

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies

Agro-alimentaires (INATAA)

Département de Biotechnologie alimentaire

N° d'ordre :

Série :

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires

Option : Biotechnologie Alimentaire

*Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez
des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à
partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien*

Présenté par

GOMRI Mohamed Amine

Devant le jury composé de :

Président :	Pr. AGLI A.	Professeur	INATAA, UMC
Rapporteur :	Dr. KHARROUB K.	Docteur	INATAA, UMC
Examineurs :	Pr. KACEM CHAOUACHE N.	Professeur	Faculté des SNV, UMC
	Dr. BARKAT M.	Docteur	INATAA, UMC

Année universitaire 2011-2012

Remerciements

Je rends grâce à Dieu, le miséricordieux, le tout puissant, pour ce miracle appelé vie, que sa lumière nous guide vers lui, et que son nom soit l'élixir de nos peines et douleurs.

*Tout d'abord, je tiens à remercier Madame **KHARROUB Karima** pour m'avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance en moi et ses encouragements mais surtout pour sa générosité dans le travail, qu'elle trouve en ces mots toute ma gratitude.*

Mes remerciements sont adressés aux membres du Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

*Mr le professeur **AGLI** qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury*

*Mr le professeur **KACEM-CHAOUCH E** qui a eu l'amabilité de participer à ce Jury*

*Mme **BARKAT** qui a bien voulu examiner ce travail*

*Je tiens à remercier Mlle **AYAD Ryma**, Mesdames **ZOUBIRI Lamia** et **DJABALI Saliha**, Messieurs **ZOUAOUI Nassim**, **BOUGUERRA Ali**, **SLIMANI Zakaria** et **FARHAT Chouaib** pour leur aide inestimable, mais aussi pour leur amitié précieuse, qu'ils trouvent ici les plus sincères marques d'affection.*

*Je remercie également Mlle **HIMED Louiza**, Messieurs **CHEMACH Loucif**, **BENSALEM Adel**, **BOUASSLA Abdallah** et **BOUFEDECHE Amine** pour leurs conseils et leur disponibilité.*

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé au cours de la réalisation de cette étude : personnel et enseignants de l'INATAA, personnel d'Objectif Santé, et à tous les autres.

*Enfin, Merci à **Ma famille**...et surtout à mon père, Mr **GOMRI Achour**, lui qui continue de croire en moi malgré toutes les difficultés et tous les obstacles.*

TABLE DES MATIERES

	Page
Résumés	
LISTE DES ABREVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1. Place des thermophiles dans le monde extrêmophile.....	3
1. Extrêmophiles.....	3
1.1. Notions d'environnements extrêmes et d'extrémophilie.....	3
2. Thermophiles.....	5
2.1. Classification.....	5
2.2. Niches écologiques des thermophiles.....	5
2.2.1. Biotopes naturels.....	6
2.2.2. Biotopes artificiels.....	7
2.3. Diversité taxonomique et métabolique des thermophiles.....	8
2.3.1. <i>Eucarya</i>	10
2.3.2. <i>Bacteria</i>	11
2.3.3. <i>Archaea</i>	13
2.4. Grandes voies métaboliques des procaryotes thermophiles.....	14
2.4.1. Autotrophie.....	14
2.4.2. Hétérotrophie.....	15
2.4.3. Oxygène.....	15
2.5. Bases moléculaires de la thermophilie.....	16
2.5.1. Acides nucléiques.....	16
2.5.2. Protéines.....	18
2.5.3. Membrane cellulaire.....	19
2.5.4. Limite supérieure de la vie à haute température.....	20
2.5.5. Thermophiles et origine de la vie.....	21

