurseurs d'édulcorants artificiels comme l'aspartame (van den Burg et Eijssink, 2013), ou encore pour l'hydrolyse des parois des cellules végétales afin de faciliter les procédés d'extraction en phase aqueuse (Casas et González, 2018).

Résultats et Discussion

Des protéases avec des caractéristiques et un poids moléculaire similaires ont montré également une activité anti-biofilms contre plusieurs agents bactériens pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* (Esakkiraj *et al.*, 2016) et sont des candidates potentielles pour la production de peptides bioactifs à partir de la caséine (Guinane *et al.*, 2015).

CONCLUSION

Conclusion

La prospection de la biodiversité des environnements naturels que recense le territoire algérien est une démarche nécessaire non seulement pour l'étude des écosystèmes qu'ils recèlent, mais également dans le but d'exploiter toutes les potentialités biotechnologiques qu'ils possèdent. En effet, cela permettrait de découvrir de nouveaux actifs biotechnologiques qu'il serait possible par la suite d'employer en industrie dans des applications notamment alimentaires.

Les premiers objectifs de cette thèse ont été d'isoler des bactéries aérobies thermophiles à partir de différents environnements chauds algériens et de prospector leur aptitude à produire des protéases extracellulaires. Au total, 138 isolats bactériens ont été isolés à partir des échantillons de sédiments, d'eau et de sols récoltés de 7 sites différents. La plupart de ces isolats présentent une forme bâtonnet, à Gram positif avec la présence d'endospores et 53 d'entre eux possèdent une activité hydrolytique envers la caséine et/ou la gélatine sur milieu de culture solide.

Par la suite, l'objectif était de caractériser sur le plan phénotypique, moléculaire et génomique ces souches productrices d'activité protéolytique. Le séquençage et l'analyse des gènes de l'ARNr 16S des 28 souches choisies par méthode ARDRA a révélé que ces dernières appartiennent aux genres *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus* et *Thermoactinomyces*. L'étude de leurs caractères phénotypiques a permis de confirmer leurs liens de parenté avec ces mêmes groupes taxonomiques. De manière générale, les souches sont aérobies strictes ou facultatives, thermophiles modérées, neutrophiles et halotolérantes. Elles ne sont pas exigeantes en facteurs de croissance et leur utilisation des sources d'énergie, de carbone et/ou d'azote est variable. Certaines souches sont capables de dégrader les polymères saccharidiques et lipidiques testés.

L'étude des génomes des souches *Geobacillus* Sah69 et *Thermoactinomyces* AS95 a permis de prédire leurs voies métaboliques, leurs liens phylogénomiques avec les membres de leurs genres respectifs et de montrer leur capacité à sécréter des protéases putatives extracellulaires.

Le quatrième objectif était d'étudier la biodiversité microbienne dans les sédiments des sources thermales de Debagh et de Ouled Ali par méthode métagénomique. L'analyse des séquences de la région V4 du gène de l'ARNr 16S de l'ADN environnemental obtenues par la technique illumina-MiSeq a révélé une dominance des communautés bactériennes dans les deux sources. Ces communautés sont caractérisées par une forte prévalence des phyla hyperthermophiles des *Aquificae* et des *Deinococcus-Thermus* quand la température de l'eau dépasse 90 °C et une prédominance des phyla phototrophes des *Chloroflexi* lorsque les

Conclusion

températures de l'eau à l'émergence sont plus basses. Le phylum des *Firmicutes* est minoritaire dans les deux sources et les genres aérobies formant-endospores les plus présents sont *Paenibacillus*, *Psychrobacillus* et *Sporosarcina*. La présence des genres auxquels appartiennent nos isolats est très limitée.

Enfin, le dernier objectif a été de produire les protéases extracellulaires de ces souches et de caractériser certaines de leurs propriétés enzymatiques.

Les activités protéasiques des 28 souches ont été dosées par 3 méthodes différentes et c'est la méthode de dosage contre l'azocaséine qui a été retenue comme étant la plus fiable. Sur la base des résultats de dosage, les souches *Geobacillus* Sah69, *Thermoactinomyces* AS95 et *Brevibacillus* OA30 ont été choisies pour un essai de production de leurs protéases.

Après avoir déterminé les valeurs de température, de pH et de salinité de leur croissance optimale sous conditions de fermentation, la production a été testée sur deux milieux de culture différents à la caséine et au lait écrémé. Les résultats ont mené à l'élimination du milieu au lait écrémé et de la souche Sah69 à cause de leurs rendements faibles.

L'extraction des protéases des souches *Thermoactinomyces* AS95 et *Geobacillus* OA30 a débouché sur le choix des extraits de cette dernière souche pour un essai de purification partielle par méthodes chromatographiques. Cet essai a permis de sélectionner les protéases F16-39 et F32-38 qui ont ensuite été partiellement caractérisées. La protéase F16-39 est une sérine-protéase d'un poids moléculaire estimé à 87,7 kDa, elle présente un maximum d'activité à 60 °C et à pH de 6,0, mais est instable après 30 minutes de chauffage à 60 °C. La protéase F32-38 est quant à elle une métalloprotéase de 64,6 kDa, sa température optimale d'activité est de 50 °C, son pH optimum est de 6,0 et montre une très grande stabilité à 50 °C. Les deux protéases montrent une remarquable stabilité en présence de divers agents chimiques testés, en particulier le SDS, les solvants et les agents tensioactifs.

Si les contraintes pratiques nous ont limitées dans la réalisation de certains aspects expérimentaux, par exemple pour les essais technologiques préliminaires avec les protéases choisies, plusieurs perspectives sont envisagées comme continuité de ce travail :

- La prospection du potentiel en protéases et en diverses enzymes hydrolytiques appartenant à d'autres groupes taxonomiques thermophiles, comme les bactéries anaérobies et les archées par méthodes culturales ;
- L'étude de la biodiversité d'autres environnements chauds, notamment d'autres sources géothermales et des sites désertiques différents ;

Conclusion

- L'utilisation des méthodes métagénomiques et clonales pour la prospection directe de la présence d'hydrolases d'intérêt biotechnologique dans les ressources génétiques de ces environnements afin d'éliminer les contraintes liées à l'emploi des méthodes culturelles classiques ;
- La poursuite de la caractérisation des protéases sélectionnées d'abord par une identification plus poussée (purification complète, poursuite de la caractérisation structurale, biochimique, étude la cinétique enzymatique, etc.). Ensuite, par l'optimisation des conditions de production de ces enzymes par méthodes clonales et par planification expérimentale. Par l'optimisation des protocoles de purification. Par l'étude de leur stabilité sous conditions de stockage. Enfin, par des essais d'applications de ces protéases dans la coagulation du lait, l'attendrissage des viandes et la revalorisation des sous-produits d'origine animale et végétale pour la production d'hydrolysats protéiques à destination alimentaire.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aanniz, T., M. Ouadghiri, M. Melloul, J. Swings, E. Elfahime, J. Ibjibjen, M. Ismaili et M. Amar Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, 46(2), 443-453. [<https://doi.org/10.1590/s1517-838246220140219>]
- Adam, P. S., G. Borrel, C. Brochier-Armanet et S. Gribaldo The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *The ISME journal*, 2017, 11(11), 2407. [<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.122>]
- Adams, M. et R. M. Kelly Enzymes from microorganisms in extreme environments. *Chemical & Engineering News*, 1995, 73(51), 32-42.
- Adedayo, M., E. Ajiboye, J. Akintunde et A. Odaibo Single cell proteins: as nutritional enhancer. *Adv Appl Sci Res*, 2011, 2(5), 396-409.
- Adiguzel, A., H. Ozkan, O. Baris, K. Inan, M. Gulluce et F. Sahin Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of microbiological methods*, 2009, 79(3), 321-328. [<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.026>]
- Adriaenssens, E. M., L. Van Zyl, P. De Maayer, E. Rubagotti, E. Rybicki, M. Tuffin et D. A. Cowan Metagenomic analysis of the viral community in Namib Desert hypoliths. *Environmental microbiology*, 2015, 17(2), 480-495. [<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12528>]
- Agrebi, R., N. Hmidet, M. Hajji, N. Ktari, A. Haddar, N. Fakhfakh-Zouari et M. Nasri Fibrinolytic serine protease isolation from *Bacillus amyloliquefaciens* An6 grown on *Mirabilis jalapa* tuber powders. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2010, 162(1), 75-88. [<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8800-z>]
- Aguiar, P., T. Beveridge et A.-L. Reysenbach *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(1), 33-39. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02790-0>]
- Agüloğlu, F. S. et E. Barış Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Starch - Stärke*, 2014, 66(1-2), 182-189. [<https://doi.org/10.1002/star.201200279>]
- Aissaoui, N., M. Mahjoubi, F. Nas, O. Mghirbi, M. Arab, Y. Souissi, A. Hoceini, A. S. Masmoudi, A. Mosbah, A. Cherif et N. Klouche-Khelil Antibacterial Potential of 2,4-Di-tert-Butylphenol and Calixarene-Based Prodrugs from Thermophilic *Bacillus licheniformis* Isolated in Algerian Hot Spring. *Geomicrobiology journal*, 2018, 1-10. [<https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1503377>]
- Akhavan Sepahy, A. et L. Jabalameli Effect of Culture Conditions on the Production of an Extracellular Protease by *Bacillus* sp. Isolated from Soil Sample of Lavizan Jungle Park. *Enzyme Research*, 2011, 2011, 7. [<http://dx.doi.org/10.4061/2011/219628>]
- Aksoy, S. Ç., A. Uzel et E. E. H. Kocabaş Extracellular serine proteases produced by *Thermoactinomyces* strains from hot springs and soils of West Anatolia. *Annals of microbiology*, 2012, 62(2), 483-492. [<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0280-z>]
- Al-Qodah, Z. Production and characterization of thermostable α -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2006, 1(7-8), 850-857. [<https://doi.org/10.1002/biot.200600033>]
- Alabras, R., K. Alashkar et A. Ayman Almariri Production and optimization of extracellular lipase enzyme produced by locally strain of *Geobacillus stearothermophilus*. *J Chem. Pharm. Sci*, 2017, 10(1), 87-92.
- Albers, S.-V., M. Jonuscheit, S. Dinkelaker, T. Urich, A. Kletzin, R. Tampe, A. Driessen et C. Schleper Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72(1), 102-111. [<https://doi.org/10.1128/aem.72.1.102-111.2006>]

Références bibliographiques

- Aliyu, H., P. Lebre, J. Blom, D. Cowan et P. De Maayer Phylogenomic re-assessment of the thermophilic genus *Geobacillus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016, 39(8), 527-533. [<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.09.004>]
- Aliyu, H., P. Lebre, J. Blom, D. Cowan et P. De Maayer Corrigendum to “Phylogenomic re-assessment of the thermophilic genus *Geobacillus*” [Syst. Appl. Microbiol. 39 (2016) 527–533]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018. [<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.07.001>]
- Alvarez, V., I. Von Der Weid, L. Seldin et A. Santos Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in applied microbiology*, 2006, 43(6), 625-630. [<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02015.x>]
- Amarouche-Yala, S., A. Benouadah, A. E. O. Bentabet et P. López-García Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles*, 2014, 18(6), 1035-1047. [<https://doi.org/10.1007/s12403-014-0130-x>]
- Amarouche-Yala, S., A. Benouadah, A. El Ouahab Bentabet, A. S. Moulla, S. A. Ouarezki et A. Azbouche Physicochemical, Bacteriological, and Radiochemical Characterization of Some Algerian Thermal Spring Waters. *Water Quality, Exposure and Health*, 2015, 7(2), 233-249. [<https://doi.org/10.1007/s12403-014-0130-x>]
- Amin, A., I. Ahmed, N. Salam, B.-Y. Kim, D. Singh, X.-Y. Zhi, M. Xiao et W.-J. Li Diversity and distribution of thermophilic bacteria in hot springs of Pakistan. *Microbial ecology*, 2017, 74(1), 116-127. [<https://doi.org/10.1007/s00248-017-0930-1>]
- Anderson, R. E., M. L. Sogin et J. A. Baross Evolutionary Strategies of Viruses, Bacteria and Archaea in Hydrothermal Vent Ecosystems Revealed through Metagenomics. *PloS one*, 2014, 9(10), e109696. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109696>]
- Antranikian, G., C. E. Vorgias et C. Bertoldo. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. In *Marine biotechnology I*. : Springer, 2005, p. 219-262. [<https://doi.org/10.1007/b135786>]
- Antranikian, G. Industrial relevance of thermophiles and their enzymes. *Thermophiles: biology and technology at high temperatures*, 2007, 113-186. [<https://doi.org/10.1201/9781420008852.ch8>]
- Arab, M., S. Bakour, R. Lalaoui, N. Aissaoui, F. Nas, A. Hoceini, P.-E. Fournier et N. Klouche-Khelil Diversity of Aerobic Bacilli Analysis Using Molecular and Culture-Based Approaches in Debagh Hot Spring. *Geomicrobiology journal*, 2018, 1-11. [<https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1520937>]
- Ardö, Y., P. L. Mesweeney, A. A. Magboul, V. K. Upadhyay et P. F. Fox. Biochemistry of cheese ripening: proteolysis. In *Cheese (Fourth Edition)*. : Elsevier, 2017, p. 445-482. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417012-4.00018-1>]
- Arya, M., G. K. Joshi, A. K. Gupta, A. Kumar et A. Raturi Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains from Soldhar (Tapovan) hot spring in Central Himalayan Region, India. *Ann Microbiol Annals of Microbiology*, 2015, 65(3), 1457-1464. [<https://doi.org/10.1007/s13213-014-0984-y>]
- Aschenbrenner, J. et A. Marx DNA polymerases and biotechnological applications. *Current opinion in biotechnology*, 2017, 48, 187-195. [<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.04.005>]
- Ash, C., F. Priest et M. Collins Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, 64, 253. [<https://doi.org/10.1007/BF00873085>]
- Atlas, R. M. *Handbook of media for environmental microbiology*. Edition ed. : CRC press, 2005. ISBN 142003748X. [<https://doi.org/10.1201/9781420037487>]
- Atlas, R. M. Microbiological media for the examination of food. In : CRC Press, Boca Raton, 2006. [<https://doi.org/10.1201/9781420002980>]

Références bibliographiques

- Azim, K., B. Souidi, S. Boukhari, C. Perissol, S. Roussos et I. T. Alami Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*, 2018, 8(2), 141-158. [<https://doi.org/10.1007/s13165-017-0180-z>]
- Badhai, J., T. S. Ghosh et S. K. Das Taxonomic and functional characteristics of microbial communities and their correlation with physicochemical properties of four geothermal springs in Odisha, India. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(1166). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01166>]
- Bahri, F. et H. Saibi Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arabian Journal of Geosciences*, 2011, 4(1-2), 207-219. [<https://doi.org/10.1007/s12517-010-0127-0>]
- Bahri, F., H. Saibi et M.-E.-H. Cherchali Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arabian Journal of Geosciences*, 2011, 4(1), 207-219. [<https://doi.org/10.1007/s12517-010-0127-0>]
- Bajorath, J., W. Hinrichs et W. Saenger The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *The FEBS Journal*, 1988, 176(2), 441-447. [<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14301.x>]
- Banerjee, G. et A. K. Ray Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2017, 33(2), 119-143. [<https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1408256>]
- Banerjee, U. C., R. K. Sani, W. Azmi et R. Soni Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 1999, 35(1), 213-219. [[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00053-9)]
- Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham et A. D. Prjibelski SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 2012, 19(5), 455-477. [<https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>]
- Barekat, S. et N. Soltanizadeh Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment. *Innovative food science & emerging technologies*, 2017, 39, 223-229. [<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.009>]
- Barrett, T., K. Clark, R. Gevorgyan, V. Gorenkov, E. Gribov, I. Karsch-Mizrachi, M. Kimelman, K. D. Pruitt, S. Resenchuk et T. Tatusova BioProject and BioSample databases at NCBI: facilitating capture and organization of metadata. *Nucleic acids research*, 2011, 40(D1), D57-D63. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1163>]
- Bartram, A. K., M. D. Lynch, J. C. Stearns, G. Moreno-Hagelsieb et J. D. Neufeld Generation of multi-million 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. *Applied and environmental microbiology*, 2011. [<https://doi.org/10.1128/aem.05896-11>]
- Barzkar, N., A. Homaei, R. Hemmati et S. Patel Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles*, 2018, 1-12. [<https://doi.org/10.1007/s00792-018-1009-8>]
- Basu, S., C. Bose, N. Ojha, N. Das, J. Das, M. Pal et S. Khurana Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformatics*, 2015, 11(4), 182. [<https://doi.org/10.6026/97320630011182>]
- Bates, S. T., D. Berg-Lyons, J. G. Caporaso, W. A. Walters, R. Knight et N. Fierer Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME journal*, 2010, 5, 908. [<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.171>]
- Battista, J. R. et F. A. Rainey. *Deinococcus*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00475>]
- Battista, J. R. *Deinococcus–Thermus* Group. In *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2016. [<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021151>]

Références bibliographiques

- Beeby, M., B. D O'connor, C. Ryttersgaard, D. R. Boutz, L. J. Perry et T. O. Yeates The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS biology*, 2005, 3(9), e309. [<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030309>]
- Bekhit, A. A., D. L. Hopkins, G. Geesink, A. A. Bekhit et P. Franks Exogenous Proteases for Meat Tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, 54(8), 1012-1031. [<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.623247>]
- Belduz, A. O., S. Dulger et Z. Demirbag *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(5), 1315-1320. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02473-0>]
- Belhai, M., Y. Fujimitsu, J. Nishijima et M. Bersi Hydrochemistry and gas geochemistry of the northeastern Algerian geothermal waters. *Arabian Journal of Geosciences*, 2016, 10(1), 8. [<https://doi.org/10.1007/s12517-016-2790-2>]
- Bendicho, S., G. Martí, T. Hernández et O. MartíN Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chemistry*, 2002, 79(2), 245-249. [[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00126-7)]
- Bendtsen, J. D., L. J. Jensen, N. Blom, G. Von Heijne et S. Brunak Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2004, 17(4), 349-356. [<http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzh037>]
- Bendtsen, J. D., L. Kiemer, A. Fausbøll et S. Brunak Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC microbiology*, 2005, 5, 58-58. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0095-6_14]
- Benson, D. A., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, J. Ostell, K. D. Pruitt et E. W. Sayers GenBank. *Nucleic acids research*, 2018, 46(D 1), D41-D47. [<https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1246>]
- Berg, J., J. Tymoczko et L. Stryer The purification of proteins is an essential first step in understanding their function. *Biochemistry*, 2015, 8, 20.
- Berger, A. et I. Schechter Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1970, 257(813), 249-264. [<https://doi.org/10.1098/rstb.1970.0024>]
- Beygmoradi, A. et A. Homaei Marine microbes as a valuable resource for brand new industrial biocatalysts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 11, 131-152. [<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.013>]
- Bezuidt, O. K., R. Pierneef, A. M. Gomri, F. Adesioye, T. P. Makhalanyaane, K. Kharroub et D. A. Cowan The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(723). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00723>]
- Bhalla, A., K. M. Bischoff et R. K. Sani Highly Thermostable Xylanase Production from A Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain WSUCF1 Utilizing Lignocellulosic Biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3(84). [<https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00084>]
- Bhatia, S., N. Batra, A. Pathak, S. J. Green, A. Joshi et A. Chauhan Metagenomic evaluation of bacterial and archaeal diversity in the geothermal hot springs of Manikaran, India. *Genome announcements*, 2015, 3(1), e01544-01514. [<https://doi.org/10.1128/genomea.01544-14>]
- Bhatt, H. B. et S. P. Singh Phylogenetic and phenogram based diversity of haloalkaliphilic bacteria from the saline desert. *Microbial Biotechnology: Technological Challenges and Developmental Trends*, 2016, 373-386. [<https://doi.org/10.1201/b19978-24>]
- Białkowska, A., E. Gromek, T. Florczak, J. Krysiak, K. Szulczewska et M. Turkiewicz. Extremophilic proteases: Developments of their special functions, potential resources and biotechnological applications. In *Biotechnology of Extremophiles*. : Springer, 2016, p. 399-444. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_14]
- Birrane, G., B. Bhyravbhatla et M. A. Navia Synthesis of Aspartame by Thermolysin: An X-ray Structural Study. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 5(6), 706-710. [<https://doi.org/10.1021/ml500101z>]

Références bibliographiques

- Bisswanger, H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 2014, 1(1), 41-55. [<https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>]
- Blanc, M., L. Marilley, T. Beffa et M. Aragno Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1997, 47(4), 1246-1248. [<https://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-4-1246>]
- Boero, F. et G. Bernardi Phenotypic vs genotypic approaches to biodiversity, from conflict to alliance. *Marine genomics*, 2014, 17, 63-64. [<https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.03.005>]
- Borgrave, S. B., M. S. Kulkarni, P. P. Kanekar et D. G. Naik. Alkaliphilic bacteria and Thermophilic actinomycetes as new sources of antimicrobial compounds. In *Industrial Biotechnology: Sustainable Production and Bioresource Utilization*. : CRC Press USA, 2017, p. 47-49. [<https://doi.org/10.1201/b19347-3>]
- Boteva, N. et M. Kambourova. Thermophiles and Their Exploration for Thermostable Enzyme Production. In D. Egamberdieva, N.-K. Birkeland, H. Panosyan et W.-J. Li eds. *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications*. Singapore : Springer Singapore, 2018, p. 167-186. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6_6]
- Bouacem, K., A. Bouanane-Darenfed, N. Boucherba, M. Joseph, M. Gagaoua, W. B. Hania, M. Kecha, S. Benallaoua, H. Hacène et B. Ollivier Partial characterization of xylanase produced by *Caldicoprobacter algeriensis*, a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2014, 174(5), 1969-1981. [<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1153-2>]
- Bouacem, K., A. Bouanane-Darenfed, H. Laribi-Habchi, M. B. Elhouli, A. Hmida-Sayari, H. Hacene, B. Ollivier, M.-L. Fardeau, B. Jaouadi et S. Bejar Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 81, 299-307. [<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.011>]
- Bouacem, K., A. Bouanane-Darenfed, N. Z. Jaouadi, M. Joseph, H. Hacene, B. Ollivier, M.-L. Fardeau, S. Bejar et B. Jaouadi Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 86, 321-328. [<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.074>]
- Bouanane-Darenfed, A., M.-L. Fardeau, P. Grégoire, M. Joseph, S. Kebbouche-Gana, T. Benayad, H. Hacene, J.-L. Cayol et B. Ollivier *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. A new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Current microbiology*, 2011, 62(3), 826-832. [<https://doi.org/10.1007/s00284-010-9789-9>]
- Bouanane-Darenfed, A., M.-L. Fardeau et B. Ollivier. The family *Caldicoprobacteraceae*. In *The Prokaryotes*. : Springer, 2014, p. 13-17. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9_395]
- Boughlali, M. Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. *La Presse thermale et climatique*, 2003, 140, 161-165.
- Bouras, N., A. Meklat, A. Zitouni, F. Mathieu, P. Schumann, C. Spröer, N. Sabaou et H.-P. Klenk *Nocardioopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 107(2), 313-320. [<https://doi.org/10.1007/s10482-014-0329-7>]
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976, 72(1-2), 248-254. [<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>]
- Bragger, J., R. M. Daniel, T. Coolbear et H. W. Morgan Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 1989, 31(5-6), 556-561. [<https://doi.org/10.1007/BF00270794>]
- Brar, S. K., M. Verma, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, S. Barnabé et J. R. Valéro *Bacillus thuringiensis* protéases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochemistry*, 2007, 42(5), 773-790. [<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.015>]

Références bibliographiques

- Brining, C., S. Spradlin, L. Cobani et C. Evilia The more adaptive to change, the more likely you are to survive: Protein adaptation in extremophiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2018. [<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.016>]
- Brochier-Armanet, C., S. Gribaldo et P. Forterre Spotlight on the *Thaumarchaeota*. *The ISME journal*, 2012, 6(2), 227. [<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.145>]
- Brock, T. Microbial growth under extreme conditions. In *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* , 1969, vol. 19, p. 15-41.
- Brock, T. D. et H. Freeze *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. *Journal of bacteriology*, 1969, 98(1), 289-297.
- Brock, T. D. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Edition ed. : Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 1461262844. [<https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6284-8>]
- Brömme, D. et R. Kleine Substrate specificity of thermitase, a thermostable serine proteinase from *Thermoactinomyces vulgaris*. *Current microbiology*, 1984, 11(2), 93-99. [<https://doi.org/10.1007/BF01567710>]
- Brumm, P. J., M. L. Land et D. A. Mead Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, a novel biomass degrader isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Standards in Genomic Sciences*, 2015, 10(1), 73. [<https://doi.org/10.1186/s40793-015-0031-z>]
- Buchholz, K. et U. T. Bornscheuer Enzyme Technology: History and Current Trends. *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions*, 2017, 5. [<https://doi.org/10.1002/9783527800599.ch2>]
- Burg, D., C. Ng, L. Ting et R. Cavicchioli Proteomics of extremophiles. *Environmental microbiology*, 2011, 13(8), 1934-1955. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02484.x>]
- Burgess, S. A., S. H. Flint, D. Lindsay, M. P. Cox et P. J. Biggs Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC microbiology*, 2017, 17(1), 140. [<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1047-x>]
- Busarakam, K., R. Brown, A. T. Bull, G. Y. A. Tan, T. D. Zucchi, L. J. Da Silva, W. R. De Souza et M. Goodfellow Classification of thermophilic actinobacteria isolated from arid desert soils, including the description of *Amycolatopsis deserti* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2016, 109(2), 319-334. [<https://doi.org/10.1007/s10482-015-0635-8>]
- Busch, M., H. B. Thoma et I. Kober Does Your Lab Coat Fit to Your Assay? *Journal of Biomolecular Screening*, 2013, 18(6), 744-747. [<https://doi.org/10.1177/1087057113481621>]
- Calteau, A. Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de Doctorat Lyon 1, 2005, 200.
- Campbell, L. L. et O. B. Williams The effect of temperature on the nutritional requirements of facultative and obligate thermophilic bacteria. *Journal of bacteriology*, 1953, 65(2), 141-145.
- Canchaya, C., C. Proux, G. Fournous, A. Bruttin et H. Brüßow Prophage genomics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2003, 67(2), 238-276. [<https://doi.org/10.1128/mmbr.67.2.238-276.2003>]
- Canganella, F. et J. Wiegel Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, 2011, 98(4), 253-279.
- Capece, M. C., E. Clark, J. K. Saleh, D. Halford, N. Heintz, S. Hoskins et L. J. Rothschild. Polyextremophiles and the constraints for terrestrial habitability. In *Polyextremophiles*. : Springer, 2013, p. 3-59. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_1]
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, S. M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J. A. Gilbert, G. Smith et R. Knight Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 2012, 6, 1621. [<https://doi.org/10.3410/f.14267308.15779504>]

Références bibliographiques

- Cappelletti, M., D. Zannoni, A. Postec et B. Ollivier Members of the Order *Thermotogales*: From Microbiology to Hydrogen Production. *ADVANCES IN PHOTOSYNTHESIS AND RESPIRATION*, 2014, 38, 197-224. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8554-9_9]
- Carlin, F. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, 2011, 28(2), 177-182. [<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.008>]
- Casas, M. P. et H. D. González. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction Processes. In *Water Extraction of Bioactive Compounds*. : Elsevier, 2018, p. 333-368. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809380-1.00013-9>]
- Castenholz, R. Class I." *Chloroflexi*". *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2001, 1, 427. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00016>]
- Castro, I. M., A. A. Lima, C. A. Paula, J. R. Nicoli et R. L. Brandão Effect of substrate and pH on the activity of proteases from *Fusarium oxysporum* var. *lini*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, 72(2), 132-134. [[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90324-A](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90324-A)]
- Cavello, I., M. S. Urbieta, A. B. Segretin, A. Giaveno, S. Cavalitto et E. R. Donati Assessment of Keratinase and Other Hydrolytic Enzymes in Thermophilic Bacteria Isolated from Geothermal Areas in Patagonia Argentina. *Geomicrobiology journal*, 2018, 35(2), 156-165. [<https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1339144>]
- Cavicchioli, R., R. Amils, D. Wagner et T. Mcgenity Life and applications of extremophiles. *Environmental microbiology*, 2011, 13(8), 1903-1907. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02512.x>]
- Cayol, J.-L., B. Ollivier, D. Alazard, R. Amils, A. Godfroy, F. Piette et D. Prieur. The extreme conditions of life on the planet and exobiology. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. : Springer, 2015, p. 353-394. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2_10]
- Cerning, J., J. Gripon et M. Desmazeaud Utilisation des enzymes dans l'industrie laitière. *Tech Lait*, 1984, 992, 9-24.
- Chakravorty, D., S. Parameswaran, V. K. Dubey et S. Patra Unraveling the rationale behind organic solvent stability of lipases. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2012, 167(3), 439-461. [<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9669-9>]
- Chan, C. S., K.-G. Chan, Y.-L. Tay, Y.-H. Chua et K. M. Goh Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(177). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00177>]
- Charlesworth, J. et B. P. Burns Extremophilic adaptations and biotechnological applications in diverse environments. *AIMS Microbiol*, 2016, 2(3), 251-261. [<http://dx.doi.org/10.3934/microbiol.2016.3.251>]
- Chazarra, S., L. Sidrach, D. López-Molina et J. N. Rodríguez-López Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 2007, 17(12), 1393-1400. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.010>]
- Chen, I.-M. A., V. M. Markowitz, K. Chu, K. Palaniappan, E. Szeto, M. Pillay, A. Ratner, J. Huang, E. Andersen et M. Huntemann IMG/M: integrated genome and metagenome comparative data analysis system. *Nucleic acids research*, 2016, gkw929. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkw929>]
- Chen, P., R. Xu, J. Wang, Z. Wu, L. Yan, W. Zhao, Y. Liu, W. Ma, X. Shi et H. Li Starch biotransformation into isomaltooligosaccharides using thermostable alpha-glucosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *PeerJ*, 2018, 6, e5086. [<https://doi.org/10.7717/peerj.5086>]
- Chenaker, H., B. Houha et V. Vincent Hydrogeochemistry and geothermometry of thermal water from north-eastern Algeria. *Geothermics*, 2018, 75, 137-145. [<https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2018.04.009>]
- Chitte, R. et S. Chaphalkar. The World of Proteases Across Microbes, Insects, and Medicinal Trees. In *Proteases in Physiology and Pathology*. : Springer, 2017, p. 517-526. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2513-6_24]

Références bibliographiques

- Choi, H., G. Liu, D. Mellacheruvu, M. Tyers, A. C. Gingras et A. I. Nesvizhskii Analyzing protein-protein interactions from affinity purification-mass spectrometry data with SAINT. *Current protocols in bioinformatics*, 2012, 8.15. 11-18.15. 23. [<https://doi.org/10.1021/pr201185r>]
- Chopra, A. K. et D. K. Mathur Purification and Characterization of Heat-Stable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67. *Journal of Dairy Science*, 1985, 68(12), 3202-3211. [[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81228-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81228-5)]
- Christen, G. L. A Rapid Method for Measuring Protease Activity in Milk Using Radiolabeled Casein. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70(9), 1807-1814. [[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80218-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80218-7)]
- Chun, J., J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim et Y.-W. Lim EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(10), 2259-2261. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64915-0>]
- Chun, J., A. Oren, A. Ventosa, H. Christensen, D. R. Arahall, M. S. Da Costa, A. P. Rooney, H. Yi, X.-W. Xu, S. De Meyer et M. E. Trujillo Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1), 461-466. [<https://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.002516>]
- Cicicopol, C., J. Peters, J. Kellermann et W. Baumeister Primary structure of a multimeric protein, homologous to the PEP-utilizing enzyme family and isolated from a hyperthermophilic archaeobacterium. *FEBS letters*, 1994, 356(2-3), 345-350. [[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01304-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01304-7)]
- Cihan, A. C., B. Ozcan et C. Cokmus *Anoxybacillus salavatliensis* sp. nov., an α -glucosidase producing, thermophilic bacterium isolated from Salavatli, Turkey. *Journal of basic microbiology*, 2011, 51(2), 136-146. [<https://doi.org/10.1002/jobm.201000115>]
- Cihan, A. C., N. Tekin, B. Ozcan et C. Cokmus The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(1), 309-324. [<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000100037>]
- Clarke, A. The thermal limits to life on Earth. *International Journal of Astrobiology*, 2014, 13(2), 141-154. [<https://doi.org/10.1017/s1473550413000438>]
- Coêlho, D. F., T. P. Saturnino, F. F. Fernandes, P. G. Mazzola, E. Silveira et E. B. Tambourgi Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. *BioMed Research International*, 2016, 2016, 6. [<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8409183>]
- Cohan, F. M. et E. B. Perry A Systematics for Discovering the Fundamental Units of Bacterial Diversity. *Current Biology*, 2007, 17(10), R373-R386. [<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.032>]
- Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. Mcgarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske et J. M. Tiedje Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 2014, 42(D1), D633-D642. [<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1244>]
- Contesini, F. J., R. R. D. Melo et H. H. Sato An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*, 2017, 1-14. [<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>]
- Coorevits, A., A. E. Dinsdale, G. Halket, L. Lebbe, P. De Vos, A. Van Landschoot et N. A. Logan Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(7), 1470-1485. [<https://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.030346-0>]
- Da Cunha, C. D., A. S. Rosado, G. V. Sebastián, L. Seldin et I. Von Der Weid Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 73(4), 949-959. [<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0531-2>]

- Daebeler, A., C. W. Herbold, J. Vierheilig, C. J. Sedlacek, P. Pjevac, M. Albertsen, R. H. Kirkegaard, J. R. De La Torre, H. Daims et M. Wagner Cultivation and Genomic Analysis of “*Candidatus Nitrosocaldus islandicus*,” an Obligately Thermophilic, Ammonia-Oxidizing Thaumarchaeon from a Hot Spring Biofilm in Graendalur Valley, Iceland. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(193). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00193>]
- Dai, J., Y. Liu, Y. Lei, Y. Gao, F. Han, Y. Xiao et H. Peng A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* ssp. nov. with very high ethanol tolerance. *FEMS microbiology letters*, 2011, 320(1), 72-78. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02294.x>]
- Dai, K., J.-L. Wen, F. Zhang, X.-W. Ma, X.-Y. Cui, Q. Zhang, T.-J. Zhao et R. J. Zeng Electricity production and microbial characterization of thermophilic microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 2017, 243, 512-519. [<https://doi.org/10.2166/wst.2008.431>]
- Daniel, R. M. et M. J. Danson. [24] Assaying activity and assessing thermostability of hyperthermophilic enzymes. In *Methods in Enzymology*. : Academic Press, 2001, vol. 334, p. 283-293. [[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)34476-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)34476-2)]
- Daniel, R. M., M. J. Danson, R. Eenthal, C. K. Lee et M. E. Peterson The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. *Extremophiles*, 2008, 12(1), 51-59. [<https://doi.org/10.1007/s00792-007-0089-7>]
- Daniel, R. M., M. E. Peterson, M. J. Danson, N. C. Price, S. M. Kelly, C. R. Monk, C. S. Weinberg, M. L. Oudshoorn et C. K. Lee The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemical Journal*, 2010, 425(2), 353-360. [<https://doi.org/10.1042/bj20091254>]
- Daniel, R. M. et M. J. Danson Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS letters*, 2013, 587(17), 2738-2743. [<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.027>]
- Danson, M. J. et D. W. Hough Thermostability and thermoactivity of extremozymes. *EXTREMOPHILES-Volume I*, 2009, 3, 209.
- Darlu, P. et P. Tassy La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes. Paris, France, 1993.
- Dartnell, L. Biological constraints on habitability. *Astronomy & Geophysics*, 2011, 52(1), 1.25-21.28. [<http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-4004.2011.52125.x>]
- Das, R. et M. Gerstein The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Functional & integrative genomics*, 2000, 1(1), 76-88. [<https://doi.org/10.1007/s101420000003>]
- Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott et K. M. Jones *Data for biochemical research*. Edition ed. : Clarendon Press, 2002. ISBN 0198553587.
- De Cordt, S., K. Vanhoof, J. Hu, G. Maesmans, M. Hendrickx et P. Tobback Thermostability of soluble and immobilized α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 40(3), 396-402. [<https://doi.org/10.1002/bit.260400309>]
- De La Torre, J. R., C. B. Walker, A. E. Ingalls, M. Könneke et D. A. Stahl Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental microbiology*, 2008, 10(3), 810-818. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01506.x>]
- De Vos, P. Studying the bacterial diversity of the soil by culture-independent approaches. In *Endospore-forming Soil Bacteria*. : Springer, 2011, p. 61-72. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8_3]
- De Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer et W. B. Whitman. Phylum BXIII. *Firmicutes*. In D.R. Boone, R.W. Castenholz et G. G.M. eds. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York : Springer Science & Business Media, 2011, vol. 3, p. 625-637. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_29]

Références bibliographiques

- De Vos, P. *Bacillales*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00057>]
- De Vos, P., W. Ludwig, K.-H. Schleifer et W. B. Whitman. “*Paenibacillaceae*” fam. nov. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00114>]
- De Vos, P., F. Thompson, C. Thompson et J. Swings. A Flavor of Prokaryotic Taxonomy: Systematics Revisited. In *Microbial Resources*. : Elsevier, 2017, p. 29-44. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804765-1.00002-3>]
- Decastro, M.-E., E. Rodríguez-Belmonte et M.-I. González-Siso Metagenomics of Thermophiles with a Focus on Discovery of Novel Thermozyymes. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(1521). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01521>]
- Delsuc, F., H. Brinkmann et H. Philippe Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6, 361. [<https://doi.org/10.1038/nrg1603>]
- Demain, A. L. et P. Vaishnav Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 2009, 27(3), 297-306. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00542-0>]
- Demirjian, D. C., P. C. Shah et F. Morís-Varas. Screening for novel enzymes. In *Biocatalysis-From discovery To Application*. : Springer, 1999, p. 1-29. [https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7_1]
- Deng, L., Z. Wang, S. Yang, J. Song, F. Que, H. Zhang et F. Feng Improvement of Functional Properties of Wheat Gluten Using Acid Protease from *Aspergillus usarii*. *PloS one*, 2016, 11(7), e0160101. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160101>]
- Derekova, A., C. Sjøholm, R. Mandeva et M. Kambourova *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria). *Extremophiles*, 2007, 11(4), 577-583. [<https://doi.org/10.1007/s00792-007-0071-4>]
- Derekova, A., R. Mandeva et M. Kambourova Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008a, 24(9), 1697-1702. [<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9663-0>]
- Derekova, A., R. Mandeva et M. Kambourova Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World J Microbiol Biotechnol World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008b, 24(9), 1697-1702. [<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9663-0>]
- Desantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu et G. L. Andersen Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72(7), 5069-5072. [<https://doi.org/10.1128/aem.03006-05>]
- Desjardins, P. et D. Conklin NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2010, (45). [<https://doi.org/10.3791/2565>]
- Devasena, T. *Enzymology*. Edtion ed. : Oxford University Press, 2010. ISBN 0198064438.
- Dewan, S. S. *Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*. 2017.
- Dhandapani, R. et R. Vijayaragavan Production of a thermophilic, extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1994, 10(1), 33-35. [<https://doi.org/10.1007/BF00357559>]
- Di Cera, E. Serine proteases. *IUBMB life*, 2009, 61(5), 510-515. [<https://doi.org/10.1002/iub.186>]

Références bibliographiques

- Dipippo, J. L., C. L. Nesbø, H. Dahle, W. F. Doolittle, N.-K. Birkland et K. M. Noll *Kosmotoga olearia* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic heterotroph isolated from an oil production fluid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(12), 2991-3000. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.008045-0>]
- Dodsworth, J. A., B. A. Hungate et B. P. Hedlund Ammonia oxidation, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in two US Great Basin hot springs with abundant ammonia-oxidizing archaea. *Environmental microbiology*, 2011, 13(8), 2371-2386. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02508.x>]
- Donaghy, J., K. Bronnenmeier, P. Soto-Kelly et A. McKay Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercoarium*. *Journal of applied microbiology*, 2000, 88(3), 458-466. [<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00983.x>]
- Donk, P. A highly resistant thermophilic organism. *Journal of bacteriology*, 1920, 5(4), 373.
- Drejer, E. B., S. Hakvåg, M. Irla et T. Brautaset Genetic Tools and Techniques for Recombinant Expression in Thermophilic *Bacillaceae*. *Microorganisms*, 2018, 6(2)(42), 1-19. [<https://doi.org/10.3390/microorganisms6020042>]
- Dulger, S., Z. Demirbag et A. O. Belduz *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5), 1499-1503. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02863-0>]
- Dumorne, K., D. C. Córdova, M. Astorga-Eló et P. Renganathan Extremozymes: A potential source for industrial applications. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2017, 27(4), 649-659. [<https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>]
- Dumorné, K. Biotechnological and Industrial Applications of Enzymes Produced by Extremophilic Bacteria. A Mini Review. *Preprints. Life sciences*, 2018, 1-22. [<https://doi.org/10.20944/preprints201801.0198.v1>]
- Dutt, K., G. Meghwanshi, P. Gupta et R. Saxena Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. *Letters in applied microbiology*, 2008, 46(5), 513-518. [<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02324.x>]
- Ebeling, W., N. Hennrich, M. Klockow, H. Metz, H. D. Orth et H. Lang Proteinase K from *Tritirachium album limber*. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(1), 91-97. [<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x>]
- Edgar, R. C., B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince et R. Knight UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16), 2194-2200. [<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>]
- Eggen, R., A. Geerling, J. Watts et W. M. De Vos Characterization of pyrolysin, a hyperthermoactive serine protease from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *FEMS microbiology letters*, 1990, 71(1-2), 17-20. [[https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90025-1)]
- Egorova, K. et G. Antranikian Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current opinion in microbiology*, 2005, 8(6), 649-655. [<https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.015>]
- Eid, A. E. et A. J. Matty A simple in vitro method for measuring protein digestibility. *Aquaculture*, 1989, 79(1), 111-119. [[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90451-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90451-1)]
- Eijsink, V. G. H., A. Bjørk, S. Gåseidnes, R. Sirevåg, B. Synstad, B. V. D. Burg et G. Vriend Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology*, 2004, 113(1), 105-120. [<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.026>]
- Elleuche, S., C. Schäfers, S. Blank, C. Schröder et G. Antranikian Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current opinion in microbiology*, 2015, 25, 113-119. [<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.011>]

Références bibliographiques

- Esakkiraj, P., B. Meleppat, A. K. Lakra, R. Ayyanna et V. Arul Cloning, expression, characterization and application of protease produced by *Bacillus cereus* PMW8. RSC Advances, 2016, 6(45), 38611-38616. [<https://doi.org/10.1039/c5ra27671c>]
- Esclapez-Espliego, J. M., V. Bautista-Saiz, J. Torregrosa-Crespo, A. V. Luque, M. L. Camacho-Carrasco, C. Pire, M. J. Bonete et R. M. Martínez-Espinosa. Extremophile Enzymes and Biotechnology. In R. Durvasula et D.S. Rao eds. *Extremophiles: From Biology to Biotechnology*. : CRC Press, 2018, p. 227-242. [<https://doi.org/10.1201/9781315154695>]
- Esin, A., T. Ellis et T. Warnecke Horizontal gene flow into *Geobacillus* is constrained by the chromosomal organization of growth and sporulation. bioRxiv, 2018. [<https://doi.org/10.1101/381442>]
- Ewing, B., L. Hillier, M. C. Wendl et P. Green Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. Genome research, 1998, 8(3), 175-185. [<https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>]
- Ezaki, T. *Peptococcaceae*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 1-5. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00134>]
- Farrelly, V., F. A. Rainey et E. Stackebrandt Effect of genome size and rrm gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Applied and environmental microbiology, 1995, 61(7), 2798-2801. [<https://doi.org/10.1007/bf01919508>]
- Feder, J. et J. M. Schuck Studies on the *Bacillus subtilis* neutral-protease-and *Bacillus thermoproteolyticus* thermolysin-catalyzed hydrolysis of dipeptide substrates. Biochemistry, 1970, 9(14), 2784-2791. [<https://doi.org/10.1021/bi00816a005>]
- Feller, G. Protein folding at extreme temperatures: current issues. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. : Elsevier, 2017. [<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.1965>]
- Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 1985, 783-791. [<https://doi.org/10.2307/2408678>]
- Fernandes, P. Enzymes in Fish and Seafood Processing. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2016, 4(59). [<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00059>]
- Ferrera, I. et A.-L. Reysenbach. Thermophiles. In *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2001. [<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000406>]
- Ferrero, M., G. Castro, C. Abate, M. Baigori et F. Sineriz Thermostable alkaline protéases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. Applied microbiology and biotechnology, 1996, 45(3), 327-332. [<https://doi.org/10.1007/s002530050691>]
- Fiala, G. et K. O. Stetter *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 C. Archives of microbiology, 1986, 145(1), 56-61. [<https://doi.org/10.1007/BF00413027>]
- Finch, A. et J. Kim Thermophilic Proteins as Versatile Scaffolds for Protein Engineering. Microorganisms, 2018, 6(4), 97. [<https://doi.org/10.3390/microorganisms6040097>]
- Finn, R. D., P. Coggill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, J. Mistry, A. L. Mitchell, S. C. Potter, M. Punta, M. Qureshi et A. Sangrador-Vegas The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic acids research, 2015, 44(D1), D279-D285. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>]
- Finore, I., L. Lama, A. Poli, P. Di Donato et B. Nicolaus. Biotechnology Implications of Extremophiles as Life Pioneers and Wellspring of Valuable Biomolecules. In *Microbial Factories*. : Springer, 2015, p. 193-216. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2595-9_13]

Références bibliographiques

- Forterre, P., A. Bergerat et P. Lopex-Garcia The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. *FEMS microbiology reviews*, 1996, 18(2-3), 237-248. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00240.x>]
- Foti, M. J., D. Y. Sorokin, E. E. Zacharova, N. V. Pimenov, J. G. Kuenen et G. Muyzer Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia). *Extremophiles*, 2008, 12(1), 133-145. [<https://doi.org/10.1007/s00792-007-0117-7>]
- Foued, B., D. Hénia, B. Lazhar, M. Nabil et C. Nabil Hydrogeochemistry and geothermometry of thermal springs from the Guelma region, Algeria. *Journal of the Geological Society of India*, 2017, 90(2), 226-232. [<https://doi.org/10.1007/s12594-017-0703-y>]
- Frazier, W. C. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 1926, 302-309. [<https://doi.org/10.1093/infdis/39.4.302>]
- Fuchsman, C. A., R. E. Collins, G. Rocap et W. J. Brazelton Effect of the environment on horizontal gene transfer between bacteria and archaea. *PeerJ*, 2017, 5, e3865. [<https://doi.org/10.7717/peerj.3865>]
- Fuciños, P., C. Abadín, A. Sanromán, M. Longo, L. Pastrana et M. Rúa Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: partial purification and preliminary biochemical characterisation. *Journal of Biotechnology*, 2005, 117(3), 233-241. [<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.01.019>]
- Fuke, P., A. A. Khardenavis et H. J. Purohit Recent Trends in Bacterial Keratinases. *Recent Advances in Biotechnology*, 2018, 33-42.
- Fukuchi, S., K. Yoshimune, M. Wakayama, M. Moriguchi et K. Nishikawa Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of molecular biology*, 2003, 327(2), 347-357. [[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00150-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00150-5)]
- Galperin, M. Y. Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*. *Microbiology spectrum*, 2013, 1(2), TBS-0015-2012. [<https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.tbs-0015-2012>]
- Galperin, M. Y., D. M. Kristensen, K. S. Makarova, Y. I. Wolf et E. V. Koonin Microbial genome analysis: the COG approach. *Briefings in Bioinformatics*, 2017, 1-8. [<http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbx117>]
- García-Aljaro, C., E. Ballesté et M. Muniesa Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Current opinion in microbiology*, 2017, 38, 95-105. [<https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.011>]
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel et A. Bairoch. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook*. : Springer, 2005, p. 571-607. [<https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>]
- Geiger, R., R. H. Aron et T. Paul *The climate near the ground*. Edition ed. Cambridge : Harvard University Press, 1995. ISBN 0674135008 9780674135000. [<https://doi.org/10.1007/978-3-322-86582-3>]
- Georges, F. Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2010, 22(32), 323101. [<https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/32/323101>]
- Gessesse, A. et B. A. Gashe Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(5), 479. [<https://doi.org/10.1023/A:1018308513853>]
- Gessesse, A., R. Hatti-Kaul, B. A. Gashe et B. Mattiasson Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(5), 519-524. [[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(02\)00324-1](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00324-1)]
- Ghelani, A., R. Patel, A. Mangrola et P. Dudhagara Cultivation-independent comprehensive survey of bacterial diversity in Tulsi Shyam Hot Springs, India. *Genomics data*, 2015, 4, 54-56. [<https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.03.003>]

Références bibliographiques

- Ghilamical, A. M., N. L. Budambula, S. E. Anami, T. Mehari et H. I. Boga Thermotolerant bacteria of biotechnological potential from hot springs in Eritrea. *African Journal of Microbiology Research*, 2018, 12(22), 512-524. [<https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8626>]
- Ghosh, A., K. Chakrabarti et D. Chattopadhyay Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2008, 35(8), 825-834. [<https://doi.org/10.1007/s10295-008-0354-5>]
- Giddings, L.-A. et D. J. Newman. Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. In *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles*. : Springer, 2015, p. 1-75. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14361-3_1]
- Gillis, M., P. Vandamme, P. D. Vos, J. Swings et K. Kersters. Polyphasic Taxonomy. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00021>]
- Goh, K. M., U. M. Kahar, Y. Y. Chai, C. S. Chong, K. P. Chai, V. Ranjani, R. M. Illias et K.-G. Chan Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2013, 97(4), 1475-1488. [<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4663-2>]
- Gomes, E., A. R. De Souza, G. L. Orjuela, R. Da Silva, T. B. De Oliveira et A. Rodrigues. Applications and benefits of thermophilic microorganisms and their enzymes for industrial biotechnology. In *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. : Springer, 2016, p. 459-492. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_21]
- Gomes, J. et W. Steiner The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology*, 2004, 42(4), 223-235.
- Gómez, F. et V. Parro. Applications of extremophiles in astrobiology: habitability and life detection strategies. In *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. : Springer, 2012, p. 199-229. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-99691-1_9]
- Gomri, M. A. Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. Mémoire de Magistère Université Mentouri Constantine, 2012, 137.
- González-González, R., P. Fuciños et M. L. Rúa. An Overview on Extremophilic Esterases. In R. Sani et R. Krishnaraj eds. *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*. Cham : Springer, 2017, p. 181-204. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1_10]
- Goodfellow, M. et A. L. Jones. *Thermoactinomycetaceae*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015a. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00119>]
- Goodfellow, M. et A. L. Jones. *Thermoactinomyces*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015b, p. 1-5. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00575>]
- Gordon, R. E., W. Haynes, C. H.-N. Pang et N. Smith *The genus Bacillus*. Edition ed. : , 1973. 109-126 p.
- Gower, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, 1971, 857-871. [<https://doi.org/10.2307/2528823>]
- Gram, C. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *General Microbiology*, 1884, 2, 185-189.
- Guangrong, H., Y. Tiejing, H. Po et J. Jiaying Purification and characterization of a protease from Thermophilic *Bacillus* strain HS08. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(24).