Chapitre 2. Applications des thermophiles et de leurs biomolécules.....	23
1. Evolution des méthodes d'obtention des actifs biotechnologiques.....	23
1.1. Applications basées sur les cellules entières.....	23
1.1.1. Agents de minéralisation.....	23
1.1.2. Piles à combustible microbiennes.....	24
1.1.3. Production d'hydrogène.....	24
1.2. Applications basées sur les biomolécules.....	25
1.2.1. Enzymes.....	25
1.2.1.1. Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides.....	25
1.2.1.2. Enzymes produisant des sucres rares.....	31
1.2.1.3. Protéases.....	32
1.2.1.4. Lipases et estérases.....	33
1.2.1.5. Enzymes de manipulation des acides nucléiques.....	33
1.2.1.6. Autres enzymes.....	34
1.2.2. Solutés compatibles.....	35
1.2.3. Lipides et peptides.....	35
Chapitre 3. Taxonomie polyphasique.....	38
1. Taxonomie phénotypique.....	38
2. Taxonomie numérique.....	38
3. Taxonomie génotypique.....	39
MATERIEL ET METHODES	
1. Sources thermales étudiées.....	41
2. Echantillonnage.....	42
3. Isolement, purification et conservation des isolats.....	43
4. Souches témoin.....	43
5. Identification des isolats.....	43
5. 1. Caractérisations culturelle et cellulaire des isolats.....	44
5.2. Caractérisations physiologique et biochimique.....	44
5.2.1. Température, pH et NaCl.....	44
5.2.2. Utilisation de substrats carbonés.....	44
5.2.3. Utilisation du citrate.....	45
5.2.4. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron.....	45
5.2.5. Test Mannitol-Mobilité.....	45
5.2.6. Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	45
5.2.7. Caractérisation du type fermentaire.....	45
5.2.8. Recherche de la β -galactosidase.....	46
5.2.9. Recherche de l'uréase.....	46
5.2.10. Dégradation des acides aminés.....	46
6. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	47
6.1. Amylase.....	47
6.2. Protéases.....	47
6.3. Activités lipolytiques.....	47
6.4. Cellulase.....	48
7. Taxonomie numérique.....	48

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse physico-chimique des échantillons.....	50
2. Isolement et purification des isolats.....	51
3. Caractérisation phénétique des isolats.....	51
3.1. Caractérisation culturelle et morphologique.....	51
3.1.1. Aspect macroscopique.....	51
3.1.2. Aspect microscopique.....	54
3.2. Caractérisation physiologique des isolats.....	56
3.2.1. Température de croissance.....	56
3.2.2. Tolérance au NaCl et spectre de pH.....	56
3.2.3. Utilisation des substrats carbonés.....	57
3.3. Caractérisation biochimique des isolats.....	57
3.3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	57
3.3.2. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron.....	57
3.3.3. Test Mannitol-Mobilité.....	59
3.3.4. Caractérisation du type fermentaire.....	59
3.3.5. Recherche de la β -galactosidase.....	59
3.3.6. Recherche de l'uréase.....	59
3.3.7. Utilisation du tryptophane.....	59
3.3.8. Production de décarboxylases (LDC, ODC) et arginine dihydrolase (ADH).....	59
4. Profils des activités hydrolytiques extracellulaires des souches isolées.....	64
5. Taxonomie numérique.....	69
6. Discussion.....	74

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	79
---	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	81
---	-----------

ANNEXES

GLOSSAIRE

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Nom et prénom : **GOMRI Mohamed Amine**

Année universitaire : **2011-2012**

Thème : **Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien**

Nature du diplôme : **Magister en Sciences Alimentaires**

Option : **Biotechnologie Alimentaire**

Résumé

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles autochtones des environnements chauds tels que les sources thermales terrestres possèdent des capacités d'adaptations moléculaires intéressantes et constituent ainsi une importante source de molécules bioactives peu conventionnelles issues de mécanismes biochimiques et moléculaires uniques. Les enzymes hydrolytiques de ces organismes offrent des avantages majeurs et fournissent de nouvelles possibilités soit de l'amélioration ou de la création de nouveaux procédés biotechnologiques.

Dans la perspective d'étudier une partie de leur potentiel enzymatique, 83 souches bactériennes thermophiles aérobies ont été isolées à partir d'échantillons d'eau et de sédiments prélevés au niveau de plusieurs sites géothermaux répartis entre les régions de Guelma et de Ouargla situés respectivement au Nord-Est et au Sud-Est de l'Algérie.

Une caractérisation phénétique a été réalisée, et a permis d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces microorganismes et qui ont servi à une taxonomie numérique, qui a mené à la construction d'un dendrogramme. Quatre types d'activités hydrolytiques ont été recherchés par l'utilisation de sept différents substrats.

Les souches bactériennes forment des bâtonnets et des filaments à Gram positif, essentiellement, elles sont thermophiles modérées, aérobies et neutrophiles. L'analyse numérique a permis de les grouper en trois principaux phénons, clustérisés sur la base du pourcentage de similitude. Le screening des activités hydrolytiques a permis de trouver un ou plusieurs types d'hydrolases chez 77 isolats, les activités protéolytiques et amylolytique sont les plus rencontrées.

Mots clés: Screening, activités hydrolytiques, thermophiles, source thermales, taxonomie numérique

Screening for extracellular hydrolytic activities in thermophilic aerobic bacteria strains isolated from Algerian terrestrial hot springs

Abstract

Thermophilic and hyperthermophilic microorganisms inhabiting hot environments such as terrestrial hot springs have interesting molecular adaptation capacities and constitute an important source of bioactive molecules emerging from unique molecular and biochemical mechanisms. Hydrolytic enzymes of these organisms offer major advantages and give new possibilities to ameliorate existing processes or to create new ones.

With the purpose of studying some of their enzymatic potentials, 83 thermophilic, aerobic bacteria strains were isolated from water and sediment samples taken from different points divided between the regions of Guelma and Ouargla located in North-Eastern and South-Eastern of Algeria, respectively.

Phenotypic characterization has been realized, and allowed to obtain some morphological, biochemical and physiological proprieties of these microorganisms, these data led to realize a dendrogram by numerical taxonomy. Four types of hydrolytic activities were investigated by using seven different substrates.

Strains were generally rods and filaments, Gram positive in most cases; they were moderately thermophiles, aerobes and neutrophiles. Numerical analyses clustered them into 3 principal phenons, based on similarity between strains. Screening for hydrolytic activities led to find one or several types of hydrolases in seventy-seven strains, proteolytic and amylolytic activities were mostly found.

Key words: Screening, hydrolytic activities, thermophilic, hot springs, numerical taxonomy

البحث عن أنشطة اماهة لاخلوية (خارج الخلية) لدى سلالات بكتيرية هوائية محبة للحرارة معزولة من ينابيع حارة
جزائرية

ملخص

الكائنات المجهرية المحبة للحرارة (الترموفيلية) والجد محبة للحرارة (هيبترموفيلية) والتي تتخذ من البيئات الحارة موطنها طبيعيا لها-كاليينابيع المعدنية الساخنة- تملك القدرة على التكيف الجزيئي وتشكل بالتالي مصدرا هاما للجزيئات ذات النشاط الحيوي المسؤولة عن ميكانيزمات جزيئية و بيوكيميائية استثنائية. إنزيمات الاماهة لهاته الكائنات تملك مقومات معتبرة من حيث أنها تمنح الإمكانيّة لتحسين العمليات التكنولوجية الحيوية أو استحداث اخرى جديدة.

بههدف دراسة بعض من قدراتها الإنزيمية، تم عزل 83 سلالة بكتيرية هوائية محبة للحرارة من عينات ماء و رواسب تم جمعها من عدة ينابيع حارة متواجدة على مستوى منطقتي قالمة و ورقلة الواقعتين في الشمال الشرقي والجنوب الشرقي من الجزائر.

دراسة الخصائص الظاهرة لهاته السلالات سمحت بتحديد بعض خصائصها المورفولوجية، البيوكيميائية و الفيزيولوجية، هاته المعطيات سمحت بتجميع السلالات حسب نسبة تشابهها، باستعمال التصنيف الرقمي ، كما تم البحث عن أربعة أنواع من إنزيمات الاماهة باستخدام سبعة مركبات مختلفة.