Références bibliographiques

- Guendouze, A., L. Plener, J. Bzdrenga, P. Jacquet, B. Rémy, M. Elias, J.-P. Lavigne, D. Daudé et E. Chabrière Effect of Quorum Quenching Lactonase in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Comparison with Quorum Sensing Inhibitors. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8. [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00227>]
- Gueroui, Y., A. Maoui, H. Touati, M. Guettaf et A. Bousbia Hydrogeochemical and environmental isotopes study of the northeastern Algerian thermal waters. *Environmental Earth Sciences*, 2018, 77(22), 747. [<https://doi.org/10.1007/s12665-018-7938-9>]
- Guinane, C. M., R. M. Kent, S. Norberg, P. M. O'connor, P. D. Cotter, C. Hill, G. F. Fitzgerald, C. Stanton et R. P. Ross Generation of the antimicrobial peptide caseicin A from casein by hydrolysis with thermolysin enzymes. *International Dairy Journal*, 2015, 49, 1-7. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.001>]
- Gundala, P. B. et P. Chinthala. Extremophilic Pectinases. In R. Sani et R. Krishnaraj. *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*. Cham : Springer 2017, p. 155-180. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1_9]
- Gupta, R., Q. Beg et P. Lorenz Bacterial alkaline protéases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2002, 59(1), 15-32. [<https://doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>]
- Gupta, R. et P. Ramnani Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 70(1), 21. [<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>]
- Hamza, H. M., S. M. Ali et H. G. Hassan Partial purification of gelatinase enzyme from local isolate of *Brevibacillus laterosporus*. *National Journal of Chemistry*, 2006, 23, 437-442. [www.uobabylon.edu.iq/publications/chemistry_edition7/njc7_publication_6.DOC]
- Han, P., P. Zhou, S. Hu, S. Yang, Q. Yan et Z. Jiang A novel multifunctional α -amylase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*: biochemical characterization and three-dimensional structure. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2013, 170(2), 420-435. [<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0198-y>]
- Harley, J. P. Harley-Prescott: Laboratory exercises in microbiology. In : McGraw-Hill. México, 2002, p. 1-350.
- Harzevili, F. D. Microbial biotechnology: An introduction. In *Microbial biotechnology*. : CRC Press, 2014, p. 16-23. [<https://doi.org/10.1201/b17587-2>]
- Hassan, N., T.-H. Nguyen, M. Intanon, L. D. Kori, B. K. C. Patel, D. Haltrich, C. Divne et T. C. Tan Biochemical and structural characterization of a thermostable β -glucosidase from *Halothermothrix orenii* for galacto-oligosaccharide synthesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99(4), 1731-1744. [<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6015-x>]
- Hayashi, M. et D. O. Rosenberry Effects of ground water exchange on the hydrology and ecology of surface water. *Groundwater*, 2002, 40(3), 309-316. [<https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2002.tb02659.x>]
- Hedlund, B. P., S. K. Murugapiran, T. W. Alba, A. Levy, J. A. Dodsworth, G. B. Goertz, N. Ivanova et T. Woyke Uncultivated thermophiles: current status and spotlight on 'Aigarchaeota'. *Current opinion in microbiology*, 2015, 25, 136-145. [<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.008>]
- Hedlund, B. P., S. C. Thomas, J. A. Dodsworth, C. L. Zhang et R. Miller. Life in High-Temperature Environments. In *Manual of Environmental Microbiology, Fourth Edition*. : American Society of Microbiology, 2016, p. 4.3. 4-1-4.3. 4-15. [<https://doi.org/10.1128/9781555818821.ch4.3.4>]
- Heigener, H. Verwertung von Amine-Sfiuren als gemeinsame C-und N-Quelle durch bekannte Bodenbakterien, nebst botanischer Beschreibung neu isolierter Betain-und-Valin-Abbauer. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. II*, 1935, 93, 81-113.
- Heinrikson, R. L. [20] Applications of thermolysin in protein structural analysis. In *Methods in enzymology*. : Elsevier, 1977, vol. 47, p. 175-189. [[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(77\)47022-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(77)47022-8)]

Références bibliographiques

- Heulin, T., G. De Luca, M. Barakat, M. Gommeaux, A. De Groot, L. Blanchard, P. Ortet et W. Achouak. Bacterial adaptation to hot and dry deserts. In *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. : Springer, 2017, p. 75-98. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-99691-1_4]
- Heyndrickx, M., L. Vauterin, P. Vandamme, K. Kersters et P. De Vos Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of microbiological methods*, 1996, 26(3), 247-259. [[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00916-5](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00916-5)]
- Hirsch, C. et D. Christensen Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 1983, 46(4), 925-929.
- Holden, J. Extremophiles: hot environments. In M. Schaechter ed. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. : Academic Press, 2009, p. 127-146. [<https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00281-9>]
- Horikoshi, K. Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Current opinion in microbiology*, 1998, 1(3), 291-295. [[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(98\)80032-5](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(98)80032-5)]
- Horne, D. S. et J. A. Lucey. Rennet-induced coagulation of milk. In *Cheese (Fourth Edition)*. : Elsevier, 2017, p. 115-143. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417012-4.00005-3>]
- Hou, W., S. Wang, H. Dong, H. Jiang, B. R. Briggs, J. P. Peacock, Q. Huang, L. Huang, G. Wu, X. Zhi, W. Li, J. A. Dodsworth, B. P. Hedlund, C. Zhang, H. E. Hartnett, P. Dijkstra et B. A. Hungate A Comprehensive Census of Microbial Diversity in Hot Springs of Tengchong, Yunnan Province China Using 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *PloS one*, 2013, 8(1), e53350. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053350>]
- Hrabák, J. et K. Martínek Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of apicultural research*, 2007, 46(3), 160-164. [<https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101388>]
- Hreggvidsson, G. O., S. K. Petursdottir, S. H. Björnsdottir et O. H. Fridjonsson Microbial speciation in the geothermal ecosystem. *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*, 2012, 37-67. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-99691-1_3]
- Huang, B. Q. et E. C. Yeung. Chemical and physical fixation of cells and tissues: an overview. In *Plant microtechniques and protocols*. : Springer, 2015, p. 23-43. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_2]
- Huang, X., B. Tian, Q. Niu, J. Yang, L. Zhang et K. Zhang An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Research in microbiology*, 2005, 156(5), 719-727. [<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.006>]
- Huber, R., J. Stöhr, S. Hohenhaus, R. Rachel, S. Burggraf, H. W. Jannasch et K. O. Stetter *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal vent environment. *Archives of microbiology*, 1995, 164(4), 255-264. [<https://doi.org/10.1007/bf02529959>]
- Hussein, A. H., B. K. Lisowska et D. J. Leak. The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. In *Advances in applied microbiology*. : Elsevier, 2015, vol. 92, p. 1-48. [<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.03.001>]
- Hussein, E. I., J. H. Jacob, M. a. K. Shakhathreh, M. A. Abd Al-Razaq, A. S. F. Juhmani et C. T. Cornelison Exploring the microbial diversity in Jordanian hot springs by comparative metagenomic analysis. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(6), e00521. [<https://doi.org/10.1002/mbo3.521>]
- Ibrahim, A. S., A. A. Al-Salamah, Y. B. El-Badawi, M. A. El-Tayeb et G. Antranikian Detergent-, solvent- and salt-compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: purification and characterization. *Extremophiles*, 2015, 19(5), 961-971. [<https://doi.org/10.1007/s00792-015-0771-0>]
- Illanes, A., C. Altamirano et L. Wilson. Homogeneous enzyme kinetics. In A. Illanes ed. *Enzyme biocatalysis*. Dordrecht : Springer, 2008, p. 107-153. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7_3]

Références bibliographiques

- Imberger, N., D. Meske, J. Juergensen, M. Schulte, P. Barthen, U. Rabausch, A. Angelov, M. Mientus, W. Liebl et R. A. Schmitz Metagenomic cellulases highly tolerant towards the presence of ionic liquids-linking thermostability and halotolerance. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012, 95(1), 135-146. [<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3732-2>]
- Iqbal, I., M. N. Aftab, M. Afzal, A. Ur-Rehman, S. Aftab, A. Zafar, Z. Ud-Din, A. R. Khuharo, J. Iqbal et I. Ul-Haq Purification and characterization of cloned alkaline protease gene of *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of basic microbiology*, 2015, 55(2), 160-171. [<https://doi.org/10.1002/jobm.201400190>]
- Irfan, M., H. I. Guler, A. O. Belduz, A. Shah et S. Canakci Cloning, purification and characterization of a cellulase-free xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* AK53. *Applied biochemistry and microbiology*, 2016, 52(3), 277-286. [<https://doi.org/10.1134/s0003683816030066>]
- Itoh, T. et T. Iino. Phylogeny and biological features of thermophiles. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. : Springer, 2013, p. 249-270. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_9]
- Iubmb. Recommendations of the Nomenclature Committee of the IUBMB. In. : Academic Press, San Diego, 1992.
- Iubmb. Enzyme Nomenclature. EC 3. Hydrolases. Introduction. 2018, [cited Cited. Available from Internet:<<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html#EC34>>.
- Jacobs, M., M. Eliasson, M. Uhlén et J.-I. Flock Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic acids research*, 1985, 13(24), 8913-8926. [<https://doi.org/10.1093/nar/13.24.8913>]
- Jaenicke, R. et G. Böhm The stability of proteins in extreme environments. *Current opinion in structural biology*, 1998, 8(6), 738-748. [[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80094-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80094-8)]
- Jain, D., S. D. Sunda, S. Sanadhya, D. J. Nath et S. K. Khandelwal Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *3 Biotech*, 2017, 7(1), 4. [<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0583-7>]
- Janzen, William p. Screening Technologies for Small Molecule Discovery: The State of the Art. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(9), 1162-1170. [<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.07.015>]
- Jaouadi, N. Z., H. Rekik, A. Badis, S. Trabelsi, M. Belhouli, A. B. Yahiaoui, H. B. Aicha, A. Toumi, S. Bejar et B. Jaouadi Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *PloS one*, 2013, 8(10), e76722. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076722>]
- Jayasinghearachchi, H. S. et B. Lal *Oceanotoga teriensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from offshore oil-producing wells. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(3), 554-560. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.018036-0>]
- Jeanthon, C. Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 77(2), 117-133. [<https://doi.org/10.1023/A:100246382502>]
- Jellouli, K., O. Ghorbel-Bellaaj, H. B. Ayed, L. Manni, R. Agrebi et M. Nasri Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MPI: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, 2011, 46(6), 1248-1256. [<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.012>]
- Jian, S., T. Wenyi et C. Wuyong Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. *Journal of cleaner production*, 2011, 19(4), 325-331. [<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2010.10.011>]
- Jiang, H., H. Dong, G. Zhang, B. Yu, L. R. Chapman et M. W. Fields Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. *Applied and environmental microbiology*, 2006a, 72(6), 3832-3845. [<https://doi.org/10.1128/aem.02869-05>]

Références bibliographiques

- Jiang, Y., F. Xin, J. Lu, W. Dong, W. Zhang, M. Zhang, H. Wu, J. Ma et M. Jiang State of the art review of biofuels production from lignocellulose by thermophilic bacteria. *Bioresource Technology*, 2017. [<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.142>]
- Jiang, Z., Y. Wei, D. Li, L. Li, P. Chai et I. Kusakabe High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers*, 2006b, 66(1), 88-96. [<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.030>]
- Joffin, J. et G. Leyral *Microbiologie Technique Tome 1" Dictionnaire des techniques"*. Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine, 2006a.
- Joffin, J. et G. Leyral *Microbiologie technique, Tome 2: Documentation Technique, Collection Biologie Technique*. Ed. Doin, CRDP Aquitaine. 363p, 2006b.
- Jorge, C. D., N. Borges, I. Bagyan, A. Bilstein et H. Santos Potential applications of stress solutes from extremophiles in protein folding diseases and healthcare. *Extremophiles*, 2016, 20(3), 251-259. [<https://doi.org/10.1007/s00792-016-0828-8>]
- Juárez, A. G. V., G. Rost, U. Heitmann, E. Heger et R. Müller Development of a biotechnological process for the production of high quality linen fibers. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2011, 34(8), 913-921. [<https://doi.org/10.1007/s00449-011-0542-y>]
- Jünemann, S., F. J. Sedlazeck, K. Prior, A. Albersmeier, U. John, J. Kalinowski, A. Mellmann, A. Goesmann, A. Von Haeseler, J. Stoye et D. Harmsen Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nature biotechnology*, 2013, 31, 294. [<https://doi.org/10.1038/nbt.2522>]
- Kahar, U. M., C. L. Ng, K.-G. Chan et K. M. Goh Characterization of a type I pullulanase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 reveals an unusual substrate hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 2016, 100(14), 6291-6307. [<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7451-6>]
- Kalia, V. C., P. Kumar, S. T. Pandian et P. Sharma. Biofouling control by quorum quenching. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. : Springer, 2015, p. 431-440. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_15]
- Kambourova, M. et A. Derekova. Developments in Thermostable Gellan Lyase. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. : Springer, 2013, p. 711-730. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_27]
- Kambourova, M., N. Radchenkova, I. Tomova et I. Bojadjieva. Thermophiles as a Promising Source of Exopolysaccharides with Interesting Properties. In *Biotechnology of Extremophiles*:. : Springer, 2016, p. 117-139. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_4]
- Kambourova, M. Recent Advances in Extremophilic α -Amylases. In *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*. : Springer, 2017, p. 99-113. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1_7]
- Kambourova, M. Thermostable enzymes and polysaccharides produced by thermophilic bacteria isolated from Bulgarian hot springs. *Engineering in Life Sciences*, 2018. [<https://doi.org/10.1002/elsc.201800022>]
- Kambura, A. K., R. K. Mwirichia, R. W. Kasili, E. N. Karanja, H. M. Makonde et H. I. Boga Bacteria and Archaea diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya. *BMC microbiology*, 2016, 16(1), 136. [<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0748-x>]
- Kämpfer, P. et S. P. Glaeser. Prokaryote characterization and identification. In *The Prokaryotes*. : Springer, 2013, p. 123-147. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0_6]
- Kanamaru, H., T. Takesue, O. Odawara et T. Tsuchidate. Method for producing recombinant proteins using recombinant *Brevibacillus*. Patent US20170211116A1. In. : Google Patents, 2017. [<https://patents.google.com/patent/US20170211116A1/en>]

Références bibliographiques

- Kanehisa, M., M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato et K. Morishima KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research*, 2017, 45(D1), D353-D361. [<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw1092>]
- Kanekar, P., S. Nilegaonkar, S. Sarnaik et A. Kelkar Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. *Bioresource Technology*, 2002, 85(1), 87-93. [[https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(02\)00018-4](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(02)00018-4)]
- Kang, J., K.-M. Park, K.-H. Choi, C.-S. Park, G.-E. Kim, D. Kim et J. Cha Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 48(3), 260-266. [<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.006>]
- Kedaid, F. Z. Database on the geothermal resources of Algeria. *Geothermics*, 2007, 36(3), 265-275. [<https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2007.02.002>]
- Khalil, A., N. Sivakumar, M. Arslan et S. Qarawi Novel *Anoxybacillus flavithermus* AK1: A Thermophile Isolated from a Hot Spring in Saudi Arabia. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2018, 43(1), 73-81. [<https://doi.org/10.1007/s13369-017-2622-z>]
- Khan, I. U., N. Habib, F. Hussain, W.-D. Xian, A. Amin, E.-M. Zhou, I. Ahmed, X.-Y. Zhi et W.-J. Li *Thermus caldifontis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(8), 2868-2872. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002037>]
- Khelil, O. et B. Cheba Thermophilic cellulolytic microorganisms from western Algerian sources: promising isolates for cellulosic biomass recycling. *Procedia Technology*, 2014, 12, 519-528. [<https://doi.org/10.1016/j.protcy.2013.12.524>]
- Khyami-Horani, H. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1996, 12(4), 399-401. [<https://doi.org/10.1007/bf00340219>]
- Kikani, B., A. Sharma et S. Singh Culture dependent diversity and phylogeny of thermophilic bacilli from a natural hot spring reservoir in the Gir Forest, Gujarat (India). *Microbiology*, 2015, 84(5), 687-700. [<https://doi.org/10.1134/S0026261715050124>]
- Kim, K., E. Lee, C. Kim, J. Park et M.-J. Kim Ionic-surfactant-coated subtilisin: activity, enantioselectivity, and application to dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. *Organic & biomolecular chemistry*, 2017, 15(41), 8836-8844. [<https://doi.org/10.1039/c7ob02181j>]
- Kim, M. et J. Chun. 16S rRNA gene-based identification of bacteria and archaea using the EzTaxon server. In *Methods in Microbiology*. : Elsevier, 2014, vol. 41, p. 61-74. [<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>]
- King, G. Genomic analysis of novel thermophilic aerobic CO-oxidizing bacteria derived from a unique biofilm community growing on the trunks of dead, steaming trees in the Puhimau thermal area on the flank of Kilauea volcano, Hawaii. Données non-publiées. *Genome NCBI*, 2014.
- Kleine, R. Properties of thermitase, a thermostable serine protease from *Thermoactinomyces vulgaris*. *Acta biologica et medica Germanica*, 1982, 41(1), 89-102.
- Kluszens, L. D., G.-J. W. Van Alebeek et A. G. Voragen Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemical Journal*, 2003, 370(2), 651-659. [<https://doi.org/10.1042/bj20021595>]
- Koch, R., F. Canganella, H. Hippe, K. Jahnke et G. Antranikian Purification and Properties of a Thermostable Pullulanase from a Newly Isolated Thermophilic Anaerobic Bacterium, *Fervidobacterium pennavorans* Ven5. *Applied and environmental microbiology*, 1997, 63(3), 1088-1094. [[https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(83\)80186-2](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(83)80186-2)]
- Kocsis, L., P. Herman et A. Eke The modified Beer–Lambert law revisited. *Physics in Medicine & Biology*, 2006, 51(5), N91. [<https://doi.org/10.1088/0031-9155/51/5/n02>]

- Korhonen, H. et A. Pihlanto Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 2006, 16(9), 945-960. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>]
- Kowalczyk, P., S. Mahdi-Oraibi, A. Misiewicz, N. Gabzdyl, A. Miskiewicz et G. Szparecki Feather-Degrading Bacteria: Their Biochemical and Genetic Characteristics. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2018, 43(1), 33-41. [<https://doi.org/10.1007/s13369-017-2700-2>]
- Kretschmer, S. Alteration of interaction with virulent bacteriophage Tal during differentiation of *Thermoactinomyces vulgaris*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 1982, 22(9), 629-637. [<https://doi.org/10.1002/jobm.19820220904>]
- Krieg, N. R. et P. J. Padgett. Phenotypic and physiological characterization methods. In *Methods in Microbiology*. : Elsevier, 2011, vol. 38, p. 15-60. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387730-7.00003-6>]
- Krishnamurthi, S., A. Ruckmani, R. Pukall et T. Chakrabarti *Psychrobacillus* gen. nov. and proposal for reclassification of *Bacillus insolitus* Larkin & Stokes, 1967, *B. psychrotolerans* Abd-El Rahman et al., 2002 and *B. psychrodurans* Abd-El Rahman et al., 2002 as *Psychrobacillus insolitus* comb. nov., *Psychrobacillus psychrotolerans* comb. nov. and *Psychrobacillus psychrodurans* comb. nov. . *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(7), 367-373. [<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.06.003>]
- Kristjansson, J. et G. Hreggvidsson Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995, 11(1), 17-25. [<https://doi.org/10.1007/bf00339134>]
- Kuisiène, N., J. Raugalas, M. Stuknyte et D. Chitavichius Identification of the genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer. *FEMS microbiology letters*, 2007, 277(2), 165-172. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00954.x>]
- Kumar, A., A. Alam, D. Tripathi, M. Rani, H. Khatoon, S. Pandey, N. Z. Ehtesham et S. E. Hasnain Protein adaptations in extremophiles: An insight into extremophilic connection of mycobacterial proteome. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2018a. [<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.01.003>]
- Kumar, C. G. et H. Takagi Microbial alkaline protéases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 1999, 17(7), 561-594. [[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00027-0)]
- Kumar, K., N. Arumugam, K. Permaul et S. Singh Thermostable enzymes and their industrial applications. *Microbial Biotechnology: An Interdisciplinary Approach*, 2016a, 115-162. [<https://doi.org/10.1201/9781315367880-6>]
- Kumar, M., A. N. Yadav, R. Tiwari, R. Prasanna et A. K. Saxena Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs. *Annals of microbiology*, 2014, 64(2), 741-751. [<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0709-7>]
- Kumar, S., K. K. Krishnani, B. Bhushan et M. P. Brahmane Metagenomics: Retrospect and Prospects in High Throughput Age. *Biotechnology Research International*, 2015, 2015, 13. [<http://dx.doi.org/10.1155/2015/121735>]
- Kumar, S., G. Stecher et K. Tamura MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 2016b. [<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>]
- Kumar, V., A. K. Dangi et P. Shukla Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. *Molecular biotechnology*, 2018b, 1-10. [<https://doi.org/10.1007/s12033-018-0059-6>]
- Kumari, M., A. Sharma et M. Jagannadham Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*, 2012, 131(4), 1295-1303. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.122>]
- Kurup, V. P. et R. J. Heinzen Isolation and characterization of actinophages of *Thermoactinomyces* and *Micropolyspora*. *Canadian journal of microbiology*, 1978, 24(7), 794-797. [<https://doi.org/10.1139/m78-133>]

Références bibliographiques

- Kuznetsova, E., M. Proudfoot, S. A. Sanders, J. Reinking, A. Savchenko, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards et A. F. Yakunin Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS microbiology reviews*, 2005, 29(2), 263-279. [<https://doi.org/10.1016/j.fmre.2004.12.006>]
- Kwan, K., S. Nakai et B. Skura Comparison of four methods for determining protease activity in milk. *Journal of food science*, 1983, 48(5), 1418-1421. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb03505.x>]
- Kwon, K.-M., S. G. Kang, T. G. Sokolova, S. S. Cho, Y. J. Kim, C.-H. Kim et S.-T. Kwon Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus barophilus* Ch5 and its application for long and accurate PCR. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 86, 117-126. [<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.004>]
- Ladenstein, R. et G. Antranikian. Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. In *Biotechnology of Extremophiles*. : Springer, 1998, p. 37-85. [<https://doi.org/10.1007/bfb0102289>]
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* *Nature*, 1970, 227(5259), 680-685. [<https://doi.org/10.1038/227680a0>]
- Lakshmi Bhargavi, P. et R. S. Prakasham A fibrinolytic, alkaline and thermostable metalloprotease from the newly isolated *Serratia* sp. RSPB11. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 61, 479-486. [<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.009>]
- Laubach, C. Spore-bearing bacteria in water. *Journal of bacteriology*, 1916, 1(5), 505.
- Leber, T. M. et F. R. Balkwill Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical biochemistry*, 1997, 249(1), 24-28. [<https://doi.org/10.1006/abio.1997.2170>]
- Lebre, P. H., H. Aliyu, P. De Maayer et D. A. Cowan In silico characterization of the global *Geobacillus* and *Parageobacillus* secretome. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1), 156. [<https://doi.org/10.1186/s12934-018-1005-9>]
- Lee, H. S., K. K. Kwon, S. G. Kang, S.-S. Cha, S.-J. Kim et J.-H. Lee Approaches for novel enzyme discovery from marine environments. *Current opinion in biotechnology*, 2010, 21(3), 353-357. [<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.015>]
- Lee, S.-Y., J.-S. Kim, J.-E. Kim, K. Sapkota, M.-H. Shen, S. Kim, H.-S. Chun, J.-C. Yoo, H.-S. Choi et M.-K. Kim Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *Protein expression and purification*, 2005, 43(1), 10-17. [<https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.05.004>]
- Lee Tsay, A. Y. L., San-San, M. Y. Chen et S. H. Wu Identification of a gene encoding Lon protease from *Brevibacillus thermoruber* WR-249 and biochemical characterization of its thermostable recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(4), 834-844. [<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.03988.x>]
- Leinonen, R., H. Sugawara, M. Shumway et C. On Behalf of the International Nucleotide Sequence Database The Sequence Read Archive. *Nucleic acids research*, 2011, 39(suppl_1), D19-D21. [<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq1019>]
- Leuchtenberger, A. et H. Ruttloff Effect of oils and fatty acids on growth and enzyme production of *Thermoactinomyces vulgaris*. III. Influence of culture vessels, strains, and medium composition. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 1983, 23(10), 635-644.
- Levary, D. A., R. Parthasarathy, E. T. Boder et M. E. Ackerman Protein-protein fusion catalyzed by sortase A. *PloS one*, 2011, 6(4), e18342. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018342>]
- Lewin, A., A. Wentzel et S. Valla Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Current opinion in biotechnology*, 2013, 24(3), 516-525. [<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.012>]
- Lewin, A., T. A. Strand, T. Haugen, G. Klinkenberg, H. K. Kotlar, S. Valla, F. Drabløs et A. Wentzel Discovery and Characterization of a Thermostable Esterase from an Oil Reservoir Metagenome. *Advances in Enzyme Research*, 2016, 4(02), 68. [<http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.42008>]

Références bibliographiques

- Li, Q., L. Yi, P. Marek et B. L. Iverson Commercial proteases: Present and future. *FEBS letters*, 2013, 587(8), 1155-1163. [<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>]
- Lima-Bittencourt, C. I., S. Astolfi-Filho, E. Chartone-Souza, F. R. Santos et A. M. Nascimento Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. *BMC microbiology*, 2007, 7(1), 58. [<https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-58>]
- Lin, X., M. Fusek et J. Tang. Thermopsin, a thermostable acid protease from *Sulfolobus acidocaldarius*. In *Structure and Function of the Aspartic Proteinases*. : Springer, 1991, p. 255-257. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6012-4_29]
- Littlechild, J. A. Archaeal enzymes and applications in industrial biocatalysts. *Archaea*, 2015, 2015. [<https://doi.org/10.1155/2015/147671>]
- Liu, B., F. Zhou, S. Wu, Y. Xu et X. Zhang Genomic and proteomic characterization of a thermophilic *Geobacillus* bacteriophage GBSV1. *Research in microbiology*, 2009, 160(2), 166-171. [<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.12.005>]
- Liu, X. et C. Kokare. Microbial Enzymes of Use in Industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*. : Elsevier, 2017, p. 267-298. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803725-6.00011-x>]
- Liu, Y. et R. Guo Interaction between casein and sodium dodecyl sulfate. *Journal of colloid and interface science*, 2007, 315(2), 685-692. [<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.018>]
- Llarch, A., N. Logan, J. Castellví, M. Prieto et J. Guinea Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial ecology*, 1997, 34(1), 58-65. [<https://doi.org/10.1007/s002489900034>]
- Logan, N. A., O. Berge, A. H. Bishop, H.-J. Busse, P. De Vos, D. Fritze, M. Heyndrickx, P. Kämpfer, L. Rabinovitch et M. S. Salkinoja-Salonen Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(8), 2114-2121. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>]
- Logan, N. A. et G. Halket. Developments in the taxonomy of aerobic, endospore-forming bacteria. In *Endospore-forming Soil Bacteria*. : Springer, 2011, p. 1-29. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8_1]
- Logan, N. A. et P. D. Vos. *Bacillaceae*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015a. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00112>]
- Logan, N. A. et P. D. Vos. *Brevibacillus*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015b. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00550>]
- Logan, N. A. et P. D. Vos. *Bacillus*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015c. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>]
- Logan, N. A., P. D. Vos et A. Dinsdale. *Geobacillus*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00533>]
- Logan, N. a. L. A. et R. N. a. N. Allan Aerobic, endospore-forming bacteria from antarctic geothermal soils. *Microbiology of Extreme Soils*, 2008, 155-175. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74231-9_8]
- Loman, N. J., R. V. Misra, T. J. Dallman, C. Constantinidou, S. E. Gharbia, J. Wain et M. J. Pallen Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature biotechnology*, 2012, 30, 434. [<https://doi.org/10.1038/nbt.2198>]

Références bibliographiques

- López-García, P. Extremophiles. In B.B. Gargaud M., Martin H., Reisse J. *Lectures in Astrobiology. Advances in Astrobiology and Biogeophysics*. Berlin, Heidelberg : Springer, 2005, p. 657-679. [https://doi.org/10.1007/10913406_20]
- Ludwig, W., J. Euzéby et W. B. Whitman. Road map of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. : Springer, 2010, p. 1-19. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4_1]
- Ludwig, W., K.-H. Schleifer et W. B. Whitman. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00025>]
- Luo, H. et F. T. Robb A modulator domain controlling thermal stability in the Group II chaperonins of Archaea. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2011, 512(1), 111-118. [<https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.04.017>]
- Maayer, P. D., H. Aliyu et D. A. Cowan Reorganising the order *Bacillales* through phylogenomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, *In press*, 1-12. [<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.007>]
- Macelroy, R. D. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 1974, 6(1), 74-75. [[https://doi.org/10.1016/0303-2647\(74\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0303-2647(74)90026-4)]
- Madigan, M. T. et A. Orent Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current opinion in microbiology*, 1999, 2(3), 265-269. [[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(99\)80046-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(99)80046-0)]
- Madigan, M. T. Bacterial habitats in extreme environments. In *Journey to Diverse Microbial Worlds*. : Springer, 2000, p. 61-72. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4269-4_5]
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley et D. A. Stahl *Brock biology of microorganisms, 14th edition*. Edition ed. : , 2014. ISBN 9780321897398 0321897390.
- Maeda, T., T. Yoshimura, R. Garcia-Contreras et H. I. Ogawa Purification and characterization of a serine protease secreted by *Brevibacillus* sp. KH3 for reducing waste activated sludge and biofilm formation. *Bioresour Technol*, 2011, 102(22), 10650-10656. [<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.098>]
- Makhalanyane, T. P., A. Valverde, E. Gunnigle, A. Frossard, J.-B. Ramond et D. A. Cowan Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS microbiology reviews*, 2015, 39(2), 203-221. [<https://doi.org/10.1093/femsre/fuu011>]
- Manachini, P., M. Fortina, C. Parini et R. Craveri *Bacillus thermoruber* sp. nov., nom. rev., a red-pigmented thermophilic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1985a, 35(4), 493-496. [<https://dx.doi.org/10.1099/00207713-35-4-493>]
- Manachini, P. L., M. G. Fortina, C. Parini et R. Craveri *Bacillus thermoruber* sp. nov., nom. rev., a Red-Pigmented Thermophilic Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1985b, 35(4), 493-496. [<https://dx.doi.org/10.1099/00207713-35-4-493>]
- Manachini, P. L., M. G. Fortina et C. Parini Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber*-a new species of *Bacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 1988, 28(4), 409-413. [<https://doi.org/10.1007/bf00268205>]
- Mandic-Mulec, I. et J. I. Prosser. Diversity of endospore-forming bacteria in soil: characterization and driving mechanisms. In *Endospore-forming Soil Bacteria*. : Springer, 2011, p. 31-59. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8_2]
- Mandic-Mulec, I., P. Stefanic et J. D. Van Elsas. Ecology of bacillaceae. In *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*. : American Society of Microbiology, 2016, p. 59-85. [<http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>]

Références bibliographiques

- Mansfeld, J. Stearolysin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*. : Elsevier, 2013, p. 554-560. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382219-2.00112-5>]
- Mapelli, F., E. Crotti, F. Molinari, D. Daffonchio et S. Borin. Extreme Marine Environments (Brines, Seeps, and Smokers). In *The Marine Microbiome*. : Springer, 2016, p. 251-282. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33000-6_9]
- Marathe, S. K., M. A. Vashistht, A. Prashanth, N. Parveen, S. Chakraborty et S. S. Nair Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(1), 39-46. [<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.001>]
- Marchant, R. et I. Banat. The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. : Springer, 2010, p. 1887-1896. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_138]
- Margaryan, A., G. Shahinyan, P. Hovhannisyanyan, H. Panosyan, N.-K. Birkeland et A. Trchounian. *Geobacillus* and *Anoxybacillus* spp. from Terrestrial Geothermal Springs Worldwide: Diversity and Biotechnological Applications. In D. Egamberdieva, N.-K. Birkeland, H. Panosyan et W.-J. Li eds. *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications*. Singapore : Springer Singapore, 2018, p. 119-166. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6_5]
- Marguet, E. et P. Forterre Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles. *Extremophiles*, 1998, 2(2), 115-122. [<https://doi.org/10.1007/s007920050050>]
- Marks, T. J. et P. T. Hamilton Characterization of a thermophilic bacteriophage of *Geobacillus kaustophilus*. *Archives of virology*, 2014, 159(10), 2771-2775. [<https://doi.org/10.1007/s00705-014-2101-8>]
- Martin, M. et M. Vandenbol The hunt for original microbial enzymes: an initiatory review on the construction and functional screening of (meta) genomic libraries. *BASE*, 2016.
- Matthews, B. W. Thermolysin. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 2011. [<https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0491>]
- Mclean, E. Soil pH and lime requirement. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, 1982, (methods of soil an2), 199-224. [<https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed>]
- McMullan, G., J. Christie, T. Rahman, I. Banat, N. Ternan et R. Marchant. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. In : Portland Press Limited, 2004. [<https://doi.org/10.1042/bst0320214>]
- Mébrouk, B. The Prospects for Geothermal Application in Algeria. In *Progress in Sustainable Energy Technologies: Generating Renewable Energy*. : Springer, 2014, p. 567-573. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07896-0_34]
- Mehta, D. et T. Satyanarayana. Diversity of hot environments and thermophilic microbes. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. : Springer, 2013, p. 3-60. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_1]
- Mehta, D. et T. Satyanarayana Domain C of thermostable α -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* mediates raw starch adsorption. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, 98(10), 4503-4519. [<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5459-8>]
- Mehtani, P., C. Sharma, S. Chatterjee et P. Bhatnagar Proteases: The industrial biocatalyst. *IISU-JOST*, 2013, 2, 1-12.
- Meklat, A., N. Bouras, A. Zitouni, N. Sabaou, F. Mathieu, P. Schumann, C. Spröer et H.-P. Klenk *Saccharopolyspora ghardaiensis* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *The Journal of antibiotics*, 2014, 67(4), 299-303. [<https://doi.org/10.1038/ja.2013.136>]

Références bibliographiques

- Menzel, P., S. R. Gudbergsdóttir, A. G. Rike, L. Lin, Q. Zhang, P. Contursi, M. Moracci, J. K. Kristjánsson, B. Bolduc et S. Gavrilov Comparative metagenomics of eight geographically remote terrestrial hot springs. *Microbial ecology*, 2015, 70(2), 411-424. [<https://doi.org/10.1007/s00248-015-0576-9>]
- Mesbah, N. M. et J. Wiegel Life at extreme limits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1), 44-57. [<https://doi.org/10.1196/annals.1419.028>]
- Meyer-Dombard, D., E. Shock et J. Amend Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology*, 2005, 3(3), 211-227. [<https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2005.00052.x>]
- Miller, D., J. Bryant, E. Madsen et W. Ghiorse Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and environmental microbiology*, 1999, 65(11), 4715-4724. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543776>]
- Miranda-Tello, E., M.-L. Fardeau, L. Fernández, F. Ramírez, J.-L. Cayol, P. Thomas, J.-L. Garcia et B. Ollivier *Desulfovibrio capillatus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico. *Anaerobe*, 2003, 9(2), 97-103. [[https://doi.org/10.1016/s1075-9964\(03\)00064-7](https://doi.org/10.1016/s1075-9964(03)00064-7)]
- Mishra, S. S., R. C. Ray, C. M. Rosell et D. Panda Microbial Enzymes in Food Applications. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*, 2017, 1. [<https://doi.org/10.1201/9781315368405>]
- Mishra, V. K. Optimization of thermotolerant alkaline protease production from *Brevibacillus brevis* strain BT2 using surface response methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 7, 87-94. [<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.008>]
- Mitra, S., B. C. Mukhopadhyay, A. R. Mandal, A. P. Arukha, K. Chakrabarty, G. K. Das, P. K. Chakrabarty et S. R. Biswas Cloning, overexpression, and characterization of a novel alkali-thermostable xylanase from *Geobacillus* sp. WBI. *Journal of basic microbiology*, 2015, 55(4), 527-537. [<https://doi.org/10.1002/jobm.201400495>]
- Miyano, M., K. Tanaka, S. Ishikawa, K. Mori, A. Miguel-Arribas, W. J. J. Meijer et K.-I. Yoshida A novel method for transforming the thermophilic bacterium *Geobacillus kaustophilus*. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1), 127. [<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0969-9>]
- Mokrane, S., N. Bouras, A. Meklat, A. Lahoum, A. Zitouni, C. Verheecke, F. Mathieu, P. Schumann, C. Spröer et N. Sabaou *Thermoactinomyces khenchelensis* sp. nov., a filamentous bacterium isolated from soil sediment of a terrestrial hot spring. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2016, 109(2), 311-317. [<https://doi.org/10.1007/s10482-015-0634-9>]
- Morrison, L. E. et F. W. Tanner Studies on Thermophilic Bacteria: I. Aerobic Thermophilic Bacteria from Water. *Journal of bacteriology*, 1922, 7(3), 343-366.
- Mothe, T. et V. R. Sultanpuram Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3 Biotech*, 2016, 6(1), 53. [<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0377-y>]
- Mótyán, J., F. Tóth et J. Tózsér Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 2013, 3(4), 923. [<http://dx.doi.org/10.3390/biom3040923>]
- Moura, M. V. H., R. A. De Andrade, L. Dobler, K. De Godoy Daiha, G. C. Brêda, C. D. Anobom et R. V. Almeida. Extremophilic Lipases. In R. Sani et R. Krishnaraj eds. *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*. : Springer, 2017, p. 249-270. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1_13]
- Mukherjee, A. K., S. K. Rai et N. K. Bordoloi Biodegradation of waste chicken-feathers by an alkaline β -keratinase (Mukartinase) purified from a mutant *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(8), 1229-1237. [<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.09.007>]

Références bibliographiques

- Mukherjee, S., D. Stamatis, J. Bertsch, G. Ovchinnikova, O. Verezemskaja, M. Isbandi, A. D. Thomas, R. Ali, K. Sharma et N. C. Kyrpidis Genomes OnLine Database (GOLD) v. 6: data updates and feature enhancements. *Nucleic acids research*, 2016, gkw992. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkw992>]
- Müller, A. L., J. R. De Rezende, C. R. Hubert, K. U. Kjeldsen, I. Lagkouvardos, D. Berry, B. B. Jørgensen et A. Loy Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. *The ISME journal*, 2014, 8(6), 1153-1165. [<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.225>]
- Nascimento, W. C. a. D. et M. L. L. Martins Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004, 35(1-2), 91-96. [<https://doi.org/10.1590/s1517-83822004000100015>]
- Nath, S., G. R. Satpathy, R. Mantri, S. Deep et J. C. Ahluwalia Evaluation of enzyme thermostability by enzyme assay and differential scanning calorimetry A study of alcohol dehydrogenase. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 1997, 93(18), 3351-3354. [<https://doi.org/10.1039/A700108H>]
- Nazina, T., T. Tourova, A. Poltarau, E. Novikova, A. Grigoryan, A. Ivanova, A. Lysenko, V. Petrunyaka, G. Osipov et S. Belyaev Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(2), 433-446. [<https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>]
- Nazina, T. N., D. S. Sokolova, A. A. Grigoryan, N. M. Shestakova, E. M. Mikhailova, A. B. Poltarau, T. P. Tourova, A. M. Lysenko, G. A. Osipov et S. S. Belyaev *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(1), 43-53. [<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.001>]
- Neifar, M., S. Maktouf, R. E. Ghorbel, A. Jaouani et A. Cherif Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*. Wiley, Hoboken, 2015, 245-268. [<https://doi.org/10.1002/9781118733103.ch10>]
- Nelson, M. C., H. G. Morrison, J. Benjamino, S. L. Grim et J. Graf Analysis, Optimization and Verification of Illumina-Generated 16S rRNA Gene Amplicon Surveys. *PloS one*, 2014, 9(4), e94249. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094249>]
- Nielsen, H. Predicting secretory proteins with SignalP. *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*, 2017, 59-73. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5_6]
- Nisbet, E. et N. Sleep The habitat and nature of early life. *Nature*, 2001, 409(6823), 1083-1091. [<https://doi.org/10.1038/35059210>]
- Nisha, M. et T. Satyanarayana Characteristics, protein engineering and applications of microbial thermostable pullulanases and pullulan hydrolases. *Applied microbiology and biotechnology*, 2016, 100(13), 5661-5679. [<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7572-y>]
- Nishizawa, M., S. Sakai, U. Konno, N. Nakahara, Y. Takaki, Y. Saito, H. Imachi, E. Tasumi, A. Makabe et K. Koba Nitrogen and oxygen isotope effects of ammonia oxidation by thermophilic *Thaumarchaeota* from a geothermal water stream. *Applied and environmental microbiology*, 2016, 82(15), 4492-4504. [<https://doi.org/10.1128/aem.00250-16>]
- Nurkasanah, S. et N. Widodo The Effect of Different Media Content on Protease Activity *Bacillus subtilis*. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 2015, 3(2), 104-106.
- Okamoto, M., Y. Yonejima, Y. Tsujimoto, Y. Suzuki et K. Watanabe A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 2001, 57(1-2), 103-108. [<https://doi.org/10.1007/s002530100731>]

Références bibliographiques

- Olajuyigbe, F. M. et J. O. Ajele Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. African Journal of Biotechnology, 2005, 4(8), 776-779. [<https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3155>]
- Oliverio, A. M., J. F. Power, A. Washburne, S. C. Cary, M. B. Stott et N. Fierer The ecology and diversity of microbial eukaryotes in geothermal springs. The ISME journal, 2018, 12(8), 1918-1928. [<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0104-2>]
- Olson, D. G., R. Sparling et L. R. Lynd Ethanol production by engineered thermophiles. Current opinion in biotechnology, 2015, 33, 130-141. [<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.006>]
- Ong, P. S. et G. M. Gaucher Production, purification and characterization of thermomycolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. Canadian journal of microbiology, 1976, 22(2), 165-176. [<https://doi.org/10.1139/m76-023>]
- Orphan, V., L. Taylor, D. Hafenbradl et E. Delong Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. Applied and environmental microbiology, 2000, 66(2), 700-711. [<https://doi.org/10.1128/aem.66.2.700-711.2000>]
- Ortiz, A., C. Tokarski et C. Rolando Analyse des protéines ou protéomique. Techniques de l'ingénieur-Analyse et mesure en biotechnologie, 2011, P3312, 1-19.
- Ouali, S., A. Khellaf et K. Baddari Etude des ressources géothermiques du sud algérien. Revue des Energies Renouvelables, 2007, 10(3), 407-414.
- Ouali, S. Contribution à l'étude de quelques réservoirs géothermiques en Algérie. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, 2015, 196.
- Ouali, S. Eléments de l'Atlas géothermique de l'Algérie. Bulletin des Energies Renouvelables, 2018, 44, 11.
- Overbeek, R., R. Olson, G. D. Pusch, G. J. Olsen, J. J. Davis, T. Disz, R. A. Edwards, S. Gerdes, B. Parrello et M. Shukla The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic acids research, 2013, 42(D1), D206-D214. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>]
- Overmann, J. Green Nonsulfur Bacteria. In *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2001. [<http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0000457>]
- Page, M. J. et E. Di Cera Serine peptidases: classification, structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(7-8), 1220-1236. [<https://doi.org/10.1007/s00018-008-7565-9>]
- Palleroni, N. J. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. Antonie van Leeuwenhoek, 1997, 72(1), 3-19. [<https://doi.org/10.1023/A:1000394109961>]
- Palmisano, M. M., L. K. Nakamura, K. E. Duncan, C. A. Istock et F. M. Cohan *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(5), 1671-1679. [<https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1671>]
- Panda, A. K., S. S. Bisht, S. Demondal, N. S. Kumar, G. Gurusubramanian et A. K. Panigrahi *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. Antonie van Leeuwenhoek, 2014, 105(4), 623-639. [<https://doi.org/10.1007/s10482-013-0099-7>]
- Panda, A. K., S. S. Bisht, N. S. Kumar et S. De Mandal Investigations on microbial diversity of Jakrem hot spring, Meghalaya, India using cultivation-independent approach. Genomics data, 2015, 4, 156-157. [<https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.04.016>]
- Panosyan, H. Phylogenetic diversity of thermophilic bacilli isolated from geothermal springs of Nagorno Karabakh. Chemistry and Biology, 2017, 51(3), 179-185.
- Panyam, D. et A. Kilara Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. Trends in food science & technology, 1996, 7(4), 120-125. [[https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10012-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10012-1)]

Références bibliographiques

Parfait, B. et D. Vidaud Analyse des acides nucléiques. Techniques de l'ingénieur Analyse et mesure en biotechnologie, 2002, base documentaire : TIB160DUO.(ref. article : p3315).

Parthasarathy, R., S. Subramanian et E. T. Boder Sortase A as a novel molecular “stapler” for sequence-specific protein conjugation. Bioconjugate chemistry, 2007, 18(2), 469-476. [<https://doi.org/10.1021/bc060339w>]

Peeples, T. L. Bioremediation Using Extremophiles. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. : Elsevier, 2014, p. 251-268. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800021-2.00010-8>]

Perrière, G. et C. Brochier-Armanet *Concepts et méthodes en phylogénie moléculaire*. Edition ed. : Springer, 2010. ISBN 228799047X.

Péter, G., J. Tornai-Lehoczki, K. S. Shin et D. Dlačny *Ogataea thermophila* sp. nov., the teleomorph of *Candida thermophila*. FEMS yeast research, 2007, 7(3), 494-496. [<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00208.x>]

Petit, J. L. et S. Tagger Dégradation des hydrocarbures en présence d'autres substances organiques par des bactéries isolées de l'eau de mer. Canadian journal of microbiology, 1976, 22(11), 1654-1657. [<https://doi.org/10.1139/m76-243>]

Petrova, D. H., S. A. Shishkov et S. S. Vlahov Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties. Journal of basic microbiology, 2006, 46(4), 275-285. [<https://doi.org/10.1002/jobm.200510063>]

Peyronel, D. V. et A. M. B. Cantera A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein. Electrophoresis, 1995, 16(1), 1894-1897. [<https://doi.org/10.1002/elps.11501601311>]

Pham, V. H. T. et J. Kim Cultivation of unculturable soil bacteria. TRENDS in Biotechnology, 2012, 30(9), 475-484. [<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.007>]

Pikuta, E., A. Lysenko, N. Chuvilskaya, U. Mendrock, H. Hippe, N. Suzina, D. Nikitin, G. Osipov et K. Laurinavichius *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(6), 2109-2117. [<https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2109>]

Pikuta, E. V. *Anoxybacillus*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00529>]

Plenge, M. F., A. S. Engel, C. R. Omelon et P. C. Bennett Thermophilic Archaeal Diversity and Methanogenesis from El Tatio Geyser Field, Chile. Geomicrobiology journal, 2017, 34(3), 220-230. [<https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1168496>]

Pollack, R., F. Lorraine, M. Walter et M. Ronald. Laboratory exercises in Microbiology . US. In. : John Wiley & Sons, Inc, 2009, p. 1-302.

Porto, A., G. Campos-Takaki et J. Lima Filho Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. Applied biochemistry and biotechnology, 1996, 60(2), 115-122. [<https://doi.org/10.1007/BF02788066>]

Powell, J. T., A. D. Chatziefthimiou, S. A. Banack, P. A. Cox et J. S. Metcalf Desert crust microorganisms, their environment, and human health. Journal of Arid Environments, 2015, 112, 127-133. [<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2013.11.004>]

Power, J. F., C. R. Carere, C. K. Lee, G. L. Wakerley, D. W. Evans, M. Button, D. White, M. D. Climo, A. M. Hinze et X. C. Morgan Microbial biogeography of 1,000 geothermal springs in New Zealand. bioRxiv, 2018, 247759. [<https://doi.org/10.1101/247759>]

Références bibliographiques

- Pranckute, R. et N. Kuisiene Physicochemical properties of bacteriocin produced by thermophilic *Geobacillus* sp. strain. *Journal of Biotechnology*, 2016, (231), S76. [<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.275>]
- Priest, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, 1977, 41(3), 711.
- Priest, F. G. Regulation of extracellular enzyme synthesis in bacilli. In *Extracellular Enzymes of Microorganisms*. : Springer, 1987, p. 3-12. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1274-1_1]
- Priest, F. G., M. Goodfellow et C. Todd A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Microbiology*, 1988, 134(7), 1847-1882. [<https://dx.doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>]
- Prieto-Barajas, C. M., R. Alfaro-Cuevas, E. Valencia-Cantero et G. Santoyo Effect of seasonality and physicochemical parameters on bacterial communities in two hot spring microbial mats from Araró, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 2017, 88(3), 616-624. [<https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.07.010>]
- Puente, X., L. Sanchez, A. Gutierrez-Fernandez, G. Velasco et C. Lopez-Otin. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. In. : Portland Press Limited, 2005. [<https://doi.org/10.1042/bst0330331>]
- Quehenberger, J., L. Shen, S.-V. Albers, B. Siebers et O. Spadiut *Sulfolobus*—a potential key organism in future biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8. [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02474>]
- Quérellou, J. et J. Guézennec *Biotechnologie des extrêmophiles*. *Techniques de l'Ingenieur*, 2010, 1-13.
- Rabouille, C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, 2017, 27(3), 230-240. [<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>]
- Raddadi, N., A. Cherif, D. Daffonchio, M. Neifar et F. Fava Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99(19), 7907-7913. [<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>]
- Rahman, R., M. Basri et A. Salleh Thermostable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1; nutritional factors affecting protease production. *Annals of microbiology*, 2003, 53(2), 199-210.
- Rahman, R. N. Z. A., C. N. Razak, K. Ampon, M. Basri, W. M. Zin, W. Yunus et A. B. Salleh Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Applied microbiology and biotechnology*, 1994, 40(6), 822-827. [<https://doi.org/10.1007/BF00173982>]
- Rai, S. K. et A. K. Mukherjee Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. *Bioresource Technology*, 2009, 100(9), 2642-2645. [<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.042>]
- Rai, S. K. et A. K. Mukherjee Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β -keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 54(1), 47-56. [<https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.01.007>]
- Rainey, F. A. et A. Oren. Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them. In *Methods in Microbiology*. : Elsevier, 2006, vol. 35, p. 1-25. [[https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(08\)70004-7](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(08)70004-7)]
- Ramasamy, D., A. K. Mishra, J.-C. Lagier, R. Padhmanabhan, M. Rossi, E. Sentausa, D. Raoult et P.-E. Fournier A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2), 384-391. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.057091-0>]
- Ramet, J. et J. Scher. Propriétés physiques du coagulum. In *Le fromage. Troisième édition*. . Paris : Tec & Doc-Lavoisier, 1997, p. 206-218.

Références bibliographiques

- Ramganes, S., A. Maredza et M. Tekere. Microbial exploration in extreme conditions: Metagenomic analysis and future perspectives. In C. Benedetti ed. *Metagenomics-Methods, Applications and Perspectives*. : Nova Science Publishers, 2014, p. 157-181.
- Ranawat, P. et S. Rawat Stress response physiology of thermophiles. *Archives of microbiology*, 2017, 199(3), 391-414. [<https://doi.org/10.1007/s00203-016-1331-4>]
- Rao, D. S. et R. Durvasula. Extremophiles: Nature's Amazing Adapters. In *Extremophiles*. : CRC Press, 2018, p. 1-18. [<https://doi.org/10.1201/9781315154695>]
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge et V. V. Deshpande Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998, 62(3), 597-635.
- Raval, V. H., S. Pillai, C. M. Rawal et S. P. Singh Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochemistry*, 2014, 49(6), 955-962. [<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.014>]
- Rawat, S. et B. N. Johri. Role of Thermophilic Microflora in Composting. In T. Satyanarayana, J. Littlechild et Y. Kawarabayasi eds. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Dordrecht : Springer, 2013, p. 137-169. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_5]
- Rawlings, N. D. et A. J. Barrett Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 1993, 290(Pt 1), 205.
- Rawlings, N. D. Protease families, evolution and mechanism of action. In *Proteases: Structure and Function*. : Springer, 2013, p. 1-36.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett, P. D. Thomas, X. Huang, A. Bateman et R. D. Finn The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic acids research*, 2018, 46(D1), D624-D632. [<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx1134>]
- Razak, N. A., M. Y. A. Samad, M. Basri, W. Yunus, K. Ampon et A. B. Salleh Thermostable extracellular protease of *Bacillus stearothermophilus*: factors affecting its production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1994, 10(3), 260-263. [<https://doi.org/10.1007/BF00414858>]
- Reeb, J., E. Kloppmann, M. Bernhofer et B. Rost Evaluation of transmembrane helix predictions in 2014. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2015, 83(3), 473-484. [<https://doi.org/10.1002/prot.24749>]
- Rekadwad, B. et J. M. Gonzalez Multidisciplinary involvement and potential of thermophiles. *Folia Microbiologica*, 2018. [<https://doi.org/10.1007/s12223-018-0662-8>]
- Reps, A., P. Kołakowski et F. Dajnowiec Ripening Cheeses. *High pressure food science, bioscience and chemistry*, 1998, (222), 265.
- Reysenbach, A.-L., R. Huber, K. O. Stetter, M. Ishii, T. Kawasumi, Y. Igarashi, W. Eder, S. L'haridon et C. Jeanthon. Phylum BI. *Aquificae* phy. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. : Springer, 2001, p. 359-367. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_18]
- Reysenbach, A.-L. *Aquificae* class. nov. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015a. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00009>]
- Reysenbach, A.-L. *Thermotogae* class. nov. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015b. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00051>]
- Reysenbach, A. et N. Pace Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction. *Archaea: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1995, 101-107.

Références bibliographiques

- Rhodes, M. E., J. R. Spear, A. Oren et C. H. House Differences in lateral gene transfer in hypersaline versus thermal environments. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11(1), 199. [<https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-199>]
- Ribeiro, A. L., M. Sánchez, A. Hidalgo et J. Berenguer. Stabilization of Enzymes by Using Thermophiles. In J.-L. Barredo et I. Herráiz eds. *Microbial Steroids: Methods and Protocols*. New York, NY : Springer New York, 2017, p. 297-312. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7183-1_21]
- Rigoldi, F., S. Donini, A. Redaelli, E. Parisini et A. Gautieri Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2018, 2(1), 011501. [<https://doi.org/10.1063/1.4997367>]
- Rohlf, F. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis: version 2.02. Exeter Software. Setauket, New York, 1998.
- Rosenberg, E., E. F. Delong, S. Lory, E. Stackebrandt et F. Thompson *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes*. edited by E. Rosenberg. Edition ed. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2014a. 567 p. ISBN 978-3-642-30119-3.
- Rosenberg, E., E. F. Delong, S. Lory, E. Stackebrandt et F. Thompson *The Prokaryotes : Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea*. edited by E. Rosenberg. Edition ed. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag 2014b. 1028 p. ISBN 978-3-642-38955-9.
- Rozanov, A. S., A. V. Bryanskaya, T. V. Ivanisenko, T. K. Malup et S. E. Peltek Biodiversity of the microbial mat of the Garga hot spring. *BMC Evolutionary Biology*, 2017a, 17(2), 254. [<https://doi.org/10.1186/s12862-017-1106-9>]
- Rozanov, A. S., A. V. Bryanskaya, A. V. Kotenko et S. E. Peltek Draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. Gus2-1 isolated from the hot-spring Gusikha in Bargusyn Valley (Baikal Rift Zone, Russia). *Genomics data*, 2017b, 11, 1. [<https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.11.014>]
- Saibi, H. Geothermal resources in Algeria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009, 13(9), 2544-2552. [<https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2007.02.002>]
- Saitou, N. et M. Nei. The neighbor-joining method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. In *Japanese Journal of Genetics*. : GENETICS SOC JAPAN NATL INST GENETICS, YATA, MISHIMA, SHIZUOKA 411, JAPAN, 1986, vol. 61, p. 611-611. [<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>]
- Sakaguchi, M., M. Takezawa, R. Nakazawa, K. Nozawa, T. Kusakawa, T. Nagasawa, Y. Sugahara et M. Kawakita Role of disulphide bonds in a thermophilic serine protease aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1. *Journal of biochemistry*, 2008, 143(5), 625-632. [<https://doi.org/10.1093/jb/mvn007>]
- Salem, J. Enzymes: Purification. In *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2001. [<https://doi.org/10.1038/npg.els.0000863>]
- Salinas, M. B., M.-L. Fardeau, J.-L. Cayol, L. Casalot, B. K. Patel, P. Thomas, J.-L. Garcia et B. Ollivier *Petrobacter succinatimandens* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an Australian oil well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(3), 645-649. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02732-0>]
- Salleh, A. B., N. Z. R. A. Rahman et M. Basri *New lipases and proteases*. Edition ed. : Nova Publishers, 2006. ISBN 1600210686.
- Sambrook, J. et D. W. Russell *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd edition. ColdSpring-Harbour Laboratory Press, UK, 2001, A1-A5.
- Sanchez, S. et A. L. Demain. Useful Microbial Enzymes—An Introduction. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*. : Elsevier, 2017, p. 1-11. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803725-6.00001-7>]
- Sander, J. D. et J. K. Joung CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 2014, 32, 347. [<https://doi.org/10.1038/nbt.2842>]

Références bibliographiques

- Sanger, F., S. Nicklen et A. R. Coulson DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(12), 5463-5467. [<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>]
- Sangwan, N., C. Lambert, A. Sharma, V. Gupta, P. Khurana, J. P. Khurana, R. E. Sockett, J. A. Gilbert et R. Lal Arsenic rich Himalayan hot spring metagenomics reveal genetically novel predator-prey genotypes. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(6), 812-823. [<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12297>]
- Santos, H., P. Lamosa, N. Borges, L. G. Gonçalves, T. Pais et M. V. Rodrigues. Organic compatible solutes of prokaryotes that thrive in hot environments: the importance of ionic compounds for thermostabilization. In *Extremophiles handbook*. : Springer, 2011, p. 497-520. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_23]
- Sar, P., S. K. Kazy, D. Paul et A. Sarkar. Metal Bioremediation by Thermophilic Microorganisms. In T. Satyanarayana, J. Littlechild et Y. Kawarabayasi eds. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. : Springer, 2013, p. 171-201. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_6]
- Sareen, R. et P. Mishra Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Applied microbiology and biotechnology*, 2008, 79(3), 399-405. [<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1429-y>]
- Sathe, S. S., S. Soni, V. P. Ranvir, V. G. Choudhari, A. A. Odaneth, A. M. Lali et S. K. Chandrayan Heterologous expression and biochemical studies of a thermostable glucose tolerant β -glucosidase from *Methylococcus capsulatus* (bath strain). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102, 805-812. [<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.078>]
- Savitha, S., S. Sadhasivam, K. Swaminathan et F. H. Lin Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2011, 42(2), 298-304. [<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.05.012>]
- Sawant, R. et S. Nagendran Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World J Pharm Sci*, 2014, 3, 568-579.
- Saxena, R., W. Davidson, A. Sheoran et B. Giri Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 2003, 39(2), 239-247. [[https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00068-2](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00068-2)]
- Sayeh, R., J. L. Birrien, K. Alain, G. Barbier, M. Hamdi et D. Prieur Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles*, 2010, 14(6), 501-514. [<https://doi.org/10.1007/s00792-010-0327-2>]
- Schaeffer, A. B. et M. D. Fulton A simplified method of staining endospores. *Science*, 1933, 77(1990), 194-194.
- Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts et B. Witholt Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409, 258. [<http://dx.doi.org/10.1038/35051736>]
- Schulze-Makuch, D., A. Airo et J. Schirmack The Adaptability of Life on Earth and the Diversity of Planetary Habitats. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 2011. [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02011>]
- Seckbach, J. Biodiversity and Extremophiles In J. Seckbach ed. *Life as we know it*. Dordrecht : Springer, 2006, p. 3-143. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4403-8_1]
- Seswita Zilda, D., E. Harmayani, J. Widada, W. Asmara, H. E. Irianto, G. Patantis et Y. N. Fawzya Screening of thermostable protease producing microorganisms isolated from Indonesian hot spring. *Squalen*, 2012a, 7(3), 105-114.
- Seswita Zilda, D., E. N. I. Harmayani, J. Widada, W. Asmara, E. K. O. Irianto, G. Patantis et Y. Nuri Fawzya Optimization of Culture Conditions to Produce Thermostable Keratinolytic Protease of *Brevibacillus thermoruber* LII, Isolated from the Padang Cermin Hot Spring, Lampung, Indonesia. *Microbiol Indones* *Microbiology Indonesia*, 2012b, 6(4), 194-200. [<https://doi.org/10.5454/mi.6.4.8>]

- Setlow, P., S. Wang et Y.-Q. Li Germination of spores of the orders *Bacillales* and *Clostridiales*. Annual review of microbiology, 2017, 71, 459-477. [<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093558>]
- Shang, Y.-S., X.-E. Zhang, X.-D. Wang, Y.-C. Guo, Z.-P. Zhang et Y.-F. Zhou Biochemical characterization and mutational improvement of a thermophilic esterase from *Sulfolobus solfataricus* P2. Biotechnology Letters, 2010, 32(8), 1151-1157. [<https://doi.org/10.1007/s10529-010-0274-0>]
- Sharma, M. Actinomycetes: source, identification, and their applications. Int J Curr Microbiol App Sci, 2014, 3(2), 801-832.
- Sharma, P., R. Kumar et N. Capalash. Restriction enzymes from thermophiles. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. : Springer, 2013, p. 611-647. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_23]
- Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki et K. Komagata Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1996, 46(4), 939-946. [<https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-248>]
- Shivaji, S., T. Srinivas et G. Reddy. The Family *Planococcaceae*. In *The Prokaryotes*. : Springer, 2014, p. 303-351. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9_351]
- Shoemaker, G. K., D. H. Juers, J. M. L. Coombs, B. W. Matthews et D. B. Craig Crystallization of β -Galactosidase Does Not Reduce the Range of Activity of Individual Molecules. Biochemistry, 2003, 42(6), 1707-1710. [<https://doi.org/10.1021/bi0204138>]
- Shrestha, N., G. Chilkoor, B. Vemuri, N. Rathinam, R. K. Sani et V. Gadhamshetty Extremophiles for microbial-electrochemistry applications: A critical review. Bioresource Technology, 2018, 255, 318-330. [<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.151>]
- Sierra-Garcia, I. N., B. M. Dellagnezze, V. P. Santos, R. Capilla, E. V. S. Neto, N. Gray et V. M. Oliveira Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales. Extremophiles, 2017, 21(1), 211-229. [<https://doi.org/10.1007/s00792-016-0897-8>]
- Silva, C. R. D., A. B. Delatorre et M. L. L. Martins Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. Brazilian Journal of Microbiology, 2007, 38(2), 253-258. [<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>]
- Simeonov, A., A. Jadhav, C. J. Thomas, Y. Wang, R. Huang, N. T. Southall, P. Shinn, J. Smith, C. P. Austin et D. S. Auld Fluorescence spectroscopic profiling of compound libraries. Journal of medicinal chemistry, 2008, 51(8), 2363-2371. [<https://doi.org/10.1021/jm701301m>]
- Singh, A. et V. P. Singh Production of extracellular hydrolytic enzymes by an obligate thermophile *Thermoactinomyces vulgaris*. Vegetos: An International Journal of Plant Research, 2012, 25(1), 138-145.
- Singh, B., M. J. Poças-Fonseca, B. Johri et T. Satyanarayana Thermophilic molds: biology and applications. Critical reviews in microbiology, 2016a, 42(6), 985-1006. [<https://doi.org/10.3109/1040841x.2015.1122572>]
- Singh, B. P., S. Vij et S. Hati Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. Peptides, 2014, 54, 171-179. [<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>]
- Singh, P. K., V. Sharma, P. B. Patil et S. Korpole Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. PloS one, 2012, 7(3), e31498. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031498>]
- Singh, R., A. Mittal, M. Kumar et P. K. Mehta Microbial protease in commercial applications. J Pharm Chem Biol Sci, 2016b, 4(3), 365-374.
- Singh, S., A. M. Madlala et B. A. Prior *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. FEMS microbiology reviews, 2003, 27(1), 3-16. [[https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(03\)00018-4](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(03)00018-4)]

Références bibliographiques

Singh, S. P., R. J. Shukla et B. A. Kikani. Molecular diversity and biotechnological relevance of thermophilic actinobacteria. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. : Springer, 2013, p. 459-479. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_18]

Sinsuwan, S., N. Raksakulthai, S. Rodtong et J. Yongsawatdigul Production and characterization of proteinases from *Brevibacillus* sp. isolated from fish sauce fermentation 2006. [<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02058.x>]

Sneath, P. H. et R. R. Sokal *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. Edition ed. : , 1973. ISBN 0716706970.