نتائج الدراسة بينت ان معظم السلالات المعزولة عبارة عن عصيات و بكتيريا خيطية من النوع جرام ايجابي ، التصنيف الرقمي سمح بتقسيم السلالات إلى ثلاثة أقسام تصنيفية رئيسية. البحث عن أنشطة إنزيمية لاخلوية أفضى إلى اكتشاف نوع أو أكثر من هاته الإنزيمات لدى سبعة و سبعين سلالة. تحليل النشاء والبروتين كانت أكثر النشاطات الإنزيمية المصادفة.

الكلمات المفتاح: بحث، أنشطة الاماهة، محبة للحرارة، الينابيع الحارة، التصنيف الرقمي

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC: ATP-Binding Cassette
ADH : Arginine Dihydrolase
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AI: Arabinose Isomérasés
ARN : Acide RiboNucléique
ATCC: American Type Culture Collection
C: Cytosine
CE: Enzyme Commission
CGTase: Cyclodextrine Glucosyltransférases
CHU: Centre Hospitalo-Universitaire
CMC : CarboxyMethylCellulose
Db: Debagh
DIP: Di-myo-Inositol-1,19-Phosphate
DPGc: 2,3-DiPhosphoGlycérate cyclique
DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
G: Guanine
HFCS: High Fructose Corn Syrup
Kb: Kilobase
MPa: Mega Pascal
NiFe-hydrogénase: Nickel-Iron hydrogénase
LDC: Lysine Décarboxylase
OA: Ouled Ali
OTU: Operational Taxonomic Units
ODC: Ornithine Décarboxylase
PCR: Polymerase Chain Reaction
SCP: Single Cell Proteins
SM: Sidi Mahdi
S_J: Jaccard Similarity index
S_{SM} : Simple Matching Similarity
TSI: Triple Sugar Iron
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Terminologie des extrémophiles en fonction de la température et du pH.....	4
Figure 2. Exemples de biotopes naturels des thermophiles.....	7
Figure 3. Communautés microbiennes du parc national de Yellowstone.....	11
Figure 4. Limites supérieures de température pour le métabolisme énergétique.....	15
Figure 5. Procaryotes thermophiles et hyperthermophiles.....	21
Figure 6. Arbre phylogénétique universel basé sur les petites sous unités de l'ARN ribosomal.....	22
Figure 7. Structures et sites simplifiés d'attaque enzymatique sur la lignocellulose.....	27
Figure 8. Présentation schématique de l'action des enzymes amylolytiques et pullulytiques...	30
Figure 9. Localisation des trois sources thermales étudiées sur la carte.....	41
Figure 10. Sources hydrothermales de Guelma et de Touggourt.....	41
Figure 11. Aspects macroscopiques des souches isolées cultivées sur le milieu de culture 1..	52
Figure 12. Observation au microscope photonique à l'immersion (x100).....	54
Figure 13. Exemples d'activités hydrolytiques détectées.....	65
Figure 14. Effectifs des souches ayant pu hydrolyser les polymères testés.....	66
Figure 15. Effectifs des souches ayant pu hydrolyser les polymères tests selon leur origine d'isolement.....	67
Figure 16. Répartition des souches étudiées par type et fréquence de production des hydrolases extracellulaires.....	69
Figure 17. Dendrogramme simplifié basé sur le coefficient « Simple Matching » (S_{SM}) montrant les relations phénotypiques entre les 83 isolats et les 22 souches de référence.....	72