Soares, M. M., R. D. Silva et E. Gomes Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 1999, 30(4), 299-303. [<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37141999000400002>]

Sokal, R. R. A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas science bulletin*, 1958, 28, 1409-1438.

Soliman, N. A., M. Knoll, Y. R. Abdel-Fattah, R. D. Schmid et S. Lange Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*, 2007, 42(7), 1090-1100. [<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.005>]

Song, Z. Q., F. P. Wang, X. Y. Zhi, J. Q. Chen, E. M. Zhou, F. Liang, X. Xiao, S. K. Tang, H. C. Jiang et C. L. Zhang Bacterial and archaeal diversities in Yunnan and Tibetan hot springs, China. *Environmental microbiology*, 2013, 15(4), 1160-1175. [<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12025>]

Sookkheo, B., S. Sinchaikul, S. Phutrakul et S.-T. Chen Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein expression and purification*, 2000, 20(2), 142-151. [<https://doi.org/10.1006/prep.2000.1282>]

Sorkhoh, N., A. Ibrahim, M. Ghannoum et S. Radwan High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. *Applied microbiology and biotechnology*, 1993, 39(1), 123-126. [<https://doi.org/10.1007/BF00166860>]

Souza, A. N. D. et M. L. L. Martins Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2001, 32(4), 271-275. [<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>]

Souza, P. M. D., M. L. D. A. Bittencourt, C. C. Caprara, M. D. Freitas, R. P. C. D. Almeida, D. Silveira, Y. M. Fonseca, E. X. Ferreira Filho, A. Pessoa Junior et P. O. Magalhães A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, 46(2), 337-346. [<https://doi.org/10.1590/s1517-838246220140359>]

Souza, P. M. D., Mona Lisa De Assis Bittencourt, Carolina Canielles Caprara, Marcela De Freitas, Renata Paula Coppini De Almeida, Dâmaris Silveira, Yris Maria Fonseca, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, Adalberto Pessoa Junior, and Pérola Oliveira Magalhães. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, 46(2), 337-346. [<https://doi.org/10.1590/s1517-838246220140359>]

Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. Grimont, P. Kämpfer, M. C. Maiden, X. Nesme, R. Rosselló-Mora, J. Swings et H. G. Trüper Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(3), 1043-1047. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02360-0>]

Stan-Lotter, H. Physicochemical Boundaries of Life. In H. Stan-Lotter et S. Fendrihan eds. *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. : Springer, 2017, p. 1-21. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48327-6_1]

Statsoft, I. Statistica version 12 (data analysis software system) 2013.

Références bibliographiques

- Stetter, K. O., G. Fiala, G. Huber, R. Huber et A. Seegerer Hyperthermophilic microorganisms. FEMS microbiology letters, 1990, 75(2-3), 117-124. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04089.x>]
- Stetter, K. O. Hyperthermophilic procaryotes. FEMS microbiology reviews, 1996, 18(2-3), 149-158. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00233.x>]
- Stetter, K. O. Hyperthermophiles in the history of life. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2006, 361(1474), 1837-1843. [<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1907>]
- Stewart, E. J. Growing unculturable bacteria. Journal of bacteriology, 2012, JB. 00345-00312. [<https://doi.org/10.1128/jb.00345-12>]
- Straub, C. T., J. A. Counts, D. M. N. Nguyen, C.-H. Wu, B. M. Zeldes, J. R. Crosby, J. M. Conway, J. K. Otten, G. L. Lipscomb, G. J. Schut, M. W. W. Adams et R. M. Kelly Biotechnology of extremely thermophilic archaea. FEMS microbiology reviews, 2018, 42(5), 543-578. [<http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuy012>]
- Studholme, D. J. Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. Microbial biotechnology, 2015, 8(1), 40-48. [<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12161>]
- Stülke, J. et W. Hillen Carbon catabolite repression in bacteria. Current opinion in microbiology, 1999, 2(2), 195-201. [[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80034-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80034-4)]
- Su, C., L. Lei, Y. Duan, K.-Q. Zhang et J. Yang Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. Applied microbiology and biotechnology, 2012, 93(3), 993-1003. [<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3800-7>]
- Suboy, N. Oceanographical Tables. Moscow: USSR Oceanographic Institute Hydrometeorological Commission, 1931.
- Sumantha, A., C. Larroche et A. Pandey Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. Food technology and Biotechnology, 2006, 44(2), 211.
- Sürücü, G. Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes. Water Science and Technology, 1999, 40(1), 53-60. [[https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00363-7](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00363-7)]
- Suzuki, H. Peculiarities and biotechnological potential of environmental adaptation by *Geobacillus* species. Applied microbiology and biotechnology, 2018, 1-13. [<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9422-6>]
- Suzuki, Y., H. Matsui, Y. Tsujimoto et K. Watanabe Enzymatic degradation of fibroin fiber by a fibroinolytic enzyme of *Brevibacillus thermoruber* YAS-1. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(3), 211-215. [<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.04.005>]
- Synowiecki, J. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(42), 7020-7025. [<https://doi.org/10.5897/AJB10.966>]
- Tabouche, N. et S. Achour Etude de la qualité des eaux souterraines de la région orientale du Sahara septentrional algérien. Larhyss Journal, 2004, 3, 99-113.
- Takagi, M., T. Imanaka et S. Aiba Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. Journal of bacteriology, 1985, 163(3), 824-831. [<https://doi.org/10.1128/jb.172.1.411-418.1990>]
- Takahashi, K., A. Totsuka, T. Nakakuki et N. Nakamura Production and Application of a Maltogenic Amylase by a Strain of *Thermomonospora viridis* TF-35. Starch-Stärke, 1992, 44(3), 96-101. [<https://doi.org/10.1002/star.19920440304>]
- Takahata, Y., T. Hoaki et T. Maruyama Starvation survivability of *Thermococcus* strains isolated from Japanese oil reservoirs. Archives of microbiology, 2001, 176(4), 264-270. [<https://doi.org/10.1007/s002030100318>]

Références bibliographiques

- Takai, K., K. Nakamura, T. Toki, U. Tsunogai, M. Miyazaki, J. Miyazaki, H. Hirayama, S. Nakagawa, T. Nunoura et K. Horikoshi Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(31), 10949-10954. [<https://doi.org/10.1073/pnas.0712334105>]
- Takayanagi, T., K. Ajisaka, Y. Takiguchi et K. Shimahara Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1991, 1078(3), 404-410. [[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90163-t](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90163-t)]
- Takii, Y., H. Taguchi, H. Shimoto et Y. Suzuki *Bacillus stearothermophilus* KP 1236 neutral protease with strong thermostability comparable to thermolysin. *Applied microbiology and biotechnology*, 1987, 27(2), 186-191. [<https://doi.org/10.1007/BF00251943>]
- Tamazawa, S., D. Mayumi, H. Mochimaru, S. Sakata, H. Maeda, T. Wakayama, M. Ikarashi, Y. Kamagata et H. Tamaki *Petrothermobacter organivorans* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly anaerobic bacterium of the phylum *Deferribacteres* isolated from a deep subsurface oil reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(10), 3982-3986. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002234>]
- Tamura, K., M. Nei et S. Kumar Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(30), 11030-11035. [<https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>]
- Tanner, K., C. Vilanova et M. Porcar Bioprospecting challenges in unusual environments. *Microbial biotechnology*, 2017, 10(4), 671-673. [<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12723>]
- Tansey, M. R. et T. D. Brock The upper temperature limit for eukaryotic organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1972, 69(9), 2426-2428. [<https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2426>]
- Tatusov, R. L., M. Y. Galperin, D. A. Natale et E. V. Koonin The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research*, 2000, 28(1), 33-36. [<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>]
- Tatusova, T., M. Dicuccio, A. Badretdin, V. Chetvernin, E. P. Nawrocki, L. Zaslavsky, A. Lomsadze, K. D. Pruitt, M. Borodovsky et J. Ostell NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic acids research*, 2016, 44(14), 6614-6624. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>]
- Tavano, O. L. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 90, 1-11. [<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>]
- Tavano, O. L. Proteases. In R.C. Ray et C.M. Rosell eds. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2017, p. 162-179. [<https://doi.org/10.1201/9781315368405>]
- Tavano, O. L., A. Berenguer-Murcia, F. Secundo et R. Fernandez-Lafuente Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2018. [<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>]
- Techtmann, S. M., A. S. Colman et F. T. Robb 'That which does not kill us only makes us stronger': the role of carbon monoxide in thermophilic microbial consortia. *Environ Microbiol*, 2009, 11(5), 1027-1037. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01865.x>]
- Teodoro, C. E. D. S. et M. L. L. Martins Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2000, 31(4), 298-302. [<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000400011>]
- The Freedonia Group, I. *Global Enzymes - Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders*. Marketresearch, 2018.
- Thompson, M. J. et D. Eisenberg Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability1. *Journal of molecular biology*, 1999, 290(2), 595-604. [<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3149>]

Références bibliographiques

- Thornburg, C. C., T. M. Zabriskie et K. L. Mcphail Deep-sea hydrothermal vents: potential hot spots for natural products discovery? *Journal of natural products*, 2010, 73(3), 489-499. [<https://doi.org/10.1021/np900662k>]
- Tindall, B. J., J. Sikorski, R. A. Smibert et N. R. Krieg. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition.* : American Society of Microbiology, 2007, p. 330-393. [<https://doi.org/10.1128/9781555817497.ch15>]
- Tindall, B. J., R. Rosselló-Mora, H.-J. Busse, W. Ludwig et P. Kämpfer Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1), 249-266. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>]
- Tiquia-Arashiro, S. et D. Rodrigues. Thermophiles and Psychrophiles in Nanotechnology. In S. Tiquia-Arashiro et D. Frigi Rodrigues eds. *Extremophiles: Applications in Nanotechnology*. Cham : Springer, 2016, p. 89-127. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45215-9_3]
- Tiwari, K. et H. K. Thakur Diversity and molecular characterization of dominant *Bacillus amyloliquefaciens* (JNU-001) endophytic bacterial strains isolated from native Neem varieties of Sanganer region of Rajasthan. *J Biodivers Biopros Dev*, 2014, 1(115), 2. [<https://doi.org/10.4172/2376-0214.1000115>]
- Toldrá, F., M. Reig, M.-C. Aristoy et L. Mora Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 2017. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>]
- Torreblanca, M., F. Rodriguez-Valera, G. Juez, A. Ventosa, M. Kamekura et M. Kates Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 1986, 8(1), 89-99. [[https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(86\)80155-2](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(86)80155-2)]
- Torres, S., M. A. Martínez, A. Pandey et G. R. Castro An organic-solvent-tolerant esterase from thermophilic *Bacillus licheniformis* S-86. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2), 896-902. [<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.009>]
- Torsvik, V. et L. Øvreås. Microbial diversity, life strategies, and adaptation to life in extreme soils. In P. Dion et C.S. Nautiyal eds. *Microbiology of Extreme Soils*. Berlin, Heidelberg : Springer, 2008, p. 15-43. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74231-9_2]
- Touelle, M. et S. Sommer. Life in extreme conditions: *Deinococcus radiodurans*, an organism able to survive prolonged desiccation and high doses of ionizing radiation. In M. Gargaudn, P. López-García et H. Martin eds. *Origins and evolution of life: an astrobiological perspective*. New York : Cambridge University Press, 2011, p. 347-358. [<https://doi.org/10.1017/cbo9780511933875.024>]
- Touzel, J. P., M. O'donohue, P. Debeire, E. Samain et C. Breton *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(1), 315-320. [<https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-315>]
- Towe, K. M. Environmental oxygen conditions during the origin and early evolution of life. *Advances in Space Research*, 1996, 18(12), 7-15.
- Tripathy, S., S. K. Padhi, R. Sen, U. Maji, M. Samanta, S. Mohanty et N. K. Maiti Draft Genome Sequence of *Brevibacillus borstelensis* cifa_chp40, a Thermophilic Strain Having Biotechnological Importance. *Journal of Genomics*, 2016, 4, 4-6. [<https://dx.doi.org/10.7150%2Fjgen.14036>]
- Trujillo, M. E. *Actinobacteria*. In *Encyclopedia of Life Sciences.* : John Wiley & Sons, Ltd, 2001, p. 1-20. [<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020366.pub2>]
- Tse, C. et K. Ma. Growth and Metabolism of Extremophilic Microorganisms. In *Biotechnology of Extremophiles*:. : Springer, 2016, p. 1-46. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_1]
- Tsilinsky, P. On the thermophilic moulds. *Ann Inst Pasteur*, 1899, 13, 500-505.

Références bibliographiques

- Tsuchiya, K., H. Sakashita, Y. Nakamura et T. Kimura Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agricultural and biological chemistry*, 1991, 55(12), 3125-3127. [<https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.3125>]
- Tsudome, M., S. Deguchi, K. Tsujii, S. Ito et K. Horikoshi Versatile solidified nanofibrous cellulose-containing media for growth of extremophiles. *Applied and environmental microbiology*, 2009, 75(13), 4616-4619. [<https://doi.org/10.1128/aem.00519-09>]
- Tsujibo, H., K. Minoura, K. Miyamoto, H. Endo, M. Moriwaki et Y. Inamori Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Applied and environmental microbiology*, 1993, 59(2), 620-622.
- Turner, C. R., K. L. Uy et R. C. Everhart Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 2015, 183, 93-102. [<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>]
- Uldahl, K. et X. Peng. Biology, Biodiversity and Application of Thermophilic Viruses. In T. Satyanarayana, J. Littlechild et Y. Kawarabayasi eds. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Dordrecht : Springer, 2013. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_10]
- Urbieta, M. S., E. R. Donati, K.-G. Chan, S. Shahar, L. L. Sin et K. M. Goh Thermophiles in the genomic era: biodiversity, science, and applications. *Biotechnology advances*, 2015, 33(6), 633-647. [<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.007>]
- Van Boekel, M., V. Fogliano, N. Pellegrini, C. Stanton, G. Scholz, S. Lalljie, V. Somoza, D. Knorr, P. R. Jasti et G. Eisenbrand A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(9), 1215-1247. [<https://doi.org/10.1002/mnfr.200900608>]
- Van Den Burg, B. et V. Eijssink. Thermolysin and related *Bacillus* metallopeptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*. : Elsevier, 2013, p. 540-553. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-079611-3.50102-6>]
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters et J. Swings Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 1996, 60(2), 407-438.
- Vartoukian, S. R., R. M. Palmer et W. G. Wade Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS microbiology letters*, 2010, 309(1), 1-7. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>]
- Verma, A., M. W. Ansari, M. S. Anwar, R. Agrawal et S. Agrawal Alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. RS1 mitigates industrial pollution. *Protoplasma*, 2014, 251(3), 711-718. [<https://doi.org/10.1007/s00709-013-0559-y>]
- Verma, D., Y. Kawarabayasi, K. Miyazaki et T. Satyanarayana Cloning, Expression and Characteristics of a Novel Alkalistable and Thermostable Xylanase Encoding Gene (MxyI) Retrieved from Compost-Soil Metagenome. *PloS one*, 2013, 8(1), e52459. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052459>]
- Vermelho, A. B., M. N. L. Meirelles, A. Lopes, S. D. G. Petinate, A. A. Chaia et M. H. Branquinha Detection of extracellular protéases from microorganisms on agar plates. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1996, 91(6), 755-760. [<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000600020>]
- Vésteinsdóttir, H., D. B. Reynisdóttir et J. Örylgsson *Hydrogenophilus islandicus* sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an Icelandic hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(2), 290-294. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.023572-0>]
- Vetriani, C., A.-L. Reysenbach et J. Doré Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS microbiology letters*, 1998, 161(1), 83-88. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12932.x>]
- Viterbo, A., M. Harel et I. Chet Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS microbiology letters*, 2004, 238(1), 151-158. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09750.x>]

Références bibliographiques

- Von Heijne, G. Transcending the impenetrable: How proteins come to terms with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1988, 947(2), 307-333. [[https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90013-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90013-5)]
- Von Heijne, G. The signal peptide. *The Journal of membrane biology*, 1990, 115(3), 195-201. [<https://doi.org/10.1007/BF01868635>]
- Voorhorst, W. G. B. Molecular characterization of hydrolytic enzymes from hyperthermophilic Archaea. 1998. 9789054857969.
- Vranova, V., K. Rejsek et P. Formanek Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology*, 2013, 70, 23-32. [<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.003>]
- Wagner, I. D. et J. Wiegel Diversity of thermophilic anaerobes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1), 1-43. [<https://doi.org/10.1196/annals.1419.029>]
- Wallace, J. M. et P. F. Fox Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food Chemistry*, 1998, 62(2), 217-224. [[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00162-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00162-3)]
- Wang, L., Y. Tang, S. Wang, R.-L. Liu, M.-Z. Liu, Y. Zhang, F.-L. Liang et L. Feng Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles*, 2006, 10(4), 347. [<https://doi.org/10.1007/s00792-006-0505-4>]
- Wang, S., X. Lin, X. Huang, L. Zheng et D. S. Zilda Screening and characterization of the alkaline protease isolated from PLI-1, a strain of *Brevibacillus* sp. collected from Indonesias hot springs. *J. Ocean Univ. China Journal of Ocean University of China : Oceanic and Coastal Sea Research*, 2012, 11(2), 213-218. [<https://doi.org/10.1007/s11802-012-1845-6>]
- Wang, Y., Y. Zheng, M. Wang, Y. Gao, Y. Xiao et H. Peng Non-contiguous finished genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* type strain (E13 T), a strictly thermophilic and organic solvent-tolerant bacterium. *Standards in Genomic Sciences*, 2014, 9(3), 735. [<https://doi.org/10.4056/sigs.4968750>]
- Ward, D. M. A natural species concept for prokaryotes. *Current opinion in microbiology*, 1998, 1(3), 271-277. [[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(98\)80029-5](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(98)80029-5)]
- Webb, E. C. Enzyme nomenclature: a personal retrospective. *The FASEB Journal*, 1993, 7(12), 1192-1194. [<https://doi.org/10.1096/fasebj.7.12.8375619>]
- Wei, T., C. Xu, X. Yu, W. Jia, K. Yang, C. Jia et D. Mao Characterization of a novel thermophilic phospholipase B from *Thermotoga lettingae* TMO: applicability in enzymatic degumming of vegetable oils. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2015, 42(4), 515-522. [<https://doi.org/10.1007/s10295-014-1580-7>]
- Weigmann, H. Ueber zwei an der Käseferifung beteiligte Bakterien. . *Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II*, 1898, Zentbl. Hyg. Abt.(4), 820–834.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier et D. J. Lane 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 1991, 173(2), 697-703. [<https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>]
- Welker, M. et E. R. Moore Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(1), 2-11. [<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.013>]
- Werner, J. J., D. Zhou, J. G. Caporaso, R. Knight et L. T. Angenent Comparison of Illumina paired-end and single-direction sequencing for microbial 16S rRNA gene amplicon surveys. *The ISME journal*, 2012, 6(7), 1273. [<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.186>]
- White, R. H. Hydrolytic stability of biomolecules at high temperatures and its implication for life at 250 C. *Nature*, 1984, 310(5976), 430. [<https://doi.org/10.1038/310430a0>]

Références bibliographiques

- Widowati, E., R. Utami, E. Mahadjoeno et G. Saputro. Effect of temperature and pH on polygalacturonase production by pectinolytic bacteria *Bacillus licheniformis* strain GD2a in submerged medium from Raja Nangka (*Musa paradisiaca* var. *formatypica*) banana peel waste. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. : IOP Publishing, 2017, vol. 193, p. 012018. [<https://doi.org/10.1088/1757-899x/193/1/012018>]
- Wiegel, J. Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS microbiology letters*, 1990, 75(2-3), 155-169. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04092.x>]
- Wiegel, J. et F. Canganella. Extreme thermophiles. In *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2001. [<https://doi.org/10.1038/npg.els.0000392>]
- Wiegel, J. *Thermoanaerobacteraceae* fam. nov. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015a, p. 1. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00149>]
- Wiegel, J. *Clostridiaceae*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. Devos, H. B. et D. S. eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2015b, p. 1-5. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00129>]
- Williams, D. A. et S. D. Reed Comparison of methods for assay of fecal proteolytic activity. *Veterinary clinical pathology*, 1990, 19(1), 20-24. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1990.tb00536.x>]
- Woese, C. R. et G. E. Fox Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(11), 5088-5090. [<https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>]
- Woese, C. R., O. Kandler et M. L. Wheelis Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(12), 4576-4579. [[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90229-y](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90229-y)]
- Xia, W.-J., H.-P. Dong, L. Yu et D.-F. Yu Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, 392(1), 124-130. [<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.044>]
- Yadav, A. N., P. Verma, M. Kumar, K. K. Pal, R. Dey, A. Gupta, J. C. Padaria, G. T. Gujar, S. Kumar, A. Suman, R. Prasanna et A. K. Saxena Diversity and phylogenetic profiling of niche-specific Bacilli from extreme environments of India. *Ann Microbiol Annals of Microbiology*, 2015, 65(2), 611-629. [<https://doi.org/10.1007/s13213-014-0897-9>]
- Yakhlef, W. et A. Darbouche Metabolic diversity of thermophilic bacteria from hot springs in Algeria. *J. Acad*, 2012, 2(1), 57-65.
- Yakimov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray et H. L. Fredrickson Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and environmental microbiology*, 1995, 61(5), 1706-1713.
- Yao, S., Y. Xu, C. Xin, L. Xu, Y. Liu, H. Li, J. Li, J. Zhao et C. Cheng Genome sequence of *Thermoactinomyces daqus* H-18, a novel thermophilic species isolated from high-temperature Daqu. *Genome announcements*, 2015, 3(1), e01394-01314. [<https://doi.org/10.1128/genomea.01394-14>]
- Yildiz, S. Y., N. Radchenkova, K. Y. Arga, M. Kambourova et E. T. Oner Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99(5), 2277-2289. [<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6388-5>]
- Yoo, Y. J., Y. Feng, Y.-H. Kim et C. F. J. Yagonia. Production of Enzymes. In *Fundamentals of Enzyme Engineering*. : Springer, 2017, p. 23-33. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1026-6_3]
- Yoon, J.-H., K.-C. Lee, N. Weiss, Y. H. Kho, K. H. Kang et Y.-H. Park *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb.

Références bibliographiques

- nov., and emended description of th. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(3), 1079-1086. [<https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1079>]
- Yoon, S.-H., S.-M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo et J. Chun Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5), 1613-1617. [<https://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>]
- Yun, S. H., C.-W. Choi, S.-Y. Lee, E. C. Park et S. I. Kim. A Proteomics Approach for the Identification of Novel Proteins in Extremophiles. In P. Rampelotto ed. *Biotechnology of Extremophiles*. Cham : Springer, 2016, vol. 1, p. 303-319. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_10]
- Zakhia, F. et P. De Lajudie La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). Canadian journal of microbiology, 2006, 52(3), 169-181. [<https://doi.org/10.1139/w05-092>]
- Zarafeta, D., D. Moschidi, E. Ladoukakis, S. Gavrilov, E. D. Chrysina, A. Chatziioannou, I. Kublanov, G. Skretas et F. N. Kolisis Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases. Scientific Reports, 2016, 6, 38886. [<https://doi.org/10.1038/srep38886>]
- Zeigler, D. R. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? Microbiology, 2014, 160(1), 1-11. [<https://dx.doi.org/10.1099/mic.0.071696-0>]
- Zeikus, J. G. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. Enzyme and Microbial Technology, 1979, 1(4), 243-252. [[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(79\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(79)90043-7)]
- Zeng, F. et A. Cohen Comparison of α -amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous *Heteroptera*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2000, 126(1), 101-106. [[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(00\)00193-8](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(00)00193-8)]
- Zhang, X.-Y., X. Fan, Y.-J. Qiu, C.-Y. Li, S. Xing, Y.-T. Zheng et J.-H. Xu Properties of a Newly Identified Thermostable Esterase from *Sulfobacillus acidophilus* and Its Performance in Phthalate Ester Degradation. Applied and environmental microbiology, 2014. [<https://doi.org/10.1128/aem.02072-14>]
- Zhang, Y., S. He et B. K. Simpson Enzymes in Food Bioprocessing-Novel food enzymes, applications, and related techniques. Current Opinion in Food Science, 2018. [<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007>]
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner et W. Miller A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of computational biology, 2000, 7(1-2), 203-214. [<https://doi.org/10.1089/10665270050081478>]
- Zhou, Y., Y. Liang, K. H. Lynch, J. J. Dennis et D. S. Wishart PHAST: a fast phage search tool. Nucleic acids research, 2011, 39(suppl_2), W347-W352. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>]
- Zilda, D. Z., E. Harmayani, J. Widada, W. Asmara, H. E. Irianto, G. Patantis et Y. N. Fawzya Purification and characterization of the newly thermostable protease produced by *Brevibacillus thermoruber* LII isolated From Padang Cermin Hotspring, Indonesia. Squalen Bull. Marine Fisheries Postharvest Biotech. Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology, 2014, 9(1), 1. [<https://doi.org/10.15578/squalen.v9i1.91>]
- Zurawski, J. V., S. E. Blumer-Schuetz, J. M. Conway et R. M. Kelly The Extremely Thermophilic Genus *Caldicellulosiruptor*: Physiological and Genomic Characteristics for Complex Carbohydrate Conversion to Molecular Hydrogen 2014. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8554-9_8]

ANNEXES

ANNEXE 1.

Matériel et Méthodes

Annexe 1. Composition des réactifs et des milieux de culture utilisés durant l'expérimentation (Dawson *et al.*, 2002; Harley, 2002; Joffin et Leyral, 2006a; Joffin et Leyral, 2006b; Pollack *et al.*, 2009).

A. Colorants et réactifs

Réactifs de la coloration de Gram

- solution de violet de gentiane : 1g de violet de gentiane ; 10 mL d'alcool éthylique à 95% (v/v); 2g de phénol complétés à 100 mL avec de l'eau distillée ;
- solution de lugol de Gram : 1 g d'iodure de potassium ; 1 g d'iode complétés à 300 mL avec de l'eau distillée ;
- solution de fuschine de ziehl : 1 g de Fuschine ; 10 mL d'alcool éthylique à 95% (v/v); 5 g de phénol complétés à 100 mL avec de l'eau distillée.

Mode opératoire de la coloration de Gram (Gram, 1884)

- réaliser un frottis à partir d'une culture de 24 heures et le fixer ;
- recouvrir d'une solution au violet de gentiane et laisser agir durant 1 minute ;
- fixer la coloration au lugol pendant 30 secondes ;
- rincer à l'éthanol pendant 5 secondes ;
- recouvrir d'une solution de fuschine de ziehl et laisser agir durant 1 minute ;
- laver avec l'eau distillée, sécher et observer à l'immersion (1000 ×).

Réactifs de la coloration de Schaeffer et Fulton

- solution de vert de malachite : 5 g de vert de malachite complétés à 100 mL avec de l'eau distillée ;
- solution de vert de malachite : 5 g de safranine complétés à 100 mL avec de l'eau distillée.

Mode opératoire de la coloration de Schaeffer et Fulton (Schaeffer et Fulton, 1933)

- réaliser un frottis à partir d'une culture d'au moins 48 heures et le fixer ;
- recouvrir d'une solution au vert de malachite à 5% (p/v) et laisser agir durant 10 à 15 minutes ;
- laver soigneusement avec l'eau distillée ;
- colorer à la safranine à 5% (p/v) pendant 1 minute ;
- laver avec l'eau distillée, sécher et observer à l'immersion (1000 ×);
- les spores apparaissent en vert foncé dans des corps bactériens roses, ou bien libérées dans le frotti (spores matures).

Eau physiologique

9 g de NaCl complétés à 1000 mL par de l'eau distillée.

Réactif de Barritt (réaction de Vogues Proskauer)

- solution 1: 6 g d' α -naphthol dans 100 mL d'alcool éthylique à 95% (v/v) ;
- solution 2: 40 g d'hydroxyde de potassium dans 100 mL d'eau (à conserver au réfrigérateur).

Réactif au rouge de méthyle

0,1 g de rouge de méthyle dans 300 mL d'alcool éthylique à 95% (v/v), compléter jusqu'à 500 mL avec de l'eau distillée.

Réactif de Kovacs

150 mL de N-amyl/isoamyl alcool ; 50 mL d'acide hydrochlorique concentré et 10 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde.

Réactif de Griess

- solution A : 0,8 g d'acide sulfanilique ; 30 mL d'acide acétique ajoutés à 100 mL d'eau distillée ;
- solution B : 0,5 g d' α -naphthylamine ; 30 mL d'acide acétique ajoutés à 100 mL d'eau distillée.

Réactif de Frazier

15 g d' HgCl_2 , 20 mL d' HCl concentré complétés à 100 mL avec de l'eau distillée.

Solution de lugol (pour le test d'hydrolyse de la l'amidon et de la pectine)

1,0 g de diode, 5,0 g d'iodide de potassium ajoutés à 330 mL d'eau distillée.

Solution de rouge Congo

1,0 g de rouge Congo complété jusqu'à 100 mL d'eau distillée.

Préparation de la courbe d'étalonnage à la L-tyrosine

Pour la réalisation de la courbe d'étalonnage, une gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de L-tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 $\mu\text{g/mL}$ selon le même protocole décrit précédemment pour le dosage de l'activité et dans lequel l'extrait enzymatique est remplacé par la solution de L-tyrosine.

Les différentes concentrations de L-tyrosine sont les suivantes : 0 $\mu\text{g/mL}$ (eau distillée) ; 20 $\mu\text{g/mL}$; 40 $\mu\text{g/mL}$; 60 $\mu\text{g/mL}$; 80 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{g/mL}$.

B. Tampons**Solution de *Phosphate-Buffered Saline* X10 concentrée**

80 g de NaCl ; 2 g de KCl ; 14,4 g de Na₂HPO₄ ; 2,4 g KH₂PO₄.

Tableau 14. Composition du tampon phosphate (0,2 M).

pH	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (g/L)	pH	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (g/L)
5,7	22,40	3,49	6,9	10,80	29,51
5,8	22,08	4,29	7,0	9,36	32,73
5,9	21,60	5,37	7,1	7,92	35,95
6,0	21,05	6,60	7,2	6,72	38,63
6,1	20,40	8,05	7,3	5,52	41,31
6,2	19,56	9,93	7,4	4,56	43,46
6,3	18,60	12,07	7,5	3,84	45,07
6,4	17,64	14,22	7,6	3,12	46,68
6,5	16,44	16,90	7,7	2,52	48,55
6,6	15,00	20,12	7,8	2,04	49,09
6,7	13,56	23,34	7,9	1,68	49,89
6,8	12,24	26,29	8,0	1,27	50,81

Tableau 15. Composition du tampon phosphate (0,5 M)/citrate (0,5 M)*.

pH	Na ₂ HPO ₄ (mL)	C ₆ H ₇ O ₈ (mL)	pH	Na ₂ HPO ₄ (mL)	C ₆ H ₇ O ₈ (mL)
2,2	1,60	39,20	5,2	42,88	18,56
2,4	4,96	37,52	5,4	44,60	17,70
2,6	8,72	35,64	5,6	46,40	16,80
2,8	12,68	33,66	5,8	48,36	15,82
3,0	16,44	31,78	6,0	50,52	14,74
3,2	19,76	30,12	6,2	52,88	13,56
3,4	22,80	28,60	6,4	55,40	12,30
3,6	25,96	27,12	6,6	58,20	10,90
3,8	28,40	25,80	6,8	61,80	9,10
4,0	30,84	24,58	7,0	65,88	7,06
4,2	33,12	23,44	7,2	69,56	5,22
4,4	35,28	22,36	7,4	72,68	3,66
4,6	37,40	21,30	7,6	74,92	2,54
4,8	39,44	20,28	7,8	76,60	1,70
5,0	41,20	19,40	8,0	77,80	1,10

* : Préparer une solution d'acide citrique 0,50 M et une solution de phosphate de sodium disodique 0,50 M. Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 mL.

Tableau 16. Composition du tampon glycine (0,2 M)/NaOH (0,2 M)*.

pH	NaOH (0,2 M)
8,6	2,00
8,8	3,00
9,0	4,40
9,2	6,00
9,4	8,40
9,6	11,20
9,8	13,60
10,0	19,30
10,2	22,75

*: mélanger 25 mL d'une solution de glycine à 0,2 M avec X mL d'une solution à 0,2 M de NaOH selon le pH désiré et diluer avec de l'eau distillée jusqu'à 100 mL.

Tableau 20. Composition du tampon Na₂HPO₄ 0,2 M/Acide citrique 0,1 M.

pH	C₆H₇O₈ (mL)	Na₂HPO₄ (mL)	pH	C₆H₇O₈ (mL)	Na₂HPO₄ (mL)
2,6	89,10	10,90	5,2	46,40	53,60
2,8	84,15	15,85	5,4	44,25	55,75
3,0	79,45	20,55	5,6	42,00	58,00
3,2	75,30	24,70	5,8	39,55	60,45
3,4	71,50	28,50	6,0	36,85	63,15
3,6	67,80	32,20	6,2	33,90	66,10
3,8	64,50	35,50	6,4	30,75	69,25
4,0	61,45	38,55	6,6	27,25	72,75
4,2	58,60	41,40	6,8	22,75	77,25
4,4	55,90	44,10	7,0	17,65	82,35
4,6	53,25	46,75	7,2	13,05	86,95
4,8	50,70	49,30	7,4	9,15	90,85
5,0	48,50	51,50	7,6	6,35	93,65

Annexe 1

C. Milieux de culture

Tableau 17. Composition des milieux de culture utilisés pour la caractérisation biochimiques des souches.

Milieu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Constituant	Quantités (% p/v, v/v)												
NaCl	0,5		0,5		0,5		0,2		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Citrate de sodium	0,1												
Citrate d'ammonium ferrique					0,003			0,05					
Bleu de bromothymol	0,01												
Rouge de phénol			0,001	0	0,003								
CaCl ₂ . 2H ₂ O									0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1								0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
KH ₂ PO ₄			0,2										
K ₂ HPO ₄	0,1	0,5											
KNO ₃				0,1									
NH ₄ .H ₂ PO ₄	0,1												
Na ₂ SO ₃					0,03			0,25					
NaNO ₃						1							
Glucose		0,5	0,1		0,1			0,2					
Saccharose					1								
Lactose					1								
Mannitol				0,75									
Amidon soluble								0,2	1				
Carboxyméthylcellulose										0,5			
Pectine											1		
Tween 20												1	
Tween 80													1
Peptone de caséine				1									
Infusion coeur-cervelle						2,5							
Urée			2,4										
Extrait de levure							0,5		0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Peptone		0,5	0,1		2		0,1		0,2	0,4	0,4	0,2	0,2
Peptone viande-foie								3					
Extrait de bœuf					0,3								
Agar	1,5		2	0,35	1,2			1,1	3	3	3	3	3
Eau distillée	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
pH (± 0,2)	7,1	7,5	6,8	7,6	7,4	7,2	7,4	7,6	7,2				

1 : Citrate de Simmons ; 2 : Clark et Lubs ; 3 : Urée de Christensen ; 4 : Mannitol-Mobilité ; 5 : TSI ; 6 : Bouillon nitraté ; 7 : Eau peptonée ; 8 : Gélose viande foie ; 9 : Gélose à amidon ; 10 : Gélose à carboxyméthylcellulose ; 11 : Gélose à pectine ; 12 : Gélose à tween 20 ; 13 : Gélose à tween 80.

D. Références des réactifs

Tableau 10. Références des réactifs utilisés durant l'expérimentation.

Composé	Fournisseur	Référence	Composé	Fournisseur	Référence	Composé	Fournisseur	Référence
3-méthylbutan-1-ol	Sigma	309435	Extrait de viande	Conda	1700	NaOH	Panreac	131687
Acide acétique	Biochem Chemopharma	122703	Fe ₂ (SO ₄). 3H ₂ O	Sigma	V000349	Pectine	Sigma	76282
Acrylamide	Sigma	A7168	FeCl ₃	Sigma	157740	Pepstatine A	Sigma	P5318
Actinomycete Isolation Agar	Difco	212168	Fuschine	Panreac	251333	Peptone de caséine	Sigma	70169
Agar	Conda	1815	Gélatine	Panreac	147116	Persulfate d'ammonium	Sigma	215589
Agarose	BioRad	1613102	Gélose nutritive	Sigma	70148	Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1	Sigma	P2069
Alul	Thermo Fisher Scientific	ER0011	Gélose viande-foie	Conda	1703	Phenylmethylsulfonyl fluoride	Fluka	P7626
Amidon soluble	Biochemica	A4881	GelRed	Thermo Fisher Scientific	41003	Plate Counting Agar	Sigma	70152
Bleu de bromophénol	Merck	108122	Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	SM0312	Polyvinylpyrrolidone	Sigma	P6755
Bleu de bromothymol	Merck	101895	GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	80763	Propionate	Panreac	161810
Bleu de Coomassie R-250	BioRad	1610436	Glycérol	Sigma	G5516	Protéinase K	Sigma	P2308
Bleu de Coomassie G-250	BioRad	161-0803	HaeDIII Fast Digest	Thermo Fisher Scientific	FD0154	Réactif de Bradford	BioRad	500-0002
Bovin Serum Albumin	BioRad	5000007	HCl	Biochem Chemopharma	BVS04010	Réactif de Folin-Ciocalteu phéniqué	Panreac	A5084
C ₆ H ₇ O ₈	Sigma	C0759	HgCl ₂	Sigma	V001972	Réactif de Kovacs	Biorad	55313
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	223506	Inhibiteur de trypsine	Sigma	T0256	Réactifs de Griess	BioRad	171569
Carboxyméthylcellulose	Sigma	C5678	Isopropanol	Sigma	W292907	Rouge Congo	Sigma	C6277
Caséine	Biochemica	C3400	K ₂ HPO ₄	Sigma	1551128	Rouge de méthyle	Merck	106076
Caséine BODIPY FL	Molecular Probes	E6638	KCl	Panreac	A2939	Rouge de phénol	Merck	107241
Chloroforme	Sigma	288306	KH ₂ PO ₄	Sigma	NIST200B	Safranin O	Sigma	S2255
Citrate de sodium	Biochem Chemopharma	319460500	KNO ₃	Sigma	P8394	Sodium dodecyl sulfate	Sigma	L3771
Colour Protein Marker II	NZY	MB09002	KOH	Panreac	121515	Succinate	Panreac	131883
CuCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	459097	L-acide glutamique	Sigma	G1251	Sulfanilamide azocaséine	Sigma	A2765
D(+)-fructose	Biochemica	A3688	Lactate	Panreac	141034	Tampon DreamTaq	Thermo Fisher Scientific	K1071
D(+)-galactose	Biochemica	A1131	L-glycine	Sigma	410225	Tampon Fast Digest	Thermo Fisher Scientific	B64
D(+)-glucose	Biochemica	A1422	LiCl	Sigma	203637	Tampon Tango	Thermo Fisher Scientific	BY5
D(+)-lactose	Biochemica	A0880	L-lysine	Sigma	L5501	Trichloroacetic acid	Sigma	T6399
D(+)-maltose	Biochemica	A3891	L-thréonine	Sigma	T8625	Tris	NZYTech	MB01601
D(+)-mannose	Biochemica	A2187	L-tyrosine	Sigma	T3754	Tris-HCl	NZYTech	MB27301
D(+)-mélibiose	Biochemica	A3125	Lugol	Panreac	257041	Triton X-100	Sigma	T8787
D(+)-saccharose	Biochemica	A3935	Mannitol	Panreac	142067	Tween 20	Panreac	A4974
désoxyribonucléotides	Thermo Fisher Scientific	R0191	Méthanol	Sigma	322415	Tween 80	Panreac	142050
Dextrine	Sigma	D2006	MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M2670	Vert de malachite oxalate	Merck	115942
Dimethyl sulfoxide	Sigma	M81802	MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	105886	Violet de gentiane	Panreac	131762
Dithiothreitol	Thermo Fisher Scientific	R0861	MnCl ₂ .4H ₂ O	Sigma	M3634	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	Z0251
DreamTaq Polymérase	Thermo Fisher Scientific	EP0703	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma	T9281	α-naphthol	Biochem Chemopharma	514090100
Ethanol	Panreac	A3678	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Sigma	S9390			
Ethylendiaminetetraacetic acid	Thermo Fisher Scientific	17892	NaBr	Sigma	229881			
Extrait de levure	Conda	1732	NaCl	Sigma	433209			
β-mércaptoéthanol	Sigma	M6250	NaHCO ₃	Panreac	A0384			

DNA: deoxyribonucleic acid ; kb : kilo base pair ; bp: base pair.

ANNEXE 2.

Résultats

Tableau 25. Profils de restriction des 53 isolats après digestion par AluI et HaeIII FD.

Isolat	Fragments AluI (pb)														Fragments HaeIII FD (pb)													
	1000	950	900	800	700	600	500	450	400	300	250	200	150	100	1000	950	900	800	700	600	500	450	400	300	250	200	150	100
OA28	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Db32	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
OA23	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OA21	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
OA30	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
ENAF93	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Db59	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Db27	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Db25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Db33	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
OA31	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Sah69	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
Sah66	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
AS88	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
AS89	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
AS90	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
AS91	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AS95	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1
Db101	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OA102	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
OA103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OA104	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
OA105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OA106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OA107	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OA108	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Db109	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
Db110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	
OA111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OA112	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OA113	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Db114	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Db115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	
Db116	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
OA117	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OA118	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	
OA119	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	
Db120	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
OA121	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1

1 : présence de la bande ; 0 : absence de la bande.

Tableau 25. Profils de restriction des 53 isolats après digestion par AluI et HaeIII FD (Suite).

Isolat	Fragments AluI (pb)													Fragments HaeIII FD (pb)														
	1000	950	900	800	700	600	500	450	400	300	250	200	150	100	1000	950	900	800	700	600	500	450	400	300	250	200	150	100
OA122	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
OA123	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1
OA124	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
OA125	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
OA126	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
OA127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OA128	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
OA129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
OA130	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
OA131	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
OA132	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Db134	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
OA140	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
Db159	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1

1 : présence de la bande ; 0 : absence de la bande.

Tableau 31. Caractérisation des gènes codant pour des protéases présents sur le génome de la souche *Geobacillus* sp. Sah69.

EC	Nombre de gènes	NA gène	Classification de l'enzyme	Nom de l'enzyme	Taille (aa)	Type	Voie de sécrétion
EC:3.4.23.-	1	2645937399	Endopeptidase aspartique	Facteur de sporulation SpoIIIGA	303	Aspartique	SecretomeP
EC:3.4.23.36	1	2645937388	Peptidase de signal II	Peptidase de signal II	154	Aspartique	SecretomeP
EC:3.4.23.43	1	2645936697	Prépine peptidase	Prépine peptidase/ N-méthyltransférase	251	Aspartique	SecretomeP
EC:3.4.22.70	2	2645937355	Sortase A	Sortase A	197	Cystéine	SignalP
		2645937213		Sortase A	220		SecretomeP
EC:3.4.11.-	1	2645939016	Aminopeptidase	Aminopeptidase II	413	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.11.1	1	2645939134	Leucyl aminopeptidase	Leucyl aminopeptidase	497	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.11.18	2	2645937610	Méthionyl aminopeptidase	Méthionine aminopeptidase, type I	249	Métallo	SecretomeP
		2645937243		Méthionine aminopeptidase, type I	246		SecretomeP
EC:3.4.11.4	2	2645938651	Tripeptide aminopeptidase	Peptidase T-apparentée	374	Métallo	SecretomeP
		2645936538		Peptidase T	411		SecretomeP
EC:3.4.11.9	1	2645937004	Xaa-Pro aminopeptidase	Xaa-Pro aminopeptidase	353	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.13.19	1	2645938022	Dipeptidase membranaire	Dipeptidase membranaire	307	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.17.19	1	2645938973	Carboxypeptidase Taq	Carboxypeptidase Taq	500	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.19.11	1	2645936971	Gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate peptidase	Gamma-D-glutamyl-(L)-meso-diaminopimelate peptidase I	387	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.24.-	6	2645938753	Métalloendopeptidases	Sous unité catalytique de protéase FtsH	632	Métallo	SecretomeP
		2645936683		Facteur de sporulation SpoIVFB	286		SecretomeP
		2645937058		Oligopeptidase F	607		SecretomeP
		2645937612		Protéase-peptide antibactérienne	788		SignalP
		2645937749		Oligopeptidase F	618		SignalP
		2645937976		Régulateur de sigma E	417		SecretomeP
EC:3.4.24.27	1	2645939213	Thermolysine	Thermolysine	64	Métallo	Aucune
EC:3.4.24.78	1	2645936903	GPR endopeptidase	GPR endopeptidase	372	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.-	4	2645939008	Peptidases	Peptidoglycane endopeptidase LytE	341	Non assignées	SignalP
		2645936868		Protéase putative	309		SecretomeP
		2645936869		Protéase putative	422		SecretomeP
		2645938358		Protéine de liaison-pénicilline 1A	891		Aucune
EC:3.4.11.19	1	2645939658	Aminopeptidase D-stéréospécifique	D-aminopeptidase	372	Sérine	SecretomeP

EC : nomenclature de l'Enzyme Commission ; NA : numéro d'accèsion sur la banque *Integrated Microbial Genomes & Microbiomes* ; aa : acides aminés ; SignalP : voie de sécrétion classique ; SecretomeP : voie de sécrétion non classique.

Tableau 31. Caractérisation des gènes codant pour des protéases présents sur le génome de la souche *Geobacillus* sp. Sah69 (suite).

EC	Nombre de gènes	NA gène	Classification de l'enzyme	Nom de l'enzyme	Taille (aa)	Type	Voie de sécrétion
EC:3.4.16.4	4	2645938079	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	261	Métallo	SecretomeP
		2645938726		D-Ala-D-Ala carboxypeptidase A	451	Sérine	SignalP
		2645939578		D-Ala-D-Ala carboxypeptidase DacF	391	Sérine	SignalP
		2645939603		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	384	Sérine	SignalP
EC:3.4.19.1	1	2645937140	Acylaminoacyl-peptidase	Acylaminoacyl-peptidase	438	Sérine	SecretomeP
EC:3.4.21.-	2	2645938601	Sérine endopeptidases	Protéase Lon-apparentée ATP-dépendante	557	Sérine	SecretomeP
		2645939173		Peptide de signal A	335		SignalP
EC:3.4.21.102	1	2645939554	C-terminal peptidase	Protéase carboxyl-terminal	486	Sérine	Aucune
EC:3.4.21.105	1	2645936966	Protéase rhomboïde	Protéase rhomboïde	390	Sérine	SecretomeP
EC:3.4.21.107	2	2645939668	Peptidase Do	Sérine protéase Do	401	Sérine	Aucune
		2645939036		Sérine protéase Do	407		SecretomeP
EC:3.4.21.116	1	2645937027	SpoIVB peptidase	SpoIVB peptidase	431	Sérine	Aucune
EC:3.4.21.53	1	2645938602	Endopeptidase La	Protéinase ATP-dépendante	775	Sérine	SecretomeP
EC:3.4.21.88	2	2645938994	Répresseur LexA	Répresseur LexA	207	Sérine	SecretomeP
		2645938239		Répresseur LexA	59		SecretomeP
EC:3.4.21.89	2	2645938051	Peptidase de signal I	Peptidase de signal I	184	Sérine	SecretomeP
		2645937923		Peptidase de signal type I	183		SecretomeP
EC:3.4.21.92	1	2645939524	Endopeptidase Clp	Sous unité protéolytique de protéase Clp ATP-dépendante	196	Sérine	SecretomeP
EC:3.4.19.13	1	2645936810	Glutathione hydrolase	Gamma-glutamyltransférase 2	448	Thréonine	SecretomeP
EC:3.4.25.2	1	2645937933	HslU--HslV peptidase	Peptidase ATP-dépendante constituante de CodWX	180	Thréonine	SecretomeP

EC : nomenclature de l'Enzyme Commission ; NA : numéro d'accèsion sur la banque *Integrated Microbial Genomes & Microbiomes* ; aa : acides aminés ; SignalP : voie de sécrétion classique ; SecretomeP : voie de sécrétion non classique.

Annexe 2

Tableau 32. Résultats du blast génomique entre le génome de *Geobacillus* sp. Sah69 et les génomes du genre *Geobacillus*.

Souche	NA BioProject	Qualité	Taille (Mpb)	Contigs	% id.sym.	% sim.
<i>Geobacillus</i> sp. Manikaran-105	PRJNA354604	Draft	3,19135	140	75,92	95,92
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF-018B	PRJNA354604	Draft	3,22918	145	75,71	95,96
<i>Geobacillus</i> sp. FJAT-46040	PRJNA390033	Draft	3,36115	5	73,02	91,68
<i>Geobacillus</i> sp. A8	PRJNA213133	Draft	3,34831	173	69,25	90,72
<i>Geobacillus</i> sp. FW23	PRJNA241053	Draft	3,48683	245	68,61	90,81
<i>Geobacillus</i> sp. GHH01	PRJNA180997	Complet	3,58313	-	68,53	91,07
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	PRJNA192273	Draft	3,40238	346	68,48	91,14
<i>Geobacillus</i> sp. CAMR5420	PRJNA243324	Draft	3,49982	96	68,02	90,95
<i>Geobacillus</i> sp. JS12	PRJNA314835	Complet	3,72149	-	67,32	90,93
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61	PRJNA30537	Complet	3,66790	-	66,69	90,23
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52	PRJNA30797	Complet	3,67394	-	66,67	90,24
<i>Geobacillus</i> sp. C56-T3	PRJNA41701	Complet	3,65081	-	66,60	90,33
<i>Geobacillus</i> sp. MAS1	PRJNA222590	Draft	3,49741	121	66,29	90,37
<i>Geobacillus</i> sp. ZGt-1	PRJNA278519	Draft	3,48311	241	66,01	90,39
<i>Geobacillus</i> sp. T6	PRJNA284908	Draft	3,66136	294	65,59	90,13
<i>Geobacillus</i> sp. LEMMY01	PRJNA373874	Draft	3,58607	76	65,57	89,56
<i>Geobacillus</i> sp. CAMR12739	PRJNA243323	Draft	3,41474	74	65,38	89,73
<i>Geobacillus</i> sp. BCO2	PRJNA261745	Draft	3,41703	154	65,34	89,80
<i>Geobacillus</i> sp. 1017	PRJNA353982	Draft	3,57495	186	64,75	89,38
<i>Geobacillus</i> sp. A8	PRJNA276936	Draft	2,45196	101	60,82	89,39
<i>Geobacillus</i> sp. 46C-IIa	PRJNA354604	Draft	3,47491	51	58,12	85,71
<i>Geobacillus</i> sp. 47C-IIb	PRJNA354604	Draft	3,34749	167	55,11	84,61
<i>Geobacillus</i> sp. B4113_201601	PRJNA270597	Draft	3,65113	122	53,08	85,08
<i>Geobacillus</i> sp. PA-3	PRJNA292061	Draft	3,64648	183	52,27	84,49
<i>Geobacillus</i> sp. 44B	PRJNA354604	Draft	3,54318	284	22,94	78,91
<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	PRJNA20805	Complet	3,50880	-	22,06	82,34
<i>Geobacillus</i> sp. LYN3	PRJNA450255	Draft	3,23986	110	20,41	80,67
<i>Geobacillus</i> sp. AYN2	PRJNA407404	Draft	3,40997	124	19,78	80,71
<i>Geobacillus</i> sp. Y4.1MC1	PRJNA33183	Complet	3,91195	-	18,54	79,16
<i>Geobacillus</i> sp. 44C	PRJNA354604	Draft	3,22040	121	17,36	78,29
<i>Geobacillus</i> sp. 8	PRJNA315613	Draft	3,90380	169	2,24	80,12

NA : numéro d'accèsion sur la plateforme Bioproject ; Mpb : méga paires de bases ; id.sym. : identité symétrique ; sim. : similarité ; - : absence.

Tableau 36. Caractérisation des gènes codant pour des protéases présents sur le génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95.

EC	Nombre de gènes	NA gène	Classification de l'enzyme	Nom de l'enzyme	Taille (aa)	Type	Voie de sécrétion
EC:3.4.11.-	1	2669161098	Aminopeptidase	Aminopeptidase	371	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.11.1	1	2669161409	Leucyl aminopeptidase	Leucyl aminopeptidase	496	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.11.18	2	2669162293	Méthionyl aminopeptidase	Méthionine aminopeptidase, type I	248	Métallo	SecretomeP
		2669160492		Méthionyl aminopeptidase	255		SecretomeP
EC:3.4.11.4	1	2669160658	Tripeptide aminopeptidase	Tripeptide aminopeptidase	379	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.11.9	1	2669160600	Xaa-Pro aminopeptidase	Xaa-Pro aminopeptidase	356	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.13.19	1	2669162208	Dipeptidase membranaire	Dipeptidase	314	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.13.22	1	2669162592	D-Ala-D-Ala dipeptidase	D-Ala-D-Ala dipeptidase vanX	209	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.13.9	1	2669161261	Xaa-Pro dipeptidase	Xaa-Pro dipeptidase	367	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.16.4	4	2669161656	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (protéine de liaison-penicilline5/6)	413	Sérine	SignalP
		2669160691		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	382		SignalP
		2669160674		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (protéine de liaison-penicilline5/6)	396		SignalP
		2669160158		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	248		SignalP
EC:3.4.17.13	1	2669160847	Muramoyltetrapeptide carboxypeptidase	Muramoyltetrapeptide carboxypeptidase	311	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.17.19	1	2669161990	Carboxypeptidase Taq	Carboxypeptidase Taq	500	Métallo	SecretomeP
EC:3.4.19.13	1	2669160052	Glutathione hydrolase	Gamma-glutamyltransférase 1 Thréonine peptidase	546	Thréonine	Aucune
EC:3.4.21.-	2	2669160488	Sérine endopeptidase	Protéase Lon- apparentée ATP-dépendante	553	Sérine	SecretomeP
		2669161116		Subtilisine/protéase extracellulaire mineure Epr	361		SecretomeP
EC:3.4.21.102	1	2669161852	C-terminal peptidase	Carboxyl-terminal protéase	483	Sérine	Aucune
EC:3.4.21.105	1	2669161166	Protéase rhomboïde	Protéase rhomboïde GluP	202	Sérine	Aucune

EC : nomenclature de l'Enzyme Commission ; NA : numéro d'accèsion sur la banque *Integrated Microbial Genomes & Microbiomes* ; aa : acides aminés ; SignalP : voie de sécrétion classique ; SecretomeP : voie de sécrétion non classique.

Tableau 36. Caractérisation des gènes codant pour des protéases présents sur le génome de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 (suite).

EC	Nombre de gènes	NA gène	Classification de l'enzyme	Nom de l'enzyme	Taille (aa)	Type	Voie de sécrétion
EC:3.4.21.107	1	2669161693	Peptidase Do	Sérine protéase Do	396	Sérine	Aucune
EC:3.4.21.116	1	2669160632	SpoIVB peptidase	Protéine B de sporulation stade IV	510	Sérine	Aucune
EC:3.4.21.19	1	2669160091	Glutamyl endopeptidase	glutamyl endopeptidase	309	Sérine	SignalP
EC:3.4.21.53	1	2669160489	Endopeptidase La	Protéase Lon ATP-dépendante	782	Sérine	SecretomeP
EC:3.4.21.62	1	2669161116	Subtilisine	Subtilisine/protéase extracellulaire mineure Epr	361	Sérine	SecretomeP
EC:3.4.21.66	2	2669161391	Thermitase	Thermitase	386	Sérine	SignalP
		2669160310		Thermitase	384		SignalP
EC:3.4.21.88	1	2669160815	Répresseur LexA	Répresseur LexA	206	Sérine	SecretomeP
EC:3.4.21.89	3	2669162546	Signal peptidase I	Signal peptidase I	174	Sérine	Aucune
		2669161541		Signal peptidase I	182		SecretomeP
		2669162410		Peptidase de signal type I	181		Aucune
EC:3.4.21.92	2	2669161893	Endopeptidase Clp	Sous unité Clp protéase ATP-dépendante	188	Sérine	SecretomeP
		2669160485		Sous unité Clp protéase ATP-dépendante	194		SecretomeP
EC:3.4.22.70	2	2669159986	Sortase A	Sortase A	200	Cystéine	SecretomeP
		2669161861		Sortase A	215		Aucune
EC:3.4.23.-	1	2669161453	Endopeptidase aspartique	Facteur de sporulation SpoIIIGA	302	Aspartique	Aucune
EC:3.4.23.36	1	2669161466	Signal peptidase II	Signal peptidase II	162	Aspartique	Aucune
EC:3.4.23.43	1	2669160514	Prépiline peptidase	Prépiline peptidase/ N-méthyltransférase	233	Aspartique	Aucune
EC:3.4.24.-	5	2669162378	Métalloendopeptidases	Cell division protease FtsH	667	Métallo	SecretomeP
		2669160524		Protéine de sporulation étape IV FB	288		Aucune
		2669160673		Inhibiteur immunitaire A	755		SignalP
		2669161590		Protéase site-2	421		Aucune
		2669162144		Oligopeptidase F	604		Aucune
EC:3.4.24.78	1	2669161289	GPR endopeptidase	Endopeptidase de germination GPR	370	Aspartique	SecretomeP
EC:3.4.25.2	1	2669161581	HslU--HslV peptidase	Peptidase ATP-dépendante constituante de CodWX	180	Thréonine	SecretomeP

EC : nomenclature de l'Enzyme Commission ; NA : numéro d'accèsion sur la banque *Integrated Microbial Genomes & Microbiomes* ; aa : acides aminés ; SignalP : voie de sécrétion classique ; SecretomeP : voie de sécrétion non classique.

Annexe 2

Tableau 37. Résultats du blast génomique entre le génome de *Thermoactinomyces* sp. AS95 et les génomes du genre *Thermoactinomyces*.

Souche	NA BioProject	Qualité	Taille (Mbp)	Contigs	%id.sym.	% sim.
<i>Thermoactinomyces</i> sp. Gus2-1	PRJNA258247	Draft	2,62331	92	96,09	99,61
<i>Thermoactinomyces</i> sp. CDF	PRJNA285030	Draft	2,45383	20	95,73	99,54
<i>Thermoactinomyces</i> sp. DSM 45892	PRJEB16549	Draft	3,19306	53	1,06	76,07
<i>Thermoactinomyces</i> sp. DSM 45891	PRJEB17913	Draft	2,98519	47	0,88	75,97

NA : numéro d'accèsion sur la plateforme Bioproject ; id.sym. : identité symétrique ; sim. : similarité ; DSM : *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen* ; - : absence.

Tableau 39. Pourcentages des phyla bactériens présents au niveau de chaque point de prélèvement.

Échantillon Phylum	Db1									Db2						Db3					OA						
	Db11	Db12	Db13	Db14	Db15	Db16	Db17	Db18	\bar{X}	Db21	Db22	Db23	Db24	Db25	\bar{X}	Db31	Db32	Db33	Db34	\bar{X}	OA41	OA42	OA43	OA44	OA45	OA46	\bar{X}
<i>Fibrobacteres</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,003	
<i>Thermodesulfobacteria</i>	0,038	0,015	0,008	0,022	0,221	0,201	0,073	0,010	0,073	0,616	0,185	0,204	0,010	0,733	0,349	0,018	0,013	0,005	0,008	0,011	0,020	0,033	0,000	0,014	0,020	0,031	0,020
<i>Elusimicrobia</i>	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,020	0,007	0,000	0,006	0,000	0,003	0,006
<i>Nitrospirinae</i>	0,000	0,000	0,003	0,001	0,001	0,000	0,004	0,002	0,001	0,000	0,002	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,003	0,000	0,002	0,003	0,044	0,033	0,000	0,057	0,017	0,007	0,027
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,016	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,006	0,003	0,014	0,001	0,000	0,001	0,000	0,003	0,004	0,023	0,001	0,002	0,008	0,071	0,037	0,000	0,078	0,031	0,040	0,043
<i>Actinobacteria</i>	1,777	0,633	0,103	0,406	0,403	0,154	0,183	0,448	0,513	0,075	0,014	0,014	0,039	0,012	0,031	0,132	0,479	0,365	0,079	0,264	1,153	0,420	0,937	1,038	0,247	0,398	0,699
<i>Deferribacteres</i>	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,007	0,000	0,005	0,004	0,002	0,002	0,000	0,002	0,000	0,002	0,001
<i>Armatimonadetes</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Planctomycetes</i>	0,119	0,100	0,105	1,422	0,095	0,022	0,521	0,498	0,360	0,018	0,007	0,010	0,014	0,040	0,018	0,823	1,248	2,159	0,129	1,090	2,703	1,175	1,041	1,179	0,430	0,902	1,238
<i>Chlamydiae</i>	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,023	0,003	0,007	0,004	0,002	0,000	0,004	0,002	0,001	0,002
<i>Synergistetes</i>	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,004	0,001	0,000	0,024	0,007	0,030	0,007	0,000	0,023	0,005	0,011	0,012
<i>Deinococcus-Thermus</i>	78,98	68,82	10,47	56,90	62,69	81,13	35,46	20,73	51,90	2,08	2,22	0,53	2,06	1,92	1,76	24,13	6,84	9,50	36,31	19,20	1,32	1,80	4,89	1,91	1,28	0,70	1,98
<i>Candidatus saccharibacteria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,002	
<i>Nitrospirae</i>	0,020	0,014	0,051	1,058	0,034	0,021	0,053	0,193	0,180	0,017	0,005	0,016	0,008	0,012	0,011	0,219	0,151	0,050	0,049	0,117	2,359	1,369	0,728	1,001	1,080	2,281	1,470
<i>Firmicutes</i>	4,99	13,64	41,90	17,11	17,63	2,82	22,77	22,48	17,92	1,49	0,47	3,86	1,01	1,50	1,66	8,77	13,65	5,64	23,40	12,87	8,48	5,32	7,91	5,13	3,99	5,96	6,13
<i>Acetothermia</i>	0,74	0,70	2,35	6,23	0,34	0,16	11,19	7,49	3,65	0,09	0,08	0,04	0,07	0,10	0,08	0,26	9,01	1,11	0,21	2,65	19,29	21,14	18,11	15,86	19,59	38,79	22,13
<i>Bacteroidetes</i>	0,636	1,819	0,990	1,139	1,986	0,404	4,965	2,275	1,777	0,077	0,044	0,061	0,060	0,186	0,086	8,106	1,665	2,613	2,939	3,831	1,087	0,290	0,937	0,375	0,228	0,295	0,535
<i>Cyanobacteria</i>	0,09	0,12	28,03	1,06	0,09	0,09	1,22	7,83	4,81	0,07	0,05	0,09	0,07	0,07	0,07	0,46	2,45	0,46	23,50	6,72	2,92	0,44	1,56	0,79	0,29	0,39	1,06
<i>Chlorobi</i>	0,100	0,179	0,121	0,159	0,145	0,045	0,973	0,239	0,245	0,014	0,014	0,016	0,014	0,090	0,030	4,782	0,609	0,778	0,138	1,577	0,117	0,077	0,104	0,080	0,102	0,104	0,097
<i>Acidobacteria</i>	0,084	0,075	0,391	0,886	0,181	0,152	0,133	0,935	0,355	0,147	0,162	0,267	0,629	0,628	0,367	1,548	0,538	0,265	0,209	0,640	6,585	3,462	2,601	3,889	2,707	2,837	3,680
<i>Ignavibacteriae</i>	0,026	0,056	0,082	0,039	0,022	0,022	0,051	0,575	0,109	0,014	0,008	0,012	0,013	0,022	0,014	0,898	0,658	0,283	0,149	0,497	0,832	0,156	0,208	0,178	0,107	0,091	0,262
<i>Aquificae</i>	9,18	8,94	0,95	7,17	9,74	4,34	6,52	0,86	5,96	65,56	55,60	85,79	82,45	68,33	71,55	1,56	0,79	0,76	1,29	1,10	0,35	0,47	1,25	0,38	0,33	0,38	0,53
<i>Fusobacteria</i>	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,002	0,014	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,005	0,000	0,000	0,002	0,002	0,014	0,013	0,000	0,025	0,000	0,017	0,012
<i>Spirochaetes</i>	0,065	0,107	0,584	0,108	0,024	0,022	0,340	0,358	0,201	0,019	0,016	0,007	0,011	0,020	0,015	0,310	0,378	0,195	0,405	0,322	1,531	0,385	0,208	0,612	0,126	0,206	0,511
<i>Chloroflexi</i>	0,88	2,62	11,08	3,10	2,52	1,34	10,82	28,58	7,62	0,32	0,18	0,19	0,24	0,92	0,37	26,49	54,94	63,24	3,84	37,13	22,12	41,71	39,65	44,86	54,54	27,94	38,47
<i>Dictyoglomi</i>	0,002	0,010	0,015	0,002	0,009	0,164	0,015	0,014	0,029	0,019	0,000	0,002	0,001	0,004	0,005	0,007	0,009	0,003	0,016	0,009	0,006	0,081	0,104	0,006	0,072	0,093	0,061
<i>Proteobacteria</i>	2,17	2,02	2,48	2,53	2,49	1,28	3,99	4,58	2,69	29,27	40,92	8,82	13,22	25,30	23,51	19,25	5,70	12,34	5,69	10,75	24,60	19,03	15,92	18,64	12,69	13,67	17,43
<i>Thermotogae</i>	0,027	0,032	0,038	0,137	0,316	7,418	0,596	0,094	1,082	0,054	0,013	0,031	0,046	0,061	0,041	1,784	0,286	0,090	1,482	0,911	0,028	0,047	0,312	0,027	0,041	0,031	0,081
<i>Verrucomicrobia</i>	0,036	0,070	0,162	0,492	1,023	0,187	0,061	1,728	0,470	0,014	0,008	0,016	0,020	0,022	0,016	0,299	0,456	0,050	0,030	0,209	1,315	0,737	1,145	0,923	0,576	0,657	0,892
<i>Caldiserica</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,001
<i>Non-classés</i>	0,034	0,029	0,082	0,034	0,052	0,021	0,047	0,063	0,045	0,020	0,011	0,016	0,022	0,023	0,018	0,109	0,096	0,065	0,078	0,087	2,971	1,759	2,393	2,905	1,504	4,172	2,617
Total	100																										

 \bar{X} : moyenne.

Tableau 40. Pourcentages des familles au sein du phylum des *Firmicutes* au niveau de chaque point de prélèvement.

Échantillon Famille	Db1									Db2						Db3					OA							
	Db11	Db12	Db13	Db14	Db15	Db16	Db17	Db18	̄	Db21	Db22	Db23	Db24	Db25	̄	Db31	Db32	Db33	Db34	̄	OA41	OA42	OA43	OA44	OA45	OA46	̄	
<i>Lachnospiraceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
<i>Alicyclobacillaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,00	0,10	0,03	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00		
<i>Natranaerobiaceae</i>	0,20	0,10	0,00	0,08	0,08	0,05	0,10	0,03	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01	0,01		
<i>Peptoniphilaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00		
<i>Peptococcaceae</i>	8,98	5,55	17,98	4,44	3,46	15,43	7,65	7,14	8,83	2,90	5,90	0,68	3,81	4,04	3,47	12,27	22,48	28,96	7,00	17,68	3,88	8,42	7,89	4,83	5,02	5,84	5,98	
<i>Streptococcaceae</i>	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,05	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	
<i>Staphylococcaceae</i>	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,05	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,10	0,09	0,04	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	
<i>Thermoactinomycetaceae</i>	2,48	1,17	0,21	1,54	0,51	0,26	0,33	0,46	0,87	0,32	0,36	0,09	0,29	0,45	0,30	2,34	0,50	0,23	0,23	0,82	1,74	2,24	1,32	1,12	3,04	2,31	1,96	
<i>Bacillaceae</i>	2,15	1,17	17,79	3,80	1,31	3,01	4,70	3,77	4,71	55,52	55,81	29,29	70,76	58,39	53,95	6,12	3,03	4,65	10,27	6,02	5,15	20,98	13,16	10,81	27,18	17,38	15,78	
<i>Clostridiaceae</i>	11,22	35,26	0,70	17,17	12,57	15,43	18,22	3,11	14,21	1,61	3,76	0,59	2,48	1,52	1,99	2,32	1,37	2,88	0,29	1,72	38,47	16,14	10,53	26,22	9,09	8,34	18,13	
<i>Thermodesulfobiaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>Syntrophomonadaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,40	0,00	0,40	0,04	0,01	0,17	
<i>Clostridiales famille xvi. incertae sedis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,02	0,03	0,01	
<i>Clostridiales</i>	0,01	0,00	0,02	0,15	0,08	0,05	0,03	0,13	0,06	0,00	0,54	0,00	0,10	0,00	0,13	0,04	0,30	0,82	0,01	0,29	0,05	0,06	0,00	0,08	0,02	0,04	0,04	
<i>Pasteuriaceae</i>	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,18	0,00	0,10	0,00	0,09	0,01	1,30	0,02	0,00	0,33	0,33	0,77	0,00	0,88	0,26	0,40	0,44	
<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	4,27	6,00	0,89	4,37	2,10	3,91	3,13	2,67	3,42	2,01	3,22	0,63	1,81	3,05	2,15	24,31	10,38	24,17	1,11	14,99	11,39	23,43	15,79	15,28	27,54	17,78	18,54	
<i>Caldicoprobacteraceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,04	0,00	0,01	
<i>Halanaerobiaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	
<i>Planococcaceae</i>	1,56	0,68	15,37	2,48	0,76	5,02	3,01	4,17	4,13	22,24	7,16	61,57	5,62	19,82	23,28	4,27	1,74	2,77	11,39	5,04	23,59	9,07	13,16	16,44	9,03	29,58	16,81	
<i>Halobacteroidaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,04	0,06	0,03	
<i>Eubacteriaceae</i>	0,05	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,04	0,19	0,04	0,02	0,00	0,06	2,07	0,55	1,32	1,52	1,11	1,17	1,29	
<i>Thermolithobacteraceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,06	1,32	0,36	0,12	0,03	0,33	
<i>Acidaminococcaceae</i>	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,08	0,10	0,19	0,07	
<i>Symbiobacteriaceae</i>	0,23	0,11	0,01	0,17	0,27	0,05	0,03	0,01	0,11	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,04	0,07	0,18	0,00	0,01	0,06	0,41	0,67	1,32	0,52	0,97	0,79	0,78	
<i>Ruminococcaceae</i>	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,00	0,02	0,15	0,03	0,16	0,36	0,05	0,10	0,09	0,15	0,07	0,10	0,07	0,01	0,06	0,33	0,34	0,00	0,32	0,41	0,54	0,32	
<i>Bacillales</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,18	0,00	0,28	0,14	0,13	0,14	
<i>Gracilibacteraceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,01	
<i>Paenibacillaceae</i>	68,64	49,61	46,95	65,62	78,39	56,50	62,62	78,08	63,30	14,75	20,75	6,93	14,10	12,29	13,76	47,73	58,14	35,22	69,63	52,68	8,77	13,72	28,95	16,36	13,93	13,12	15,81	
<i>Thermoanaerobacterales famille iii. incertae sedis</i>	0,13	0,25	0,01	0,05	0,34	0,05	0,10	0,03	0,12	0,08	1,07	0,05	0,10	0,00	0,26	0,10	0,02	0,05	0,01	0,04	0,19	1,44	2,63	0,80	0,73	1,15	1,16	
<i>Clostridiales famille xvii. incertae sedis</i>	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,05	0,01	0,10	0,02	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,07	0,06	0,36	0,07	0,01	0,12	1,00	0,18	0,00	0,60	0,22	0,21	0,37	
<i>Lactobacillaceae</i>	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,09	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,18	1,32	0,24	0,12	0,08	0,32	
<i>Carnobacteriaceae</i>	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,18	0,05	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,86	0,09	0,00	0,20	0,12	0,29	0,26	
<i>Veillonellaceae</i>	0,02	0,03	0,02	0,05	0,09	0,00	0,01	0,03	0,03	0,08	0,00	0,05	0,19	0,00	0,06	0,02	0,03	0,00	0,01	0,01	1,26	0,92	1,32	2,59	0,61	0,43	1,19	
Total	100																											

X: moyenne.

Tableau 43. Codification des caractères phénotypiques des souches pour la construction du phénoگرامme.

Caractère \ Souche	OA117	Db101	Db114	Db120	Db134	OA123	OA140	OA21	OA23	OA113	AS88	AS90	OA30	Sah69	Db159	AS95	AS89	Db27	Db32	Db59	ENAF93	OA105	OA107	OA126	OA129	OA130	OA28	Sah66
Aspect colonie L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
Aspect colonie M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
Aspect colonie R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pigmentation crème	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Colonies transparentes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
Pigmentation jaune	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pigmentation blanche	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gram positif	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Forme cellulaire en bâtonnet	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Forme cellulaire filamenteuse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mode de groupement isolé	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mode de groupement en chaînette	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mode de groupement mycélien	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Endospores	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	9	1	1	9	1	1	1	9	1	1	1	1
Position terminale	1	0	1	1	9	1	1	1	1	0	9	1	0	1	1	1	9	0	0	9	0	0	9	0	1	0	1	0
Position subterminale	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	9	1	1	9	1	1	1	9	1	0	1	0
Mobilité cellulaire	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Croissance aérobie	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Croissance anaérobie	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
Croissance à T°:																												
10 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
30 °C	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
35 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
55 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
65 °C	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
70 °C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
75 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T° optimale de croissance:																												
45 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 °C	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
55 °C	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
60 °C	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

L : lisse ; M : muqueux ; R : rugueux ; 1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère ; 9 : caractère non observé ; T° : température.

Tableau 43. Codification des caractères phénotypiques des souches pour la construction du phénoграмme (suite).

Caractère \ Souche	OA117	Db101	Db114	Db120	Db134	OA123	OA140	OA21	OA23	OA113	AS88	AS90	OA30	Sah69	Db159	AS95	AS89	Db27	Db32	Db59	ENAF93	OA105	OA107	OA126	OA129	OA130	OA28	Sah66
Croissance à pH:																												
5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
5,5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
6,0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
6,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8,5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
9,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
9,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH optimal de croissance:																												
6,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7,0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
7,5	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
8,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance à NaCl% (p/v):																												
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
3,5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
7,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl % optimal de croissance:																												
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère.

Tableau 43. Codification des caractères phénotypiques des souches pour la construction du phénotypogramme (suite).

Souche	OA117	Db101	Db114	Db120	Db134	OA123	OA140	OA21	OA23	OA113	AS88	AS90	OA30	Sah69	Db159	AS95	AS89	Db27	Db32	Db59	ENAF93	OA105	OA107	OA126	OA129	OA130	OA28	Sah66	
Utilisation de:																													
D(+)-Glucose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
D(+)-Fructose	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
D(+)-Galactose	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	
D(+)-Mélibiose	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
D(+)-Mannose	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
D(+)-Saccharose	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	
D(+)-Maltose	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
D(+)-Lactose	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	
L-Tyrosine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L-Glutamate	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
L-Glycine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L-Thréonine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L-Lysine	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
Lactate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Acétate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Citrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Propionate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Succinate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mannitol	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glycérol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Ethanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Méthanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Dextrine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
Pectine	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Amidon	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	
Production de:																													
Catalase	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oxydase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Uréase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-galactosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
NO ₅ réductase	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
Tryptophanase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère.

Tableau 43. Codification des caractères phénotypiques des souches pour la construction du phénoگرامme (suite).

Souche Caractère	OA117	Db101	Db114	Db120	Db134	OA123	OA140	OA21	OA23	OA113	AS88	AS90	OA30	Sah69	Db159	AS95	AS89	Db27	Db32	Db59	ENAF93	OA105	OA107	OA126	OA129	OA130	OA28	Sah66	
Production de :																													
CO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
H ₂ S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Acides mixtes (RM)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Acétoïne (VP)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Production d'acides à partir de:																													
D(+)-Glucose	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
D(+)-Fructose	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
D(+)-Galactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
D(+)-Lactose	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
D(+)-Saccharose	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
D(+)-Maltose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
D(+)-Dextrine	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
D(+)-Mélibiose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
D(+)-Mannitol	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
D(+)-Mannose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hydrolyse de:																													
Amidon	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	
Pectine	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Tween 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tween 80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
CMC	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Caséine	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
Gélatine	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	

RM: rouge de méthyle ; VP: Voges-Proskauer ; 1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère ; CMC : carboxyméthylcellulose.

Annexe 2

Tableau 44. Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre l'azocaséine. L'intensité de la couleur orange est proportionnelle à celle de l'activité.

Souche	DO (366 nm)							Unité enzymatique (U)				
	E1	E2	E3	B	E1-B	E2-B	E3-B	E1-B	E2-B	E3-B	\bar{X}	ET
AS88	0,117	0,121	0,111	0,099	0,018	0,022	0,012	1,80	2,20	1,20	1,73	0,50
AS89	0,214	0,196	0,209	0,099	0,115	0,097	0,110	11,50	9,70	11,00	10,73	0,93
AS90	0,172	0,175	0,169	0,099	0,073	0,076	0,070	7,30	7,60	7,00	7,30	0,30
AS95	0,300	0,310	0,304	0,099	0,201	0,211	0,205	20,10	21,10	20,50	20,57	0,50
Db101	0,109	0,102	0,110	0,099	0,010	0,003	0,011	1,00	0,30	1,10	0,80	0,44
Db114	0,202	0,215	0,214	0,099	0,103	0,116	0,115	10,30	11,60	11,50	11,13	0,72
Db120	0,212	0,220	0,218	0,099	0,113	0,121	0,119	11,30	12,10	11,90	11,77	0,42
Db134	0,102	0,111	0,108	0,099	0,003	0,012	0,009	0,30	1,20	0,90	0,80	0,46
Db159	0,114	0,111	0,100	0,099	0,015	0,012	0,001	1,50	1,20	0,10	0,93	0,74
Db27	0,256	0,271	0,292	0,099	0,157	0,172	0,193	15,70	17,20	19,30	17,40	1,81
Db32	0,115	0,110	0,116	0,099	0,016	0,011	0,017	1,60	1,10	1,70	1,47	0,32
Db59	0,201	0,256	0,241	0,099	0,102	0,157	0,142	10,20	15,70	14,20	13,37	2,84
ENAF93	0,317	0,278	0,302	0,099	0,218	0,179	0,203	21,80	17,90	20,30	20,00	1,97
OA105	0,156	0,142	0,169	0,099	0,057	0,043	0,070	5,70	4,30	7,00	5,67	1,35
OA107	0,285	0,237	0,275	0,099	0,186	0,138	0,176	18,60	13,80	17,60	16,67	2,53
OA113	0,322	0,340	0,296	0,099	0,223	0,241	0,197	22,30	24,10	19,70	22,03	2,21
OA117	0,127	0,108	0,107	0,099	0,028	0,009	0,008	2,80	0,90	0,80	1,50	1,13
OA123	0,149	0,119	0,127	0,099	0,050	0,020	0,028	5,00	2,00	2,80	3,27	1,55
OA126	0,172	0,152	0,148	0,099	0,073	0,053	0,049	7,30	5,30	4,90	5,83	1,29
OA129	0,329	0,306	0,301	0,099	0,230	0,207	0,202	23,00	20,70	20,20	21,30	1,49
OA130	0,348	0,326	0,332	0,099	0,249	0,227	0,233	24,90	22,70	23,30	23,63	1,14
OA140	0,117	0,126	0,149	0,099	0,018	0,027	0,050	1,80	2,70	5,00	3,17	1,65
OA21	0,202	0,158	0,152	0,099	0,103	0,059	0,053	10,30	5,90	5,30	7,17	2,73
OA23	0,120	0,117	0,109	0,099	0,021	0,018	0,010	2,10	1,80	1,00	1,63	0,57
OA28	0,274	0,236	0,239	0,099	0,175	0,137	0,140	17,50	13,70	14,00	15,07	2,11
OA30	0,328	0,372	0,330	0,099	0,229	0,273	0,231	22,90	27,30	23,10	24,43	2,48
Sah66	0,301	0,321	0,298	0,099	0,202	0,222	0,199	20,20	22,20	19,90	20,77	1,25
Sah69	0,356	0,398	0,378	0,099	0,257	0,299	0,279	25,70	29,90	27,90	27,83	2,10
Prot. K	0,965	0,961	0,971	0,099	0,866	0,862	0,872	86,60	86,20	87,20	86,67	0,50

E: essai ; B: blanc ; ET: écart type ; \bar{X} : moyenne ; Prot.: protéinase.

Annexe 2

Tableau 45. Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre la caséine. L'intensité de la couleur bleue est proportionnelle à celle de l'activité.

Souche	DO (660 nm)							Unité enzymatique (U)				
	E1	E2	E3	B	E1-B	E2-B	E3-B	E1-B	E2-B	E3-B	\bar{X}	ET
AS88	0,21	0,20	0,19	0,10	0,11	0,09	0,08	12,75	8,46	4,89	8,70	3,93
AS89	0,18	0,25	0,29	0,10	0,08	0,15	0,19	3,46	28,11	42,04	24,54	19,53
AS90	0,26	0,18	0,20	0,10	0,16	0,08	0,10	30,61	3,46	9,54	14,54	14,25
AS95	0,41	0,36	0,49	0,10	0,31	0,26	0,39	85,96	66,68	113,46	88,70	23,51
Db101	0,27	0,19	0,20	0,10	0,17	0,09	0,10	36,32	6,32	9,18	17,27	16,56
Db114	0,18	0,20	0,23	0,10	0,08	0,10	0,13	3,11	9,89	20,96	11,32	9,01
Db120	0,22	0,18	0,18	0,10	0,12	0,08	0,08	17,39	4,54	2,75	8,23	7,99
Db134	0,26	0,22	0,18	0,10	0,16	0,12	0,08	30,61	18,11	1,68	16,80	14,51
Db159	0,21	0,22	0,20	0,10	0,10	0,12	0,10	12,04	17,04	11,32	13,46	3,11
Db27	0,39	0,23	0,31	0,10	0,29	0,13	0,21	78,46	19,54	50,96	49,65	29,49
Db32	0,17	0,18	0,20	0,10	0,07	0,08	0,10	0,96	3,82	9,89	4,89	4,56
Db59	0,33	0,39	0,27	0,10	0,23	0,29	0,17	56,32	77,75	35,25	56,44	21,25
ENAF93	0,28	0,34	0,42	0,10	0,18	0,24	0,32	38,46	60,96	87,75	62,39	24,67
OA105	0,18	0,18	0,20	0,10	0,08	0,08	0,10	2,04	2,04	9,89	4,65	4,54
OA107	0,36	0,39	0,27	0,10	0,26	0,29	0,17	66,68	79,18	36,68	60,85	21,84
OA113	0,45	0,40	0,36	0,10	0,35	0,30	0,26	99,89	81,68	67,75	83,11	16,12
OA117	0,20	0,18	0,19	0,10	0,10	0,08	0,09	9,89	3,82	6,32	6,68	3,05
OA123	0,20	0,20	0,20	0,10	0,09	0,10	0,10	8,46	10,96	10,61	10,01	1,35
OA126	0,18	0,19	0,18	0,10	0,08	0,09	0,08	3,82	7,04	2,75	4,54	2,23
OA129	0,40	0,32	0,37	0,10	0,30	0,22	0,27	82,39	54,54	69,54	68,82	13,94
OA130	0,26	0,49	0,33	0,10	0,16	0,38	0,22	30,96	112,04	54,89	65,96	41,65
OA140	0,19	0,22	0,19	0,10	0,09	0,12	0,08	6,32	18,11	4,89	9,77	7,25
OA21	0,18	0,29	0,21	0,10	0,08	0,19	0,11	3,46	40,96	13,82	19,42	19,37
OA23	0,20	0,26	0,21	0,10	0,10	0,16	0,11	8,82	31,32	14,18	18,11	11,75
OA28	0,36	0,31	0,26	0,10	0,26	0,21	0,15	66,32	49,18	29,89	48,46	18,22
OA30	0,37	0,40	0,47	0,10	0,27	0,30	0,37	72,39	81,32	107,39	87,04	18,19
Sah66	0,37	0,40	0,22	0,10	0,27	0,30	0,11	72,04	80,96	15,61	56,20	35,44
Sah69	0,50	0,46	0,39	0,10	0,40	0,36	0,29	117,75	102,75	77,75	99,42	20,21
Prot. K	0,59	0,46	0,47	0,10	0,49	0,36	0,37	149,18	101,68	106,68	119,18	26,10

E: essai ; B: blanc ; ET: écart type ; \bar{X} : moyenne ; Prot.: protéinase.

Tableau 46. Résultats du dosage des activités protéolytiques des souches contre l'azocaséine la caséine BODIPY FL. L'intensité de la couleur verte est proportionnelle à celle de l'activité.

Souche	Unités du signal fluorescent							Unité enzymatique				
	E1	E2	E3	B	E1-B	E2-B	E3-B	E1-B	E2-B	E3-B	\bar{X}	ET
AS88	611	879	750	450	161	429	300	1,61	4,29	3,00	2,97	1,34
AS89	7244	7025	7436	450	6794	6575	6986	67,94	65,75	69,86	67,85	2,06
AS90	3020	2879	2992	450	2570	2429	2542	25,70	24,29	25,42	25,14	0,75
AS95	7655	8125	8963	450	7205	7675	8513	72,05	76,75	85,13	77,98	6,63
Db101	573	632	589	450	123	182	139	1,23	1,82	1,39	1,48	0,31
Db114	5971	6120	5890	450	5521	5670	5440	55,21	56,70	54,40	55,44	1,17
Db120	8869	8945	8891	450	8419	8495	8441	84,19	84,95	84,41	84,52	0,39
Db134	2653	2701	2690	450	2203	2251	2240	22,03	22,51	22,40	22,31	0,25
Db159	624	670	645	450	174	220	195	1,74	2,20	1,95	1,96	0,23
Db27	11747	12003	11890	450	11297	11553	11440	112,97	115,53	114,40	114,30	1,28
Db32	780	809	789	450	330	359	339	3,30	3,59	3,39	3,43	0,15
Db59	1290	1289	1278	450	840	839	828	8,40	8,39	8,28	8,36	0,07
ENAF93	7556	6895	7125	450	7106	6445	6675	71,06	64,45	66,75	67,42	3,36
OA105	567	678	567	450	117	228	117	1,17	2,28	1,17	1,54	0,64
OA107	8092	8001	8112	450	7642	7551	7662	76,42	75,51	76,62	76,18	0,59
OA113	14451	13980	13678	450	14001	13530	13228	140,01	135,3	132,28	135,86	3,90
OA117	580	567	608	450	130	117	158	1,30	1,17	1,58	1,35	0,21
OA123	566	540	564	450	116	90	114	1,16	0,90	1,14	1,07	0,14
OA126	530	523	567	450	80	73	117	0,80	0,73	1,17	0,90	0,24
OA129	7973	8001	8123	450	7523	7551	7673	75,23	75,51	76,73	75,82	0,80
OA130	10339	10567	11045	450	9889	10117	10595	98,89	101,17	105,95	102,00	3,60
OA140	582	678	521	450	132	228	71	1,32	2,28	0,71	1,44	0,79
OA21	644	547	591	450	194	97	141	1,94	0,97	1,41	1,44	0,49
OA23	660	701	678	450	210	251	228	2,10	2,51	2,28	2,30	0,21
OA28	1372	1450	1389	450	922	1000	939	9,22	10,00	9,39	9,54	0,41
OA30	11647	12890	12098	450	11197	12440	11648	111,97	124,40	116,48	117,62	6,29
Sah66	9756	10278	9856	450	9306	9828	9406	93,06	98,28	94,06	95,13	2,77
Sah69	12383	12496	13125	450	11933	12046	12675	119,33	120,46	126,75	122,18	4,00
Prot. K	15356	16320	15263	450	14906	15870	14813	149,06	158,70	148,13	151,96	5,85

E: essai ; B: blanc ; ET: écart type ; \bar{X} : moyenne ; Prot.: protéinase.

Tableau 47. Résultats du dosage de la L-Tyrosine à DO 660 nm.

[Tyrosine]	Essai	DO 660 nm	Moyenne	Écart type
00 µg/ml	E1	0,044	0,046	0,003
	E2	0,044		
	E3	0,050		
20 µg/ml	E1	0,140	0,146	0,008
	E2	0,155		
	E3	0,142		
40 µg/ml	E1	0,175	0,199	0,021
	E2	0,211		
	E3	0,212		
60 µg/ml	E1	0,230	0,242	0,012
	E2	0,242		
	E3	0,253		
80 µg/ml	E1	0,299	0,289	0,011
	E2	0,291		
	E3	0,277		
100 µg/ml	E1	0,344	0,347	0,004
	E2	0,346		
	E3	0,351		

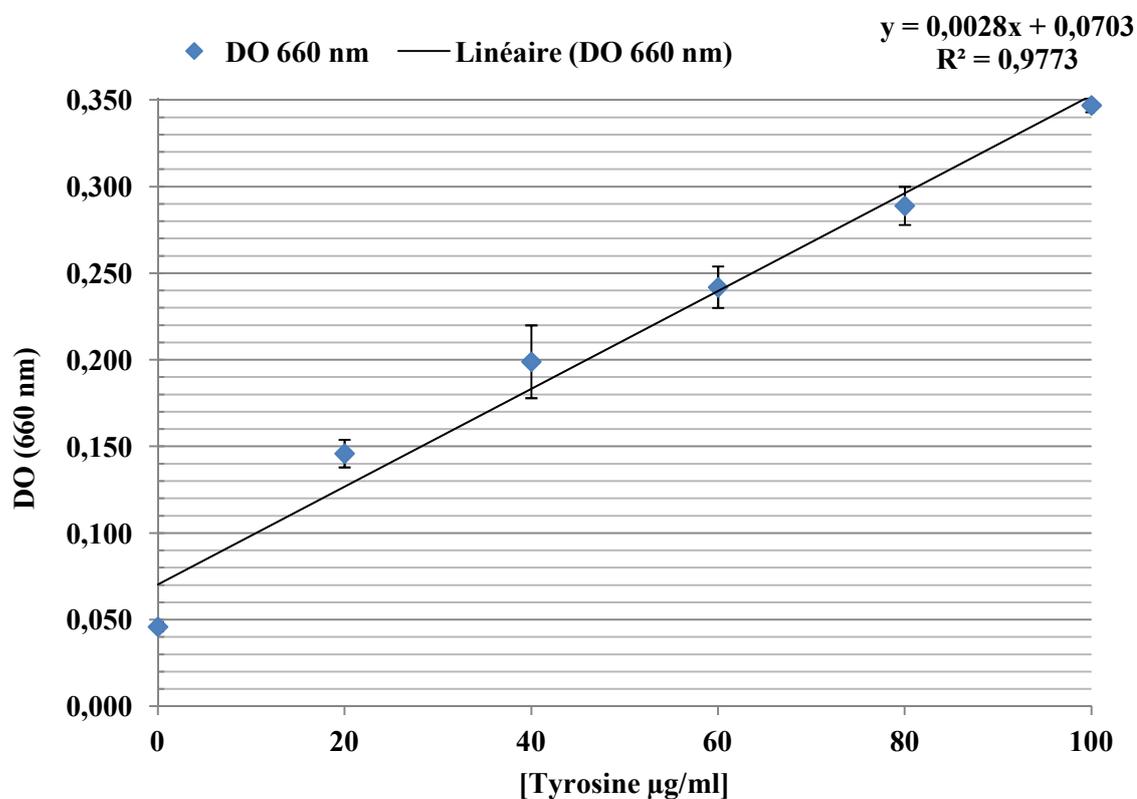


Figure 33. Courbe d'étalonnage de la L-Tyrosine utilisée pour le calcul de l'activité protéasique contre la caséine.

Tableau 48. Résultats de l'analyse de la variance à un facteur pour la méthode à la caséine.

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance		
Essai 1	29	1206,892857	41,61699507	1615,498077		
Essai 2	29	1182,25	40,76724138	1292,224729		
Essai 3	29	1028,321429	35,45935961	1255,216083		
Analyse de variance						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	645,8509266	2	322,9254633	0,232714536	0,792888881	3,105156608
À l'intérieur des groupes	116562,2889	84	1387,646296			
Total	117208,1398	86				

Tableau 49. Résultats de l'analyse de la variance à un facteur pour la méthode à la caséine BODIPY FL.

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance		
Essai 1	29	1410,41	48,63482759	2465,420876		
Essai 2	29	1441,39	49,70310345	2593,104794		
Essai 3	29	1436,63	49,53896552	2529,831167		
Analyse de variance						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	19,19432644	2	9,597163218	0,003794167	0,996213193	3,105156608
À l'intérieur des groupes	212473,9914	84	2529,452279			
Total	212493,1857	86				

Tableau 50. Résultats de l'analyse de la variance à un facteur pour la méthode à l'azocaséine.

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance		
Essai 1	29	411,1	14,17586207	266,2111823		
Essai 2	29	402,4	13,87586207	276,0061823		
Essai 3	29	400,4	13,80689655	272,165665		
Analyse de variance						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2,231954023	2	1,115977011	0,004111003	0,995897636	3,105156608
À l'intérieur des groupes	22802,72483	84	271,4610099			
Total	22804,95678	86				

Tableau 51. Valeurs de densité optique à 660 nm des souches *Geobacillus* sp. Sah69, *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 sur différents températures et pH.

Souche	T (°C)	t (h)	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Sah69	50	\bar{X}	0,092	0,137	0,194	0,258	0,257	0,284	0,307	0,357	Nuit			0,424	0,385	0,370
	50	ET	0,012	0,006	0,017	0,011	0,026	0,012	0,024	0,046				0,021	0,043	0,020
	55	\bar{X}	0,143	0,287	0,384	0,447	0,408	0,344	0,323	0,320				0,244	0,180	0,150
	55	ET	0,002	0,027	0,027	0,005	0,015	0,011	0,040	0,022				0,008	0,019	0,024
	60	\bar{X}	0,082	0,159	0,148	0,066	0,087	0,147	0,119	0,143				0,083	0,078	0,076
	60	ET	0,018	0,029	0,023	0,010	0,013	0,017	0,016	0,010				0,012	0,012	0,015
AS95	50	\bar{X}	0,150	0,159	0,176	0,192	0,198	0,199	0,234	0,249	Nuit			0,350	0,337	0,312
	50	ET	0,026	0,001	0,014	0,013	0,017	0,003	0,011	0,004				0,016	0,036	0,011
	55	\bar{X}	0,134	0,226	0,316	0,367	0,405	0,424	0,445	0,481				0,384	0,383	0,299
	55	ET	0,011	0,015	0,020	0,004	0,006	0,006	0,010	0,022				0,010	0,006	0,019
	60	\bar{X}	0,092	0,059	0,069	0,033	0,026	0,056	0,074	0,115				0,049	0,018	0,016
	60	ET	0,007	0,023	0,017	0,009	0,009	0,011	0,013	0,012				0,007	0,009	0,014
OA30	50	\bar{X}	0,075	0,074	0,049	0,072	0,211	0,215	0,236	0,277	Nuit			0,322	0,325	0,294
	50	ET	0,063	0,049	0,019	0,009	0,027	0,005	0,007	0,019				0,010	0,024	0,043
	55	\bar{X}	0,085	0,201	0,329	0,433	0,459	0,492	0,529	0,526				0,435	0,419	0,396
	55	ET	0,033	0,025	0,024	0,004	0,015	0,032	0,018	0,014				0,011	0,008	0,033
	60	\bar{X}	0,056	0,138	0,135	0,168	0,172	0,218	0,245	0,262				0,212	0,211	0,194
	60	ET	0,005	0,029	0,027	0,034	0,030	0,017	0,020	0,015				0,015	0,019	0,019
Sah69	6,5	\bar{X}	0,031	0,036	0,090	0,285	0,285	0,325	0,287	0,317	Nuit			0,224	0,191	0,247
	6,5	ET	0,005	0,003	0,006	0,016	0,026	0,019	0,016	0,024				0,005	0,010	0,021
	7,0	\bar{X}	0,030	0,075	0,178	0,304	0,371	0,349	0,400	0,425				0,297	0,270	0,249
	7,0	ET	0,009	0,006	0,023	0,014	0,028	0,010	0,039	0,017				0,024	0,021	0,023
	7,5	\bar{X}	0,032	0,044	0,098	0,268	0,311	0,284	0,247	0,239				0,162	0,139	0,143
	7,5	ET	0,001	0,002	0,007	0,006	0,039	0,013	0,010	0,015				0,010	0,005	0,008
	8,0	\bar{X}	0,037	0,023	0,044	0,256	0,266	0,333	0,350	0,392				0,331	0,269	0,320
	8,0	ET	0,017	0,003	0,001	0,018	0,022	0,012	0,009	0,021				0,014	0,006	0,006
	AS95	6,5	\bar{X}	0,037	0,031	0,035	0,072	0,318	0,360	0,418		0,443	Nuit			0,586
6,5		ET	0,010	0,002	0,002	0,038	0,012	0,015	0,033	0,024				0,026	0,044	0,037
7,0		\bar{X}	0,040	0,072	0,073	0,097	0,205	0,224	0,243	0,285				0,194	0,182	0,095
7,0		ET	0,006	0,017	0,022	0,032	0,006	0,006	0,009	0,027				0,017	0,003	0,025
7,5		\bar{X}	0,040	0,023	0,023	0,059	0,224	0,240	0,289	0,305				0,306	0,309	0,368
7,5		ET	0,012	0,001	0,002	0,007	0,031	0,006	0,015	0,019				0,006	0,012	0,013
8,0		\bar{X}	0,032	0,035	0,028	0,151	0,173	0,223	0,252	0,320				0,287	0,267	0,266
8,0		ET	0,010	0,012	0,014	0,032	0,026	0,027	0,013	0,015				0,019	0,024	0,007
OA30	6,5	\bar{X}	0,038	0,037	0,138	0,259	0,260	0,266	0,310	0,336	Nuit			0,404	0,390	0,368
	6,5	ET	0,003	0,003	0,004	0,029	0,016	0,007	0,026	0,008				0,021	0,040	0,029
	7,0	\bar{X}	0,098	0,214	0,342	0,446	0,472	0,505	0,542	0,539				0,448	0,432	0,409
	7,0	ET	0,033	0,025	0,024	0,004	0,015	0,032	0,018	0,014				0,011	0,008	0,033
	7,5	\bar{X}	0,033	0,030	0,019	0,053	0,189	0,213	0,245	0,297				0,472	0,456	0,425
	7,5	ET	0,002	0,001	0,002	0,001	0,014	0,020	0,013	0,019				0,023	0,007	0,015
	8,0	\bar{X}	0,034	0,031	0,022	0,028	0,133	0,152	0,170	0,214				0,436	0,433	0,398
	8,0	ET	0,001	0,002	0,002	0,001	0,018	0,009	0,013	0,023				0,019	0,005	0,008

T : température ; t : temps ; \bar{X} : moyenne ; ET : écart type.

Tableau 52. Valeurs de densité optique à 660 nm des souches *Geobacillus* sp. Sah69, *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 sur différentes concentrations de NaCl.

Souche	NaCl (%)		t (h)										Nuit		
	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	
Sah69	0 \bar{X}	0,015	0,018	0,030	0,159	0,170	0,232	0,274	0,315	Nuit			0,208	0,174	0,146
	0 ET	0,004	0,004	0,005	0,007	0,008	0,006	0,011	0,013				0,009	0,009	0,013
	1 \bar{X}	0,027	0,019	0,073	0,171	0,134	0,149	0,171	0,205				0,281	0,207	0,131
	1 ET	0,003	0,001	0,001	0,010	0,006	0,004	0,010	0,018				0,016	0,007	0,009
	2 \bar{X}	0,024	0,024	0,078	0,173	0,139	0,138	0,158	0,160				0,109	0,078	0,080
	2 ET	0,004	0,003	0,005	0,009	0,007	0,010	0,006	0,011				0,012	0,002	0,004
	3 \bar{X}	0,022	0,023	0,093	0,164	0,159	0,176	0,213	0,244				0,116	0,079	0,095
	3 ET	0,002	0,001	0,003	0,011	0,004	0,012	0,018	0,016				0,023	0,004	0,005
AS95	0 \bar{X}	0,015	0,027	0,086	0,172	0,162	0,179	0,200	0,201	Nuit			0,282	0,233	0,227
	0 ET	0,001	0,001	0,004	0,004	0,008	0,009	0,011	0,007				0,015	0,009	0,014
	1 \bar{X}	0,023	0,038	0,107	0,184	0,180	0,220	0,248	0,290				0,350	0,305	0,274
	1 ET	0,003	0,002	0,003	0,001	0,010	0,012	0,008	0,027				0,005	0,006	0,011
	2 \bar{X}	0,019	0,040	0,103	0,153	0,146	0,178	0,205	0,214				0,247	0,183	0,197
	2 ET	0,005	0,002	0,003	0,008	0,002	0,006	0,024	0,022				0,017	0,006	0,009
	3 \bar{X}	0,017	0,039	0,081	0,154	0,155	0,165	0,182	0,199				0,263	0,226	0,231
	3 ET	0,003	0,003	0,003	0,007	0,008	0,008	0,010	0,008				0,016	0,012	0,014
OA30	0 \bar{X}	0,015	0,015	0,050	0,119	0,156	0,173	0,199	0,219	Nuit			0,074	0,070	0,101
	0 ET	0,002	0,003	0,004	0,008	0,017	0,007	0,020	0,014				0,005	0,006	0,020
	1 \bar{X}	0,020	0,020	0,034	0,095	0,151	0,207	0,238	0,288				0,244	0,187	0,179
	1 ET	0,004	0,006	0,008	0,023	0,014	0,013	0,022	0,023				0,009	0,015	0,028
	2 \bar{X}	0,022	0,017	0,014	0,016	0,014	0,018	0,084	0,167				0,243	0,224	0,215
	2 ET	0,004	0,005	0,005	0,006	0,001	0,002	0,017	0,011				0,013	0,020	0,034
	3 \bar{X}	0,018	0,018	0,015	0,030	0,029	0,034	0,122	0,167				0,131	0,127	0,136
	3 ET	0,002	0,005	0,003	0,018	0,005	0,003	0,012	0,022				0,006	0,012	0,008

T : température ; t : temps ; % en p/v ; \bar{X} : moyenne ; ET : écart type.

Annexe 2

Tableau 53. Taux de croissance par heure (h^{-1}) de la souche *Geobacillus* sp. Sah69 sous différentes conditions physiologiques de température, de pH et NaCl. L'intensité des couleurs est proportionnelle à celle du taux de croissance.

t (h)	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
T (°C)														
50	0	0,045	0,051	0,042	0,027	0,024	0,021	0,022	Nuit			0,017	0,013	0,012
55 ▼	0	0,144	0,120	0,076	0,044	0,025	0,018	0,015				0,005	0,002	0,000
60	0	0,077	0,033	-0,004	0,001	0,008	0,004	0,005				0,000	0,000	0,000
pH														
6,5	0	0,005	0,029	0,064	0,042	0,037	0,026	0,024				0,010	0,007	0,009
7,0 ▼	0	0,045	0,074	0,068	0,057	0,040	0,037	0,033				0,013	0,011	0,009
7,5	0	0,012	0,033	0,059	0,046	0,032	0,022	0,017				0,006	0,005	0,005
8,0	0	-0,014	0,003	0,055	0,038	0,037	0,031	0,030				0,015	0,011	0,012
NaCl (%)														
0 ▼	0	0,003	0,008	0,036	0,026	0,027	0,026	0,025				0,010	0,007	0,005
1	0	-0,008	0,023	0,036	0,018	0,015	0,014	0,015				0,013	0,008	0,004
2	0	0,000	0,027	0,037	0,019	0,014	0,013	0,011				0,004	0,002	0,002
3	0	0,001	0,035	0,035	0,023	0,019	0,019	0,019	0,005	0,003	0,003			

T : température ; t : temps ; % de NaCl en p/v ; ▼ : valeur optimale de croissance.

Tableau 54. Taux de croissance par heure (h^{-1}) de la souche *Thermoactinomyces* sp. AS95 sous différentes conditions physiologiques de température, de pH et NaCl. L'intensité des couleurs est proportionnelle à celle du taux de croissance.

t (h)	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
T (°C)														
50	0	0,009	0,013	0,010	0,008	0,006	0,008	0,008	Nuit			0,010	0,008	0,007
55 ▼	0	0,092	0,091	0,058	0,045	0,036	0,031	0,029				0,013	0,011	0,007
60	0	-0,033	-0,012	-0,015	-0,011	-0,004	-0,002	0,002				-0,002	-0,003	-0,003
pH														
6,5 ▼	0	-0,006	-0,001	0,009	0,047	0,040	0,038	0,034				0,027	0,022	0,017
7,0	0	0,032	0,017	0,014	0,028	0,023	0,020	0,020				0,008	0,006	0,002
7,5	0	-0,017	-0,008	0,005	0,031	0,025	0,025	0,022				0,013	0,012	0,014
8,0	0	0,003	-0,002	0,030	0,024	0,024	0,022	0,024				0,013	0,011	0,010
NaCl (%)														
0	0	0,012	0,036	0,039	0,024	0,020	0,019	0,016				0,013	0,010	0,009
1 ▼	0	0,015	0,042	0,040	0,026	0,025	0,023	0,022				0,016	0,013	0,010
2	0	0,021	0,042	0,034	0,021	0,020	0,019	0,016				0,011	0,007	0,007
3	0	0,022	0,032	0,034	0,023	0,019	0,017	0,015	0,012	0,010	0,009			

T : température ; t : temps ; % de NaCl en p/v ; ▼ : valeur optimale de croissance.

Annexe 2

Tableau 55. Taux de croissance par heure (h^{-1}) de la souche *Brevibacillus* sp. OA30 sous différentes conditions physiologiques de température, de pH et NaCl. L'intensité des couleurs est proportionnelle à celle du taux de croissance.

t (h)	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
T (°C)														
50	0	-0,001	-0,013	-0,001	0,023	0,018	0,016	0,017	Nuit			0,012	0,011	0,009
55 ▼	0	0,116	0,122	0,087	0,062	0,051	0,044	0,037				0,017	0,015	0,013
60	0	0,082	0,040	0,028	0,019	0,020	0,019	0,017				0,008	0,007	0,006
pH														
6,5	0	-0,001	0,050	0,055	0,037	0,029	0,027	0,025				0,018	0,016	0,014
7,0 ▼	0	0,116	0,122	0,087	0,062	0,051	0,044	0,037				0,017	0,015	0,013
7,5	0	-0,003	-0,007	0,005	0,026	0,022	0,021	0,022				0,022	0,019	0,016
8,0	0	-0,003	-0,006	-0,001	0,017	0,015	0,014	0,015				0,020	0,018	0,015
NaCl (%)														
0	0	0,000	0,018	0,026	0,024	0,020	0,018	0,017				0,003	0,003	0,004
1 ▼	0	0,000	0,007	0,019	0,022	0,023	0,022	0,022	0,011	0,008	0,007			
2	0	-0,005	-0,004	-0,002	-0,001	-0,001	0,006	0,012	0,011	0,009	0,008			
3	0	0,000	-0,001	0,003	0,002	0,002	0,010	0,012	0,006	0,005	0,005			

T : température ; t : temps ; % de NaCl en p/v ; ▼ : valeur optimale de croissance.

Annexe 2

Tableau 56. Valeurs de la turbidité des cultures à 660 nm et des activités protéasiques contre l'azocaséine des souches *Geobacillus* sp. Sah69, *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30 sur les milieux de culture MC et ME.

Paramètre	Sah69	t (h)												
		0	2	4	8	12	20	24	28	36	48	56	60	64
DO (660 nm)	MC	0,054	0,068	0,152	0,245	0,178	0,173	0,178	0,168	0,201	0,181	0,195	0,150	0,156
	MC ET	0,013	0,010	0,011	0,032	0,025	0,008	0,011	0,024	0,019	0,020	0,035	0,029	0,031
Activité protéasique (U)	MC act	1,733	4,067	4,067	2,700	6,300	4,100	2,100	10,167	7,467	4,600	3,067	0,633	2,333
	MC act ET	1,680	1,767	1,767	1,997	3,242	0,656	4,444	4,716	3,343	1,058	2,122	2,011	2,511
DO (660 nm)	ME	0,106	0,147	0,211	0,350	0,466	0,515	0,602	0,756	0,848	0,934	0,971	0,697	0,636
	ME ET	0,008	0,032	0,020	0,015	0,028	0,031	0,084	0,021	0,044	0,008	0,024	0,020	0,010
Activité protéasique (U)	ME act	0,400	0,400	0,500	0,667	0,067	1,567	1,167	14,400	28,433	3,633	4,833	5,467	5,533
	ME act ET	0,458	0,985	0,656	0,907	0,416	0,751	1,069	4,484	3,855	0,839	4,565	4,550	6,123
Paramètre	AS95	t (h)												
		0	2	4	8	12	20	24	28	36	48	56	60	64
DO (660 nm)	MC	0,136	0,558	1,544	1,544	1,566	1,358	1,301	1,063	0,979	0,527	0,460	0,329	0,415
	MC ET	0,031	0,004	0,013	0,018	0,009	0,008	0,074	0,017	0,001	0,017	0,014	0,020	0,039
Activité protéasique (U)	MC act	1,067	5,467	3,600	1,733	1,967	2,267	3,100	7,267	3,633	68,833	61,467	35,033	29,467
	MC act ET	1,815	0,058	0,173	1,818	1,069	0,321	0,954	0,757	0,491	4,405	0,907	5,897	3,980
DO (660 nm)	ME	0,016	0,077	0,103	0,145	0,179	0,370	0,437	0,569	0,680	0,843	0,749	0,647	0,603
	ME ET	0,003	0,007	0,037	0,001	0,020	0,002	0,026	0,025	0,023	0,130	0,064	0,025	0,009
Activité protéasique (U)	ME act	0,567	3,767	1,033	3,933	1,600	2,867	4,867	5,833	2,300	14,067	28,100	15,767	15,933
	ME act ET	0,808	0,404	0,379	0,833	1,480	0,058	1,274	0,971	0,436	4,661	4,371	2,413	5,845
Paramètre	OA30	t (h)												
		0	2	4	8	12	20	24	28	36	48	56	60	64
DO (660 nm)	MC	0,050	0,449	0,563	0,642	0,710	0,775	0,785	1,084	1,057	0,861	0,697	0,502	0,269
	MC ET	0,017	0,011	0,004	0,029	0,039	0,050	0,055	0,023	0,010	0,049	0,022	0,030	0,023
Activité protéasique (U)	MC act	1,800	0,467	1,133	0,400	1,100	2,600	1,767	1,267	67,233	116,833	67,233	28,967	7,900
	MC act ET	1,323	0,503	0,153	0,265	1,277	1,153	1,680	0,611	3,645	8,009	8,991	2,055	0,781
DO (660 nm)	ME	0,081	0,071	0,110	0,147	0,131	0,041	0,054	0,039	0,042	0,040	0,034	0,036	0,018
	ME ET	0,004	0,039	0,024	0,022	0,016	0,006	0,013	0,008	0,008	0,005	0,004	0,003	0,005
Activité protéasique (U)	ME act	1,200	0,500	1,333	0,533	0,833	1,000	1,400	6,600	2,033	0,867	2,667	2,833	0,833
	ME act ET	2,352	0,529	0,551	0,551	0,586	2,193	0,721	0,656	1,150	0,907	0,643	0,702	0,513

DO: densité optique; act: activité protéasique contre l'azocaséine ; ET: écart type; t: temps ; ME : milieu de culture au lait écrémé ; MC : milieu de culture à la caséine.

Tableau 57. Valeurs des dosages de l'activité protéasique à l'azocaséine et de la concentration en protéines totales par la méthode de Bradford pour les étapes d'extraction des protéases des souches *Thermoactinomyces* sp. AS95 et *Brevibacillus* sp. OA30. L'activité protéasique de la protéinase K est utilisée comme témoin positif.

Souche		<i>Brevibacillus</i> sp. OA30		<i>Thermoactinomyces</i> sp. AS95		Protéinase K	
Étape	Paramètre	Essai	Activité protéasique (U)	Protéines totales (mg/mL)	Activité protéasique (U)	Protéines totales (mg/mL)	Activité protéasique (U)
Surnageant		E1	149,0	0,615	64,8	0,391	122,6
		E2	146,9	0,590	66,7	0,404	138,7
		E3	145,7	0,593	73,2	0,427	140,3
		\bar{X}	147,2	0,599	68,2	0,407	133,9
		ET	1,7	0,014	4,4	0,018	9,8
Filtrat à 0,45 μ m		E1	144,1	0,535	50,0	0,364	179,2
		E2	145,7	0,551	52,0	0,356	177,9
		E3	141,4	0,553	62,9	0,364	180,4
		\bar{X}	143,7	0,546	55,0	0,361	179,2
		ET	2,2	0,010	6,9	0,004	1,3
Filtrat à 0,2 μ m		E1	143,0	0,515	55,2	0,356	179,2
		E2	134,6	0,528	46,6	0,357	177,9
		E3	129,3	0,519	52,3	0,362	180,4
		\bar{X}	135,6	0,521	51,4	0,358	179,2
		ET	6,9	0,007	4,4	0,004	1,3
Précipitat au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 80 % (p/v)		E1	129,9	0,192	47,1	0,151	161,5
		E2	133,9	0,200	47,0	0,160	160,2
		E3	127,3	0,183	46,6	0,117	165,0
		\bar{X}	130,4	0,191	46,9	0,143	162,2
		ET	3,3	0,008	0,3	0,023	2,5
Surnageant du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 80 % (p/v)		E1	0,0	0,009	0,1	0,010	1,7
		E2	0,0	0,031	0,1	0,009	1,6
		E3	0,0	0,034	0,1	0,025	1,7
		\bar{X}	0,0	0,025	0,1	0,015	1,7
		ET	0,0	0,014	0,0	0,009	0,0
Dialysat		E1	126,2	0,459	41,6	0,146	121,4
		E2	129,6	0,495	42,0	0,148	120,9
		E3	128,5	0,472	42,3	0,151	119,2
		\bar{X}	128,1	0,476	42,0	0,149	120,5
		ET	1,7	0,018	0,4	0,003	1,2
Dialysat filtré à 0,20 μ m		E1	124,2	0,469	40,5	0,148	121,4
		E2	125,4	0,436	39,2	0,148	120,9
		E3	120,7	0,499	41,7	0,151	119,2
		\bar{X}	123,4	0,468	40,5	0,149	120,5
		ET	2,4	0,032	1,3	0,002	1,2

\bar{X} : moyenne ; ET: écart type.