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1. Produits potentiels des microorganismes extrêmophiles.....	5
Tableau 2. Exemples de la diversité métabolique des thermophiles.....	9
Tableau 3. Principaux facteurs responsables de la thermostabilité des acides nucléiques	17
Tableau 4. Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (annexe 1)	
Tableau 5. D'autres exemples d'applications des thermophiles, et de leurs biomolécules.....	37
Tableau 6. Composition ionique des eaux des sources thermales étudiées (annexe 2)	
Tableau 7. Milieux utilisés pour l'isolement, la purification et la conservation des souches (annexe 3)	
Tableau 8. Résultats des essais réalisés avec les souches tests (annexe 3)	
Tableau 9. Milieux utilisés pour la caractérisation physiologique et biochimique (annexe 3)	
Tableau 10. Milieux utilisés pour la recherche des activités hydrolytiques extracellulaires (annexe 3)	
Tableau 11. Souches de références utilisées pour la taxonomie numérique.....	49
Tableau 12. Caractères phénétiques des souches de référence utilisées pour la taxonomie numérique (annexe 4)	
Tableau 13. Valeurs de température et de pH enregistrées au niveau des points de prélèvements d'eau.....	50
Tableau 14. Répartition des isolats par origine et par milieu de culture utilisé.....	53
Tableau 15. Caractérisation culturelle et cellulaire des isolats.....	55
Tableau 16. Caractérisation physiologique des isolats.....	58
Tableau 17. Utilisation des substances organiques.....	60-61
Tableau 18. Caractérisation biochimique des isolats.....	62-63
Tableau 19. Activités hydrolytiques des souches étudiées.....	67
Tableau 20. Fréquences des principaux caractères positifs pour chaque cluster exprimées en pourcentages calculés pour chaque test.....	72-73

Introduction

L'accélération du développement des sociétés humaines et par conséquent des demandes en matières premières, en produits et biens de consommation a accentué cette exigence exercée sur les chercheurs afin d'innover de nouveaux procédés de production et d'améliorer les processus déjà existant. La biotechnologie a apporté à cette problématique des outils de développement indispensables aujourd'hui pour l'industrie et la recherche fondamentale là où les méthodes de chimie seules peinent à satisfaire les exigences environnementales et à assurer la rentabilité des procédés.

L'intérêt grandissant porté aux organismes extrêmophiles et aux applications biotechnologiques qu'ils recèlent tient beaucoup au fait qu'il s'agit d'une nouvelle frontière à explorer. En outre, les extrêmophiles nous amènent à réviser les connaissances de base en biologie. Ceci explique pourquoi le nombre d'études sur les microorganismes extrêmophiles ne cesse d'augmenter. Ces organismes « exotiques » se sont adaptés à vivre à des températures de plus de 100°C, à de basses températures au fond des mers polaires froides, à des pressions allant jusqu'à 110 MPa en mer profonde, à des valeurs très basses ou élevées de pH (pH 0-1 ou pH 10-11), ou à des concentrations très élevées en NaCl (35 %, p/v). De récents développements prouvent clairement que les composants cellulaires des archées et des bactéries extrêmophiles sont uniques et fournissent une source valable de nouveaux biocatalyseurs et composés. Beaucoup d'enzymes industrielles sont exigées pour fonctionner dans des conditions extrêmes, il y a également une demande de plus en plus croissante en biocatalyseurs stables, utilisables en biotechnologie moderne. On s'attend à ce que les extrêmophiles et donc leurs composants cellulaires, jouent un rôle important dans les industries de produits chimiques, alimentaires, pharmaceutiques, de papier et de textiles mais aussi en biotechnologie environnementale (Horvath et Horvath, 2002).

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe ainsi des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sols désertiques et surtout les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment qu'on a commencé à s'intéresser aux microorganismes habitants ces environnements locaux et les publications concernant le sujet sont encore très rares (Kecha *et al.*, 2007 ; Bouanane-Darenfed *et al.*, 2011).

Pourtant l'étude des microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles indigènes à ces milieux hostiles à la vie peut aider à mieux exploiter cette importante source de molécules bioactives à des températures nettement plus élevées que celles d'organismes conventionnels, en particulier leurs enzymes.

Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles aérobies hétérotrophes ont été isolées de plusieurs environnements et jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique (Pinzón-Martínez *et al.*, 2010). Les enzymes produites par ces organismes sont extrêmement thermoactives, rigoureusement thermostables ayant même des activités à des températures dépassant les températures maximales de croissance de leurs organismes. Elles résistent souvent aux dénaturants chimiques tels que les détergents, les solvants organiques et les valeurs extrêmes de pH (Antranikian *et al.*, 2005). Exécuter des processus biotechnologiques à températures élevées a plusieurs avantages : (i) l'élévation de la température est accompagnée par une réduction des risques de contamination, (ii) une viscosité réduite, et un coefficient de diffusion des composés organiques plus élevé, (iii) une augmentation de la biodisponibilité, (iv) une solubilité des composés organiques et un taux de réaction améliorés (Niehaus *et al.*, 1999 ; Antranikian *et al.*, 2005). Comme conséquence, l'intérêt pour l'isolement et la caractérisation des procaryotes thermophiles et de leurs enzymes est de plus en plus accentué dans la perspective d'augmenter leurs applications industrielles. Dans le domaine alimentaire, ces enzymes sont d'un grand intérêt. Des exemples comme les amylases, les protéases, les lipases et d'autres hydrolases comme les cellulases, les chitinases thermostables ont déjà trouvés des débouchés d'utilisation (Antranikian *et al.*, 2008).