Tableau 58. Valeurs de la DO à 595 nm de la BSA à différentes concentrations lors de l'essai Bradford.

[BSA] mg/ml	0			0,05			0,1			0,2			0,3			0,4			0,5		
Essai	E1	E2	E3																		
DO 595 nm	0,299	0,312	0,318	0,421	0,415	0,446	0,499	0,501	0,497	0,626	0,637	0,640	0,720	0,645	0,799	0,856	0,905	0,915	0,933	1,000	1,017
Moyenne	0,310			0,427			0,499			0,634			0,721			0,892			0,983		
Écart type	0,010			0,016			0,002			0,007			0,077			0,032			0,044		

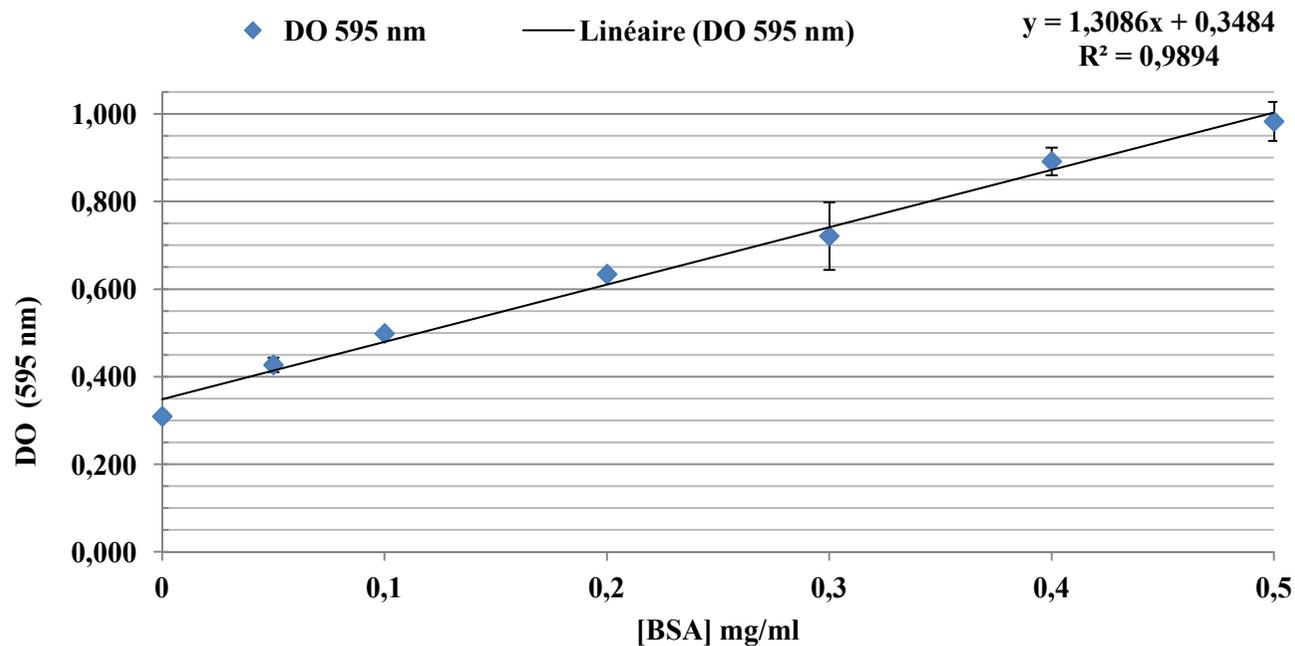
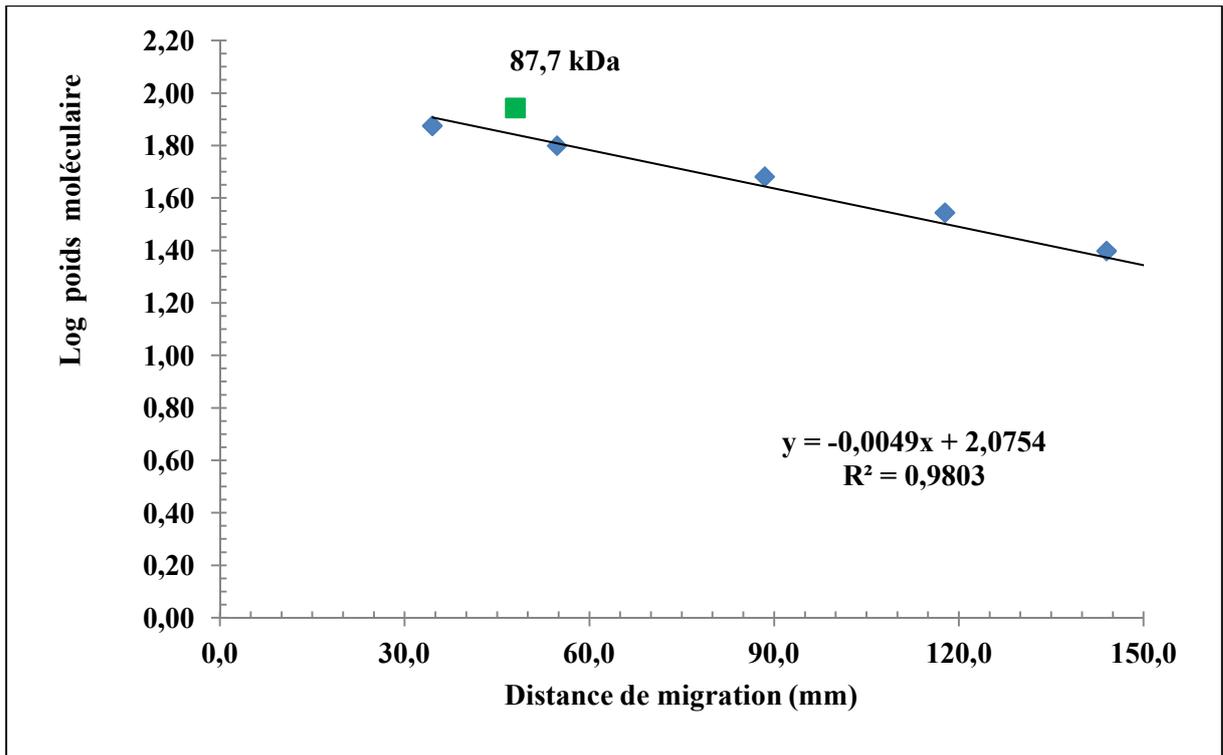


Figure 40. Courbe d'étalonnage de la BSA par la méthode de Bradford.

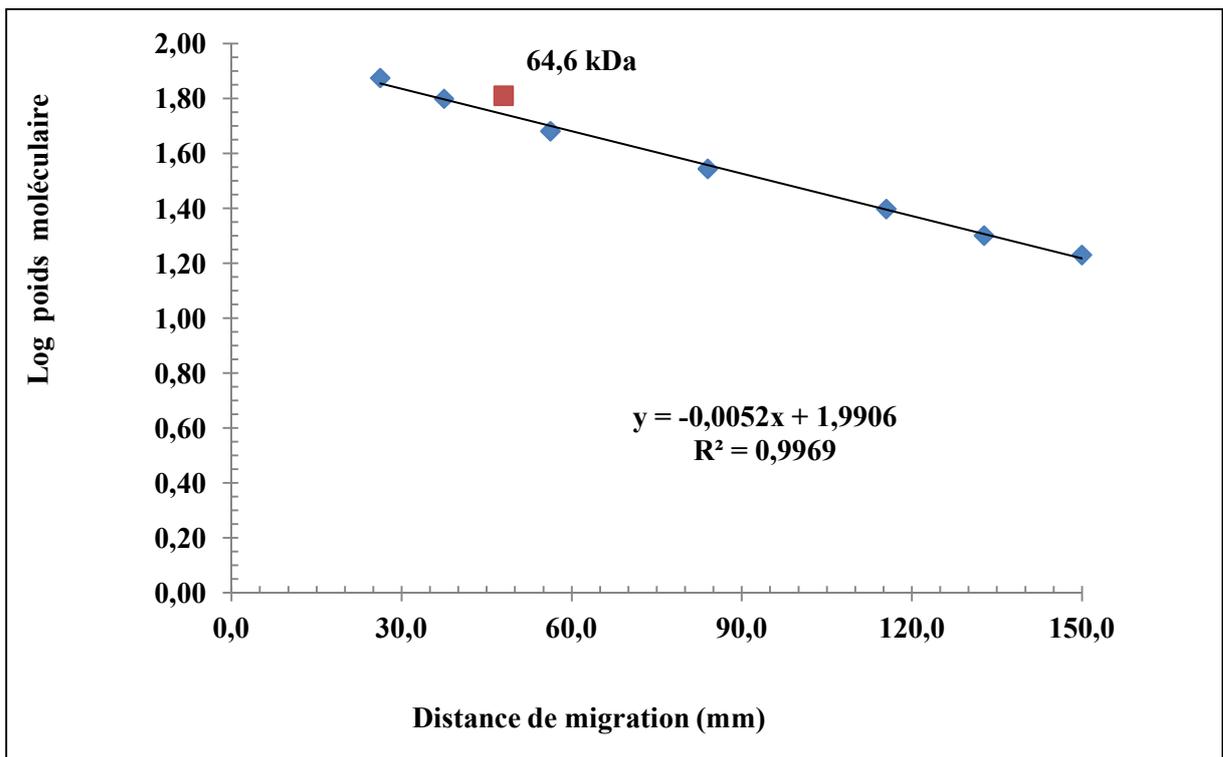
Tableau 64. Valeurs des dosages de l'activité protéasique à l'azocaséine et de la concentration en protéines totales par la méthode de Bradford pour les étapes de purification des protéases de la culture *Brevibacillus* sp. OA30. L'activité protéasique de la protéinase K est utilisée comme témoin positif.

Étape	Fraction	Essai	Activité totale (U)	[Protéines] (mg/mL)	Volume (mL)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Protéinase K (U)	
Chromatographie échangeuse d'anions	Avant concentration	Fraction 16	E1	20,1	0,196	6	1,174	17,116	170,4
			E2	19,6	0,234		1,404	13,963	167,7
			E3	21,0	0,257		1,541	13,625	161,7
			\bar{X}	20,2	0,229		1,373	14,902	166,6
			ET	0,7	0,031		0,185	1,926	4,5
	Fraction 25	E1	14,5	0,756	6	4,537	3,196	170,4	
		E2	17,0	0,786		4,716	3,605	167,7	
		E3	18,8	0,762		4,573	4,111	161,7	
		\bar{X}	16,8	0,768		4,609	3,637	166,6	
		ET	2,2	0,016		0,094	0,458	4,5	
	Fraction 32	E1	28,8	0,421	6	2,526	11,401	170,4	
		E2	30,0	0,419		2,514	11,933	167,7	
		E3	31,2	0,432		2,592	12,037	161,7	
		\bar{X}	30,0	0,424		2,544	11,791	166,6	
		ET	1,2	0,007		0,042	0,341	4,5	
	Fraction 47	E1	12,2	0,564	5	2,821	4,325	170,4	
		E2	14,0	0,599		2,997	4,671	167,7	
		E3	9,4	0,574		2,871	3,274	161,7	
		\bar{X}	11,9	0,579		2,896	4,090	166,6	
		ET	2,3	0,018		0,091	0,727	4,5	
Après concentration	Fraction 16	E1	125,0	0,425	1,6	0,680	183,8	133,3	
		E2	117,7	0,398		0,637	184,8	131,3	
		E3	125,1	0,448		0,717	174,5	131,7	
		\bar{X}	122,6	0,424		0,678	181,060	132,1	
		ET	4,2	0,025		0,040	5,681	1,1	
	Fraction 25	E1	82,9	0,893	2,0	1,786	46,4	133,3	
		E2	90,1	0,953		1,906	47,3	131,3	
		E3	99,9	0,971		1,942	51,4	131,7	
		\bar{X}	91,0	0,939		1,878	48,377	132,1	
		ET	8,5	0,041		0,082	2,689	1,1	
Fraction 32	E1	110,2	0,702	1,5	1,053	104,7	133,3		
	E2	113,1	0,722		1,083	104,4	131,3		
	E3	118,3	0,697		1,046	113,2	131,7		
	\bar{X}	113,9	0,707		1,061	107,412	132,1		
	ET	4,1	0,013		0,020	4,972	1,1		
Fraction 47	E1	39,2	0,623	2,0	1,246	31,5	133,3		
	E2	44,2	0,659		1,318	33,5	131,3		
	E3	46,5	0,648		1,296	35,9	131,7		
	\bar{X}	43,3	0,643		1,287	33,625	132,1		
	ET	3,7	0,018		0,037	2,211	1,1		
Résidus du flux continu	E1	23,6	0,119	20,0	2,380	9,9	121,4		
	E2	24,8	0,121		2,420	10,2	120,9		
	E3	25,8	0,121		2,420	10,7	119,2		
	\bar{X}	24,7	0,120		2,407	10,275	120,5		
	ET	1,1	0,001		0,023	0,373	1,2		
Gel filtration	Avant concentration	Fraction 16-F39	E1	23,1	0,077	15,0	1,155	20,0	159,1
			E2	24,5	0,083		1,245	19,7	155,1
			E3	25,2	0,102		1,530	16,5	157,5
			\bar{X}	24,3	0,087		1,310	18,716	157,2
			ET	1,1	0,013		0,196	1,952	2,0
	Fraction 32-F38	E1	27,9	0,140	12,0	1,680	16,6	159,1	
		E2	26,2	0,135		1,620	16,2	155,1	
		E3	28,1	0,145		1,740	16,1	157,5	
		\bar{X}	27,4	0,140		1,680	16,310	157,2	
		ET	1,0	0,005		0,060	0,258	2,0	
	Après concentration	Fraction 16-F39	E1	49,3	0,486	3,0	1,458	33,8	153,1
			E2	54,5	0,420		1,260	43,3	159,7
			E3	52,4	0,467		1,401	37,4	154,6
			\bar{X}	52,1	0,458		1,373	38,156	155,8
			ET	2,6	0,034		0,102	4,765	3,5
Fraction 32-F38	E1	57,8	0,417	4,0	1,668	34,7	153,1		
	E2	56,6	0,421		1,684	33,6	159,7		
	E3	52,3	0,426		1,704	30,7	154,6		
	\bar{X}	55,6	0,421		1,685	32,985	155,8		
	ET	2,9	0,005		0,018	2,053	3,5		

[Protéines]: concentration en protéines; E: essai; \bar{X} : moyenne; ET: écart type.



(A)



(B)

Figure 46. Estimation des poids moléculaires des protéases. A : courbe étalon de la protéase 16-F39 ; B : courbe étalon de la protéase 32-F38.

Annexe 2

Tableau 66. Dosage des activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38 contre l'azocaséine à différentes valeurs de températures.

T (°C)	Activité totale (DO)					Activité totale (U)		Protéines totales (mg)		Activité spécifique (U/mg)					Activité relative (%)					
	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	
Protéase 16-F39	30	0,053	0,093	0,085	0,077	0,021	7,7	2,1	1,37	0,10	3,87	6,79	6,20	5,62	1,54	29,94	41,89	40,67	37,50	6,57
	40	0,087	0,127	0,112	0,109	0,020	10,9	2,0	1,37	0,10	6,35	9,27	8,18	7,93	1,47	49,15	57,21	53,59	53,32	4,03
	45	0,142	0,156	0,163	0,154	0,011	15,4	1,1	1,37	0,10	10,36	11,39	11,90	11,22	0,78	80,23	70,27	77,99	76,16	5,22
	50	0,140	0,212	0,123	0,158	0,047	15,8	4,7	1,37	0,10	10,22	15,47	8,98	11,56	3,45	79,10	95,50	58,85	77,81	18,36
	55	0,155	0,158	0,218	0,177	0,036	17,7	3,6	1,37	0,10	11,31	11,53	15,91	12,92	2,59	87,57	71,17	104,31	87,68	16,57
	60	0,177	0,222	0,209	0,203	0,023	20,3	2,3	1,37	0,10	12,92	16,20	15,26	14,79	1,69	100,00	100,00	100,00	100,00	11,43
	65	0,156	0,138	0,147	0,147	0,009	14,7	0,9	1,37	0,10	11,39	10,07	10,73	10,73	0,66	88,14	62,16	70,33	73,54	13,28
	70	0,115	0,208	0,110	0,144	0,055	14,4	5,5	1,37	0,10	8,39	15,18	8,03	10,54	4,03	64,97	93,69	52,63	70,43	21,07
80	0,060	0,065	0,078	0,068	0,009	6,8	0,9	1,37	0,10	4,38	4,74	5,69	4,94	0,68	33,90	29,28	37,32	33,50	4,04	
Protéase 32-F38	30	0,309	0,242	0,281	0,277	0,030	27,7	3,4	1,69	0,02	18,3	14,32	16,6	16,41	1,99	61,55	53,42	65,50	60,16	6,16
	40	0,393	0,364	0,381	0,379	0,010	37,9	1,5	1,69	0,02	23,3	21,54	22,5	22,45	0,86	78,29	80,35	88,81	82,48	5,58
	45	0,419	0,348	0,395	0,387	0,040	38,7	3,6	1,69	0,02	24,8	20,59	23,4	22,92	2,14	83,47	76,82	92,07	84,12	7,65
	50	0,502	0,453	0,429	0,461	0,040	46,1	3,7	1,69	0,02	29,7	26,8	25,4	27,30	2,20	100,00	100,00	100,00	100,00	8,07
	55	0,429	0,370	0,395	0,398	0,030	39,8	3,0	1,69	0,02	25,4	21,89	23,4	23,55	1,75	85,46	81,68	92,07	86,40	5,26
	60	0,204	0,197	0,182	0,194	0,010	19,4	1,1	1,69	0,02	12,1	11,66	10,8	11,50	0,67	40,64	43,49	42,42	42,18	1,44
	65	0,098	0,111	0,119	0,109	0,010	10,9	1,1	1,69	0,02	5,8	6,568	7,04	6,47	0,63	19,52	24,50	27,74	23,92	4,14
	70	0,127	0,090	0,096	0,104	0,020	10,4	2,0	1,69	0,02	7,51	5,325	5,68	6,17	1,18	25,30	19,87	22,38	22,51	2,72
80	0,126	0,078	0,100	0,101	0,020	10,1	2,4	1,69	0,02	7,46	4,615	5,92	6,00	1,42	25,10	17,22	23,31	21,88	4,13	

T : température ; DO: densité optique ; E: essai ; \bar{X} : moyenne; ET: écart type.

Annexe 2

Tableau 67. Estimation de l'effet de la température optimale sur les activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38.

Temps (minutes)	Activité totale (DO)					Activité totale (U)		Protéines totales (mg)		Activité spécifique (U/mg)					Activité relative (%)					
	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	
Protéase 16-F39	20	0,273	0,341	0,362	0,325	0,047	32,5	4,7	1,37	0,10	19,93	24,89	26,42	23,75	3,40	100,00	100,00	100,00	100,00	14,3
	30	0,225	0,243	0,223	0,23	0,011	23,0	1,1	1,37	0,10	16,42	17,74	16,28	16,81	0,80	82,42	71,26	61,60	71,76	10,4
	40	0,208	0,208	0,202	0,206	0,003	20,6	0,3	1,37	0,10	15,18	15,18	14,74	15,04	0,25	76,19	61,00	55,80	64,33	10,6
	50	0,172	0,157	0,171	0,167	0,008	16,7	0,8	1,37	0,10	12,55	11,46	12,48	12,17	0,61	63,00	46,04	47,24	52,09	9,47
	60	0,155	0,155	0,156	0,155	0,001	15,5	0,1	1,37	0,10	11,31	11,31	11,39	11,34	0,04	56,78	45,45	43,09	48,44	7,31
	90	0,142	0,163	0,144	0,15	0,012	15,0	1,2	1,37	0,10	10,36	11,90	10,51	10,92	0,85	52,01	47,80	39,78	46,53	6,22
	120	0,119	0,169	0,121	0,136	0,028	13,6	2,8	1,37	0,10	8,69	12,34	8,83	9,95	2,07	43,59	49,56	33,43	42,19	8,16
	180	0,088	0,088	0,086	0,087	0,001	8,7	0,1	1,37	0,10	6,42	6,42	6,28	6,37	0,08	32,23	25,81	23,76	27,27	4,42
	210	0,062	0,061	0,071	0,065	0,006	6,5	0,6	1,37	0,10	4,53	4,45	5,18	4,72	0,40	22,71	17,89	19,61	20,07	2,44
	240	0,059	0,062	0,062	0,061	0,002	6,1	0,2	1,37	0,10	4,31	4,53	4,53	4,45	0,13	21,61	18,18	17,13	18,97	2,34
Protéase 32-F38	20	0,192	0,194	0,190	0,192	0,002	19,2	0,2	1,69	0,02	11,4	11,48	11,2	11,36	0,12	35,16	36,06	35,58	35,60	0,45
	30	0,285	0,257	0,261	0,268	0,015	26,8	1,5	1,69	0,02	16,9	15,21	15,4	15,84	0,90	52,20	47,77	48,88	49,61	2,30
	40	0,291	0,244	0,282	0,272	0,025	27,2	2,5	1,69	0,02	17,2	14,44	16,7	16,11	1,48	53,30	45,35	52,81	50,49	4,45
	50	0,285	0,281	0,279	0,282	0,003	28,2	0,3	1,69	0,02	16,9	16,63	16,5	16,67	0,18	52,20	52,23	52,25	52,23	0,03
	60	0,344	0,311	0,318	0,324	0,017	32,4	1,7	1,69	0,02	20,4	18,4	18,8	19,19	1,03	63,00	57,81	59,55	60,12	2,64
	90	0,521	0,478	0,515	0,505	0,023	50,5	2,3	1,69	0,02	30,8	28,28	30,5	29,86	1,38	95,42	88,85	96,44	93,57	4,12
	120	0,546	0,538	0,534	0,539	0,006	53,9	0,6	1,69	0,02	32,3	31,83	31,6	31,91	0,36	100,00	100,00	100,00	100,00	1,13
	180	0,509	0,559	0,485	0,518	0,038	51,8	3,8	1,69	0,02	30,1	33,08	28,7	30,63	2,23	93,22	103,90	90,82	95,98	6,96
	210	0,497	0,536	0,511	0,515	0,020	51,5	2,0	1,69	0,02	29,4	31,72	30,2	30,45	1,17	91,03	99,63	95,69	95,45	4,31
	240	0,489	0,423	0,439	0,450	0,034	45,0	3,4	1,69	0,02	28,9	25,03	26,0	26,65	2,04	89,56	78,62	82,21	83,46	5,57

DO: densité optique ; E: essai ; \bar{X} : moyenne; ET: écart type.

Annexe 2

Tableau 68. Dosage des activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38 contre l'azocaséine à différentes valeurs de pH.

pH	Activité totale (DO)					Activité totale (U)		Protéines totales (mg)		Activité spécifique (U/mg)					Activité relative (%)					
	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	
Protéase 16-F39	4,0	0,005	0,007	0,011	0,008	0,003	0,8	0,3	1,37	0,10	0,36	0,51	0,80	0,56	0,22	3,13	3,70	6,51	4,45	1,81
	5,0	0,021	0,029	0,025	0,025	0,004	2,5	0,4	1,37	0,10	1,53	2,12	1,82	1,82	0,29	13,13	15,34	14,79	14,42	1,16
	6,0	0,160	0,189	0,169	0,173	0,015	17,3	1,5	1,37	0,10	11,68	13,80	12,34	12,60	1,08	100,00	100,00	100,00	100,00	8,60
	7,0	0,117	0,128	0,129	0,125	0,007	12,5	0,7	1,37	0,10	8,54	9,34	9,42	9,10	0,49	73,13	67,72	76,33	72,39	4,35
	8,0	0,094	0,109	0,107	0,103	0,008	10,3	0,8	1,37	0,10	6,86	7,96	7,81	7,54	0,59	58,75	57,67	63,31	59,91	2,99
	9,0	0,075	0,062	0,063	0,067	0,007	6,7	0,7	1,37	0,10	5,47	4,53	4,60	4,87	0,53	46,88	32,80	37,28	38,99	7,19
	10,0	0,063	0,063	0,056	0,061	0,004	6,1	0,4	1,37	0,10	4,60	4,60	4,09	4,43	0,29	39,38	33,33	33,14	35,28	3,55
	11,0	0,034	0,063	0,033	0,043	0,017	4,3	1,7	1,37	0,10	2,48	4,60	2,41	3,16	1,24	21,25	33,33	19,53	24,70	7,52
Protéase 32-F38	4,0	0,025	0,017	0,022	0,021	0,004	2,1	0,4	1,69	0,02	1,48	1,00	1,3	1,26	0,24	6,00	4,16	5,43	5,19	0,94
	5,0	0,031	0,024	0,024	0,026	0,004	2,6	0,4	1,69	0,02	1,83	1,42	1,42	1,56	0,24	7,43	5,87	5,93	6,41	0,89
	6,0	0,417	0,409	0,405	0,410	0,006	41	0,6	1,69	0,02	24,7	24,2	24,0	24,28	0,36	100,00	100,00	100,00	100,00	1,49
	7,0	0,200	0,177	0,167	0,181	0,017	18,1	1,7	1,69	0,02	11,8	10,47	9,88	10,73	1,00	47,96	43,28	41,23	44,16	3,45
	8,0	0,172	0,175	0,167	0,171	0,004	17,1	0,4	1,69	0,02	10,2	10,36	9,88	10,14	0,24	41,25	42,79	41,23	41,76	0,89
	9,0	0,086	0,089	0,088	0,088	0,002	8,8	0,2	1,69	0,02	5,09	5,27	5,21	5,19	0,09	20,62	21,76	21,73	21,37	0,65
	10,0	0,021	0,025	0,024	0,023	0,002	2,3	0,2	1,69	0,02	1,24	1,48	1,42	1,38	0,12	5,04	6,11	5,93	5,69	0,58
	11,0	0,021	0,027	0,019	0,022	0,004	2,2	0,4	1,69	0,02	1,24	1,60	1,12	1,32	0,25	5,04	6,60	4,69	5,44	1,02

DO: densité optique ; E: essai ; \bar{X} : moyenne; ET: écart type.

Tableau 69. Dosage des activités enzymatiques des protéases 16-F39 et 32-F38 contre l'azocaséine en présence de différents agents chimiques.

Agent chimique	Activité totale (DO)					Activité totale (U)		Protéines totales (mg)		Activité spécifique (U/mg)					Activité relative (%)					
	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	E1	E2	E3	\bar{X}	ET	
Protéase 16-F39	Mg ²⁺	0,120	0,108	0,108	0,112	0,007	11,2	0,7	1,37	0,10	8,76	7,88	7,88	8,18	0,51	153,85	131,71	131,71	139,09	12,78
	Li ²⁺	0,087	0,115	0,114	0,105	0,016	10,5	1,6	1,37	0,10	6,35	8,39	8,32	7,69	1,16	111,54	140,24	139,02	130,27	16,23
	Fe ³⁺	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	1,37	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Cu ²⁺	0,025	0,025	0,014	0,021	0,006	2,1	0,6	1,37	0,10	1,82	1,82	1,02	1,56	0,46	32,05	30,49	17,07	26,54	8,23
	Zn ²⁺	0,025	0,014	0,014	0,018	0,006	1,8	0,6	1,37	0,10	1,82	1,02	1,02	1,29	0,46	32,05	17,07	17,07	22,07	8,65
	Mn ²⁺	0,052	0,079	0,078	0,070	0,015	7,0	1,5	1,37	0,10	3,80	5,77	5,69	5,09	1,12	66,67	96,34	95,12	86,04	16,79
	Ca ²⁺	0,070	0,056	0,079	0,068	0,012	6,8	1,2	1,37	0,10	5,11	4,09	5,77	4,99	0,85	50,00	26,42	64,23	46,88	19,10
	Contrôle positif	0,078	0,082	0,082	0,081	0,002	8,1	0,2	1,37	0,10	5,69	5,99	5,99	5,89	0,17	100,00	100,00	100,00	100,00	2,86
	Ethanol	0,081	0,163	0,085	0,110	0,046	11,0	4,6	1,37	0,10	5,91	11,90	6,20	8,00	3,37	62,79	123,48	82,52	89,60	30,96
	Méthanol	0,025	0,000	0,017	0,014	0,013	1,4	1,3	1,37	0,10	1,82	0,00	1,24	1,02	0,93	19,38	0,00	16,50	11,96	10,46
	Acétone	0,084	0,137	0,110	0,110	0,027	11,0	2,7	1,37	0,10	6,13	10,00	8,03	8,05	1,93	65,12	103,79	106,80	91,90	23,24
	SDS	1,606	1,807	1,652	1,688	0,105	168,8	10,5	1,37	0,10	117,23	131,90	120,58	123,24	7,69	1244,96	1368,94	1603,88	1405,93	182,30
	Tween-20	0,100	0,147	0,145	0,131	0,027	13,1	2,7	1,37	0,10	7,30	10,73	10,58	9,54	1,94	77,52	111,36	140,78	109,89	31,65
	Tween-80	0,155	0,162	0,143	0,153	0,010	15,3	1,0	1,37	0,10	11,31	11,82	10,44	11,19	0,70	120,16	122,73	138,83	127,24	10,12
	Triton X-100	0,186	0,199	0,211	0,199	0,013	19,9	1,3	1,37	0,10	13,58	14,53	15,40	14,50	0,91	144,19	150,76	204,85	166,60	33,29
	EDTA	0,112	0,095	0,098	0,102	0,009	10,2	0,9	1,37	0,10	8,18	6,93	7,15	7,42	0,66	86,82	71,97	95,15	84,65	11,74
	Contrôle positif	0,129	0,132	0,103	0,121	0,016	12,1	1,6	1,37	0,10	9,42	9,64	7,52	8,86	1,16	100,00	100,00	100,00	100,00	13,14
	DTT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	1,37	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	PMSF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	1,37	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Pepstatine A	0,047	0,107	0,107	0,087	0,035	8,7	3,5	1,37	0,10	3,43	7,81	7,81	6,35	2,53	72,31	100,94	100,00	91,08	16,27
Inhibiteur de trypsine	0,082	0,102	0,080	0,088	0,012	8,8	1,2	1,37	0,10	5,99	7,45	5,84	6,42	0,89	126,15	96,23	74,77	99,05	25,81	
DMSO	0,058	0,082	0,082	0,074	0,014	7,4	1,4	1,37	0,10	4,23	5,99	5,99	5,40	1,01	89,23	77,36	76,64	81,07	7,07	
Contrôle positif	0,065	0,106	0,107	0,093	0,024	9,3	2,4	1,37	0,10	4,74	7,74	7,81	6,76	1,75	100,00	100,00	100,00	100,00	25,86	
Protéase 32-F38	Mg ²⁺	0,480	0,489	0,491	0,487	0,006	48,7	0,6	1,69	0,02	28,40	28,93	29,05	28,80	0,35	138,73	138,92	152,01	143,22	7,61
	Li ²⁺	0,375	0,331	0,317	0,341	0,030	34,1	3,0	1,69	0,02	22,19	19,59	18,76	20,18	1,79	108,38	94,03	98,14	100,19	7,39
	Fe ³⁺	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	1,69	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Cu ²⁺	0,025	0,025	0,025	0,025	0,000	2,5	0,0	1,69	0,02	1,48	1,48	1,48	1,48	0,00	7,23	7,10	7,74	7,36	0,34
	Zn ²⁺	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	1,69	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mn ²⁺	0,390	0,381	0,383	0,385	0,005	38,5	0,5	1,69	0,02	23,08	22,54	22,66	22,76	0,28	112,72	108,24	118,58	113,18	5,18
	Ca ²⁺	0,427	0,409	0,422	0,419	0,009	41,9	0,9	1,69	0,02	25,27	24,20	24,97	24,81	0,55	124,13	131,51	132,70	129,45	4,65
	Contrôle positif	0,346	0,352	0,323	0,340	0,015	34,0	1,5	1,69	0,02	20,47	20,83	19,11	20,14	0,91	100,00	100,00	100,00	100,00	4,50
	Ethanol	0,344	0,319	0,317	0,327	0,015	32,7	1,5	1,69	0,02	20,36	18,88	18,76	19,33	0,89	98,57	96,37	94,35	96,43	2,11
	Méthanol	0,379	0,355	0,347	0,360	0,017	36,0	1,7	1,69	0,02	22,43	21,01	20,53	21,32	0,99	108,60	107,25	103,27	106,37	2,77
	Acétone	0,348	0,372	0,333	0,351	0,020	35,1	2,0	1,69	0,02	20,59	22,01	19,70	20,77	1,16	99,71	112,39	99,11	103,74	7,50
	SDS	1,522	1,488	1,447	1,486	0,037	148,6	3,7	1,69	0,02	90,06	88,05	85,64	87,92	2,21	436,10	449,55	430,74	438,80	9,69
	Tween-20	0,104	0,100	0,078	0,094	0,014	9,4	1,4	1,69	0,02	6,15	5,92	4,62	5,56	0,83	29,80	30,21	23,21	27,74	3,93
	Tween-80	0,461	0,497	0,511	0,490	0,026	49,0	2,6	1,69	0,02	27,28	29,41	30,24	28,97	1,53	132,09	150,15	152,08	144,78	11,03
	Triton X-100	0,473	0,497	0,496	0,489	0,014	48,9	1,4	1,69	0,02	27,99	29,41	29,35	28,92	0,80	135,53	150,15	147,62	144,43	7,81
	EDTA	0,006	0,000	0,003	0,003	0,003	0,3	0,3	1,69	0,02	0,36	0,00	0,18	0,18	0,18	1,72	0,00	0,89	0,87	0,86
	Contrôle positif	0,349	0,331	0,336	0,339	0,009	33,9	0,9	1,69	0,02	20,65	19,59	19,88	20,04	0,55	100,00	100,00	100,00	100,00	2,74
	DTT	0,000	0,000	0,004	0,001	0,002	0,1	0,2	1,69	0,02	0,00	0,00	0,24	0,08	0,14	0,00	0,00	1,43	0,48	0,82
	PMSF	0,569	0,528	0,536	0,544	0,022	54,4	2,2	1,69	0,02	33,67	31,24	31,72	32,21	1,29	196,89	192,70	191,43	193,67	2,86
	Pepstatine A	0,326	0,299	0,313	0,313	0,014	31,3	1,4	1,69	0,02	19,29	17,69	18,52	18,50	0,80	112,80	109,12	111,79	111,24	1,90
Inhibiteur de trypsine	0,521	0,533	0,517	0,524	0,008	52,4	0,8	1,69	0,02	30,83	31,54	30,59	30,99	0,49	180,28	194,53	184,64	186,48	7,30	
DMSO	0,240	0,267	0,233	0,247	0,018	24,7	1,8	1,69	0,02	14,20	15,80	13,79	14,60	1,06	83,04	97,45	83,21	87,90	8,27	
Contrôle positif	0,289	0,274	0,280	0,281	0,008	28,1	0,8	1,69	0,02	17,10	16,21	16,57	16,63	0,45	100,00	100,00	100,00	100,00	2,69	

DO: densité optique;
EDTA: éthylène
diamine tétra-
acétique;
DTT: dithiothréitol;
DMSO:
diméthylsulfoxyde
PMSF:
phenylmethylsulfonyl
fluoride; SDS:
dodécylsulfate de
sodium; E: essai; \bar{X} :
moyenne;
ET: écart type.

ANNEXE 3.
Production scientifique



Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods

Mohamed Amine Gomri¹ · Tedj El Moulouk Khaldi² · Karima Kharroub¹

Received: 7 June 2018 / Accepted: 1 November 2018 / Published online: 9 November 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature and the University of Milan 2018

Abstract

Terrestrial hot environments are important resources for isolation of thermophilic microorganisms. Few studies have been made on microbial diversity of Algerian geothermal sites. This paper reports the diversity of thermophilic, aerobic endospore-forming bacteria from water and sediment samples taken from Hammam Ouled Ali and Hammam Debagh, two hot springs with a wide range of temperatures and a very rich mineral composition, located in the region of Guelma, north-east of Algeria using culture-dependent and culture-independent approaches. Sequences of the V4 region of the 16S rRNA gene from environmental DNA extracted from sediment samples were analyzed and a set of isolates from water and sediment have been characterized by phenotypic and molecular methods. Phylogenetic surveys using environmental DNA sequences indicated that three families dominated the two hot springs: *Planococcaceae*, *Bacillaceae*, and *Paenibacillaceae*. Phenotypic characterization revealed the morphological, biochemical, and physiological properties of these microorganisms, all of which exhibited a range of common extracellular enzymatic activities. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was used to cluster isolates into different phylotypic groups and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences of selected isolates showed that all were closely related to four genera of thermophilic Bacilli: *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, and *Brevibacillus*. Our results provide important insights into the microbial ecology of Guelma hot springs. They showed that the phylogenetic diversity of bacterial communities within the two studied hot springs was mostly aerobic, with the presence of taxonomic groups of great biotechnological interest. Bioprospection of thermozymes and other biomolecules within these communities will probably provide a data basis for their industrial exploitation.

Keywords Thermophilic · Bacilli · Endospore-forming · Microbial diversity · Hot spring · Algeria

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13213-018-1401-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mohamed Amine Gomri
gomrima@umc.edu.dz

Tedj El Moulouk Khaldi
moulouk.khaldi@umc.edu.dz

¹ Equipe Métabolites des Extrémophiles (METEX), Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Route de Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria

² Laboratoire Alimentation, Nutrition et Santé (ALNUTS), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Route de Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria

Introduction

Thermophilic and hyperthermophilic microorganisms inhabiting hot aqueous environments such as terrestrial hot springs have unique molecular adaptation capacities and can be a significant source of bioactive molecules (Gomes et al. 2016).

The phylum *Firmicutes* consists of at least 26 families and 223 genera. Some members of the *Firmicutes* are thermophiles and/or halophiles (Schleifer 2009).

Inside this phylum, thermophilic endospore-forming bacteria constitute an important taxonomic group with widely cited potential biotechnological applications (Raddadi et al. 2015). Many of their bioactive compounds such as antimicrobial agents, compatible solutes, and biopolymers can find their way into industrial, pharmaceutical, and medical use, but their thermozymes, especially hydrolases, are maybe the most exploited and studied resource (Charlesworth and Burns

2016; Kambourova et al. 2016; Dumorne et al. 2017). For example, thermostable amylases, cellulases, and proteases of great industrial interest have been isolated from thermophilic strains of the *Firmicutes* (Elleuche et al. 2015; Contesini et al. 2017; Zhang et al. 2018). Indeed, there is an increasing focus on the utilization of renewable sources to satisfy the exponentially growing industrial needs. Microorganisms living in extreme habitats are an ideal source for polymer degraders, which allow to perform biotransformation reactions at non-conventional conditions under which many proteins are completely denatured (Antranikian 2007).

Algeria contains numerous and largely unstudied extreme environments. For example, over than 240 geothermal springs have been recorded in Northern Algeria but the data on their biodiversity is very limited. These springs might be considered as naturally well protected, renewable, and quasi-infinite resources (Fekraoui and Kedaïd 2005; Amarouche-Yala et al. 2014), but can, on the other hand, be particularly vulnerable to microbial contamination due to human activities and their biodiversity could be significantly affected (Field 1999).

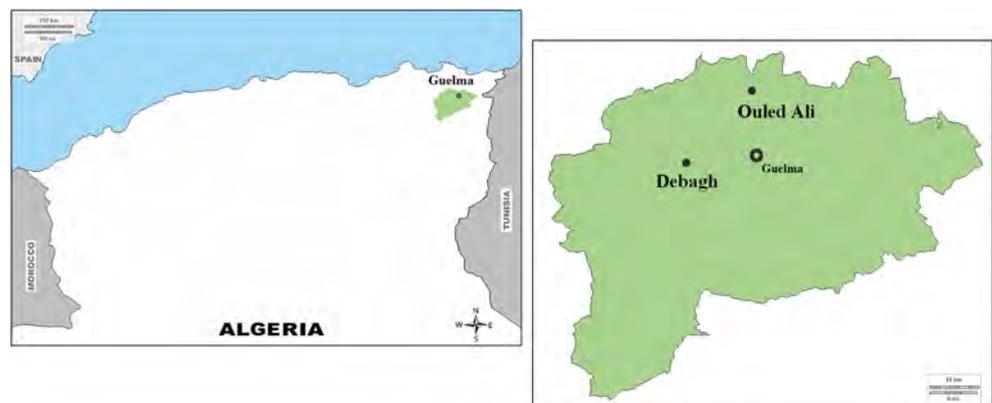
In this work, we investigate the diversity of thermophilic, aerobic endospore-forming bacteria of Hammam Ouled Ali and Hammam Debagh, two hot springs located in the region of Guelma, North-East Algeria, using culture-dependent and culture-independent methods.

Materials and methods

Studied sites, sampling, and isolation procedure

Environmental samples were collected from four different sites of two hot springs: Ouled Ali (36°34' N; 7°23' E) and Debagh (36° 27' N; 7°16' E) located in the Department of Guelma, North-East Algeria (Fig. 1). These springs are used for their therapeutic properties as baths and spas and are found to be near travertine deposits with a very rich mineral salt composition. Hammam Debagh is the hottest spring in Algeria, with temperatures rising up to 98 °C.

Fig. 1 Map of Algeria depicting sampling locations



Water and sediment samples were used for isolation of thermophilic bacteria from each site. Four to eight sediment samples of 20 g from each site were used for the extraction of environmental DNA. Temperature and pH values of the sampling sites were measured in situ, and pH was rechecked at the laboratory. Samples were collected in sterile containers and were stored at 4 °C until further use.

Environmental DNA extraction and sequencing

Metagenomic DNA of 23 sediment samples was extracted using a previously described protocol (Miller et al. 1999). The quantity and quality of the genomic DNA was measured with a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Extracted metagenomic DNA was purified with the GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).

16S rRNA gene V4 variable region PCR primers (515/806 with forward primer barcode) were used in a 30-cycle PCR (5 cycles used on PCR products) using the HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, USA) under the following conditions: 94 °C for 3 min, followed by 28 cycles of 94 °C for 30 s, 53 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min, after which a final elongation step at 72 °C for 5 min was performed. After amplification, PCR products were checked in 2% (w/v) agarose gel to determine the success of amplification and the relative intensity of bands. Multiple samples were pooled together in equal proportions based on their molecular weight and DNA concentrations. Pooled samples were purified using calibrated Ampure XP beads, and the pooled and purified PCR product was used to prepare a DNA library using the Illumina TruSeq DNA library preparation protocol. Sequencing was performed at MRDNA (Shallowater, TX, USA) on an Illumina MiSeq following the manufacturer's guidelines.

Diversity survey of aerobic endospore-forming bacteria in environmental DNA

Sequence data were processed using the MRDNA analysis pipeline (MR DNA, Shallowater, TX, USA). Sequences were

joined and depleted of barcodes. Sequences < 150 bp and sequences with ambiguous base calls were removed. Sequences were denoised, operational taxonomic units (OTUs) generated, and chimeras removed using UCHIME (Edgar et al. 2011). OTUs were defined by clustering at 3% divergence (97% similarity) by CD-HIT (Li and Godzik 2006). Final OTUs were taxonomically classified using BLASTn against a curated database derived from Greengenes, RDP II, and NCBI (DeSantis et al. 2006; Cole et al. 2014; Benson et al. 2018).

Availability of data

The sequence data sets were submitted to NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the accession number (SRP153378) for public access.

Isolation of bacteria

For the isolation of aerobic thermophilic bacteria, 1 g aliquots of sediment was added to enrichment broth (0.4% peptone, 0.2% yeast extract, 0.2% NaCl *w/v*) and incubated at 55 °C for 24 h. Of water samples or enrichment broths, 0.1 mL volumes were then sprayed onto five different growth media: M1, *Thermus* medium agar (Atlas 2005); M2, Medium 256 agar (Atlas 2005); M3, Nutrient agar (Sigma); M4, Plate Counting Agar (Sigma); M5, *Actinomycetes* Agar (Difco), pH adjusted to 7.2 ± 0.2. Plates were incubated at 55 °C for 72 h.

Further purification of isolates was done on *Thermus* agar plates. The isolated colonies were stored at 4 °C.

Phenotypic characterization

The selected isolates were characterized using 103 phenotypic tests based on minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria and criteria described by the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Logan et al. 2009; De Vos et al. 2011).

Colonies morphology was studied by inoculating the cultures on M1 plates and incubating at 55 °C for 24 h. Cell morphology was observed by light microscopy after Gram staining. The presence of endospores was investigated using the Schaeffer-Fulton technique (Bartholomew and Mittwer 1950).

The physiological and biochemical characteristics of each isolate were determined using standard procedures, following 24 to 48 h incubation at optimal growth temperatures, in triplicate. Temperature, pH, and NaCl requirements were studied by inoculating the cultures on M1 agar/broth and incubating at a range of temperatures (10–80 °C, with an interval of 5 °C), pH levels (5.0–10.0, with an interval of pH 0.5 unit), and NaCl concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, and 15% *w/v*) to record the minimum, optimum, and maximum temperature-, pH-, and salinity-dependent growth of all

isolates. Catalase activity was tested with 10% (*v/v*) H₂O₂, oxidase production was checked using Oxidase Strips (Sigma), and β-galactosidase production was checked using Ortho-Nitrophenyl-β-Galactoside (ONPG) disks (Fluka). Carbon substrate utilization was evaluated using 1% (*w/v*) sugars: (D(+)-glucose, D(+)-fructose, D(+)-galactose, D(+)-mannose, D(+)-saccharose, D(+)-maltose, D(+)-lactose, and dextrin), 0.1% (*w/v*) amino acids (L-tyrosine, L-glycine, L-glutamic acid, L-threonine, and L-lysine), 0.1% (*w/v*) organic acids (lactate, acetate, citrate, propionate, and succinate), 0.1% (*w/v*) alcohols (mannitol, glycerol, ethanol, and methanol), and 1% (*w/v*) polysaccharides (starch, pectin) on agar plates containing 0.05% (*w/v*) NH₄Cl and 0.005% (*w/v*) Na₂HPO₄. Acid production from growth on sugars (1%, *w/v*) was recorded on nutrient broth containing 0.003% of phenol red as a pH indicator. Other standard biochemical tests carried out included the following: Methyl Red (MR) and Voges Proskauer (VP) reactions, formation of indole, urease production, mannitol motility, and triple sugar iron tests (Tindall et al. 2007).

Screening for extracellular hydrolase production

The isolates were tested for extracellular enzymatic activities by growth on solid media. Amylolytic activity was tested on a growth medium containing 1% (*w/v*) of starch (Gordon et al. 1973). Caseinolytic and gelatinolytic activities were tested on growth media containing 1% (*w/v*) of casein and 0.4% (*w/v*) of gelatin, respectively (Frazier 1926; Priest et al. 1988). Cellulolytic activities were investigated using a growth media containing 0.5% (*w/v*) of carboxymethyl cellulose (CMC) (Bragger et al. 1989). Pectinolytic activities were determined using 1% (*w/v*) pectin (Soares et al. 1999), and extracellular lipases were screened in growth media containing 1% (*v/v*) of Tween 20 or Tween 80 (Khyami-Horani 1996). All cultures were incubated at optimal growth temperature for 48 to 72 h.

Phenogram construction

A dendrogram of the phenotypic characteristics of the isolates was constructed using NTSYS-pc ver. 2.02i (Exeter Software, Setauket, NY). A binary 0/1 matrix, based on the absence or presence of a phenotypic feature, was assembled. Simple matching (SM) coefficients were calculated, and a dendrogram was constructed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) (Gower 1971).

DNA extraction, 16S rRNA gene amplification

All strains were grown aerobically on M1 medium (pH 7.2) at 55 °C for 24 h. Genomic DNA was extracted using a modified protocol as described previously (Miller et al. 1999). The quantity and quality of the genomic DNA was measured using a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

The 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal bacterial primers E9F (GAGTTTGATCCTGGCTCA) (Farrelly et al. 1995) and U1510R (GGTTACCTGTTACGACTT) (Reysenbach and Pace 1995).

A typical PCR contained the following (final concentration): 1× DreamTaq Buffer, 1% (v/v) bovine serum albumin, 1.25 U DreamTaq Polymerase (Thermo Scientific), 1 μM (each) primer, 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate, and 10 to 100 ng template DNA in a 50-mL reaction volume. PCR conditions were as follows: 95 °C for 3 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, 72 °C for 85 s; and a final incubation at 72 °C for 5 min. PCR products were electrophoresed and visualized on a 1% (w/v) agarose gel.

Amplified ribosomal DNA restriction analysis and sequencing

Restriction digestion amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) profiles on agarose gels, generated by AluI and HaeIII fast digests (FD) (Thermo Fisher Scientific), were analyzed to avoid sequencing redundant clones.

The reaction mixture containing 3.33 μl amplified 16S rRNA gene product, 0.67 μl Tango buffer (10×) for AluI or 0.67 μl FD buffer (10×) for HaeIII FD, 0.33 μl AluI or 0.33 HaeIII FD (10 U/μl), and 5.67 μl deionized water was incubated at 37 °C for 3 h (AluI) or 5 min (HaeIII FD). AluI was inactivated by heating at 65 °C for 20 min. Restriction digest products were loaded into 2.5% (w/v) agarose gels, electrophoresed at 90 V for 90 min. Restriction fragment size was estimated by inclusion of a 100-bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). The gel was visualized using a Bio-Rad Imager Gel Doc XR System, and the restriction patterns of each sample were compared. Fragments smaller than 100 bp were not included in this analysis. The NTYSIS-pc package (version 2.02i, Exeter Software, Setauket, NY) was used to score similarity and clustering analysis using the binary data. Dice coefficients were used to calculate the similarity among the isolates and dendrograms were constructed using the UPGMA method (Nei and Li 1979).

Amplicons of the selected isolates from the ARDRA were then purified with the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Thermo Fisher Scientific). E9F and U1510R primers were used for capillary sequencing at the Central DNA Sequencing Facility, University of Stellenbosch.

Phylogenetic analysis

Identities with 16S rRNA sequences of described taxa were investigated using the nBLAST tool against the EzBioCloud Database of cultured organisms (Yoon et al. 2017). Multiple sequence alignments were performed with MEGA 7 software using the ClustalW algorithm (Thompson et al. 1994). 16S

rRNA gene-based phylogenetic trees were constructed, based on neighbor-joining (Saitou and Nei 1986) and maximum composite likelihood models (Tamura et al. 2004) with 1000 bootstrap replications (Felsenstein 1985) using MEGA 7 program package (Kumar et al. 2016). The 16S rRNA gene sequence of *Sulfobacillus acidophilus* DSM 10332^T was used as outgroup.

Nucleotide accession numbers

Nucleotide sequences have been deposited in the NCBI database under accession numbers MF136820 to MF136840.

Results

Sampling sites

The samples for this study were collected from four different sites at two hot pools: Debagh1 (Db1), Debagh2 (Db2), Debagh3 (Db3), and Ouled Ali (OA). Temperature and pH values for each site are shown in Table 1. Chemical analyses of the spring waters presented by different studies showed some common parameters between the two hot springs: high temperature, slightly acid to neutral pH, high concentrations of silica, major concentrations of sodium chloride with large content of calcium sulfate, gas emissions of carbon dioxide and nitrogen at the thermal vents (Saibi 2009; Bahri et al. 2011; Amarouche-Yala et al. 2015).

Aerobic endospore-forming bacteria communities in hot springs sediments

We performed a MiSeq sequencing of the V4 region of 16S rRNA amplicons from metagenomic DNA extracted from sediment samples from the four sites. Filtration of the data generated 2,238,462 good sequence reads from the 23 pooled samples. Db1 samples had the most important reads (887,026), followed by Db2 (511,956), OA (479,579), and Db3 (359,901). About 193,318 good reads were classified under archaea, while 2,002,967 good reads were classified under bacteria. For the bacterial diversity, the result showed 30 phyla (see [supplementary](#)). *Firmicutes* abundance among other bacterial phyla is shown in Fig. 2.

Prevalence of *Firmicutes* within the total bacterial community in each of the four sites was significantly different. It was very low in Db2 and OA (1.66 and 6.13%, respectively) in comparison with Db1 (12.86%) and Db3 (17.92%) pools. In general, *Firmicutes* were relatively a minor taxonomic group in the four sites. Dominant phyla were different in Db1 (*Deinococcus-Thermus*), Db2 (*Aquificae*), Db3 and OA (*Chloroflexi*).

When studying *Firmicutes* diversity present in each site at the family taxonomic level, we notice that aerobic endospore-

Table 1 Localization and physicochemical data of the sampling sites

Parameters	Sampling sites			
	Ouled Ali (OA)	Debagh 1 (Db1)	Debagh 2 (Db2)	Debagh 3 (Db3)
Localization	(36°34' N; 7°23' E)	(36° 27' N; 7°16' E)		
Altitude (masl)	270	350		
Temperature (°C)	54 ± 1.0	91 ± 0.5	95 ± 0.5	56 ± 1.0
pH	7.0 ± 0.05	6.6 ± 0.02	6.8 ± 0.08	6.8 ± 0.1

formers are dominant in the four sites (Fig. 3). In fact, the presence of three major families of aerobic thermophilic endospore-forming bacilli is observed: *Planococcaceae*, *Bacillaceae*, and the *Paenibacillaceae* which were the *Firmicutes* dominant family in Db1 (61.61%) and Db3 (59.08%). *Clostridiaceae* and *Thermoanaerobacteraceae* were the most noticeable anaerobic endospore-forming families present in the sediment samples.

The major thermophilic aerobic endospore-forming genera of *Firmicutes* phylum present within the bacterial communities of the four sites were *Paenibacillus*, *Psychrobacillus*, and *Sporosarcina* with at least 1% of the total sequences (see supplementary). Genera such as *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, and *Brevibacillus* were minor (less than 1%) in both hot springs.

Isolation of thermophilic bacteria

One hundred seven aerobic, thermophilic, chemoheterotrophic bacterial isolates were obtained from the cultivation of the different samples collected from the four sites. Literature indicates that the temperature used for the isolation procedure (55 °C) allows to identify a wide range of thermophilic heterotrophic

aerobic bacterial taxa from both hot and mild environments (Trujillo 2001; Logan et al. 2009; Battista and Rainey 2015; De Vos 2015; De Vos et al. 2015). The selection and purification of these isolates were based on the morphological variability of their colonies and their microscopic aspect. The Ouled Ali site samples provided 49 isolates whereas 58 isolates came from Debagh three sites. Sediment samples from both hot springs yielded 63 isolates while water samples provided 44 isolates. Thirty-five isolates were collected from growth medium M1, 25 from M2, 33 from M3, 11 from M4, and 3 isolates from M5.

Phenotypic characterization and extracellular hydrolase production

Phenotypic characterization and screening for extracellular enzymatic activities was performed for 20 isolates selected by ARDRA analysis (Table 2). Colonies were smooth or moist, of circular shape, cream or transparent and generally non-pigmented after incubation at 55 °C for 48 h. Cells were typically Gram-positive, rod-shaped, and single or in chains. Based on microscopic observation, ellipsoidal endospores were located in either a terminal or subterminal position.

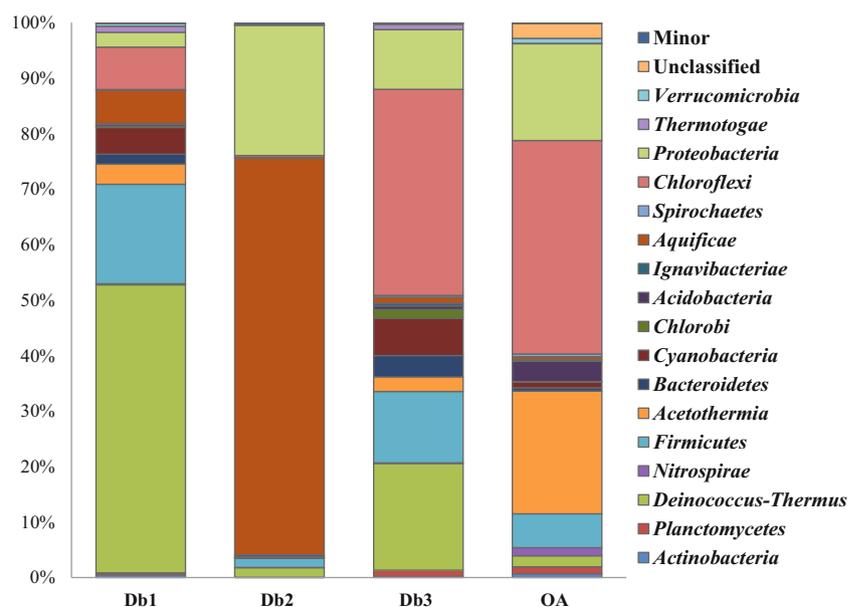
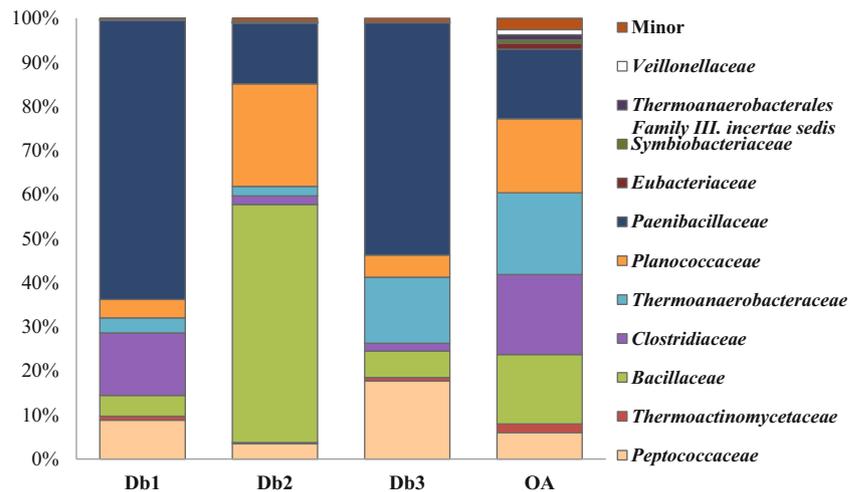
Fig. 2 Percentages of the major phyla in each site (the sequence percentage is above 0.5% in at least one site)

Fig. 3 Percentages of the major families within the *Firmicutes* phylum in each site (the sequence percentage is above 0.5% in at least one site)



Strains were moderately thermophilic and neutrophilic, with growth ranges between 30 and 75 °C and optimum growth between 50 and 60 °C, and at pH values from 5.0 to 9.0 with optimum growth between pH 6.5 and 7.5. All the strains were able to grow at 0% (*w/v*) NaCl and tolerated salt concentrations between 1 and 10% (*w/v*). Optimum growth occurred at 3% (*w/v*) for the most halotolerant strain.

Isolates were aerobic and were able to produce catalase and/or oxidase. The majority of the strains were not able to produce β -galactosidase. Glucose was used as carbon source by all strains while the utilization of other substrates was variable. Fermentation of sugars, RM, and VP reactions were negative in most cases, indicating the presence of aerobic metabolic pathways. Indole and urease tests were negative. Mannitol-mobility and triple sugar iron test results were variable (Table 2).

All of the 21 strains showed positive results for at least one of the seven extracellular hydrolytic activities tested. Amylases and proteases were the most commonly produced extracellular enzymes while lipolytic and cellulolytic activities were the least expressed enzymatic activities (Table 2).

The phenotype-based UPGMA dendrogram of selected strains is shown in [supplementary](#). Strains showed no particular pattern related to the physicochemical properties of their isolation sites. Clusters did not reflect any specific phenotypic differences.

Amplified ribosomal DNA restriction analysis

ARDRA analysis was conducted in order to eliminate redundant clones from the set of isolates. Analysis profiles, using AluI and HaeIII of 45 isolates, were combined and used to construct a dendrogram using UPGMA cluster analysis based upon the similarity index calculated using Dice coefficient (Fig. 4). In total, 23 different bands, ranging in size from 100 to 1000 bp, were observed. AluI and HaeIII are the most frequently used enzymes for ARDRA of members of the

genus *Bacillus*, giving the highest number of differentiating bands (Blanc et al. 1997; McMullan et al. 2004; Kuisiene et al. 2007). We noted that restriction digestion with AluI was more discriminative than HaeIII FD. Isolates could be assigned to 28 distinct clusters, divided into five groups at similarity levels of 70% (group V), 84% (groups III and IV), 87% (group II), and 92% (group I). Results were compared with phenotypic characters to select representatives of each pattern group for further molecular characterization.

Molecular characterization and phylogenetic analysis

Twenty-one organisms were selected for phylogenetic analysis: 8 originated from Debagh hot spring and 13 from Ouled Ali. 16S rRNA sequences were compared to the EzBioCloud version 2018-05 using the nBLAST tool, yielding sequence identities ranging from 98.69 to 100% between the selected strains and type strains (see [supplementary](#)). Isolates were affiliated with the following species: *Anoxybacillus gonensis* (Belduz et al. 2003), *Anoxybacillus flavithermus* (Pikuta et al. 2000; Dai et al. 2011), *Anoxybacillus thermarum* (Poli et al. 2009), *Bacillus paralicheniformis* (Dunlap et al. 2015), *Bacillus licheniformis* (Weigmann 1898), *Geobacillus thermoleovorans* (Nazina et al. 2001), and *Brevibacillus thermoruber* (Manachini et al. 1985; Shida et al. 1996).

The phylogenetic analysis is shown in Fig. 5. Strains affiliated to the *Bacillaceae* (Logan and Vos 2015b) and the *Paenibacillaceae* families (De Vos et al. 2015) were mostly related to four genera: *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, and *Brevibacillus* with a predominance of *Bacillus* (10 strains) and *Anoxybacillus* (9 strains).

Discussion

In this work, the diversity of thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian Hot Springs with variable water

Table 2 Phenotypic characterization of the strains

Characteristic	Db101	Db114	Db120	Db134	Db159	Db27	Db32	Db59	OAI05	OAI07	OAI13
Colonies aspect	Smooth Cream	Smooth Cream	Smooth Cream	Smooth Cream	Smooth Cream	Moist Transparent	Smooth Cream				
Colonies pigmentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	Rods Subterminal	Rods Terminal	Rods Terminal	Rods NO	Rods Terminal	Rods Subterminal	Rods Subterminal	Rods NO	Rods Subterminal	Rods Subterminal	Rods NO
Cell shape	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endospores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T _o range (°C)	[35–65]	[35–65]	[35–65]	[35–65]	[30–70]	[25–60]	[30–60]	[25–70]	[35–70]	[25–70]	[25–70]
Optimum T _o (°C)	60	55	55	50	50	50	50	55	55	50	50
pH range	[6.5–8.0]	[6.5–8.5]	[6.5–8.0]	[6.5–8.0]	[6.5–8.0]	[6.5–8.5]	[6.5–8.5]	[6.5–8.0]	[6.5–8.5]	[6.5–8.5]	[6.5–8.5]
Optimum pH	7.5	7.0	7.5	7.0	7.5	7.0	7.0	7.5	7.0	7.0	6.5
NaCl %	[0–3]	[0–3]	[0–3]	[0–3]	[0–3]	[0–10]	[0–10]	[0–5]	[0–2]	[0–3]	[0–3]
Optimum NaCl %	0	1	0.5	2	2	2	3	0.5	0	0.5	1
Catalase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
β-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of:											
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Acid from:											
D(+)-Glucose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
D(+)-Fructose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
D(+)-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Lactose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
D(+)-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D(+)-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Dextrin	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
D(+)-Melibiose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D(+)-Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of:											
Cellulose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Starch	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Pectin	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Casein	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Gelatin	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of:											
D(+)-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Fructose	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Mannitol	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-

Table 2 (continued)

L-Glycine			+					+							+
L-Threonine															
L-Lysine															
Lactate															
Acetate															
Propionate															
Succinate															
Glycerol															
Ethanol															
Methanol															
Citrate															
Pectin															
Starch															
L-Lysine			+											+	+
Lactate			+											+	+
Propionate															
Succinate															
Glycerol															
Ethanol															
Methanol															
Citrate															
Pectin															
Starch															

NO not observed, + positive result, - negative result

temperatures has been studied with culture-dependent and culture-independent approaches.

The prevalence of the *Firmicutes* among the bacterial communities of the two hot springs by MiSeq sequencing of the V4 region of 16S rRNA gene extracted from sediment samples was investigated. The results showed that this phylum was minor in the four sites. Indeed, bacterial communities in sites Db1 (91 °C) and Db2 (95 °C) were dominated by two other aerobic chemoheterotrophic and more thermophilic phyla: *Deinococcus-Thermus* and *Aquificae*, respectively (Reysenbach et al. 2001; Battista 2016), while phototrophic thermophilic phyla were the most abundant when temperatures were under 80 °C in Db 3 (75 °C) and OA (54 °C), where *Chloroflexi* was the most prevalent phylum (Castenholz 2001). We also found that the prevalence of *Firmicutes* was more important when the temperature of the pools increased: from 6.13% in OA (54 °C) to 12.87% in Db3 (75 °C), to finally reach its highest percentage (17.92%) in Db1 (91 °C). On the other hand, it seems that the limit temperature for the growth of the members of this group was below the temperature of Db2 pool (95 °C) where the prevalence of representative OTUs dropped to 1.66%.

Results of microbial diversity studies for similar environments using the same metagenomic approach were variable. In the Manikaran hot springs (India), *Firmicutes* (28 to 84%), *Aquificae* (2 to 64%), and *Deinococcus-Thermus* (1 to 18%) were the dominant phyla (Bhatia et al. 2015). In Jakrem hot springs (India), *Firmicutes* (61%), *Chloroflexi* (21%), and *Cyanobacteria* (13%) were the most abundant (Panda et al. 2015). *Firmicutes* represented 7.5% of the microbial diversity in Eryuan hot spring (China) (Menzel et al. 2015) and between 6 and 21% of the total microbial diversity in Ma'in hot spring (Jordan) (Hussein et al. 2017). In Murtazaabad hot springs (Pakistan), *Chloroflexi* and *Firmicutes* represented 29 and 10% of the bacterial diversity, respectively (Amin et al. 2017).

The diversity of *Firmicutes* within the four sites was mainly aerobic. Three families of aerobic endospore-forming *Firmicutes* were dominant, especially in Debagh sites: *Paenibacillaceae* (De Vos et al. 2015), *Bacillaceae* (Logan and Vos 2015a), and *Planococcaceae* (Shivaji et al. 2014). *Paenibacillus* (Ash et al. 1993), *Psychrobacillus* (Krishnamurthi et al. 2010), and *Sporosarcina* (Yoon et al. 2001) were, respectively, the most abundant genera of each family. In OA, where the temperature was the lowest among all the studied points, the distribution between aerobic and anaerobic families was more equal with more diversity than in Debagh sites. This is confirmed by the fact that more variability was found in the strains isolated from OA than in Db. Higher temperatures tend to limit the diversity of the environments (Gómez and Parro 2012). The limited depth of the studied pools (between 50 cm and 1 m) might be favorable to the presence of aerobic thermophiles since it is known that dissolved oxygen quantity is more important in surface water (Hayashi and Rosenberry 2002).

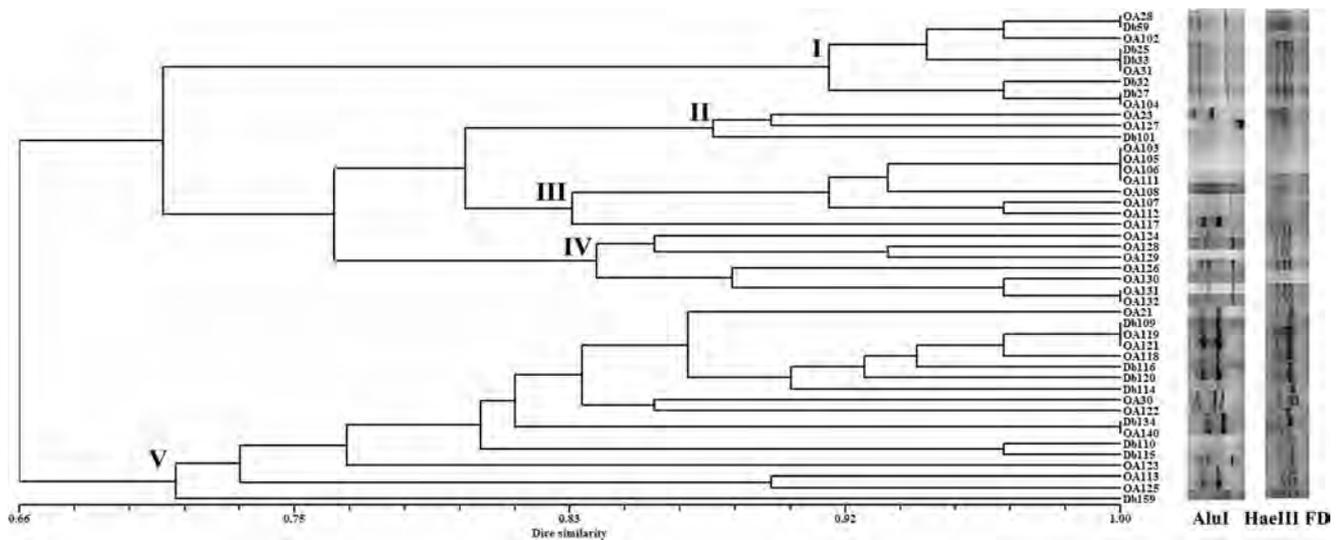


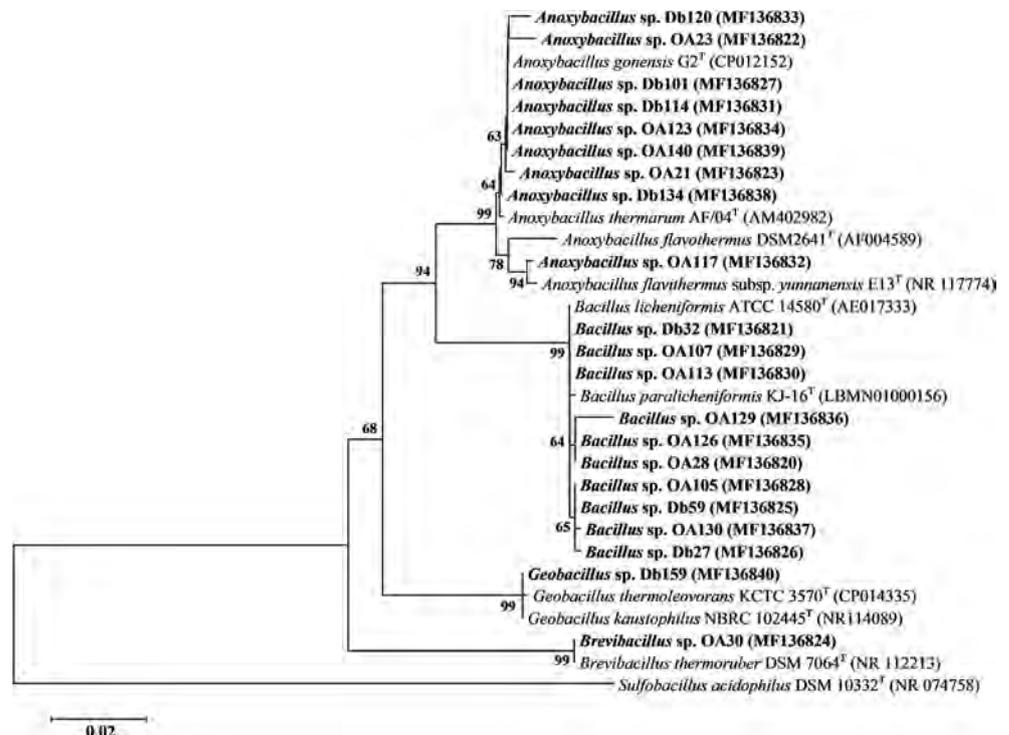
Fig. 4 Differences in restriction patterns. Dendrogram of 45 isolates ARDRA distances obtained by digestion with AluI + HaeIII FD. Isolates are regrouped under seven different pattern groups: I, II, III, IV, and V. The dendrogram was constructed using the UPGMA algorithm and Dice coefficients

Ninety-three isolates have been cultured on non-specific media (M1, M2, and M3). Most aerobic endospore-formers are chemoorganotrophs with aerobic metabolism and, despite their very wide diversity, will grow well on routine media such as nutrient agar or trypticase soy agar (Logan and Allan 2008).

From an initial set of 107 isolates, 13 strains from Ouled Ali and 8 strains from Debagh were selected for molecular characterization. Ninety percent of these strains belonged to the *Bacillus* and *Anoxybacillus* genera, with no significant distribution differences among the two hot springs of the

study, in addition to two strains affiliated to *Geobacillus* and *Brevibacillus* isolated from Debagh and Ouled Ali hot springs, respectively. Reports have been made about the presence of representatives of these genera in hot springs located in geographically different sites: for example in Armenia (Panosyan 2017), Bulgaria (Derekova et al. 2008), China (Song et al. 2013), Morocco (Aanniz et al. 2015), Tunisia (Sayeh et al. 2010), Turkey (Adiguzel et al. 2009), and Russia (Foti et al. 2008). Isolates had typical phenotypic characters described for *Bacillales* members, they were commonly Gram-positive,

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between the strains of this study (indicated in bold letters) and strains of related genera of the family *Bacillaceae*. The strains and their corresponding Genbank accession numbers are shown following the organism name and indicated in parentheses. The phylogenetic tree was made using the neighbor-joining method with maximum composite likelihood model implemented in MEGA 7. The tree includes the 16S rRNA gene sequence of *Sulfobacillus acidophilus* DSM 10332^T as outgroup. Bootstrap consensus trees were inferred from 1000 replicates, only bootstrap values > 60% are indicated. The scale bar represents 0.02 nucleotide changes per position



rod-shaped, chemoorganotrophic, aerobic, and moderate thermophiles (De Vos et al. 2011; Logan and Vos 2015b). Identity between the strains of the study and type strains of databanks was between 98 and 100%. These type strains were isolated from different hot and mild environments. Thermophilic aerobic endospore-forming bacteria are widely distributed in water, soil, and many other environments and it is not uncommon to isolate them from mesophilic environments (Logan and Halket 2011; Müller et al. 2014).

All of the selected strains showed at least one extracellular enzyme activity among the tested activities. Amylases and caseinases production was numerically the most important and further studies of these enzymes might be interesting. For example, the proteasic activity of one of the strains isolated in this study, *Brevibacillus* sp. OA30, was investigated and an acid protease with remarkable properties was characterized (Gomri et al. 2018). Thermophilic aerobic endospore-forming bacteria are well known to be a good source of thermoenzymes, including xylanases, proteases, amylases, peroxidases, glucose isomerases, lipases, and DNA restriction enzymes (Maurer 2004; Schallmeyer et al. 2004; Satyanarayana et al. 2013; Panosyan 2017).

A dendrogram was constructed to discriminate the 21 isolates based on their phenotypic characters. It seems that the clusterization of the OTUs was generally not influenced by the strains origin. The physiology of the endospore-forming bacteria is influenced by complex multifactorial conditions of their environments and temperature might not be the decisive parameter in the variation of the phenotypic features of these microorganisms (Mandic-Mulec et al. 2016; Gauvry et al. 2017). A natural environment provides both sufficient nutrients and favorable physical and chemical conditions of temperature, pH, availability of water, redox, etc. (Carlin 2011).

ARDRA might be an interesting tool for the screening and the identification of new strains of heterotrophic thermophilic endospore-forming bacteria. Application of this technique in studies interested in the genetic variability of bacilli species revealed its ability to expose the exact lineage of the species rapidly (Kumar et al. 2014; Tiwari and Thakur 2014; Jain et al. 2017). The diversity rate of these groups can be very low in hot pool environments and ARDRA might help eliminate redundant clones in the prospecting process (Blanc et al. 1997; Brock 2012).

When comparing results from culture-dependent and culture-independent methods, we observed that the genera to which our isolated strains belonged (*Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, and *Brevibacillus*) had a very low distribution among the four sites. Similar observations were made on other hot springs in Malaysia (Chan et al. 2015), Tunisie (Sayeh et al. 2010), India (Kikani et al. 2015), and Bulgaria (Derekova et al. 2008) where these genera were the most frequently isolated while their abundance in environmental DNA was very low. It is important to mention that in culture-independent studies, the abundance of taxonomic groups of endospore-forming organisms belonging to the

Firmicutes risk to be underestimated. The cell lysis of such organisms is often difficult, and so subsequent DNA purification and/or PCR-based applications may also be biased (De Vos 2011; Urbieta et al. 2015).

16S rRNA gene-based methods provide good phylogenetic information to the genus level, but, in themselves, give little information on function. Importantly, traditional approaches that group isolates on the basis of common metabolic properties may be limited in terms of phylogenetic insights, but provide clues to environmental factors favoring and selecting for particular groups and can be strong indicators of potential ecosystem function. A combined approach might allow to establish more clearly the links between diversity, community structure, physiological diversity, and ecosystem function, rather than merely characterizing the presence, absence, and identity of strains present (Mandic-Mulec and Prosser 2011).

Conclusion

This work is one of the few published studies describing the diversity of thermophilic bacteria of hot springs in Algeria. The sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene from environmental DNA extracted from sediment samples showed that *Firmicutes* were present as a minor phylum in the four sites with aerobic endospore-forming members belonging to *Planococcaceae*, *Bacillaceae*, and *Paenibacillaceae* families as major representatives.

Twenty-one thermophilic endospore-forming bacteria strains were isolated from Debagh and Ouled Ali hot springs and selected for phenotypic and genotypic characterization. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA sequences revealed that these strains were affiliated with genera *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, and *Geobacillus* distributed between the two hot springs. All of the 21 isolates had at least one extracellular hydrolytic activity. Classical culture-based methods remain important for understanding the molecular adaptations of microbial guilds, particularly those isolated from extreme habitats with potential applications. One of the perspectives of this work is the use of Next-Generation Sequencing methods to explore the studied hot springs with a focus on bioprospection of thermozymes and other biomolecules of great biotechnological potential.

Acknowledgements Don Cowan and Thulani Makhwanyane, Centre for Microbial Ecology and Genomics, University of Pretoria, are gratefully acknowledged for their support in phylogenetics training. We also wish to thank Djamel Eddine Mekhancha, Laboratoire ALNUTS, Université Frères Mentouri Constantine 1 for his support during sampling, isolation, and phenotypic study.

Funding This study received financial support from the following organizations: The Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and The Genomics Research Institute and the University of Pretoria, South Africa.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent N/A

References

- Aanniz T et al (2015) Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Braz J Microbiol* 46:443–453. <https://doi.org/10.1590/s1517-838246220140219>
- Adiguzel A, Ozkan H, Baris O, Inan K, Gulluce M, Sahin F (2009) Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods* 79:321–328. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.026>
- Amarouche-Yala S, Benouadah A, Bentabet AEO, López-García P (2014) Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles* 18:1035–1047. <https://doi.org/10.1007/s12403-014-0130-x>
- Amarouche-Yala S, Benouadah A, el Ouahab BA, Moulla AS, Ouarezki SA, Azbouche A (2015) Physicochemical, bacteriological, and radiochemical characterization of some Algerian thermal spring waters. *Water Qual Expo Health* 7:233–249. <https://doi.org/10.1007/s12403-014-0130-x>
- Amin A et al (2017) Diversity and distribution of thermophilic bacteria in hot springs of Pakistan. *Microb Ecol* 74:116–127. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0930-1>
- Antranikian G (2007) Industrial relevance of thermophiles and their enzymes. In: *Thermophiles: biology and technology at high temperatures*, pp 113–186. <https://doi.org/10.1201/9781420008852.ch8>
- Ash C, Priest F, Collins M (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:253. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>
- Atlas RM (2005) *Handbook of media for environmental microbiology*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781420037487>
- Bahri F, Saïbi H, Cherchali M-E-H (2011) Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arab J Geosci* 4:207–219. <https://doi.org/10.1007/s12517-010-0127-0>
- Bartholomew JW, Mittwer T (1950) A simplified bacterial spore stain. *Stain Technol* 25:153–156. <https://doi.org/10.3109/10520295009110979>
- Battista JR (2016) *Deinococcus–Thermus* group. In: *Encyclopedia of life sciences*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021151>
- Battista JR, Rainey FA (2015) *Deinococcus*. In: Whitman WB et al (eds) *Bergey’s manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00475>
- Belduz AO, Dulger S, Demirbag Z (2003) *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1315–1320. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02473-0>
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Ostell J, Pruitt KD, Sayers EW (2018) GenBank. *Nucleic Acids Res* 46:D41–D47. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1246>
- Bhatia S, Batra N, Pathak A, Green SJ, Joshi A, Chauhan A (2015) Metagenomic evaluation of bacterial and archaeal diversity in the geothermal hot springs of Manikaran, India. *Genome Announc* 3:e01544–e01514. <https://doi.org/10.1128/genomea.01544-14>
- Blanc M, Marilley L, Beffa T, Aragno M (1997) Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *Int J Syst Evol Microbiol* 47:1246–1248. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1246>
- Bragger J, Daniel RM, Coolbear T, Morgan HW (1989) Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 31:556–561. <https://doi.org/10.1007/BF00270794>
- Brock TD (2012) *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6284-8>
- Carlin F (2011) Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol* 28:177–182. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.008>
- Castenholz R (2001) Class I. “*Chloroflexi*” *Bergey’s manual of systematic bacteriology* 1:427. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00016>
- Chan CS, Chan K-G, Tay Y-L, Chua Y-H, Goh KM (2015) Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Front Microbiol* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00177>
- Charlesworth J, Burns BP (2016) Extremophilic adaptations and biotechnological applications in diverse environments. *AIMS Microbiol* 2:251–261. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.3.251>
- Cole JR et al (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Contesini FJ, Melo RR, Sato HH (2017) An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit Rev Biotechnol* 1–14. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- Dai J, Liu Y, Lei Y, Gao Y, Han F, Xiao Y, Peng H (2011) A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* ssp. nov. with very high ethanol tolerance. *FEMS Microbiol Lett* 320:72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02294.x>
- De Vos P (2011) Studying the bacterial diversity of the soil by culture-independent approaches. In: *Endospore-forming soil bacteria*. Springer, pp 61–72. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8_3
- De Vos P (2015) Bacillales. In: Whitman WB et al (eds) *Bergey’s manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00057>
- De Vos P et al (2011) Phylum BXIII. *Firmicutes*. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (eds) *Bergey’s manual® of systematic bacteriology*, vol 3. Springer Science & Business Media, New York, pp 625–637. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_29
- De Vos P, Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB (2015) “*Paenibacillaceae*” fam. nov. In: Whitman WB et al (eds) *Bergey’s manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00114>
- Derekova A, Mandeva R, Kambourova M (2008) Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1697–1702. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9663-0>
- DeSantis TZ et al (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069–5072. <https://doi.org/10.1128/aem.03006-05>
- Dumorne K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P (2017) Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol* 27:649–659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>
- Dunlap CA, Kwon S-W, Rooney AP, Kim S-J (2015) *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:3487–3492. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000441>
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>

- Elleuche S, Schäfers C, Blank S, Schröder C, Antranikian G (2015) Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Curr Opin Microbiol* 25:113–119. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.011>
- Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E (1995) Effect of genome size and rrr gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 61:2798–2801. <https://doi.org/10.1007/bf01919508>
- Fekraoui A, Kedaïd F-Z (2005) Geothermal resources and uses in Algeria: a national update report. In: Proceedings
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 783–791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Field MS (1999) Karst hydrogeology and human activities: impacts, consequences, and implications. *Environ Eng Geosci* V:487–489. <https://doi.org/10.2113/gseageosci.V.4.487>
- Foti MJ, Sorokin DY, Zacharova EE, Pimenov NV, Kuenen JG, Muyzer G (2008) Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia). *Extremophiles* 12:133–145. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0117-7>
- Frazier WC (1926) A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J Infect Dis* 302–309. <https://doi.org/10.1093/infdis/39.4.302>
- Gauvry E, Mathot A-G, Leguérinel I, Couvert O, Postollec F, Broussolle V, Coroller L (2017) Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res Microbiol* 168:369–378. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>
- Gomes E, de Souza AR, Orjuela GL, Da Silva R, de Oliveira TB, Rodrigues A (2016) Applications and benefits of thermophilic microorganisms and their enzymes for industrial biotechnology. In: Gene expression systems in fungi: advancements and applications. Springer, pp 459–492. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_21
- Gómez F, Parro V (2012) Applications of extremophiles in astrobiology: habitability and life detection strategies. In: Adaptation of microbial life to environmental extremes. Springer, pp 199–229. https://doi.org/10.1007/978-3-211-99691-1_9
- Gomri MA, Rico-Díaz A, Escuder-Rodríguez J-J, El Moulouk Khaldi T, González-Siso M-I, Kharoub K (2018) Production and characterization of an extracellular acid protease from thermophilic *Brevibacillus* sp. OA30 isolated from an Algerian hot spring. *Microorganisms* 6:31. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020031>
- Gordon RE, Haynes W, Pang CH-N, Smith N (1973) The genus *Bacillus*. US Department of Agriculture handbook, vol 427
- Gower JC (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 857–871. <https://doi.org/10.2307/2528823>
- Hayashi M, Rosenberry DO (2002) Effects of ground water exchange on the hydrology and ecology of surface water. *Groundwater* 40:309–316. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2002.tb02659.x>
- Hussein EI, Jacob JH, Shakhathreh MAK, Abd Al-razaq MA, Juhmani AF, Cornelison CT (2017) Exploring the microbial diversity in Jordanian hot springs by comparative metagenomic analysis. *MicrobiologyOpen* 6:e00521. <https://doi.org/10.1002/mbo3.521>
- Jain D, Sunda SD, Sanadhya S, Nath DJ, Khandelwal SK (2017) Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *3 Biotech* 7:4. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0583-7>
- Kambourova M, Radchenkova N, Tomova I, Bojadjieva I (2016) Thermophiles as a promising source of exopolysaccharides with interesting properties. In: Biotechnology of extremophiles. Springer, pp 117–139. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_4
- Khyami-Horani H (1996) Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World J Microbiol Biotechnol* 12:399–401. <https://doi.org/10.1007/bf00340219>
- Kikani B, Sharma A, Singh S (2015) Culture dependent diversity and phylogeny of thermophilic bacilli from a natural hot spring reservoir in the Gir Forest, Gujarat (India). *Microbiology* 84:687–700. <https://doi.org/10.1134/S0026261715050124>
- Krishnamurthi S, Ruckmani A, Pukall R, Chakrabarti T (2010) *Psychrobacillus* gen. nov. and proposal for reclassification of *Bacillus insolitus* Larkin & Stokes, 1967, *B. psychrotolerans* Abd-El Rahman et al., 2002 and *B. psychrodurans* Abd-El Rahman et al., 2002 as *Psychrobacillus insolitus* comb. nov., *Psychrobacillus psychrotolerans* comb. nov. and *Psychrobacillus psychrodurans* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 33:367–373. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.06.003>
- Kuisiensi N, Raugalas J, Stuknyte M, Chitavichius D (2007) Identification of the genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer. *FEMS Microbiol Lett* 277:165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00954.x>
- Kumar M, Yadav AN, Tiwari R, Prasanna R, Saxena AK (2014) Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs. *Ann Microbiol* 64:741–751. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0709-7>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Logan NALA, Allan RNAN (2008) Aerobic, endospore-forming bacteria from antarctic geothermal soils. In: *Microbiology of Extreme Soils*, pp 155–175. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74231-9_8
- Logan NA, Halket G (2011) Developments in the taxonomy of aerobic, endospore-forming bacteria. In: *Endospore-forming soil bacteria*. Springer, pp 1–29. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8_1
- Logan NA, Vos PD (2015a) Bacillaceae. In: Whitman WB et al (eds) *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00112>
- Logan NA, Vos PD (2015b) Bacillus. In: Whitman WB et al (eds) *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Logan NA et al (2009) Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2114–2121. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>
- Manachini P, Fortina M, Parini C, Craveri R (1985) *Bacillus thermoruber* sp. nov., nom. rev., a red-pigmented thermophilic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 35:493–496. <https://doi.org/10.1099/00207713-35-4-493>
- Mandic-Mulec I, Prosser JI (2011) Diversity of endospore-forming bacteria in soil: characterization and driving mechanisms. In: *Endospore-forming Soil Bacteria*. Springer, pp 31–59. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8_2
- Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD (2016) Ecology of Bacillaceae. In: *The bacterial spore: from molecules to systems*. American Society of Microbiology, pp 59–85. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>
- Maurer K-H (2004) Detergent proteases. *Curr Opin Biotechnol* 15:330–334. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.06.005>
- McMullan G, Christie J, Rahman T, Banat I, Ternan N, Marchant R (2004) Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. Portland Press Limited. <https://doi.org/10.1042/bst0320214>
- Menzel P et al (2015) Comparative metagenomics of eight geographically remote terrestrial hot springs. *Microb Ecol* 70:411–424. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0576-9>
- Miller D, Bryant J, Madsen E, Ghiorse W (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 65:4715–4724
- Müller AL et al (2014) Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. *ISME J* 8:1153–1165. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.225>

- Nazina T et al (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* Int J Syst Evol Microbiol 51:433–446. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>
- Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci 76:5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Panda AK, Bisht SS, Kumar NS, De Mandal S (2015) Investigations on microbial diversity of Jakrem hot spring, Meghalaya, India using cultivation-independent approach. Genom Data 4:156–157. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.04.016>
- Panosyan H (2017) Phylogenetic diversity of thermophilic bacilli isolated from geothermal springs of Nagorno Karabakh. Chem Biol 51:179–185
- Pikuta E et al (2000) *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50:2109–2117. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2109>
- Polì A, Romano I, Cordella P, Orlando P, Nicolaus B, Berrini CC (2009) *Anoxybacillus thermanum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy. Extremophiles 13:867–874. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0274-y>
- Priest FG, Goodfellow M, Tood C (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus*. Microbiology 134:1847–1882. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>
- Raddadi N, Cherif A, Daffonchio D, Neifar M, Fava F (2015) Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. Appl Microbiol Biotechnol 99:7907–7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>
- Reysenbach A, Pace N (1995) Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction archaea: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 101–107
- Reysenbach A-L et al. (2001) Phylum BI. *Aquificae* phyl. nov. In: Bergey's manual® of systematic bacteriology. Springer, pp 359–367. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_18
- Saibi H (2009) Geothermal resources in Algeria. Renew Sust Energ Rev 13:2544–2552. <https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2007.02.002>
- Saitou N, Nei M (1986) The neighbor-joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. In: Japanese Journal of Genetics, vol 6. Genetics Soc Japan Natl Inst Genetics, Yata, Mishima, Shizuoka 411, Japan, pp 611–611. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (2013) Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. In: Biotechnology of Thermophiles. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5>
- Sayeh R, Birrien JL, Alain K, Barbier G, Hamdi M, Prieur D (2010) Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. Extremophiles 14:501–514. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0327-2>
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Can J Microbiol 50:1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Schleifer K-H (2009) Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmicutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: Bergey's manual® of systematic bacteriology. Springer, pp 19–1317. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_3
- Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K (1996) Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol 46:939–946. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-248>
- Shivaji S, Srinivas T, Reddy G (2014) The family *Planococcaceae*. In: The Prokaryotes. Springer, pp 303–351. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9_351
- Soares MM, Silva R, Gomes E (1999) Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. Rev Microbiol 30:299–303. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000400002>
- Song ZQ et al (2013) Bacterial and archaeal diversities in Yunnan and Tibetan hot springs, China. Environ Microbiol 15:1160–1175. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12025>
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci U S A 101:11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tindall BJ, Sikorski J, Smibert RA, Krieg NR (2007) Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: Methods for general and molecular microbiology, 3rd edn. American Society of Microbiology, pp 330–393. <https://doi.org/10.1128/9781555817497.ch15>
- Tiwari K, Thakur HK (2014) Diversity and molecular characterization of dominant *Bacillus amyloliquefaciens* (JNU-001) endophytic bacterial strains isolated from native neem varieties of Sanganeer region of Rajasthan. J Biodivers Biopros Dev 1:2. <https://doi.org/10.4172/2376-0214.1000115>
- Trujillo ME (2001) Actinobacteria. In: Encyclopedia of life sciences. Wiley, pp 1–20. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020366.pub2>
- Urbietta MS, Donati ER, Chan K-G, Shahar S, Sin LL, Goh KM (2015) Thermophiles in the genomic era: biodiversity, science, and applications. Biotechnol Adv 33:633–647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.007>
- Weigmann H (1898) Ueber zwei an der Käsefermentation beteiligte Bakterien. Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II Zentbl. Hyg. Abt. 820–834
- Yoon J-H, Lee K-C, Weiss N, Kho YH, Kang KH, Park Y-H (2001) *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of th. Int J Syst Evol Microbiol 51:1079–1086. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1079>
- Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int J Syst Evol Microbiol. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zhang Y, He S, Simpson BK (2018) Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. Curr Opin Food Sci. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007>



Article

Production and Characterization of an Extracellular Acid Protease from Thermophilic *Brevibacillus* sp. OA30 Isolated from an Algerian Hot Spring

Mohamed Amine Gomri ¹ , Agustín Rico-Díaz ², Juan-José Escuder-Rodríguez ², Tedj El Moulouk Khaldi ³, María-Isabel González-Siso ^{2,*} and Karima Kharroub ¹

¹ Equipe Métabolites des Extrémophiles, Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Route de Ain El Bey, 25000 Constantine, Algérie; gomrima@umc.edu.dz (M.A.G.); kkharroub@gmail.com (K.K.)

² Grupo EXPRELA, Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, 15071 A Coruña, Spain; agustin.rico.diaz@udc.es (A.R.-D.); j.escuder@udc.es (J.-J.E.-R.)

³ Laboratoire Alimentation, Nutrition et Santé (ALNUTS), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Route de Ain El Bey, 25000 Constantine, Algérie; moulouk.khaldi@umc.edu.dz

* Correspondence: migs@udc.es; Tel.: +34-981-167-000

Received: 14 March 2018; Accepted: 10 April 2018; Published: 12 April 2018



Abstract: Proteases have numerous biotechnological applications and the bioprospection for newly-thermostable proteases from the great biodiversity of thermophilic microorganisms inhabiting hot environments, such as geothermal sources, aims to discover more effective enzymes for processes at higher temperatures. We report in this paper the production and the characterization of a purified acid protease from strain OA30, a moderate thermophilic bacterium isolated from an Algerian hot spring. Phenotypic and genotypic study of strain OA30 was followed by the production of the extracellular protease in a physiologically-optimized medium. Strain OA30 showed multiple extracellular proteolytic enzymes and protease 32-F38 was purified by chromatographic methods and its biochemical characteristics were studied. Strain OA30 was affiliated with *Brevibacillus thermoruber* species. Protease 32-F38 had an estimated molecular weight of 64.6 kDa and was optimally active at 50 °C. It showed a great thermostability after 240 min and its optimum pH was 6.0. Protease 32-F38 was highly stable in the presence of different detergents and solvents and was inhibited by metalloprotease inhibitors. The results of this work suggest that protease 32-F38 might have interesting biotechnological applications.

Keywords: *Brevibacillus* sp. OA30; thermophilic; hot spring; Algeria; protease; characterization

1. Introduction

Proteases catalyze the hydrolysis of proteinaceous material, and represent the largest worldwide enzyme sales [1]. Due to their characteristic active sites, in combination with their mode of catalytic action, proteases were assigned to groups of aspartic, cysteine, glutamic acid, serine, threonine, or metalloproteases. Moreover, they can be further subdivided based on their pH preferences into acidic, alkaline or neutral proteases [2]. Numerous commercial proteases, especially isolated from microorganisms, are used in various industrial and analytical processes, such as protein analysis, feed and food biotechnology, pharmaceutical and cosmetic preparations, and cleaning processes [3–5].

For example, they have major applications in detergent formulations, cheese-making, baking, meat tenderization, and leather industries [6–8].

Extracellular proteases produced by microorganisms are of great value for industry since they reduce production costs [9]. Thermophilic microorganisms are an important source of biodiversity and thermostable molecules of biotechnological importance and their unique properties at high temperatures justify the search for new proteases, as well as other enzymes of great value [10,11]. Thermostable proteases offer compatibility with processes that function more optimally at higher temperatures (e.g., through reduced viscosity), can have high catalytic efficiencies, and offer resistance from mesophilic microbial contamination [12]. Their robustness, in addition to their broad substrate specificity, makes thermostable proteases promising candidates for various industrial areas [13].

Brevibacillus belongs to the family Paenibacillaceae, a member of the Firmicutes phylum [14]. Among the 14 validated species of this genus, thermophilic *Brevibacillus thermoruber* and *Brevibacillus levickii* were isolated from different geothermal soils and hot springs [15,16]. These organisms have been reported to produce several molecules of biotechnological relevance, such as proteases, chitinases, exopolysaccharides, and bacteriocins, and to have the ability to be used as biocontrol agents and probiotics [17–20].

The aim of this study was to produce and characterize an extracellular protease from the thermophilic *Brevibacillus* sp. strain OA30 isolated from an Algerian hot spring.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation of Strain OA30

A water sample was collected from an Algerian hot spring located at Ouled Ali (36°34' N; 7°23' E) (54 °C; pH 7.0 ± 0.05). A total of 0.1 mL of the diluted sample was poured on Plate Counting Agar medium, (pH 7.2 ± 0.2) and incubated for 72 h at 55 °C. Strain OA30 was purified and replated on *Thermus* agar medium (% w/v: 3 agar; 0.8 peptone; 0.4 yeast extract; 0.2 NaCl; pH 7.2 ± 0.2) [21]. The chemicals used for this study were principally purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Merck and Co., Inc. (Kenilworth, NJ, USA), and Fluka Biochemika (Buschs, Switzerland). All media were sterilized at 120 °C for 20 min prior to inoculation.

2.2. Screening for Extracellular Proteolytic Activity

To reveal the extracellular proteolytic activity, strain OA30 was plated on casein agar plates (% w/v: 2.5 agar; 1.0 casein; 0.2 peptone; 0.1 yeast extract; 0.2 NaCl; pH 7.2 ± 0.2) and incubated at 55 °C for 48 h. The appearance of clear zones around the colonies confirmed the presence of the enzymatic activity [22].

2.3. Phenotypic Characterization

The phenotypic characterization of the isolate was performed by different tests referring to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology and minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria [23,24]. The colonies' aspect was examined. Cell morphology was observed using a light microscope (1000×, Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)) fitted with a digital camera (Leica EC3 camera) after Gram staining of the cells. The presence of endospores was investigated using the Schaeffer-Fulton technique [23,25].

Requirements for NaCl were determined on *Thermus* agar medium at 0, 1, 3, 3.5, 5, 7.5, and 10% (w/v) NaCl. Growth was tested on pH values between 5 and 10 and on a temperature range between 30 and 75 °C. Different biochemical and physiological tests were also carried out: catalase and oxidase activities; indole and urease production; ONPG, Methyl Red (MR) and Voges–Proskauer (VP) reactions; fermentation and use as a carbon source of D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-maltose, D-saccharose, and D-lactose; and hydrolysis of gelatin, pectin, and starch [26–29].

2.4. Estimation of Growth Rates

Growth rates were estimated at different temperatures, pH, and NaCl concentrations. Only one parameter was changed each time and the two other parameter values were kept constant. Table 1 shows the different value combinations used. To prepare the preculture, approximately 20 mL of *Thermus* liquid medium were inoculated with strain OA30 and incubated overnight at 55 °C. The preculture was then transferred into a sterile 500 mL flask containing 100 mL of the same modified *Thermus* liquid medium to give an initial absorbance at 660 nm of at least 0.1. The culture was incubated in aerobic conditions using a Thermo Scientific MaxQ 4000 Benchtop Orbital Shaker (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 120 rpm for approximately 24 h. At different time intervals, the turbidity of the cultures was determined by measuring the increase in optical density at 660 nm with a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader. At least 10 absorbance measurements were taken into account.

Table 1. Temperature, pH and NaCl concentration values used to estimate growth rates.

Parameter \ Assay	Assay									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T (°C)	50				55					60
pH *	7.0	7.0	6.5	7.0	7.5	8.0	7.0	7.0	7.0	7.0
[NaCl] (% w/v)			0				1	2	3	0

* Phosphate buffer (0.2 M) was used to adjust the pH values.

2.5. Genotypic Characterization

2.5.1. DNA Extraction, 16S rRNA Gene Amplification, and Sequencing

Strain OA was grown aerobically on *Thermus* medium agar (pH 7.2) at 55 °C for 24 h. Genomic DNA was extracted using a modified protocol described previously [30]. The quantity and quality of the genomic DNA was measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific). The 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with universal bacterial primers E9F (GAGTTTGATCCTGGCTCA) [31] and U1510R (GGTTACCTTGTTACGACTT) [32]. A typical PCR contained (final concentration): 1× DreamTaq buffer, 1% (v/v) BSA (Bovine Serum Albumin), 1.25 U DreamTaq polymerase (Thermo Scientific), 1 μM (each) of primer, 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate, and 10 to 100 ng of template DNA in a 50 mL reaction volume. PCR conditions were as follows: 95 °C for 3 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, 72 °C for 85 s; and a final incubation at 72 °C for 5 min. PCR products were electrophoresed and visualized on a 1% (w/v) agarose gel. Amplicons were then purified with the GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific). E9F and U1510R primers were used for capillary sequencing at the Central DNA Sequencing Facility, University of Stellenbosch (South Africa).

2.5.2. Phylogenetic Analysis

Identities with described taxa were investigated using the nBLAST tool against the EzBioCloud database of cultured organisms [33]. Multiple sequence alignments were performed using ClustalW [34]. 16S rRNA gene-based phylogenetic tree was constructed based on neighbor-joining [35] and maximum composite likelihood models [36] with 1000 bootstrap replications [37] using the MEGA 7 program package [38]. The sequence of *Sulfobacillus acidophilus* DSM 10332^T was used as the outgroup.

2.6. Enzyme Production

For the production of extracellular proteases, two different media were used: casein medium (M1) (% w/v: 0.8 casein, 0.3 peptone, 0.2 yeast extract, 0.2 glucose, optimum concentration of NaCl, 0.01 CaCl₂·2H₂O, 0.02 MgSO₄·7H₂O, 0.1 KH₂PO₄, optimum pH) and skim milk medium (M2) (% w/v: 10% skim milk, 0.2 yeast extract, 0.2 glucose, optimum concentration of NaCl, 0.01 CaCl₂·2H₂O, 0.02 MgSO₄·7H₂O, 0.1 KH₂PO₄, optimum pH).

w/v: 8 skim milk, 0.3 peptone, 0.2 yeast extract, 0.2 glucose, optimum concentration of NaCl, 0.01 CaCl₂·2H₂O, 0.02 MgSO₄·7H₂O, 0.672 KH₂PO₄, 3.863 NaHPO₄, optimum pH). A total of 50 mL of strain OA30's preculture were prepared as in Section 2.4, and were used to inoculate 250 mL of medium M1 or medium M2 contained in a sterile 2000 mL flask. The culture was incubated at optimum temperature in vigorous aeration conditions at 140 rpm for 64 h. At different time intervals, the absorbance and the proteolytic activity of the cultures were determined as described in Section 2.9. Culture supernatants were collected by centrifugation (22,000 × *g* for 30 min at 4 °C) and used as the crude enzyme solution.

2.7. Purification of Protease

Proteins from culture supernatants were filtered through 0.45 µm, then 0.2 µm pore size membrane filters, and the filtrates were precipitated by adding ammonium sulfate at a final concentration of 80% (*w/v*) and the suspension was kept at 4 °C overnight under gentle stirring. The precipitated proteins were collected by centrifugation at 22,000 × *g* for 20 min at 4 °C and then dissolved in 25 mL phosphate-buffered saline (PBS) buffer (50 mM). The enzyme solution was dialyzed overnight in a 14 kDa cut-off dialysis tubing cellulose membrane at 4 °C against 500 mL of the same buffer, which was replaced four times every 2 h. The resulting solution was filtered again through 0.2 µm pore size membrane filters.

Anion-exchange chromatography was performed using a HiTrap Q HP 5 mL column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The column was equilibrated with 50 mM PBS (buffer A). Bounded proteins were eluted by applying a linear NaCl gradient (0–1 M) in buffer A and fractions were collected at 1 mL.

Active fractions were subsequently concentrated using a 10 kDa cut-off Amicon Pro Purification System (Millipore, Burlington, MA, USA). Tubes were first washed with 50 mM PBS.

A second purification of the fractions with enzymatic activity was done by gel filtration using a HiLoad 16/60 Superdex 200 prepgrade column (GE Healthcare) in 50 mM PBS buffer. Fractions were collected at 1 mL.

2.8. Molecular Weight Determination and Zymography

The SDS-PAGE method in a 10% polyacrylamide slab gel was carried out to analyze the molecular mass [39]. For zymogram analysis, protease was separated in a 10% SDS-polyacrylamide gel containing 0.5% (*w/v*) skim milk as a substrate. The samples were not heated prior to electrophoresis. Electrophoresis of both gels was run at 150 V for 120 min at room temperature. The zymography gel was washed with 2.5% (*v/v*) Triton X-100 for 1 h and incubated for 15 min in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and was then incubated at 50 °C overnight in a PBS solution (pH 7.5) containing 1% (*w/v*) casein. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.2% *w/v*) for 1 h and then destained in distilled water/acetic acid (80:20). The protease band appeared as a clear zone surrounded by the blue color of the gel. NZY Color Protein Marker II (Lisbon, Portugal) was used as a molecular marker for both electrophoresis techniques and for the estimation of the molecular weight of protease.

2.9. Enzyme Assay

Protease activity was determined using azocasein as a substrate. The reaction was performed in 50 mM PBS solution at pH 7.5 with 50 µL of azocasein (30 mg/mL in water) and with 25 µL of the enzyme solution for a final volume of 750 µL. The reaction was incubated in the dark at 50 °C for 1 h and stopped by adding 125 µL of 20% (*w/v*) trichloroacetic acid. The blank assay was performed using 25 µL of culture medium or PBS buffer. After centrifugation at 15,000 × *g* for 10 min, the absorbance of the supernatant was measured at 366 nm using a Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader [40]. One unit of protease activity was defined as the amount required to produce enough acid-soluble material from azocasein to yield an absorbance of 0.01 at 366 nm, following 1 h of incubation.

Protein was quantified by the Bio-Rad protein assay kit (Hercules, CA, USA) [41] with BSA as the standard.

2.10. Effect of Temperature on Protease Activity and Stability

The optimum temperature was determined by measuring enzyme activity at 30–80 °C as described above. Enzyme stability was measured by incubating for 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, and 240 min at optimum temperature in 50 mM PBS buffer pH 7.5.

2.11. Effect of pH on Protease Activity

The effect of pH on the enzymatic assay was determined by measuring the enzymatic activity using substrate solutions with different pH (4–11; Na₂HPO₄-citric acid: 5.0–7.0; Tris-HCl: 8.0–9.0; and glycine-NaOH: 10.0–11.0) at optimum temperature.

2.12. Effect of Metal Ions on Protease Activity

The effect of various metal ions on enzyme activity was determined by incubating the enzyme with 2.5 mM metal ions (Mg²⁺, Li²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, and Ca²⁺). The protease activity without metal ions served as the control and was considered as 100% activity.

2.13. Effect of Solvents on Protease Activity

The effect of solvents ethanol, methanol, and acetone on protease activity was measured by incubating the enzyme with 1% (*v/v*) of the solvents. The protease activity without solvents served as the control, which was considered as 100% activity.

2.14. Effect of Detergents and Chemicals on Protease Activity

The effect of different concentrations of surfactants: SDS, Tween-20, Tween-80, Triton X-100, metal ion chelators ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol (DTT), protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pepstatin A, trypsin inhibitor and dimethyl sulfoxide (DMSO) were studied by incubating enzyme with 1% of chemical or 1 mM of EDTA, trypsin inhibitor, and pepstatin A. The protease activity without chemicals served as the control, which was considered as 100% activity.

2.15. Statistical Analysis

Three replicates of each sample were used for statistical analysis using STATISTICA 12 software [42]. Statistical analysis was conducted by Student's *t* test. A probability level of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Isolation and Characterization of Protease-Producing Strain OA30

Strain OA30 was isolated on a nutritive agar medium used for the isolation of aerobic heterotrophic bacteria, from water samples of an Algerian terrestrial hot spring with moderate temperature (54 °C), chloride–calcica water type [43], and neutral pH (7.0). Screening for extracellular protease activity on casein agar was positive. Large, clear zones appeared around the colonies indicating the production of an extracellular enzymatic activity against casein.

3.1.1. Phenotypic Characterization

Strain OA30 produced smooth, flat, spreading colonies, with yellowish color and no particular pigmentation on *Thermus* medium. Cells were rod-shaped, Gram-positive (Figure 1), and motile, with the presence of terminally-born ellipsoidal spores. The strain was aerobic, catalase, and oxidase

positive. It was able to use all the tested sugars as carbon sources, but was unable to ferment them and could not use citrate. ONPG, VP, and MR reactions were negative. The strain was unable to produce indole, but it could use urea and hydrolyze, in addition to casein, gelatin, and starch, but did not degrade pectin.

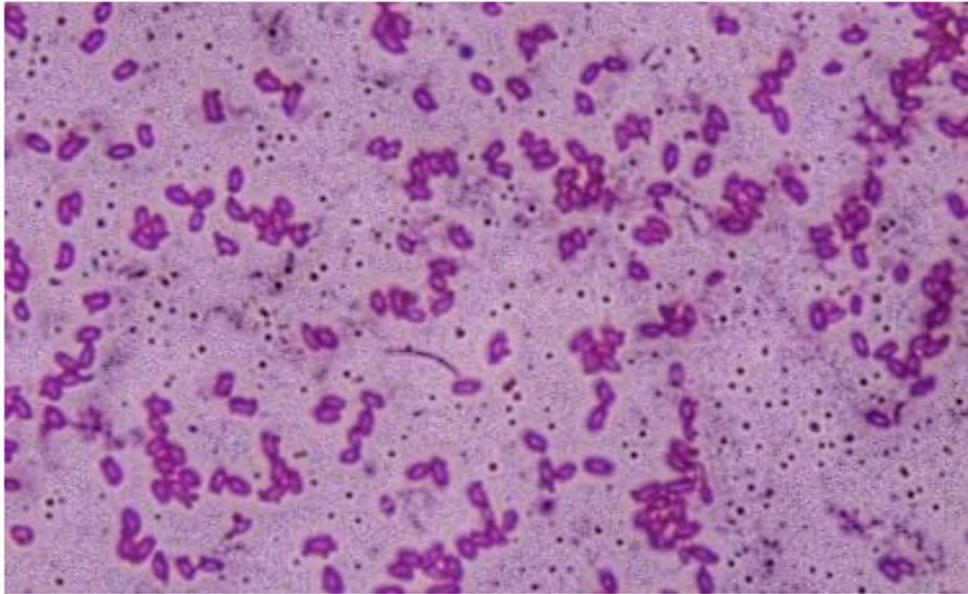


Figure 1. Cells of strain OA30 viewed by light microscopy (1000×) after Gram staining.

The growth of strain OA30 occurred at 30–70 °C, a pH range from 6.0 to 8.6, and was stopped by a 5% concentration of NaCl. Optimal growth on liquid medium was studied by measuring the absorbance of the cultures under variable physiological conditions and significantly occurred at 55 °C, pH 7.0, and at a concentration of NaCl of 1% (*w/v*) (Figure 2). These values were very close to those from the isolation site and were used as parameters to optimize the growth medium for protease production.

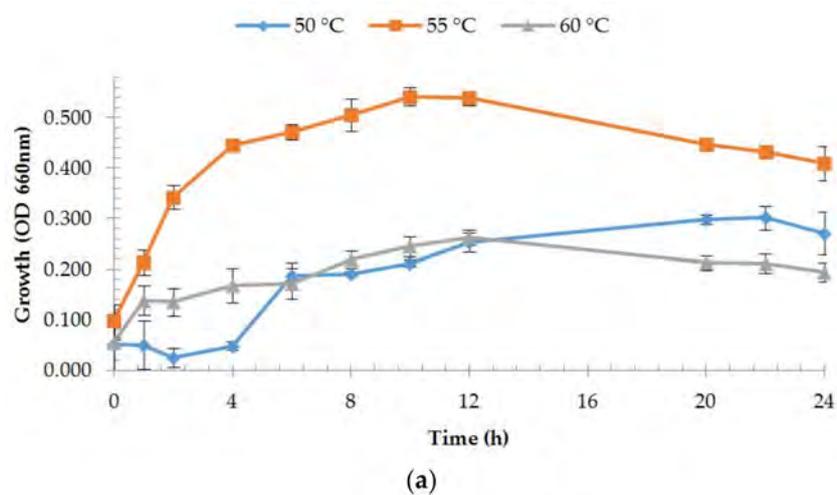


Figure 2. Cont.

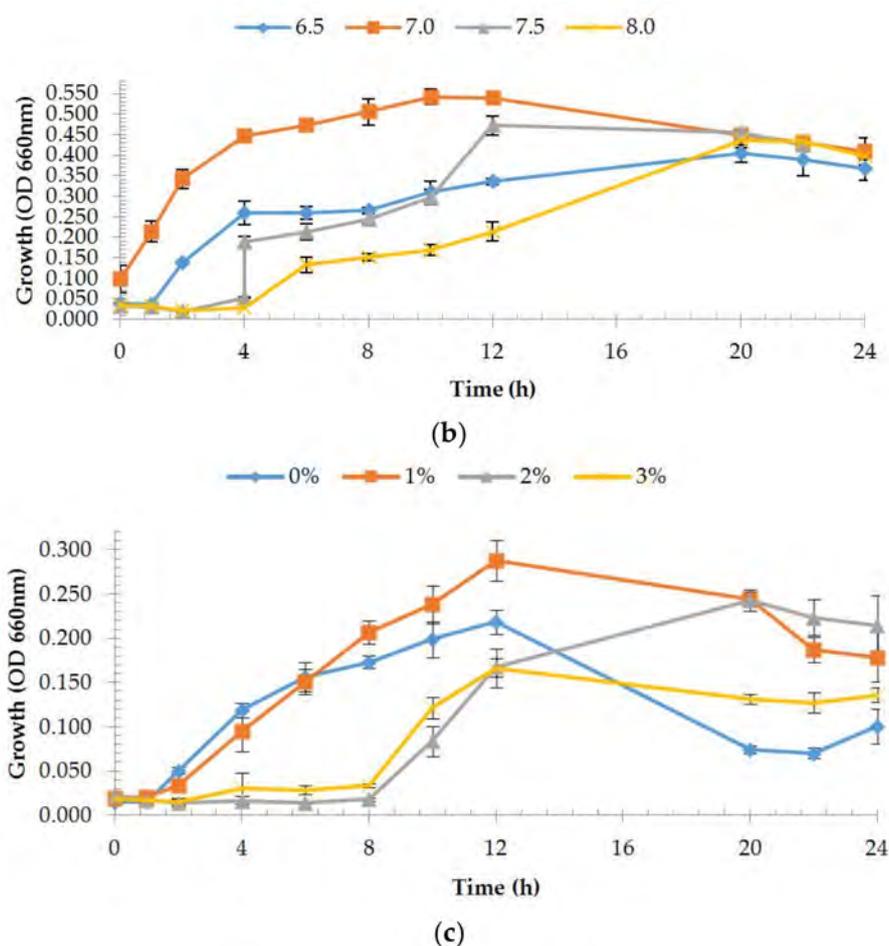


Figure 2. Growth of strain OA30 under different physiological conditions: (a) growth at different temperatures; (b) growth at different pH values; and (c) growth at different NaCl concentrations.