Le principal objectif de ce travail est un screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des bactéries thermophiles aérobies isolées de sources chaudes terrestres algériennes. Cette étude est structurée en trois parties initiées par une revue bibliographique traitant des microorganismes thermophiles, leur écologie, leur adaptation aux conditions extrêmes qui suscitent l'intérêt biotechnologique, s'ensuivra alors un exposé des différentes applications des thermophiles et de leurs molécules en industrie alimentaire et ailleurs. Les techniques taxonomiques utilisées en bactériologie sont également évoquées en fin de cette partie. La seconde partie traite de la méthodologie suivie pour l'isolement et la caractérisation phénétique des souches bactériennes étudiées, de la mise en évidence des activités enzymatiques (hydrolytiques) extracellulaires, et les méthodes statistiques utilisées dans la taxonomie numérique. Enfin, la troisième partie expose les résultats obtenus et leur discussion, suivie par une conclusion générale et des perspectives.

Revue Bibliographique

Chapitre 1. Place des thermophiles dans le monde extrêmophile

1. Extrêmophiles

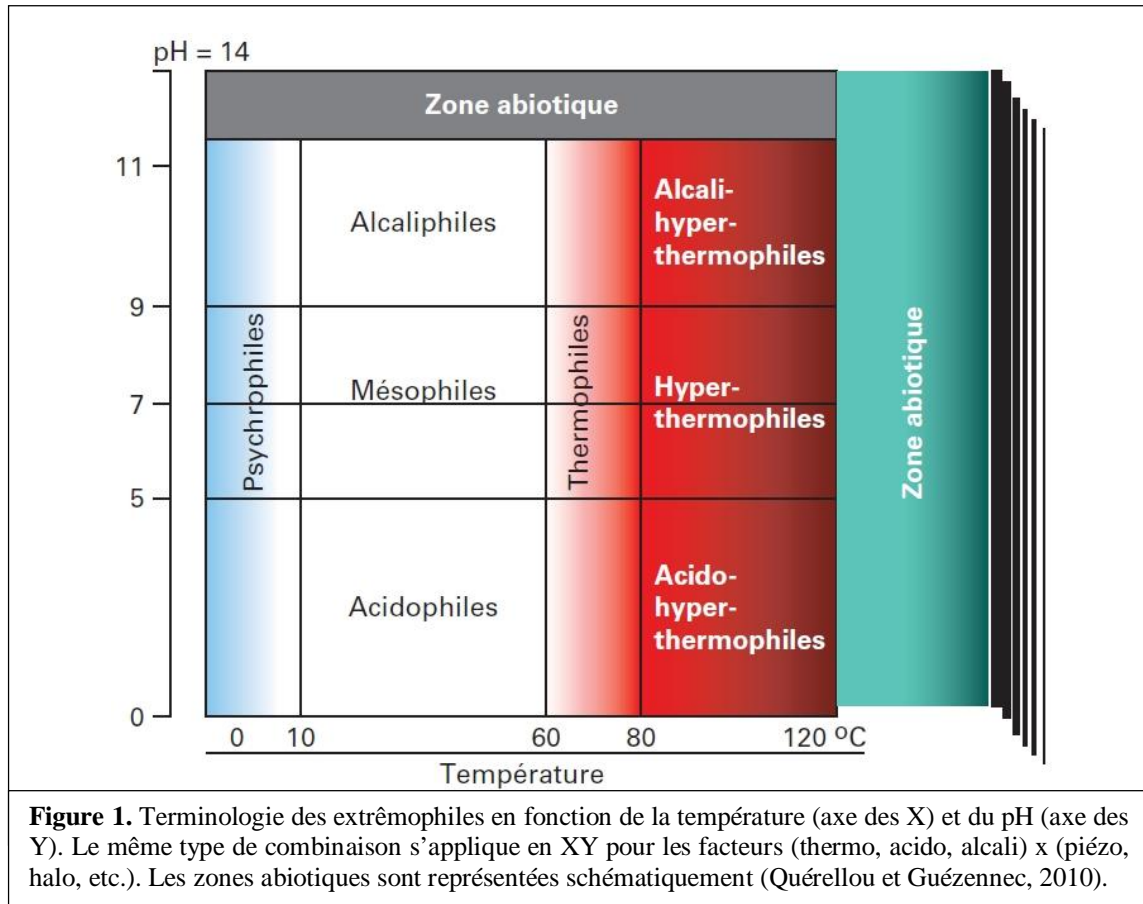
1.1. Notions d'environnements extrêmes et d'extrémophilie