3.1.2. Genotypic Characterization

The 16S rRNA gene sequences of strain OA30 have been deposited in the NCBI database under accession number MF136824. Based on the 16S rRNA gene sequence similarity searches by the nBLAST tool against the EzBioCloud database, strain OA30 showed 92 to 99% sequence similarity to members of the genus *Brevibacillus*. A 16S rRNA gene-based phylogenetic tree of *Brevibacillus* sp. strain OA30 was constructed (Figure 3). The *Brevibacillus* sp. strain OA30 16S rRNA gene sequence exhibited high identity (99%) with type strain *Brevibacillus thermoruber*, strain DSM 7064^T (Z26921), the closest validly published *Brevibacillus* species.

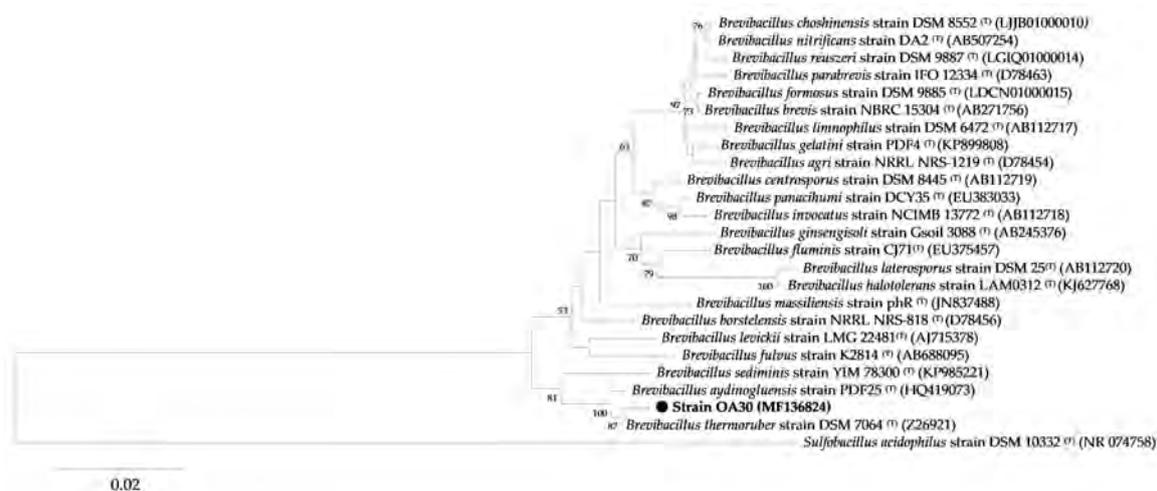


Figure 3. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between strain OA30 (1489 bp) and strains of the genus *Brevibacillus*. The strains and their corresponding Genbank accession numbers are shown following the organism name and indicated in parentheses. The phylogenetic tree was made using the neighbor-joining method with maximum composite likelihood model implemented in MEGA 7. The tree includes the 16S rRNA gene sequences of *Sulfolobillus acidophilus* DSM 10332^T as an outgroup. Bootstrap consensus trees were inferred from 1000 replicates, and only bootstrap values >50% are indicated. The scale bar represents 0.02 nucleotide changes per position. (●) indicates the isolate assessed in the current study, *Brevibacillus* sp. strain OA30.

3.2. Protease Purification

3.2.1. Enzyme Production and Medium Composition Effect

Extracellular protease production assay was performed on two different media, M1 (casein) and M2 (skim milk) (at 55 °C, pH 7.0, NaCl 1% *w/v*). Good enzyme activity and growth rates were obtained on M1, while growth on M2 was very low with no enzyme production, which appears to be unsuited for growth of strain OA30 (Figure 4). Extracellular protease activity appeared on M1 after 36 h of cultivation with the best, significantly higher value after 48 h. Purification was consequently performed on the crude enzyme solution collected from M1 (Table 2).

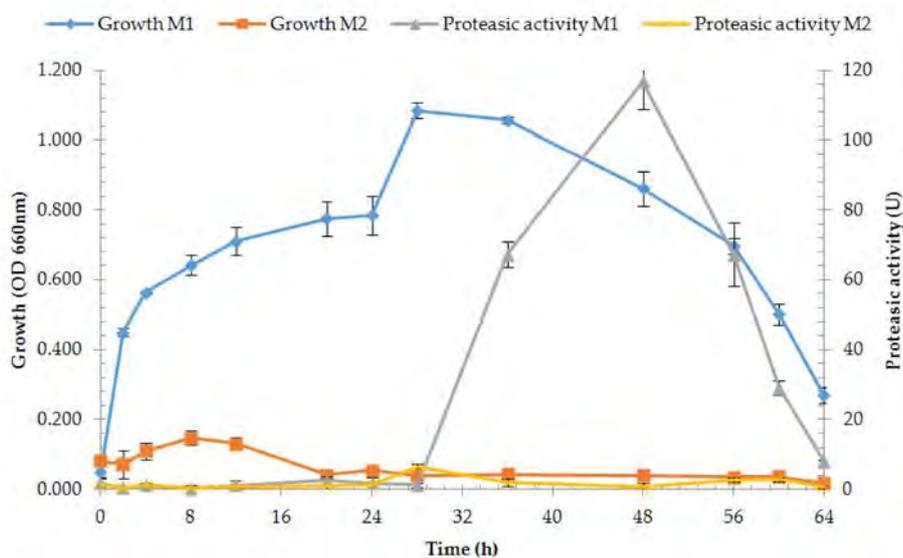


Figure 4. Protease activities and growth rates of strain OA30 on M1 and M2.

Table 2. Purification summary of protease 32-F38 from *Brevibacillus* sp. strain OA30.

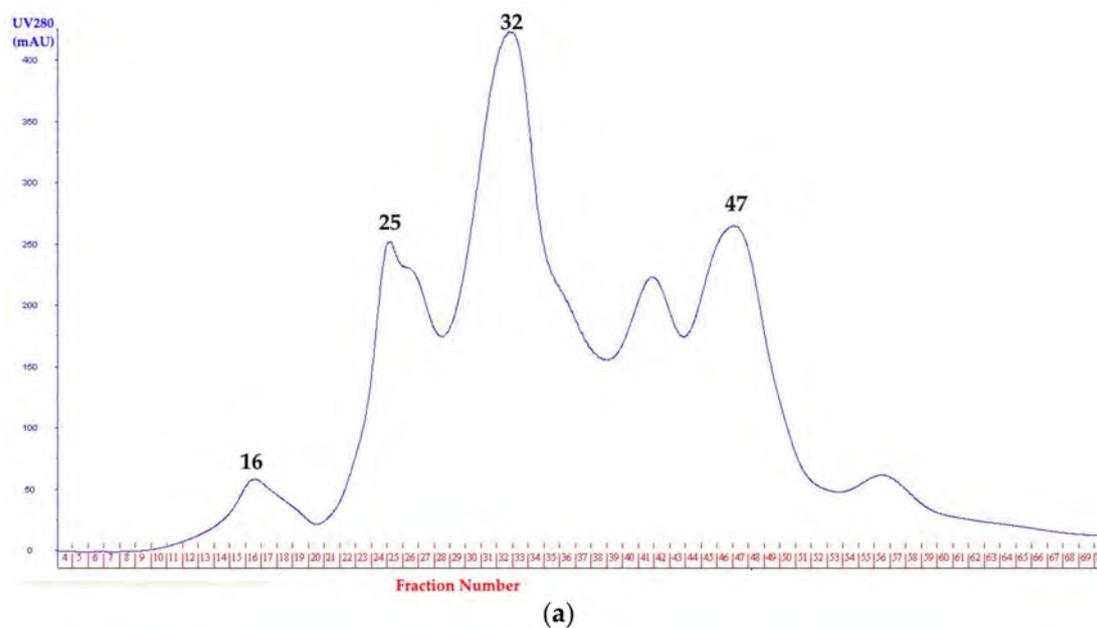
Purification Step	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (Fold)
Cell-free supernatant	131.78	147.2	1.12	100.00	1.00
80% ammonium sulfate	32.09	130.1	4.05	88.38	3.63
Dialysis	11.90	128.1	10.76	87.02	9.64
AE chromatography	2.54	30.0	11.79	20.38	10.56
Gel filtration	1.68	27.4	16.31	18.61	14.60

3.2.2. Protease Precipitation, Anion Exchange, and Gel Filtration Chromatography

Four fractions with protease activity were obtained after first purification with a HiTrap Q HP column. Fraction 32 had the highest enzyme activity (11.79 U/mg) (Figure 5a) and was selected for a second round of purification with the HiLoad 16/60 Superdex 200 prepgrade column, which gave two fractions with protease activity. Fraction 32-F38 had, significantly, the best activity (Figure 5b). This protease, named protease 32-F38, was examined for further characterization (Table 2). The presence of multiple extracellular proteases was reported for *Brevibacillus* strains isolated from similar environments. Thermophilic *Brevibacillus* species are well-known hydrolase producers [24,44].

3.3. Molecular Weight Determination and Zymography

Electrophoretic profiles of fraction 32-F38 were studied. Zymography revealed protease activity for the band corresponding to an estimated molecular weight of 64.4 kDa on the corresponding SDS-PAGE gel led in the same migration conditions for fraction 32-F38 after gel filtration chromatography (Figure 6). Monomeric proteases with molecular weights between 60 and 66 kDa from *Brevibacillus* sp. have been reported in literature [45–47].

**Figure 5.** Cont.

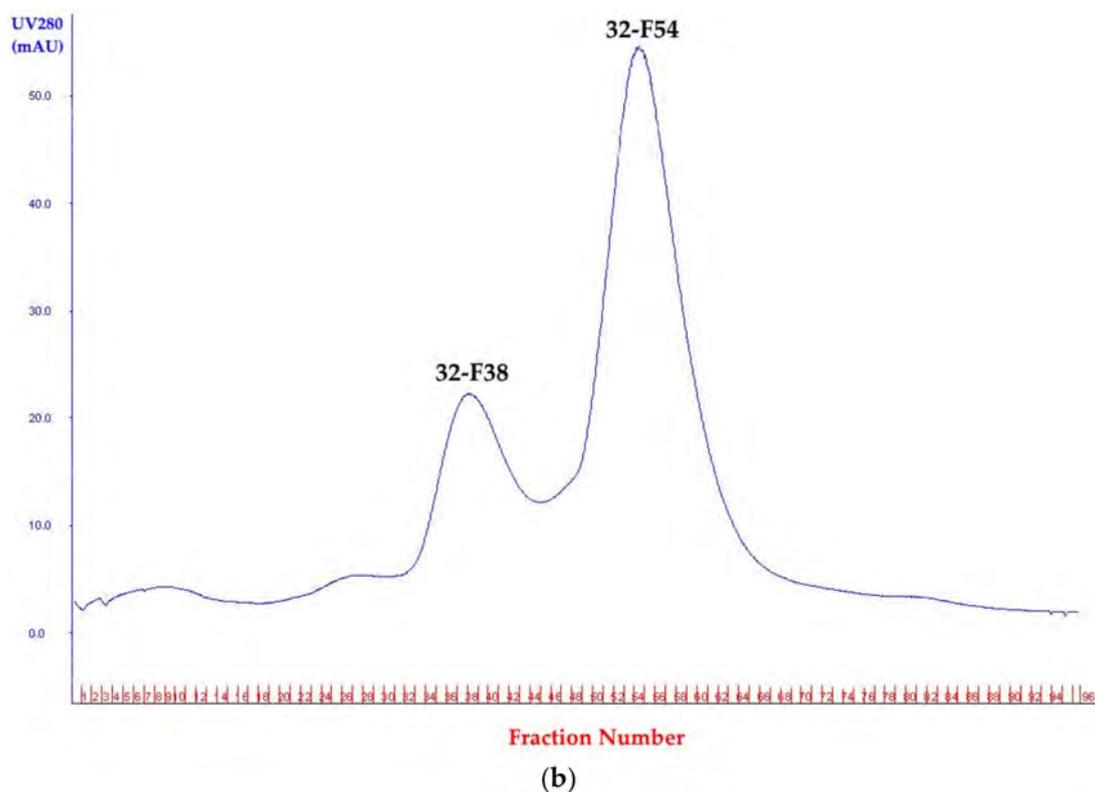


Figure 5. Purification of extracellular protease from the culture supernatant of strain OA30. (a) Anion-exchange chromatography on a HiTrap Q HP column of the dissolved precipitate from the culture supernatant. Protease activity was detected in fractions 16, 25, 32, and 47. Fraction 32 was selected for a second purification step; and (b) gel filtration chromatography on a HiLoad 16/60 Superdex 200 prepgrade column of fraction 32 containing the highest protease activity from anion-exchange chromatography. Protease activity was detected in peaks 32-F38 and 32-F54 and protease 32-F38 was selected for further investigation.

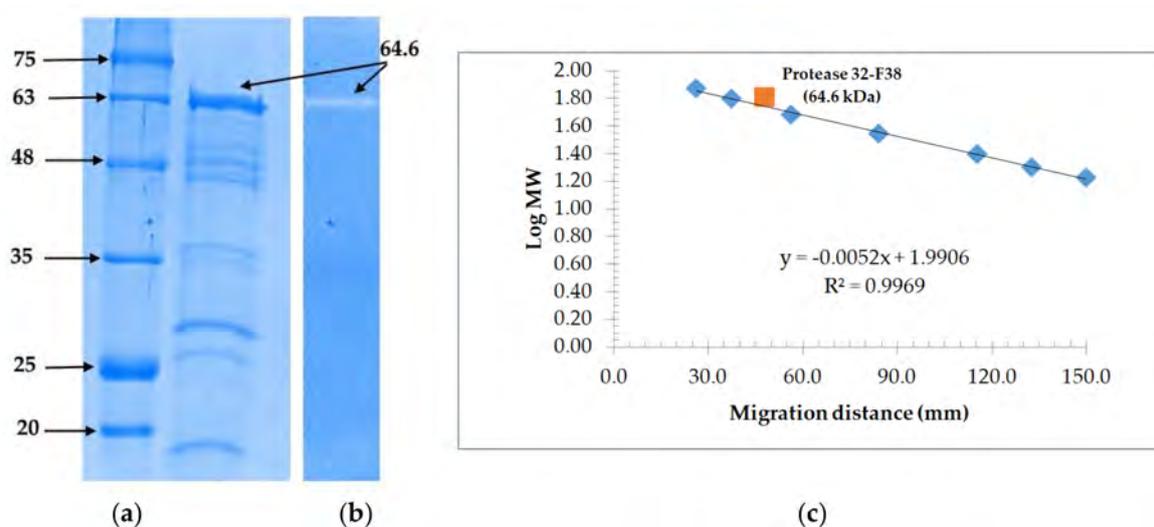


Figure 6. Electrophoresis analysis and purification of protease 32-F38 from strain OA30. (a) SDS-PAGE of the purified protease. Lane 1, protein markers (kDa). Lane 2, partially-purified protease 32-F38 obtained after gel filtration; (b) Zymogram activity staining of the purified protease; (c) Estimation of the molecular mass of protease 32-F38.

3.4. Biochemical Characterization

3.4.1. Effect of Temperature and Thermostability of the Enzyme

Relative activity of protease 32-F38 at different temperatures is shown in Figure 7. Protease activity was significantly higher at 50 °C, so this temperature was considered as the optimum temperature for the enzyme and was similar to the optimum growth temperature of strain OA30. Protease 32-F38 remained at least 80% active in the range between 40 °C and 55 °C. Thermostability tests at 50 °C revealed that the activity was the highest after 120 min of heating and relative activity lost only 16% of its value after 240 min (Figure 8). It is not uncommon that relative enzymatic activity increases after short-term heating in the case of thermoactive enzymes, as it happens with protease 32-F38 (Figure 8), and examples of other proteases can be cited [48,49].

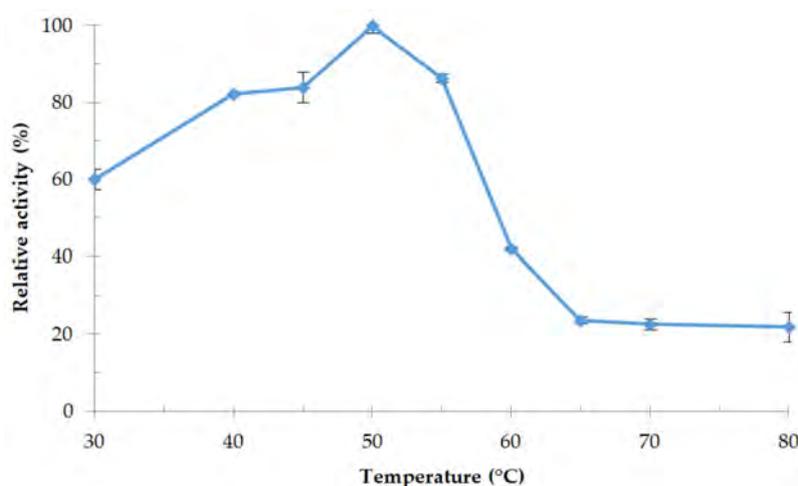


Figure 7. Optimum temperature of protease 32-F38 activity. Relative activity is expressed as a percentage of the maximum.

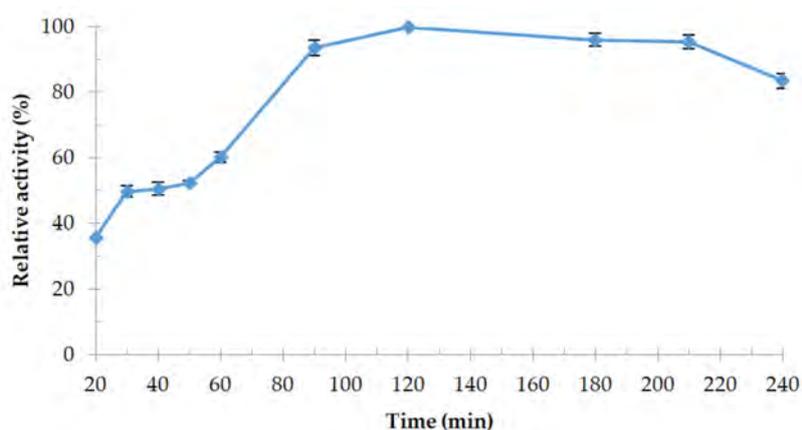


Figure 8. Thermostability of protease 32-F38 at optimum temperature (50 °C). Relative activity is expressed as a percentage of the maximum (activity after 120 min).

3.4.2. Effect of pH

The effect of pH buffers is illustrated in Figure 9. Protease 32-F38 was found to be an acid protease; optimum pH was 6.0 in Na₂HPO₄-citric acid buffer with a relative activity 55% and 58% higher than at pH 7.0 and pH 8.0 in Tris-HCl buffer, respectively. Weak activities were still observed at pH 5.0 and 11.0.

The majority of extracellular proteases reported in literature from *Brevibacillus* members were alkaline proteases with optimal pH around 8.0 [46,47,50,51], and acid proteases were rarely reported [45].

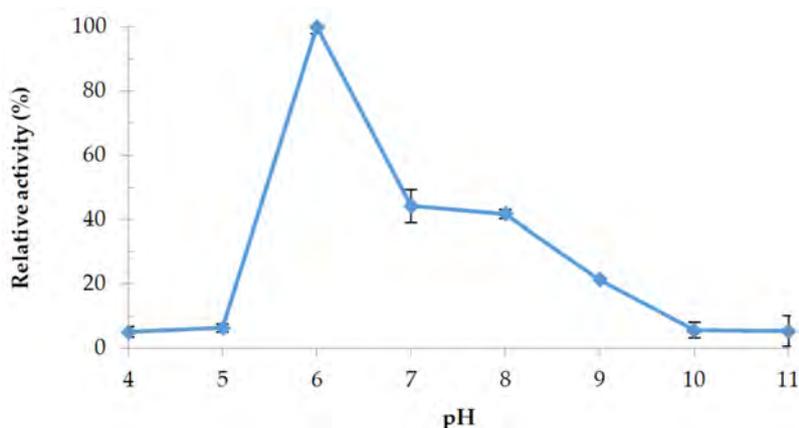


Figure 9. Effect of pH on protease 32-F38 activity. Relative activity is expressed as a percentage of the maximum.

3.4.3. Effect of Various Chemicals on Protease 32-F38 Activity

Relative activities of protease 32-F38 in the presence of different chemical agents are shown in Table 3. Ions of Mg^{2+} and Mn^{2+} showed a significant enhancing effect on the enzymatic activity with the best effect with magnesium ions, which was reported for other proteases from *Brevibacillus* spp. [50,51], and might have a protective effect against thermal denaturation of the enzyme [52]. Li^{2+} had no significant effect on protease 32-F38 while a slight inhibition was noted with calcium ions. Protease activity was completely inhibited by Zn^{2+} , Cu^{2+} , and Fe^{3+} . The same inhibitory effect of heavy metal ions was observed on a thermostable protease of several *Brevibacillus* species and is probably related to a reaction with the protein thiol groups (converting them to mercaptides), as well as with histidine and tryptophan residues. Metal ions are potent inhibitors of protein folding [46,47,51]. Protease 32-F38 activity was not affected by a 1% concentration of methanol, ethanol, or acetone. The addition of 1% SDS caused a four-fold increase in the enzyme activity, and SDS is known to denature protein substrates, such as casein, resulting in increased digestion rates. The remarkable resistance of protease 32-F38 toward SDS denaturation was also observed for other thermoactive proteases, like proteinase K and thermopain, and might be related to a modification of the protein structure due to a high number of tyrosine residues [53–55]. Enzyme activity was significantly enhanced by 1% of Tween-80 and Triton X-100 while the presence of Tween-20 was strongly inhibiting the enzyme activity. The presence of metalloprotease inhibitors EDTA and DTT inhibited the protease activity completely and 1% of DMSO reduced it by 12%. On the other hand, the inhibitor of aspartyl proteases, pepstatin A, and the inhibitors of serine proteases, trypsin inhibitor, and PMSF, increased the enzyme activity significantly. These results indicate that protease 32-F38 is most probably a metalloprotease [56,57].

Table 3. Effects of various metal ions, solvents, detergents, and other chemicals on protease from fraction 32-F38 stability.

Reagent	Concentration	Relative Activity ¹ (%)
Mg^{2+}	2.5 mM	143.24 ± 2.13
Li^{2+}	2.5 mM	100.29 ± 3.25
Fe^{3+}	2.5 mM	0.00 ± 0.00
Cu^{2+}	2.5 mM	7.35 ± 0.00
Zn^{2+}	2.5 mM	0.00 ± 0.00

Table 3. Cont.

Reagent	Concentration	Relative Activity ¹ (%)
Mn ²⁺	2.5 mM	113.24 ± 1.85
Ca ²⁺	2.5 mM	90.89 ± 3.45
Ethanol	1%	96.46 ± 2.06
Methanol	1%	106.19 ± 2.47
Acetone	1%	103.54 ± 3.06
SDS	1%	438.35 ± 3.56
Tween-20	1%	27.73 ± 2.95
Tween-80	1%	144.54 ± 4.25
Triton X-100	1%	144.25 ± 3.12
EDTA	1.0 mM	0.88 ± 0.26
DTT	1%	0.36 ± 0.02
PMSF	1%	193.59 ± 3.15
Pepstatin A	1.0 mM	111.39 ± 3.23
Trypsin inhibitor	1.0 mM	186.48 ± 2.23
DMSO	1%	87.90 ± 3.56

¹ The activity is expressed as a percentage of the activity level in the absence of reagent.

4. Conclusions

Geothermal sites are an important source of valuable molecules and only a few studies were interested in the biotechnological potential of thermophilic microorganisms isolated from Algerian hot springs. *Brevibacillus* sp. strain OA30 studied in this work showed multiple extracellular protease activities that should be investigated more closely with biochemical and genomic methods.

The characterization of the purified protease 32-F38 revealed interesting abilities of the enzyme in acid conditions and in the presence of solvents and detergents with a high stability at 50 °C. Protease 32-F38 seems to be related to other metalloproteases, such as thermolysin (EC 3.4.24.27) and bacillolysin (EC 3.4.24.28) produced by several strains of the aerobic thermophilic genera *Bacillus*, *Geobacillus* and *Brevibacillus*. Thermolysin-like proteases have potential applications in the degradation of gelatin, keratin, and other raw materials, like wheat bran and fish scales in biotechnological applications [19]. They can also act as peptide and ester synthetases and can be used for peptide synthesis and the production of a precursor of the artificial sweetener aspartame [58], and have been used for the hydrolysis of plant cell walls in order to assist in aqueous extraction processes [59]. Proteases with similar characteristics and molecular weight also showed anti-biofilm activity against pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhi* [49] and are potential candidates for the production of bioactive peptides from casein [60]. Our initial promising results contribute towards the application of protease 32-F38 in industrial and analytical processes.

Acknowledgments: We wish to acknowledge the following organizations for providing financial support for this study: the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, and the Genomics Research Institute (University of Pretoria, South Africa). The laboratory of the group EXPRELA (Universidade da Coruña, Spain) during 2017 was funded by European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement number 324439 and by the Xunta de Galicia (Consolidación Grupos Referencia Competitiva contract number ED431C2016-012), co-financed by FEDER (EEC). We want to extend special acknowledgement to Thulani P. Makhalanyane from the Centre for Microbial Ecology and Genomics (CMEG, Department of Genetics, University of Pretoria), who provided assistance in the genotypic characterization of the strain.

Author Contributions: M.A.G. isolated the strain, designed and performed this work during a research stay at the laboratory of the group EXPRELA, and led the drafting of the manuscript. A.R.-D. assisted with protease production and purification and helped with the draft. J.-J.E.-R. helped with the enzyme assay and assisted with the manuscript. T.E.M.K. helped with isolation and the manuscript draft. M.-I.G.-S. and K.K. conceived the study and provided support in drafting the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Contesini, F.J.; Melo, R.R.D.; Sato, H.H. An overview of *Bacillus* proteases: From production to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.; Thomas, P.D.; Huang, X.; Bateman, A.; Finn, R.D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D624–D632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Souza, P.M.D.; Bittencourt, M.L.D.A.; Caprara, C.C.; Freitas, M.D.; Almeida, R.P.C.D.; Silveira, D.; Fonseca, Y.M.; Ferreira Filho, E.X.; Pessoa Junior, A.; Magalhães, P.O. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 337–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chitte, R.; Chaphalkar, S. The World of Proteases Across Microbes, Insects, and Medicinal Trees. In *Proteases in Physiology and Pathology*; Springer: New York, NY, USA, 2017; pp. 517–526.
5. Tavano, O.L.; Berenguer-Murcia, A.; Secundo, F.; Fernandez-Lafuente, R. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**. [[CrossRef](#)]
6. Kumar, K.; Arumugam, N.; Permaul, K.; Singh, S. Thermostable enzymes and their industrial applications. *Microb. Biotechnol. Interdiscip. Approach* **2016**, 115–162. [[CrossRef](#)]
7. Liu, X.; Kokare, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*; Elsevier: New York, NY, USA, 2017; pp. 267–298. [[CrossRef](#)]
8. Feijoo-Siota, L.; Blasco, L.; Rodriguez-Rama, J.; Barros-Velazquez, J.; Miguel, T.; Sanchez-Perez, A.; Villa, T. Recent Patents on Microbial Proteases for the Dairy Industry. *Recent Adv. DNA Gene Seq.* **2014**, *8*, 44–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Sawant, R.; Nagendran, S. Protease: An enzyme with multiple industrial applications. *World J. Pharm. Sci.* **2014**, *3*, 568–579.
10. Haki, G.; Rakshit, S. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresour. Technol.* **2003**, *89*, 17–34. [[CrossRef](#)]
11. Mishra, S.S.; Ray, R.C.; Rosell, C.M.; Panda, D. Microbial Enzymes in Food Applications. *Microb. Enzyme Technol. Food Appl.* **2017**, *1*. [[CrossRef](#)]
12. Hussein, A.H.; Lisowska, B.K.; Leak, D.J. The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. In *Advances in Applied Microbiology*; Elsevier: New York, NY, USA, 2015; Volume 92, pp. 1–48.
13. Elleuche, S.; Schäfers, C.; Blank, S.; Schröder, C.; Antranikian, G. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2015**, *25*, 113–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Vos, P.D.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W.B. “Paenibacillaceae” fam. nov. In *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2015.
15. Manachini, P.; Fortina, M.; Parini, C.; Craveri, R. *Bacillus thermoruber* sp. nov., nom. rev., a red-pigmented thermophilic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1985**, *35*, 493–496. [[CrossRef](#)]
16. Allan, R.; Lebbe, L.; Heyrman, J.; De Vos, P.; Buchanan, C.; Logan, N.A. *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1039–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sanders, M.; Morelli, L.; Tompkins, T. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, *2*, 101–110. [[CrossRef](#)]
18. Singh, P.K.; Sharma, V.; Patil, P.B.; Korpole, S. Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Panda, A.K.; Bisht, S.S.; DeMondal, S.; Kumar, N.S.; Gurusubramanian, G.; Panigrahi, A.K. *Brevibacillus* as a biological tool: A short review. *Antonie Leeuwenhoek* **2014**, *105*, 623–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Yildiz, S.Y.; Radchenkova, N.; Arga, K.Y.; Kambourova, M.; Oner, E.T. Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 2277–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Atlas, R.M. *Handbook of Media for Environmental Microbiology*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.
22. Atlas, R.M. *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006.
23. Logan, N.A.; Berge, O.; Bishop, A.H.; Busse, H.-J.; De Vos, P.; Fritze, D.; Heyndrickx, M.; Kämpfer, P.; Rabinovitch, L.; Salkinoja-Salonen, M.S. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 2114–2121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Logan, N.A.; Vos, P.D. *Brevibacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2015.
25. Bartholomew, J.W.; Mittwer, T. A simplified bacterial spore stain. *Stain Technol.* **1950**, *25*, 153–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Frazier, W.C. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Infect. Dis.* **1926**. [[CrossRef](#)]
27. Soares, M.M.; Silva, R.d.; Gomes, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: Characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Rev. Microbiol.* **1999**, *30*, 299–303. [[CrossRef](#)]
28. Gordon, R.E.; Haynes, W.; Pang, C.H.-N.; Smith, N. The genus *Bacillus*. In *US Department of Agriculture Handbook*; Agricultural Research Service: Washington, DC, USA, 1973; pp. 109–126.
29. Harley, J.P. *Laboratory Exercises in Microbiology*; McGraw-Hill Science, Engineering & Mathematics: New York, NY, USA, 2004.
30. Miller, D.; Bryant, J.; Madsen, E.; Ghiorse, W. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4715–4724. [[PubMed](#)]
31. Farrelly, V.; Rainey, F.A.; Stackebrandt, E. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 2798–2801. [[PubMed](#)]
32. Reysenbach, A.; Pace, N. Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction. In *Archaea: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 1995; pp. 101–107.
33. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**. [[CrossRef](#)]
34. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680.
35. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[PubMed](#)]
36. Tamura, K.; Nei, M.; Kumar, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11030–11035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **1985**, *39*, 783–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Guendouze, A.; Plener, L.; Bzdrenga, J.; Jacquet, P.; Rémy, B.; Elias, M.; Lavigne, J.-P.; Daudé, D.; Chabrière, E. Effect of Quorum Quenching Lactonase in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Comparison with Quorum Sensing Inhibitors. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
42. StatSoft Inc. *Statistica*, version 12; Data Analysis Software System; StatSoft Inc.: Tulsa, OK, USA, 2013.
43. Bahri, F.; Saibi, H. Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arab. J. Geosci.* **2011**, *4*, 207–219. [[CrossRef](#)]
44. Sinsuwan, S.; Raksakulthai, N.; Rodtong, S.; Yongsawatdigul, J. Production and characterization of proteinases from *Brevibacillus* sp. isolated from fish sauce fermentation. *J. Food Sci.* **2006**. [[CrossRef](#)]
45. Seswita Zilda, D.; Harmayani, E.N.I.; Widada, J.; Asmara, W.; Irianto, E.K.O.; Patantis, G.; Nuri Fawzya, Y. Optimization of Culture Conditions to Produce Thermostable Keratinolytic Protease of *Brevibacillus thermoruber* LII, Isolated from the Padang Cermin Hot Spring, Lampung, Indonesia. *Microbiol. Indones.* **2012**, *6*, 194–200. [[CrossRef](#)]
46. Wang, S.; Lin, X.; Huang, X.; Zheng, L.; Zilda, D.S. Screening and characterization of the alkaline protease isolated from PLI-1, a strain of *Brevibacillus* sp. collected from Indonesias hot springs. *J. Ocean. Univ. China* **2012**, *11*, 213–218. [[CrossRef](#)]

47. Zilda, D.Z.; Harmayani, E.; Widada, J.; Asmara, W.; Irianto, H.E.; Patantis, G.; Fawzya, Y.N. Purification and characterization of the newly thermostable protease produced by *Brevibacillus thermoruber* LII isolated From Padang Cermin Hotspring, Indonesia. *Squalen Bull. Mar. Fish. Postharvest Biotechnol.* **2014**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)]
48. Kanekar, P.; Nilegaonkar, S.; Sarnaik, S.; Kelkar, A. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. *Bioresour. Technol.* **2002**, *85*, 87–93. [[CrossRef](#)]
49. Esakkiraj, P.; Meleppat, B.; Lakra, A.K.; Ayyanna, R.; Arul, V. Cloning, expression, characterization and application of protease produced by *Bacillus cereus* PMW8. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 38611–38616. [[CrossRef](#)]
50. Jaouadi, N.Z.; Rekik, H.; Badis, A.; Trabelsi, S.; Belhouli, M.; Yahiaoui, A.B.; Aicha, H.B.; Toumi, A.; Bejar, S.; Jaouadi, B. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nascimento, W.C.A.D.; Martins, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.* **2004**, *35*, 91–96. [[CrossRef](#)]
52. Kumar, C.G.; Takagi, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* **1999**, *17*, 561–594. [[CrossRef](#)]
53. Liu, Y.; Guo, R. Interaction between casein and sodium dodecyl sulfate. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *315*, 685–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lin, X.; Fusek, M.; Tang, J. Thermolysin, a thermostable acid protease from *Sulfolobus acidocaldarius*. In *Structure and Function of the Aspartic Proteinases*; Springer: New York, NY, USA, 1991; pp. 255–257.
55. Bajorath, J.; Hinrichs, W.; Saenger, W. The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *FEBS J.* **1988**, *176*, 441–447. [[CrossRef](#)]
56. Salleh, A.B.; Rahman, N.Z.R.A.; Basri, M. *New Lipases and Proteases*; Nova Publishers: Hauppauge, NY, USA, 2006.
57. Rawlings, N.D. Protease families, evolution and mechanism of action. In *Proteases: Structure and Function*; Springer: New York, NY, USA, 2013; pp. 1–36.
58. Van den Burg, B.; Eijssink, V. Thermolysin and related *Bacillus* metallopeptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed.; Elsevier: New York, NY, USA, 2013; pp. 540–553.
59. Casas, M.P.; González, H.D. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction Processes. In *Water Extraction of Bioactive Compounds*; Elsevier: New York, NY, USA, 2018; pp. 333–368.
60. Guinane, C.M.; Kent, R.M.; Norberg, S.; O'Connor, P.M.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C.; Ross, R.P. Generation of the antimicrobial peptide caseicin A from casein by hydrolysis with thermolysin enzymes. *Int. Dairy J.* **2015**, *49*, 1–7. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

SHORT GENOME REPORT

Open Access



Draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 isolated from a Sebkhha in Thamelah, Algeria

Oliver K. I. Bezuidt^{1,2}, Mohamed A. Gomri³, Rian Pierneef⁴, Marc W. Van Goethem¹, Karima Kharroub³, Don A. Cowan¹ and Thulani P. Makhalanyane^{1*}

Abstract

The members of the genus *Thermoactinomyces* are known for their protein degradative capacities. *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 is a Gram-positive filamentous bacterium, isolated from moderately saline water in the Thamelah region of Algeria. This isolate is a thermophilic aerobic bacterium with the capacity to produce extracellular proteolytic enzymes. This strain exhibits up to 99 % similarity with members of the genus *Thermoactinomyces*, based on 16S rRNA gene sequence similarity. Here we report on the phenotypic features of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 together with the draft genome sequence and its annotation. The genome of this strain is 2,558,690 bp in length (one chromosome, but no plasmid) with an average G + C content of 47.95 %, and contains 2550 protein-coding and 60 RNA genes together with 64 ORFs annotated as proteases.

Keywords: *Thermoactinomyces* sp. strain AS95, Genome, Thermophilic, Proteolytic activity, Taxonomo-genomics

Introduction

Modern metagenomic approaches have provided insights on the evolution and functional capacity of microbial communities resistant to classical culture-based methods [1]. However, these classical techniques remain crucial for understanding the molecular adaptations of microbial guilds, especially those with potential biotechnological applications [2, 3]. Consequently, efforts to isolate novel taxa, particularly from environmentally extreme habitats remain widespread [4, 5].

The genus *Thermoactinomyces* is a member of the family *Thermoactinomycetaceae*. The first known representative from this genus (*Thermoactinomyces vulgaris*) was isolated from decaying straw and manure [6]. Since then, a number of isolates, from a wide array of extreme habitats [7–10] have been validly described. Currently, this genus comprises ten validly published species, and a few of these are; *Thermoactinomyces vulgaris* [6], *Thermoactinomyces intermedius* [11], *Thermoactinomyces daqus* [7]

and *Thermoactinomyces guangxiensis* [8]. These species are all Gram-positive, aerobic, non-acid-fast, chemoorganotrophic, filamentous and thermophilic bacteria.

Here, we report the draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95, which was isolated from a sebkhha (endorheic salt pan) in the Thamelah region of Algeria. We present a summary of the classification and set of phenotypic features for *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 together with the description of the non-contiguous genome sequence and its annotation with particular reference to ORFs encoding proteolytic enzymes.

Organism information

Classification and features

Thermoactinomyces strain AS95 was isolated from a sebkhha water sample collected in June 2013 from the Thamelah region of Algeria (Table 1). This isolate is a Gram-positive, aerobic, thermophilic, filamentous bacterium (Fig. 1) belonging to the order *Bacillales*. Based on the 16S rRNA gene sequence similarity searches by BLASTN against the NCBI-NT database, strain AS95 showed 97–99 % sequence similarity to members of the genus *Thermoactinomyces*. A 16S rRNA gene-based

* Correspondence: Thulani.makhalanyane@up.ac.za

¹Centre for Microbial Ecology and Genomics, Department of Genetics, University of Pretoria, Natural Sciences 2 Building, Office 3-14, Lynnwood Road, Pretoria 0028, South Africa

Full list of author information is available at the end of the article

Table 1 Classification and general features of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95

MIGS ID	Property	Term	Evidence code ^a	
	Classification	Domain: <i>Bacteria</i>	TAS [20]	
		Phylum: <i>Firmicutes</i>	TAS [21–23]	
		Class: <i>Bacilli</i>	TAS [24, 25]	
		Order: <i>Bacillales</i>	TAS [26, 27]	
		Family: <i>Thermoactinomycetaceae</i>	TAS [25, 28]	
		Genus: <i>Thermoactinomyces</i>	TAS [6]	
		Species: <i>Thermoactinomyces</i> sp.	IDA	
		Strain: AS95	IDA	
		Gram stain	Positive	IDA
		Cell shape	Filamentous	IDA
	Motility	Non-motile	IDA	
	Sporulation	Endospores on unbranched sporophores	IDA	
	Temperature range	40–65 °C (Thermophilic)	IDA	
	Optimum temperature	55 °C	IDA	
	pH range; Optimum	5.6–8.6; 7.2	IDA	
	Carbon source	Peptides	IDA	
GS-6	Habitat	Saline water	IDA	
MIGS-6.3	Salinity	5.0 % total salt (w/v)	IDA	
MIGS-22	Oxygen requirement	Aerobic	IDA	
MIGS-15	Biotic relationship	Free-living	IDA	
MIGS-14	Pathogenicity	Non-pathogen	IDA	
MIGS-4	Geographic location	Thamelah, Algeria	IDA	
MIGS-5	Sample collection time	20 June 2013	IDA	
MIGS-4.1	Latitude	36°32'18.29"N	IDA	
MIGS-4.2	Longitude	5°11'48.89"E	IDA	
MIGS-4.4	Altitude	890 m above sea level	IDA	

^aEvidence codes – IDA: Inferred from Direct Assay; TAS: Traceable Author Statement (i.e. a direct report exists in the literature). These evidence codes are from the Gene Ontology Project [29]. If the evidence is IDA, then the property was directly observed for a live isolate by one of the authors or an expert mentioned in the acknowledgements

phylogenetic tree of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 was constructed (Fig. 2), based on neighbor-joining and maximum composite likelihood models with 1000 bootstrap replications using MEGA 7 [12]. The *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 (KU942442) 16S rRNA gene sequence exhibited high identity (99 %) with

Thermoactinomyces vulgaris RVH210302 (AY114167), the closest validly published *Thermoactinomyces* species.

The strain was cultivated on *Thermus* medium agar containing 2.0 g NaCl, 4.0 g yeast extract, 8.0 g peptone and 30.0 g agar per liter of distilled water. The bacterium grew optimally at 55 °C, with a broad temperature growth

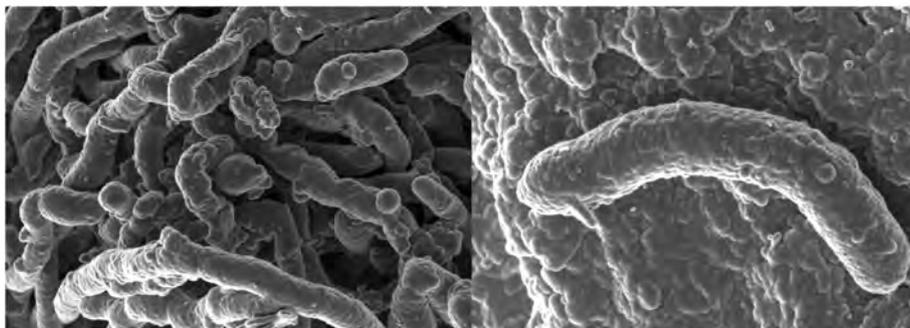
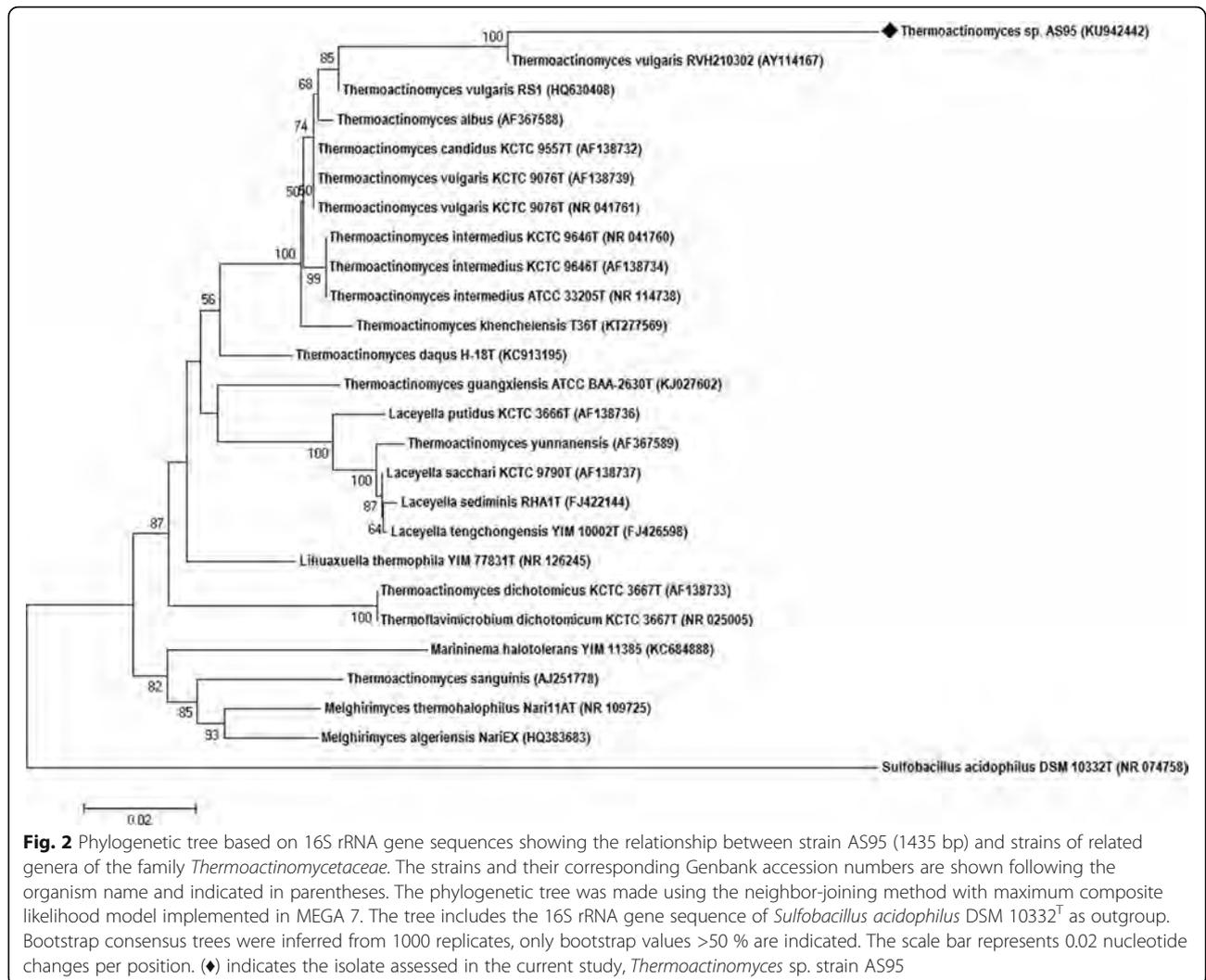


Fig. 1 Scanning electron microscopy of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 using a Cryo-SEM (JEOL)



range of between 40 and 65 °C (Table 1). The strain grew in liquid media at pH values from 5.6 to 8.6, but optimal growth occurred at a pH of 7.2. Morphologically, the isolate forms white colonies and abundant aerial mycelia with the appearance of well-developed, branched and septate substrate mycelia. The micromorphology of the cells was examined using scanning electron microscopy (Fig. 1). The predominant menaquinone was MK-7. Major fatty acids included iso-C15:0, and significant amounts of iso-C17:0 were also present.

Genome sequencing information

Genome project history

A high-quality draft genome sequence is deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession LSVF00000000 and consists of 11 scaffolds of 11 contigs. A summary of the project information and its association with MIGS version 2.0 compliance are shown in Table 2 [13].

Table 2 Project information

MIGS ID	Property	Term
MIGS-31	Finishing quality	High-quality draft
MIGS-28	Libraries used	One paired-end 300 bp library
MIGS-29	Sequencing platforms	MiSeq-Illumina
MIGS-31.2	Fold coverage	40.0x
MIGS-30	Assemblers	SPAdes 3.5.0
MIGS-32	Gene calling method	NCBI Prokaryotic Genome, Annotation Pipeline
	Genbank ID	LSVF00000000
	Genbank Date of Release	April 04, 2016
	BIOPROJECT	PRJNA312744
	GOLD ID	Gs0118400
MIGS-13	Project relevance	Biotechnological, Environmental

Growth conditions and genomic DNA preparation

Thermoactinomyces sp. strain AS95 was grown aerobically on *Thermus* medium agar (pH 7.2) at 55 °C for 24 h. Genomic DNA was extracted using a modification of a previously described protocol [14]. The quantity and quality of the genomic DNA was measured using a NanoDrop Spectrophotometer and a Qubit™ Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Genome sequencing and assembly

Genomic DNA samples of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 were sequenced at MR DNA (Shallowater, TX, USA). Genome sequencing was performed on a MiSeq (Illumina, Inc.) generating 2 x 300 bp paired-end libraries. The sequencing run produced a total of 5,085,250 reads, with a mean length of 265.58 bp. The raw paired-end sequences were subjected to the fastxtools software [15] for quality trimming using a phred quality score ≥ 20. After trimming, a total of 3,013,639 reads with a mean length of 171.11 bp were assembled using SPAdes, version 3.5.0 [16]. The final assembly resulted in a total of 11 scaffolds, which generated a genome size of 2.56 Mb.

Genome annotation

Genome annotation was carried out on the RAST server [17] and using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline tools [18]. This Whole Genome Shotgun sequence project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under accession LSVF00000000. The version described in this paper is version LSVF00000000.

Table 3 Genome statistics of the *Thermoactinomyces* sp. strain AS95

Attribute	Value	% of total ^a
Genome size (bp)	2,558,690	100.00
DNA coding region (bp)	2,214,681	86.56
DNA G + C (bp)	1,226,817	47.95
DNA scaffolds	11	
Total genes	2,649	100.00
Protein coding genes	2,550	96.26
RNA genes	60	2.26
Pseudo genes	39	1.47
Genes in internal clusters	ND	ND
Genes with function prediction	1,296	50.82
Genes with Pfam domains	2,001	78.47
Genes assigned to COGs	1,924	75.45
Genes with signal peptides	164	6.43
Genes with transmembrane helices	655	25.69
CRISPR repeats	2	ND

^aThe total is based on either the size of the genome in base pairs or the total number of protein coding genes in the annotated genome. ND: Not determined

Genome properties

The genome is composed of 2,558,690 nucleotides with 47.95 % G + C content (Table 3) and comprised 11 scaffolds of 11 contigs. The genome contains a total of 2649 genes, 2550 of which were protein coding, 39 pseudo-genes and 60 RNA coding genes. The majority of protein-coding genes (75.45 %) were assigned a putative function while the remaining genes were annotated as hypothetical. The distribution of genes in COGs functional categories is presented in Table 4.

A blastp comparison was conducted against the MEROPS database. A total of 64 protein-coding genes (2.4 %) were predicted to share homology with various categories of proteases (Table 5). Of these predictions indicated that 36 were putatively secreted in a classical pathway (SignalP), whereas the other 28 were secreted in a non-classical pathway (SecretomeP). Only 2 of the 64 protein-coding genes share sequence similarities with

Table 4 Number of genes associated with general COG functional categories

Code	Value	% of total ^a	Description
J	154	9.96	Translation, ribosomal structure and biogenesis
A	0	0.00	RNA processing and modification
K	145	5.68	Transcription
L	100	3.92	Replication, recombination and repair
B	0	0.00	Chromatin structure and dynamics
D	27	1.05	Cell cycle control, mitosis and meiosis
V	32	1.25	Defense mechanisms
T	71	2.78	Signal transduction mechanisms
M	99	3.88	Cell wall/membrane biogenesis
N	8	0.31	Cell motility
Z	0	0.03	Cytoskeleton
U	33	1.29	Intracellular trafficking and secretion
O	85	3.33	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
C	135	5.29	Energy production and conversion
G	122	4.78	Carbohydrate transport and metabolism
E	213	8.35	Amino acid transport and metabolism
F	70	2.74	Nucleotide transport and metabolism
H	108	4.23	Coenzyme transport and metabolism
I	109	4.27	Lipid transport and metabolism
P	101	3.96	Inorganic ion transport and metabolism
Q	53	2.07	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	249	9.76	General function prediction only
S	196	7.68	Function unknown
-	626	24.54	Not in COGs

^aThe total is based on the total number of protein coding genes in the annotated genome

Table 5 The four major types of proteases predicted in *Thermoactinomyces* sp. strain AS95

Type	Classical (SignalP)	Non-classical (SecretomeP)
Cysteine	6	3
Metallo	18	12
Serine	11	10
Threonine	0	2

proteases of the *Thermoactinomyces vulgaris* and sp. E79 families of peptidases in the MEROPS database.

Conclusions

This study describes the draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95, which is associated with a high level of extracellular proteolytic activities. To date, only a few metabolic pathways involved in protein degradation have been characterized for the genus *Thermoactinomyces* [19]. The genome sequence and characteristics of strain AS95 will provide new insights into the mechanisms of protein degradation in the genus *Thermoactinomyces*, and towards establishing a comprehensive genomic catalog of the metabolic diversity of the genus *Thermoactinomyces*.

Acknowledgements

We wish to acknowledge the following organizations for providing financial support for this project: The Genomics Research Institute and the University of Pretoria (OKIB, DAC, TPM), the National Research Foundation (MWVG, DAC, TPM). The Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research is also acknowledged for funding (MAG and KK).

Authors' contributions

OKIB performed the analysis, and led the drafting of the manuscript. MAG isolated the strain and conducted confirmatory analysis using 16S rRNA gene sequencing. RP performed the assembly and annotation. MWVG performed the SEM and helped draft the manuscript. KK supervised the isolation of the strain. DAC provided support in drafting the manuscript. TPM conceived the study and provided support in drafting the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Centre for Microbial Ecology and Genomics, Department of Genetics, University of Pretoria, Natural Sciences 2 Building, Office 3-14, Lynnwood Road, Pretoria 0028, South Africa. ²Biotechnology Platform, Agricultural Research Council, Pretoria, South Africa. ³Equipe Métabolites des Extrémophiles, Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Constantine, Algérie. ⁴Centre for Bioinformatics and Computational Biology, Department of Biochemistry, University of Pretoria, Pretoria 0028, South Africa.

Received: 10 May 2016 Accepted: 27 August 2016

Published online: 09 September 2016

References

- Cowan DA, Ramond J-B, Makhalyane TP, De Maayer P. Metagenomics of extreme environments. *Curr Opin Microbiol.* 2015;25:97–102.
- Taylor MP, Eley KL, Martin S, Tuffin MI, Burton SG, Cowan DA. Thermophilic ethanologeneses: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends Biotechnol.* 2009;27(7):398–405.
- Hahn MW, Lünsdorf H, Wu Q, Schauer M, Höfle MG, Boenigk J, Stadler P. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(3):1442–51.
- Harrison JP, Gheeraert N, Tsigelnitskiy D, Cockell CS. The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiol.* 2013;21(4):204–12.
- Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S, Das S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(2):561–71.
- Tsilinsky P. On the thermophilic moulds. *Ann Inst Pasteur.* 1899;13:500–5.
- Yao S, Liu Y, Zhang M, Zhang X, Li H, Zhao T, Xin C, Xu L, Zhang B, Cheng C. *Thermoactinomyces daqus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from high-temperature Daqu. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(1):206–10.
- Wu H, Liu B, Pan S. *Thermoactinomyces guangxiensis* sp. nov., a thermophilic actinomycete isolated from mushroom compost. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(9):2859–64.
- Mokrane S, Bouras N, Meklat A, Lahoum A, Zitouni A, Verheecke C, Klenk HP. *Thermoactinomyces khenchelensis* sp. nov., a filamentous bacterium isolated from soil sediment of a terrestrial hot spring. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2016;109(2):311–317.
- Yao S, Xu Y, Xin C, Xu L, Liu Y, Li H, Li J, Zhao J, Cheng C. Genome sequence of *Thermoactinomyces daqus* H-18, a novel thermophilic species isolated from high-temperature Daqu. *Genome announcements.* 2015;3(1):e01394–01314.
- Kurup V, Hollick G, Pagan E. *Thermoactinomyces intermedius*, a new species of amylase negative thermophilic actinomycetes. *Science-Ciencia Bol Cien Sur.* 1980;7:104–8.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870–1874.
- Field D, Garrity G, Gray T, Morrison N, Selengut J, Sterk P, Tatusova T, Thomson N, Allen MJ, Angiuoli SV, et al. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nat Biotechnol.* 2008;26(5):541–7.
- Miller D, Bryant J, Madsen E, Ghiorse W. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4715–24.
- FASTX-Toolkit T: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/. Accessed Mar 2016.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455–77.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D206–214.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Ciufu S, Li W. Prokaryotic genome annotation pipeline. 2013.
- Białkowska A, Gromek E, Florczak T, Krysiak J, Szulczewska K, Turkiewicz M. Extremophilic Proteases: Developments of Their Special Functions, Potential Resources and Biotechnological Applications. In: *Biotechnology of Extremophiles*. Switzerland: Springer; 2016: 399–444.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(12):4576–9.
- Gibbons NE, Murray RGE. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 1978;28(1):1–6.
- Garrity GM, Holt JG. The Road Map to the Manual. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editors. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. New York, NY: Springer New York; 2001. p. 119–66.
- Murray R. The higher taxa, or, a place for everything. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1984.
- Ludwig WW, Whitman WB. *Bacilli* class nov. In: De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. 2nd ed. New York: Springer; 2009. p. 19–20.
- Euzeby J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(5):925–7.
- Skerman V, McGowan V, Sneath PHA. Approval lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol.* 1980;30:255–420.

27. Hauduroy P, Ehringer G. Dictionnaire des bactéries pathogènes. Paris: Masson; 1953.
28. Goodfellow M, Jones AL. "*Thermoactinomycetaceae*". Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 1–18.
29. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25–9.



The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus

Oliver K. Bezuidt¹, Rian Pierneef², Amin M. Gomri³, Fiyin Adesioye¹, Thulani P. Makhalanyane^{1*}, Karima Kharroub³ and Don A. Cowan¹

¹ Department of Genetics, Centre for Microbial Ecology and Genomics, University of Pretoria, Pretoria, South Africa,

² Department of Biochemistry, Centre for Bioinformatics and Computational Biology, University of Pretoria, Pretoria,

South Africa, ³ Equipe Métabolites des Extrémophiles, Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments, Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire, Université des Frères Mentouri, Constantine, Algeria

OPEN ACCESS

Edited by:

Jae-Ho Shin,
Kyungpook National University,
South Korea

Reviewed by:

Kian Mau Goh,
Universiti Teknologi Malaysia,
Malaysia
Daniel R. Zeigler,
The Ohio State University, USA

*Correspondence:

Thulani P. Makhalanyane
thulani.makhalanyane@up.ac.za

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Genomic
Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 18 March 2016

Accepted: 02 May 2016

Published: 24 May 2016

Citation:

Bezuidt OK, Pierneef R, Gomri AM, Adesioye F, Makhalanyane TP, Kharroub K and Cowan DA (2016) The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus. *Front. Microbiol.* 7:723. doi: 10.3389/fmicb.2016.00723

The genus *Geobacillus* is comprised of a diverse group of spore-forming Gram-positive thermophilic bacterial species and is well known for both its ecological diversity and as a source of novel thermostable enzymes. Although the mechanisms underlying the thermophilicity of the organism and the thermostability of its macromolecules are reasonably well understood, relatively little is known of the evolutionary mechanisms, which underlie the structural and functional properties of members of this genus. In this study, we have compared 29 *Geobacillus* genomes, with a specific focus on the elements, which comprise the conserved core and flexible genomes. Based on comparisons of conserved core and flexible genomes, we present evidence of habitat delineation with specific *Geobacillus* genomes linked to specific niches. Our analysis revealed that *Geobacillus* and *Anoxybacillus* share a high proportion of genes. Moreover, the results strongly suggest that horizontal gene transfer is a major factor deriving the evolution of *Geobacillus* from *Bacillus*, with genetic contributions from other phylogenetically distant taxa.

Keywords: *Geobacillus*, pan-genome, horizontal gene transfer, conserved core, flexible genomes, soft core

INTRODUCTION

The genus *Geobacillus* comprises a diverse group of Gram-positive aerobic and facultative anaerobic endospore-forming bacterial species. Based on 16S rRNA gene sequence similarity these bacteria were all classified as a separate unit designated as group 5 of thermophilic *Bacillus* (Ash et al., 1991). As the genus *Bacillus* was previously reported to be genetically extremely heterogeneous (Ash et al., 1991), its taxonomy was revised and the species assigned to group 5 were reclassified as members of the genus *Geobacillus*, with *Geobacillus stearothermophilus* (Donk, 1920; Nazina et al., 2001) as the type strain based on DNA–DNA hybridization, fatty acid and 16SrRNA gene analyses (Nazina et al., 2001). The *Geobacillus* strains, which have been sequenced and reported to date show an average genome size of 3.5–3.9 Mbp and a G + C content ranging from 45 to 55% (Hussein et al., 2015). These genomes include *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermodenitrificans*, *G. stearothermophilus*, *G. caloxylosilyticus*

and *G. thermoglucosidasius*, which are members of the 15 validly reported *Geobacillus* species (Brumm et al., 2015) form 9 distinct sequence similarity groups based on phylogenies constructed with 16S rRNA and *recN* genes (Nazina et al., 2001; Zeigler, 2005). Four distinct phylogenetic clusters are formed using the variant single-nucleotide sites of their core genome (Studholme, 2015).

Members of the genus *Geobacillus* are facultative thermophiles, growing at optimum temperatures ranging from 45 to 75°C (Coorevits et al., 2012). They are ubiquitous in natural and man-made thermal environments, including hydrothermal pools, desert soils, waste-treatment plants, hot water pipelines, dairy-processing, and mining environments and compost (Marchant et al., 2002; Kimura et al., 2003; Deflaun et al., 2007; Zhao et al., 2012; Bezuidt et al., 2015) and may also be isolated from a variety of non-thermal sites (Corwin, 2002). *Geobacillus* species are important in the field of biotechnology due to their diverse degradative and biosynthetic physiologies (Cripps et al., 2009; De Maayer et al., 2014; Hussein et al., 2015; Studholme, 2015) and for the production of multiple thermostable enzymes (Shariff et al., 2011; Bhalla et al., 2015).

Ecological diversity in bacteria is typically a result of micro-evolutionary events, such as horizontal gene transfer (HGT), which are tightly linked with microbial adaptation and evolution (Boto, 2010). While the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* species have been previously explored (Alcaraz et al., 2010), these interactions have not been specifically defined in *Geobacillus*. To understand the effect of HGT in shaping the evolution of *Geobacillus* from *Bacillus*, we apply comparative genomics approaches, focusing on the core, soft-core, shell, and cloud genomes.

MATERIALS AND METHODS

Genome Sequences

The 29 *Geobacillus* genomes used for pan-genome analyses as well as the 19 *Bacillus* and 13 *Anoxybacillus* genomes, used for gene conservancy analyses were acquired from the NCBI¹. The characteristics of all strains are summarized in the Supplementary Table S1.

Pan-Genome Analysis and Clustering

The methodology for creating orthologous gene clusters was previously described by Contreras-Moreira and Vinuesa (2013). Briefly, to allocate genes into the different categorical orthologous levels, GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) was used to conduct sequence similarity searches and clustering of the coding sequences (CDSs) from the 29 genomes using pair-wise BLASTP (Altschul et al., 1990) and OrthoMCL (OMCL; Li et al., 2003) algorithms. For the identification and clustering of genes into different orthologous groups the parameters were set as: $-E < 1e-05$ expectation value for blastp searches; $-C > 75\%$ minimum alignment coverage to qualify sequences as best hits; $-t 0$ reporting all the computed

clusters and; $-F 1.5$ OMCL inflation parameter. The four clusters determined from the analyses were defined as previously described (Koonin and Wolf, 2008; Kaas et al., 2012): core – genes present in all the genomes; softcore – genes present in 95% (≥ 28) of the genomes; shell – genes present in >3 and <26 of the genomes; cloud – genes present in <2 of the genomes.

Average Amino Acid Identities amongst *Geobacillus* Homologous CDSs

A GET_HOMOLOGUES script was used to estimate the average amino acid identities of CDSs between individual members of a pan-genome. The percent identities of protein coding genes in the 4 clusters in the 29 genomes were determined in the form of a Gower's distance matrix using a script from GET_HOMOLOGUES. The distance matrices were further illustrated in the form of a heatmap to show similarities and differences between genomes.

Functional Classification of Orthologous Genes

The four clusters determined for the 29 genomes were searched for pattern similarity using a standalone RPS-BLAST (reverse position specific blast) with $-E < 1e-05$ against a conserved domain database of clusters of orthologous groups (COG; Tatusov et al., 2000)². Genes with pattern similarities were assigned functional classes, which were later categorized into different COG subgroups to determine their distributions for all the cluster compartments.

Identification of Carbohydrate Active Enzymes

The dbCAN database (Yin et al., 2012) was used to search the clusters for the presence of different families of carbohydrate-active enzymes (CAZymes; Alalouf et al., 2011) and their associated domains. Each cluster was searched for pattern similarity using hmmscan (Eddy, 1998) against the CAZymes family specific hidden markov model (HMM; Rabiner, 1989). The results obtained were processed to determine the abundances and distributions of the different CAZymes families and their domains within each cluster.

Introgression of Genomic Regions between Divergent Populations

All elements contained within the four clusters were compared against the Predicted Genomic Islands database (Pre_GI; Pierneef et al., 2015) by means of BLASTP using a cutoff E value $< 1e-05$. Pre_GI is a collection of horizontally acquired genetic material identified in 2,407 bacterial/archaeal organisms and entails 656,806 proteins from diverse sources. The highest scoring hit for each element in a cluster was determined and all four clusters were individually analyzed with respect to host taxonomy, host general information, and CDS description of the subject. The majority of sequences, in

¹ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/genbank/bacteria/

²ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/mmdb/cdd/little_endian/

all four clusters, that displayed no significant similarity were described as “hypothetical proteins” and excluded from further analysis.

Homology Searches of the *Geobacillus* Pan-Genome in *Anoxybacillus* and *Bacillus* Genomes

A large-scale Blast score ratio (LS-BSR; Sahl et al., 2014) was used to determine the variable composition of genes in each pan-genome cluster within the 13 *Anoxybacillus* and 19 *Bacillus* genomes to infer their evolution and phylogeny. The TBLASTN BSR values calculated for the genomes against the clusters were converted into matrices of 1's and 0's. Here, genes with BSR ≥ 0.8 were considered to be conserved (1) and those with BSR < 0.8 were designated as divergent (0) between the clusters and genomes. The matrices were displayed as heatmaps to show similarities and differences between the genomes and clusters.

Average Nucleotide Identities amongst *Geobacillus* and *Anoxybacillus* CDSs

The GET_HOMOLOGUES methodology was used to compare 29 *Geobacillus* and 13 *Anoxybacillus* genomes to estimate average

nucleotide identities of their CDSs by means of BLASTN. The percent identities of the CDSs between the genomes were determined in the form of a Gower's distance matrix using a GET_HOMOLOGUES functionality. The distance matrix was visualized as a heatmap to show similarities and differences between genomes.

Geo_Island Prediction and Homology

All *Geobacillus* strains/isolates were subjected to the SeqWord Gene Island Sniffer (SWGIS; Bezuidt et al., 2009) for island prediction. SWGIS is a standalone island predictor employing oligonucleotide usage (OU) frequencies to isolate areas of horizontal transfer in archaeal and bacterial genomes. OU frequencies establish microbial genomic signatures and local deviations from the global pattern indicate regions of probable horizontal transfer. OU pattern (OUP) using 4-mer frequencies, embodied in an island allows for the determination of compositional similarity between islands by correlating lists of consecutively similar word patterns. Sequence comparison among islands was obtained by BLASTN analysis. To increase the reliability of possible homology between genomic islands, we combined data derived from compositional and sequence-based comparison methods (Pierneef et al., 2015).

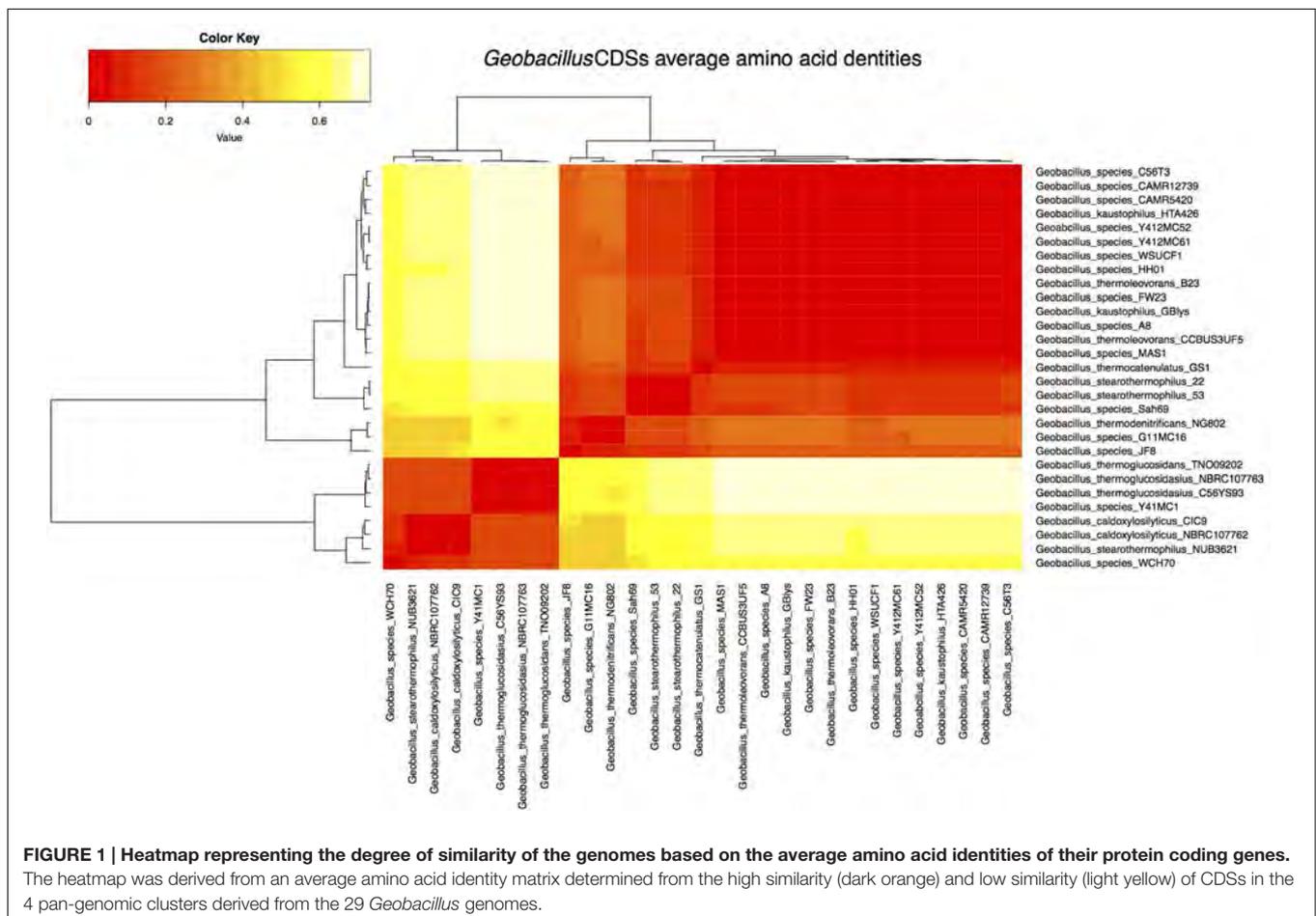


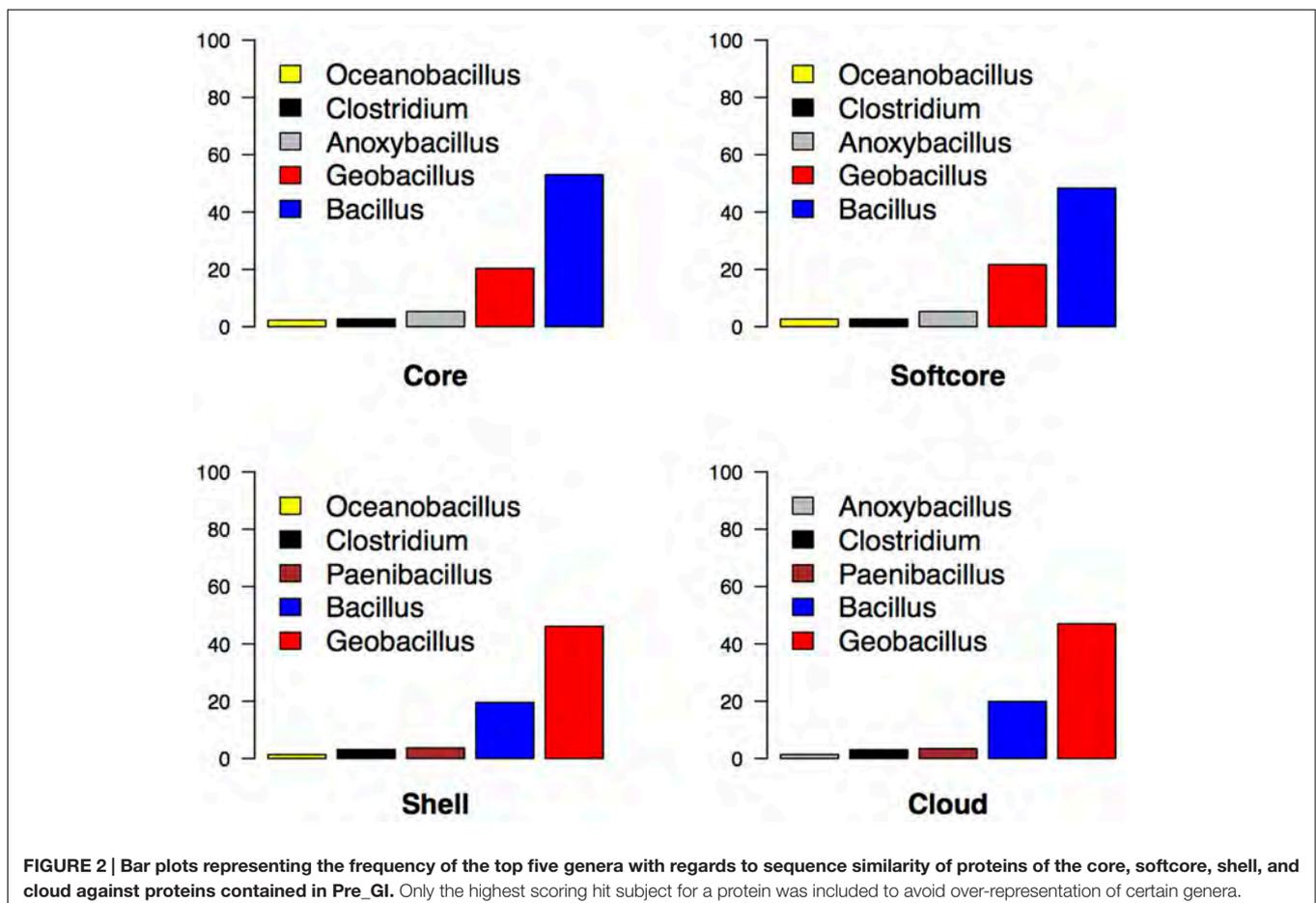
FIGURE 1 | Heatmap representing the degree of similarity of the genomes based on the average amino acid identities of their protein coding genes. The heatmap was derived from an average amino acid identity matrix determined from the high similarity (dark orange) and low similarity (light yellow) of CDSs in the 4 pan-genomic clusters derived from the 29 *Geobacillus* genomes.

RESULTS AND DISCUSSION

While members of the genus *Geobacillus* are well known for their ecological, physiological and genetic diversity (Zeigler, 2014; Studholme, 2015), it is unclear how their diverse environments shape genomic composition and how this may in turn influence their lifestyles. We conducted pan-genomic analysis on the 29 genomes (12 complete and 17 draft genomes from NCBI) derived from *Geobacillus* isolates of geographically distinct origins.

The full complement of genes in the pan-genome included 13,595 clusters of protein-coding genes. Among these 527, 1,862, 3,515, and 8,218 clusters represented the core, soft-core, shell, and cloud genomes, respectively, (Supplementary Figure S1). The 'core genome' represents a pool of conserved genes, which are present in all genomes included in the analysis. The 'soft-core' represents genes present in 95% of the genomes analyzed. The inclusion of this category is important in comparative genomic analyses as it allows for the inclusion of draft genomes where some genes may not be present (Nelson and Stegen, 2015). Both the core and soft-core clusters represent a pool of highly conserved genes, which can provide information about the evolutionary history of members of the genus (Nelson and Stegen, 2015). The 'shell' cluster includes genes, which

are moderately common in the pan-genome (i.e., 3 to 26 genomes of the 29 genomes included in these analyses). The 'cloud' cluster represents genes which are present in very few of the genomes analyzed (2 or less). Both the shell and cloud clusters represent subsets of the flexible genome, which reflect both the evolutionary history of a sublineage and the lifestyle and adaptation of an organism to its particular environment (Nelson and Stegen, 2015). These two clusters are thought to have different rates of gene acquisition and deletion (Collins and Higgs, 2012). The shell is believed to include genes that are gained and lost rather slowly, whereas the cloud is comprised of genes that are rapidly gained and lost (Collins and Higgs, 2012). From pan-genomic analyses, average amino acid identity matrices were calculated using protein-CDSs within the clusters to compare and classify the 29 genomes (Supplementary Table S2). The comparisons are shown in the form of a heatmap (Figure 1), which depicts the clustering of genomes into five groups based on average shared similarities and differences of their CDSs amino acid identities (core and flexible gene pools combined) relative to the four determined by Studholme (2015). The latter illustrates the degree of HGT in microbial evolution and also displays a functional relationship between different *Geobacillus* strains obtained from variable environments.



The functional annotation of the four clusters was performed using stand-alone rps-blast against the COG PSSMs from the CDD database. The distributions of the COG categories were determined by counting all the individual subcategories assigned to genes of each cluster compartment. 435/527 (83%) core, 1571/1862 (84%) soft-core, 2150/3515 (61%) shell, and 2883/8218 (35%) cloud genes were assigned to the COG categories. The assignments were subsequently used to determine the fraction of the individual compartment genes in each of the different COG functional categories (**Supplementary Figure S2**). The majority of the COG categories were overrepresented in the flexible genome relative to the conserved core: these included genes involved in replication, recombination and repair (L), amino acid transport and metabolism (E), carbohydrate transport and metabolism (G), transcription (K), energy production and conversion (C), signal transduction mechanisms (T), defense mechanisms (V), and secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism (**Supplementary Figure S2**). The conserved core was overrepresented by genes in the COG category (J) of translation and ribosomal structure genes and partially overrepresented by categories coenzyme transport and metabolism (H), nucleotide transport and metabolism (F), protein turnover and chaperones genes (O), as seen in *Bacillus* (Alcaraz et al., 2010). Only one COG category (N), cell motility,

was found to have a similar distribution of genes between the conserved core and flexible genomes (Alcaraz et al., 2010). The overrepresentation of the COG categories in the flexible genome (rather than the core genome) is thought to be the principal driver of *Geobacillus* functional diversity. These results suggest that HGT may be a key mechanism of the adaptive nature of *Geobacillus*.

The dbCAN database was used to annotate and determine the distribution and associations of the different CAZymes within the four clusters. The dbCAN analysis provides HMM profiles derived from protein coding genes, which contain CAZyme domains classified into five enzymatic classes: glycosyl transferases (GTs), glycoside hydrolases (GHs), polysaccharide lyases (PLs), carbohydrate esterases (CEs) and auxiliary activities (Kaas et al., 2012), and (non-enzymatic) carbohydrate-binding modules (CBMs). The distributions of the CAZyme types were determined by counting all the individual classes assigned to genes of each cluster compartment. The majority of the CAZyme genes and domains of classes GHs, GTs, and CBM were overrepresented in the flexible gene pool relative to the core genome (Supplementary Table S3). The annotations for the clusters were also compared to CAZymes previously reported for the 16 *Geobacillus* strains and cataloged in the CAZy database (Supplementary Table S4). Of the different CAZyme classes

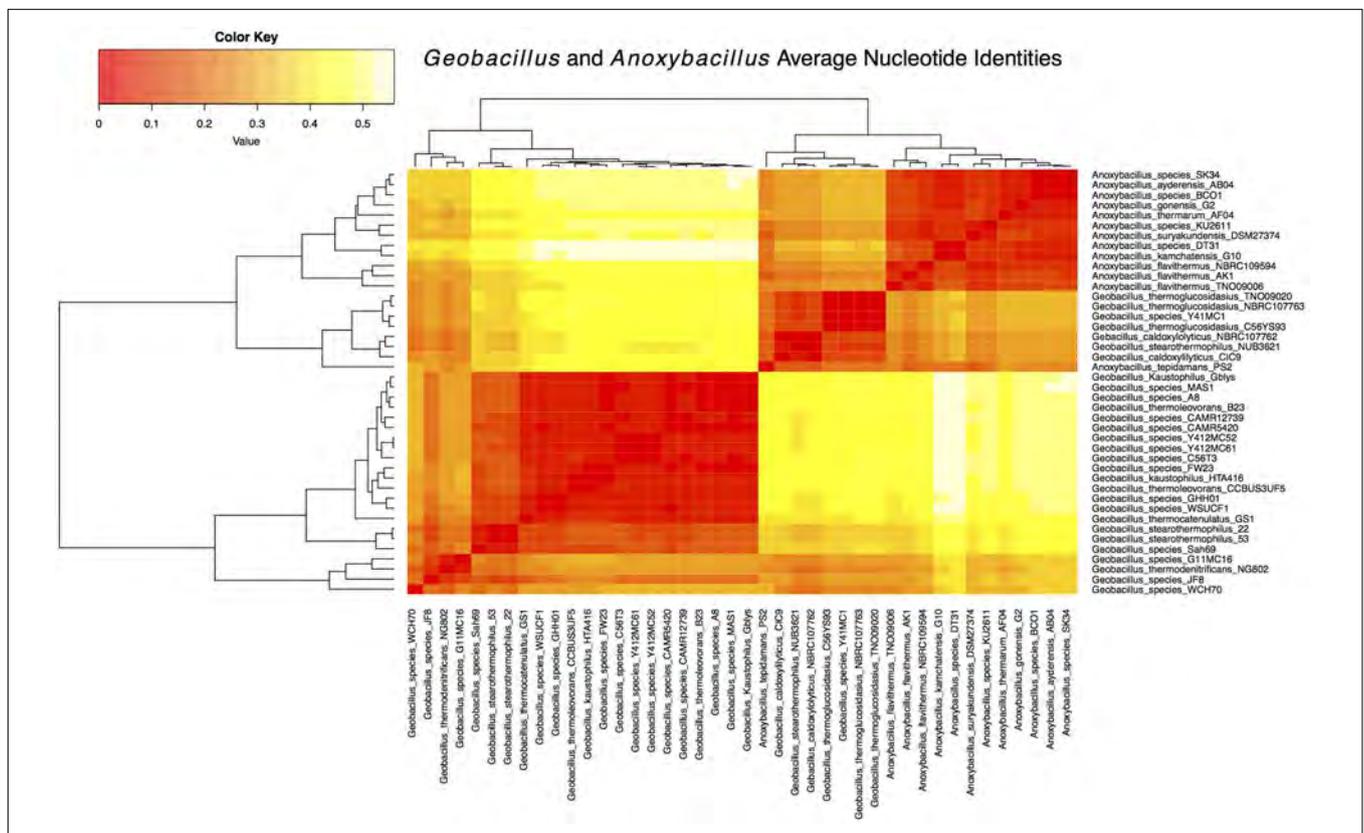


FIGURE 3 | Heatmap representing the degree of similarity among *Geobacillus* and *Anoxybacillus* based on the average nucleotide identities of their coding sequences (CDSs). The heatmap was derived from an average nucleotide identity matrix determined from the high similarity (dark orange) and low similarity (light yellow) of CDSs derived from the *Geobacillus* and *Anoxybacillus* genomes.

identified within the four clusters the following: GH 74–113 and 127, GT 7, 12–13, 70–71 and 94, CE 1–3, AA 2–4 and 7, CBM 16, 23, 37–40, 51–56 and 66–67, and PL 9 families were found to be absent from the CAZyme families previously reported for *Geobacillus* and were also overrepresented in the flexible genome (Supplementary Table S4). The overrepresentation of these classes in the flexible genome, relative to the core genome, highlights the importance of HGT and its contribution to the diversity in the metabolic machinery of *Geobacillus* species and consequently, to their ecological importance and biotechnological potential.

Protein sequences of the four clusters were compared to the Pre_GI database by means of BLASTP. High-scoring alignments were inspected with regard to the genus and general information on the organism with which sequence similarity was identified. The core cluster of *Geobacillus* displayed a strong homology to *Bacillus*, with a progressive change in overrepresentation to that of *Geobacillus* in subsequent clusters (Figure 2). This indicates the presence of a *Bacillus* ancestry in both the conserved core clusters, with the flexible genome clusters highly influenced by *Geobacillus*. The mechanistic implications are that the ancestral *Bacillus* genome has acquired, by HGT, a wide variety of bacterial and archaeal genes, the acquisition of which has led to the evolution of the genus *Geobacillus*. Such acquisitive processes are also likely to have led to the development of ‘extremophilic’ physiology of *Geobacillus*, including varying degrees of thermo- and halophilicity (Aravind et al., 1998; Koonin and Wolf, 2008).

The core cluster also displayed a moderate representation of *Anoxybacillus*, a genus that has been reported to be a closet phylogenetic neighbor to *Geobacillus* and to share a high gene synteny with both *Geobacillus* and *Bacillus* (Saw et al., 2008).

The protein sequences from each cluster were further compared with the complete and draft genomes of *Bacillus* and *Anoxybacillus*, using LS-BSR to determine the difference and proportion of genes shared within the three genera. The BSR matrix values (Supplementary Table S5) were used to review the gene conservancy average for each cluster against *Bacillus* and *Anoxybacillus* before visualization using MultiExperiment viewer (MeV version 4.9; Supplementary Figures S3–S6). The four clusters revealed high a degree of sequence similarity and gene composition, mainly for the core clusters shared between *Geobacillus* and *Anoxybacillus*. The gene conservancy average for *Anoxybacillus* were found to be: core 527 (171.8), soft-core 1862 (554.8), shell 3515 (187.9), cloud 8218 (397.1). Similarly, the values for *Bacillus* were found to be: core 527 (75.8), soft-core 1862 (216.1), shell 3515 (39.6), and cloud 8218 (84.5). Of the 13 *Anoxybacillus* genomes compared with the clusters, *Anoxybacillus tepidamans* PS2 [formally known as *G. tepidamans* (Minana-Galbis et al., 2010)] displayed the highest abundance genes from the core 527 (230), soft-core 1862 (759), and the shell 3515 (309) clusters. *A. thermarum* harboured the second highest abundance of genes from the cloud 8218 (485). As *Geobacillus* and *Anoxybacillus* were shown to be closely related, their

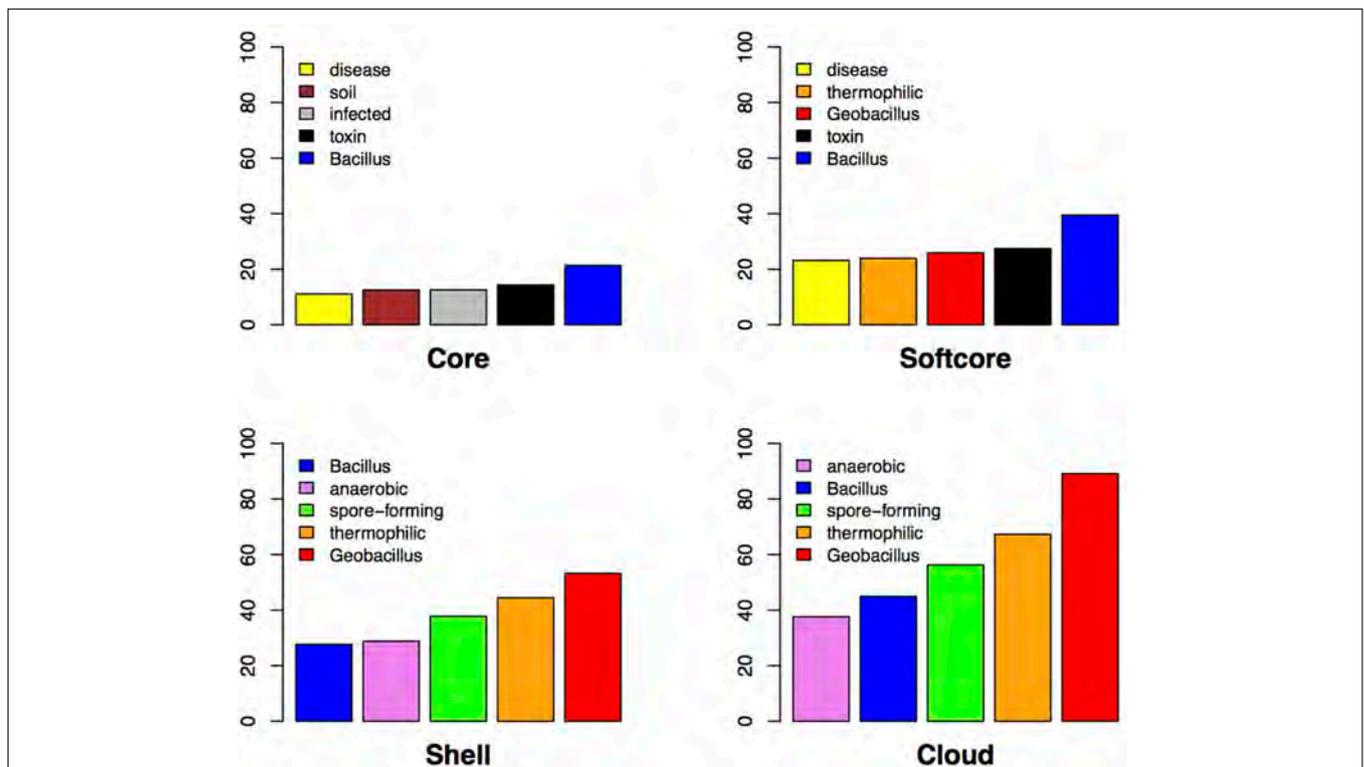


FIGURE 4 | Graphical representation of general information regarding the genera of highest scoring hits against Pre_GI with only the highest subject included. The top five word frequencies reflecting island host lifestyle, habitat and isolation are presented in the bar plot for the core, softcore, shell, and cloud.

genomes were compared to determine the average nucleotide identity matrices for their CDSs (Supplementary Table S6) and how similar these are among the genera. The matrices were illustrated as a heatmap, which depicts *A. tepidamans* PS2 clustering with *Geobacillus* whereas the other 12 *Anoxybacillus* clustering on their own (Figure 3).

The possible influence of environmental factors on the different cluster levels is shown in Figure 4. Our analysis reveals that genes, which contribute to organismal adaptation to challenging environmental conditions, are typically found in the flexible genome clusters. Environmental pressures and adaptation to niche environments is thought to have played a critical role in the evolution of *Geobacillus* from *Bacillus* (Alalouf et al., 2011). To further understand the role of HGT in the evolution of *Geobacillus*, all 29 genomes were inspected for the presence of genomic islands using SWGIS (Pierneef et al., 2015). The analysis identified 567 regions (geo_islands). Elements of the core, softcore, shell, and cloud were aligned to the geo_islands to identify the presence/absence of proteins in a horizontally acquired region. From the core genome, 357 of the 527 proteins were represented in a geo_island (67.74%) with the softcore accommodating 1,341 of the possible 1,862 (72.02%) proteins. The shell contained the highest proportion of proteins in a geo_island with 2,915 out of 3,515 (82.93%), while the cloud contained 5,835 proteins from the set of 8,218 (71.00%). The high proportion of genetic elements in the core, softcore, shell, and cloud, which are located in probable regions of horizontal transfer, may indicate the extent and influence of HGT on all categories of the *Geobacillus* genome.

All geo_islands were compared individually against Pre_GI by means of sequence (BLASTN) and compositional (tetranucleotide frequency) analyses. Sequence similarity indicated that only 2.12% of the top hits were not homologous to an island predicted in a strain of *Geobacillus*, while compositional similarity analysis showed that only 1.24% of geo_islands were possibly not of *Geobacillus* origin. This highlights the high frequency of HGT within the genus *Geobacillus*. These geo_islands serve as a genetic reservoir for members of *Geobacillus* when environmental changes are encountered and rapid evolution is crucial in order to survive.

CONCLUSION

This work provides the first insights on the importance of HGT toward the evolution of *Geobacillus*. Based on the full complement of genes determined from the 29 *Geobacillus* genomes, we were able to distinguish and define the functional roles of genes present within both the core and flexible genomes and how these contribute toward diversification of the genus. The results obtained from the COG and CAZymes analyses, suggested that the majority of genes and enzymes implicated in adaptation were overrepresented in the flexible rather than the core genome. Further sequence-based analyses on the core and flexible genomes, matched against the Pre_GI datasets, indicated that the

core genome was similar to that of *Bacillus*, whereas the flexible genome shows similarities shared within *Geobacillus* (and other organisms) as a result of multiple HGT events. Similarities shared between the core genome and the *Bacillus* Pre_GI genomic islands; suggest that *Bacillus* may have contributed toward the evolution of *Geobacillus*. For further exploration, these clusters were compared with the complete and draft genomes of *Bacillus* and *Anoxybacillus* species. The *Geobacillus* core (predominantly) and flexible genomes revealed a high level of similarity with *Anoxybacillus*, which may indicate a recent divergence of the two genera. Further comparative genomics analyses is still required in order to infer the phylogenetic relationships of the three genera, which would shed light on the influence of *Bacillus* on the evolutionary processes of both *Geobacillus* and *Anoxybacillus*. Furthermore, our analysis suggest that *A. tepidamans* PS2 should still be regarded a *Geobacillus* based on their shared genes and ANI properties.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

OB, RP, and FA conducted the bioinformatic analysis and wrote the first draft of the paper, AG isolated one of the *Geobacillus* isolates used in this study, TM, KK, and DC conceived the study and provided reagents. All authors contributed to writing the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the following organizations for supporting this research: The National Research Foundation of South Africa, the University of Pretoria Genomics Research Institute and the Department of Research and Innovation's Research Development Program (University of Pretoria).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00723>

FIGURE S1 | Barplot of pan-genome matrix determined from the *Geobacillus* genomes.

FIGURE S2 | Clusters of Orthologous Groups (COG) analysis of the *Geobacillus* pan-genome.

FIGURE S3 | Heatmap comparison of the *Geobacillus* core genes against *Anoxybacillus* and *Bacillus* genomes.

FIGURE S4 | Heatmap comparison of the *Geobacillus* soft-core genes against *Anoxybacillus* and *Bacillus* genomes.

FIGURE S5 | Heatmap comparison of the *Geobacillus* shell genes against *Anoxybacillus* and *Bacillus* genomes.

FIGURE S6 | Heatmap comparison of the *Geobacillus* cloud genes against *Anoxybacillus* and *Bacillus* genomes.

REFERENCES

- Alalouf, O., Balazs, Y., Volkshstein, M., Grimpel, Y., Shoham, G., and Shoham, Y. (2011). A new family of carbohydrate esterases is represented by a GDSL hydrolase/acetylxyylan esterase from *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* 286, 41993–42001. doi: 10.1074/jbc.M111.301051
- Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., and Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* 11:332. doi: 10.1186/1471-2164-11-332
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Aravind, L., Tatusov, R. L., Wolf, Y. I., Walker, D. R., and Koonin, E. V. (1998). Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet.* 14, 442–444. doi: 10.1016/S0168-9525(98)01553-4
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., and Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 202–206. doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00608.x
- Bezuiddt, O., Lima-Mendez, G., and Reva, O. N. (2009). SeqWord Gene Island Sniffer: a program to study the lateral genetic exchange among bacteria. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 58, 1169–1174.
- Bezuiddt, O. K., Makhalanyane, T. P., Gomri, M. A., Kharroub, K., and Cowan, D. A. (2015). Draft genome sequence of thermophilic *Geobacillus* sp. Strain Sah69, isolated from Saharan Soil, Southeast Algeria. *Genome Announc.* 3:e1447-15. doi: 10.1128/genomeA.01447-15
- Bhalla, A., Bischoff, K. M., and Sani, R. K. (2015). Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. Strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:84. doi: 10.3389/fbioe.2015.00084
- Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc. Biol. Sci.* 277, 819–827. doi: 10.1098/rspb.2009.1679
- Brumm, P., Land, M. L., Hauser, L. J., Jeffries, C. D., Chang, Y.-J., and Mead, D. A. (2015). Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. Y412MC52, a xylan-degrading strain isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Stand. Genomic Sci.* 10:81. doi: 10.1186/s40793-015-0075-0
- Collins, R. E., and Higgs, P. G. (2012). Testing the infinitely many genes model for the evolution of the bacterial core genome and pangenome. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3413–3425. doi: 10.1093/molbev/mss163
- Contreras-Moreira, B., and Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. doi: 10.1128/AEM.02411-13
- Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., et al. (2012). Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidans'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1470–1485. doi: 10.1099/ijms.0.030346-0
- Corwin, P. (2002). What are high-temperature bacteria doing in cold environments? *Trends Microbiol.* 10, 120–121. doi: 10.1016/S0966-842X(02)02311-9
- Cripps, R. E., Eley, K., Leak, D. J., Rudd, B., Taylor, M., Todd, M., et al. (2009). Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidans* for high yield ethanol production. *Metab. Eng.* 11, 398–408. doi: 10.1016/j.ymben.2009.08.005
- De Maayer, P., Brumm, P. J., Mead, D. A., and Cowan, D. A. (2014). Comparative analysis of the *Geobacillus* hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. *BMC Genomics* 15:836. doi: 10.1186/1471-2164-15-836
- Deflaun, M. F., Fredrickson, J. K., Dong, H., Pfiffner, S. M., Onstott, T. C., Balkwill, D. L., et al. (2007). Isolation and characterization of a *Geobacillus* thermoleovorans strain from an ultra-deep South African gold mine. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 152–164. doi: 10.1016/j.syapm.2006.04.003
- Donk, P. J. (1920). A highly resistant thermophilic organism. *J. Bacteriol.* 5, 373–374.
- Eddy, S. R. (1998). Profile hidden markov models. *Bioinformatics* 14, 755–763. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.755
- Hussein, A. H., Lisowska, B. K., and Leak, D. J. (2015). The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. *Adv. Appl. Microbiol.* 92, 1–48. doi: 10.1016/bs.aambs.2015.03.001
- Kaas, R. S., Friis, C., Ussery, D. W., and Aarestrup, F. M. (2012). Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics* 13:577. doi: 10.1186/1471-2164-13-577
- Kimura, H., Asada, R., Masta, A., and Naganuma, T. (2003). Distribution of microorganisms in the subsurface of the manus basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 644–648. doi: 10.1128/AEM.69.1.644-648.2003
- Koonin, E. V., and Wolf, Y. I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* 36, 6688–6719. doi: 10.1093/nar/gkn668
- Li, L., Stoeckert, C. J. Jr., and Roos, D. S. (2003). OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13, 2178–2189. doi: 10.1101/gr.1224503
- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., and Berzano, M. (2002). The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environ. Microbiol.* 4, 595–602. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00344.x
- Minana-Galbis, D., Pinzon, D. L., Loren, J. G., Manresa, A., and Oliart-Ros, R. M. (2010). Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1600–1604. doi: 10.1099/ijms.0003699-0
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., et al. (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 stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 433–446.
- Nelson, W. C., and Stegen, J. C. (2015). The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Front. Microbiol.* 6:713. doi: 10.3389/fmicb.2015.00713
- Pierneef, R., Bezuiddt, O., and Reva, O. N. (2015). Optimization and practical use of composition based approaches towards identification and collection of genomic islands and their ontology in prokaryotes. *Procedia Comput. Sci.* 51, 670–679. doi: 10.1016/j.procs.2015.05.183
- Rabiner, L. R. (1989). A tutorial on hidden markov-models and selected applications in speech recognition. *Proc. IEEE* 77, 257–286. doi: 10.1109/5.18626
- Sahl, J. W., Caporaso, J. G., Rasko, D. A., and Keim, P. (2014). The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. *PeerJ* 2:e332. doi: 10.7717/peerj.332
- Saw, J. H., Mountain, B. W., Feng, L., Omelchenko, M. V., Hou, S., Saito, J. A., et al. (2008). Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome Biol.* 9:R161. doi: 10.1186/gb-2008-9-11-r161
- Shariff, F. M., Rahman, R. N., Basri, M., and Salleh, A. B. (2011). A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2917–2934. doi: 10.3390/ijms12052917

- Studholme, D. J. (2015). Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microb. Biotechnol.* 8, 40–48. doi: 10.1111/1751-7915.12161
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., and Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28, 33–36. doi: 10.1093/nar/28.1.33
- Yin, Y. B., Mao, X. Z., Yang, J. C., Chen, X., Mao, F. L., and Xu, Y. (2012). dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 40, W445–W451. doi: 10.1093/nar/gks479
- Zeigler, D. R. (2005). Application of a recN sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1171–1179. doi: 10.1099/ijs.0.63452-0
- Zeigler, D. R. (2014). The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* 160, 1–11. doi: 10.1099/mic.0.071696-0
- Zhao, Y., Caspers, M. P., Abee, T., Siezen, R. J., and Kort, R. (2012). Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidans* TNO-09.020, a thermophilic sporeformer associated with a dairy-processing environment. *J. Bacteriol.* 194, 4118. doi: 10.1128/JB.00318-12

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Bezuidt, Pierneef, Gomri, Adesioye, Makhalanyane, Kharroub and Cowan. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Draft Genome Sequence of Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain Sah69, Isolated from Saharan Soil, Southeast Algeria

Oliver K. I. Bezuidt,^a Thulani P. Makhalanyane,^a Mohamed A. Gomri,^b Karima Kharroub,^b Don A. Cowan^a

Centre for Microbial Ecology and Genomics, Department of Genetics, University of Pretoria, Pretoria, South Africa^a; Equipe Métabolites des Extrémophiles, Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments, INATAA, Université Frères Mentouri, Constantine, Algeria^b

***Geobacillus* spp. are potential sources of novel enzymes, such as those involved in the degradation of recalcitrant polymers. Here, we report a *Geobacillus* genome that may help reveal genomic differences between this strain and publicly available representatives of the same genus from diverse niches.**

Received 20 October 2015 Accepted 27 October 2015 Published 17 December 2015

Citation Bezuidt OKI, Makhalanyane TP, Gomri MA, Kharroub K, Cowan DA. 2015. Draft genome sequence of thermophilic *Geobacillus* sp. strain Sah69, isolated from Saharan soil, southeast Algeria. *Genome Announc* 3(6):e01447-15. doi:10.1128/genomeA.01447-15.

Copyright © 2015 Bezuidt et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Don A. Cowan, don.cowan@up.ac.za.

Thermophilic environments such as desert soils contain a diverse consortia of microbial taxa, which span both archaeal and bacterial lineages (1, 2). Efforts have focused on isolation of thermophilic archaea, principally due to their potential biotechnological applications (3). However, more recently, the need to identify novel thermostable hydrolytic enzymes has led to renewed interest in isolating *Geobacillus* spp., due to their capacity to degrade complex carbohydrates for application in bioethanol production (4). We sequenced the genome of a novel isolate from a hot Saharan soil in order to further understand the metabolic capacity of this genus. *Geobacillus* spp. are thermophilic, Gram-positive, spore-forming aerobic bacteria, many of which have demonstrated broad-specificity, carbohydrate-degradative traits (5).

Geobacillus sp. strain Sah69 was grown on nutrient agar and incubated at 55°C for 24 h. Genomic DNA was obtained from the isolate using a modification of the method first described by Miller and colleagues (6). The 16S rRNA gene was amplified and sequenced, confirming that isolate Sah69 belongs to the genus *Geobacillus*. Genomic DNA was sent for sequencing on an Illumina MiSeq DNA at MR DNA, Shallowater, TX, USA. The library preparation and sequencing was done as described elsewhere (7). The genome was assembled using DNASTar SeqMan NGen software, and annotated using the Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) server (<http://rast.nmpdr.org>) (8). The draft genome had a total of 73 contigs with protein-encoding genes, 2,998,191 nucleotides, and a G+C content of 52.58%. RAST annotation revealed 102 RNAs and 3,372 coding sequences. One intact and one incomplete phage genome was predicted using the PHAST (Phage Search Tool) server (9). The genome was shown to possess the CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR-associated) elements of the Csn1, Cas1, and Cas2 families (10). These elements are essential for the acquisition of resistance by bacteria against foreign genetic elements through the excision and integration of a genome fragment from invading DNA into its CRISPR arrays.

These data will help provide knowledge about the mechanisms behind microorganisms that thrive in extreme environments.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank un-

der the accession number [LLKS00000000](https://doi.org/10.1128/genomeA.01447-15). The version described in this paper is the first version, LLKS01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Research Foundation of South Africa, the Genomics Research Institute (University of Pretoria), and the Research Development Programme (University of Pretoria) for financial support.

REFERENCES

- Amend JP, Shock EL. 2001. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25:175–243. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00576.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00576.x).
- Stetter KO. 1996. Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 18:149–158. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00233.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00233.x).
- Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2134–2139. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0708857105](https://doi.org/10.1073/pnas.0708857105).
- Taylor MP, van Zyl L, Tuffin IM, Leak DJ, Cowan DA. 2011. Genetic tool development underpins recent advances in thermophilic whole-cell biocatalysts. *Microb Biotechnol* 4:438–448. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00246.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00246.x).
- Brumm PJ, De Maayer P, Mead DA, Cowan DA. 2015. Genomic analysis of six new *Geobacillus* strains reveals highly conserved carbohydrate degradation architectures and strategies. *Front Microbiol* 6 [Epub ahead of print.] [http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00430](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00430).
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 65:4715–4724.
- Gosse JT, Hill P, Dowd SE, Boddy CN. 2015. Draft genome sequence of streptomyces sp. strain PBH53, isolated from an urban environment. *Genome Announc* 3(4):e00859-15. [http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00859-15](https://doi.org/10.1128/genomeA.00859-15).
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206–D214. [http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1226](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226).
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: A fast phage search Tool. *Nucleic Acids Res* 39:W347–W352. [http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr485](https://doi.org/10.1093/nar/gkr485).
- Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32:347–355. [http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2842](https://doi.org/10.1038/nbt.2842).

RÉSUMÉS

تشكل البينات الساخنة الطبيعية مصدراً مهماً للتنوع الميكروبيولوجي و للجزيئات الحيوية ذات الأهمية البيوتكنولوجية. من بين هاته الجزيئات، تمتلك أنزيمات الإماهة وبالخصوص أنزيمات إماهة البروتين أو البروتياز إستعمالات عديدة في مجال الصناعات الغذائية لما تقدمه من مزايا مفاعلاتية مميزة و لإستقرارها في ظروف عملية مختلفة.

الهدف الأول من هذه الأطروحة هو عزل بكتيريا هوائية محبة للحرارة ومنتجة لأنزيمات بروتياز خارج الخلية بطرق زراعية انطلاقاً من 7 مواقع جغرافية تمثل بينات جزائرية ساخنة مختلفة : ثلاثة حمامات ساخنة، أرضيتان صحراويان، سبخة و بئر بترولية. من مجموع 138 عزل مختارة على أساس المرفولوجيا المجهرية والمكبرة، تم وصف 53 عزل قادرة على إماهة الكازيين والجيلاتين في وسط زراعي صلب بإستعمال تقنية معالجة أجزاء تقبيد الحمض النووي المضخم. بعد إقصاء العزل المستنسخة، تم التعرف على ال28 سلالة البكتيرية المختارة. هاته الأخيرة تنتمي إلى 5 أنواع مختلفة : *أنوكسيسياسيلوس*، *جيوباسيلوس*، *باسيلوس*، *بريفياسيلوس* و *ثيرموأكتينومييساس*. تم تأكيد هاته النتائج من خلال طرق التعرف البيوكيميائية والفيزيولوجية.

بعد ذلك، تمت دراسة جينومات السلالتين *جيوباسيلوس* صح69 و *ثيرموأكتينومييساس* أس95. ماسمح بتأكيد وجود جينات البروتياز الخارجية وقابلية السلالتين على طرحها.

من جهة أخرى، قمنا بتحليل التنوع الحيوي المجهري لحمامي أولاد علي و دباغ عن طريق معالجة متواليات المنطقة المتغيرة 4 لجين الحمض النووي الريبوزومي 16S المحصل عليها من الحمض النووي المستخلص مباشرة من البيئة. نتائج التحليل بينت أن المجتمعات البكتيرية الهوائية مهيمنة على عينات رواسب الحمامين الساخنين مع حضور ضعيف للمجال الجزئي للفيرميكوتيس وكذا للأنواع المحصل عليها بالطرق الزراعية الكلاسيكية.

أخيراً، قمنا بدراسة كمية لإنتاج البروتياز الخارجية من طرف ال28 سلالة. بعدها قمنا بدراسة تأثير ظروف الإنتاج على ثلاثة سلالات مختارة هي *جيوباسيلوس* صح69، *ثيرموأكتينومييساس* أس95 و *بريفياسيلوس* أو30. بعد الإستخلاص والتنقية، قمنا بدراسة أنزيمتي إماهة بروتين منتج من طرف السلالة أو30: بروتياز معدنية -32ج38 و بروتياز سيرينية 16-ج39. هاتان الأخيرتان حمضيتان، نشيطتان في درجات حرارة مرتفعة نسبياً ومقاومتان لتأثير العديد من المركبات الفعالة سطحياً أو المذيبة التي تم تجربتها. هاته النتائج تشير إلى إمكانية إستعمال الإنزيمتين في تطبيقات صناعية .

Abstract

Natural hot environments can represent an important source of microbial biodiversity and biomolecules with great added value. Among these biomolecules, extracellular hydrolases and in particular proteases are of great interest for the food industry because of their single reactional properties at high temperatures and their stability in various environmental conditions.

The primary objective of this thesis is the isolation of thermophilic aerobic bacteria with extracellular proteolytic activities from 7 sites representing different Algerian hot environments: three geothermal sources, two Saharan soils, a sebkha and an oil field. On the 138 isolates selected on the basis of their macroscopic and microscopic morphological characters, 53 isolates able to degrade casein and/or gelatin on solid culture media were characterized by amplified ribosomal DNA restriction analysis. After the elimination of clones, 28 strains were identified by sequencing and analyzing their 16S rRNA genes. These strains belong to 5 genera of aerobic thermophilic endospore-forming bacteria: *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus* and *Thermoactinomyces*. The physiological and biochemical characterization of these strains confirm the relationship with these genera.

The genomes of two strains, *Geobacillus* Sah69 and *Thermoactinomyces* AS95, were then characterized. The production of putative extracellular proteases of industrial interest was revealed.

In addition, the biodiversity of the geothermal sources of Debagh and Ouled Ali was studied by metagenomic analysis of the 16S rRNA hypervariable V4 region sequences of environmental DNA collected from sediment samples. The thermophilic aerobic bacterial communities dominate the two sites with a minor presence of the phylum of *Firmicutes* and the genera isolated by cultural methods.

Lastly, the production of extracellular proteases was estimated quantitatively for the 28 selected strains. Study of production kinetics and effect of fermentation conditions on three selected strains, *Geobacillus* Sah69, *Thermoactinomyces* AS95 and *Brevibacillus* OA30, were then carried out. After the extraction of the supernatant, two proteases, metalloprotease 32-F38 and serine-protease 16-F39, were produced and purified from strain *Brevibacillus* OA30. These proteases were acid, thermoactive and had a great stability in presence of SDS, solvents and other chemical agents tested. Thus revealing a good potential for industrial application.

Key words : Algerian hot environments, diversity, bacteria, thermophilic, extracellular proteases.

Résumé

Les environnements chauds naturels peuvent représenter une source importante de biodiversité microbienne et de principes biotechnologiques à grande valeur ajoutée. Parmi ces principes, les hydrolases extracellulaires et en particulier les protéases sont d'un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire en raison de leurs propriétés réactionnelles uniques à températures élevées et leur stabilité à différentes conditions environnementales.

Le premier objectif de cette thèse est l'isolement par méthodes culturales de bactéries aérobies thermophiles possédant des activités protéolytiques extracellulaires à partir de 7 sites représentant des environnements chauds algériens différents : trois sources géothermales, deux sols sahariens, une sebkha et un forage pétrolier. Sur les 138 isolats sélectionnés sur la base de leurs propriétés morphologiques macroscopiques et microscopiques, 53 isolats capables de dégrader la caséine et/ou la gélatine sur milieu de culture solide ont été caractérisés par analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié. Suite à l'élimination des isolats clones, 28 souches ont été identifiées par séquençage et analyse bioinformatique de leurs gènes d'ARNr 16S. Ces souches appartiennent à 5 genres de bactéries thermophiles aérobies formant-endospores : *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus* et *Thermoactinomyces*. La caractérisation physiologique et biochimique de ces souches confirme la parenté avec ces genres.

Ensuite, les génomes de deux souches, *Geobacillus* Sah69 et *Thermoactinomyces* AS95, ont été caractérisés. La production de protéases extracellulaires putatives d'intérêt industriel a été révélée.

D'autre part, la biodiversité des sources géothermales de Debagh et de Ouled Ali a été étudiée par analyse métagénomique des séquences de la région V4 du gène ARNr 16S de l'ADN environnemental récolté depuis des échantillons de sédiments. Les communautés bactériennes aérobies thermophiles dominent les deux sites avec une présence minoritaire du phylum des *Firmicutes* et des genres aérobies formant-endospores ayant été isolés par méthodes culturales.

Enfin, le potentiel de production de protéases extracellulaires a été estimé quantitativement pour les 28 souches sélectionnées. L'étude des cinétiques de production et de l'effet des conditions de fermentation sur les souches sélectionnées, *Geobacillus* Sah69, *Thermoactinomyces* AS95 et *Brevibacillus* OA30, a été réalisée. Après extraction des surnageants, deux protéases, la métalloprotéase 32-F38 et la sérine-protéase 16-F39, ont été produites et purifiées à partir de la souche *Brevibacillus* OA30. Ces protéases étaient acides, thermoactives et présentaient une grande stabilité en présence du SDS, des solvants et des agents tensio-actifs testés. Révélant ainsi un bon potentiel d'applicabilité industrielle.

Mots clés : environnements chauds algériens, diversité, bactéries, thermophiles, protéases extracellulaires.