La croissance et la survie des organismes sont commandées par une série de facteurs physiques et chimiques, tous les deux biotique et abiotique. Un biotope pour un organisme est défini par un intervalle pour chacun de ces différents facteurs environnementaux. C'est donc un espace à n-dimensions, avec des limites supérieures et inférieures pour chacun des facteurs de croissance. Pour pouvoir définir un environnement extrême il faudrait d'abord définir ce qu'est un environnement non-extrême ou normal. Pour cela, un consensus général établit les facteurs physiques et chimiques les plus importants pour un environnement normal. Ces facteurs se situeraient approximativement à des valeurs de température de 4 à 50°C, de pH de 5 à 8,5 et de salinité entre celle de l'eau douce et celle de l'eau de mer (3,5%, p/v). Loin des environnements normaux, la diversité d'espèces diminue et le stress environnemental augmente. Les facteurs de stress environnemental sont habituellement additifs, l'augmentation d'un facteur, augmente la susceptibilité de l'organisme envers d'autres facteurs. Il y a plusieurs facteurs biotiques qui déterminent la croissance des organismes mais les plus importants sont probablement les sources d'énergie et de nutriments, leur disponibilité, et les capacités métaboliques individuelles (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).

Un extrêmophile est considéré comme étant un organisme dont les conditions de croissance optimales sont situées en dehors des environnements qualifiés de normaux (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995). MacElroy (1974) a mentionné pour la première fois le terme "de limite extrêmophile", mais les définitions d'extrême et d'extrêmophile sont naturellement anthropocentriques. Beaucoup d'organismes peuvent se développer dans des conditions extrêmes, mais pas nécessairement de façon optimale; ces organismes sont définies comme extrêmotrophes.

Le terme extrêmophile est le plus souvent employé pour rapporter des organismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des *Archaea*. Egalement, plusieurs termes sont utilisés pour décrire les extrêmophiles et les extrêmotrophes et des sous-définitions existent pour les organismes modérément-extrêmes, extrêmes et hyper extrêmes. Ces définitions se focalisent sur une unique extrémophilie environnementale mais beaucoup d'extrêmophiles peuvent être classés sous plusieurs catégories, on parle souvent de polyextrémophilie en sachant qu'un environnement est souvent caractérisé par deux, voire plusieurs paramètres extrêmes (Horikoshi et Bull, 2011). Parmi les microorganismes qualifiés d'extrêmophiles, on rencontre ceux qui vivent en présence de fortes concentrations de sel

(halophiles), ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), et/ou dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles) ou sous pressions élevées (piézophiles) (Figure 1).



1.2. Intérêt biotechnologique des extrêmophiles

Les extrêmophiles 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 leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. Les propriétés singulières de certaines de ces biomolécules suscitent de ce fait l'intérêt des chercheurs (Quéréllou et Guézennec, 2010).

L'étude des extrêmophiles fournit de nouvelles clefs à la compréhension des processus de la vie dans des conditions extrêmes et démêle les mécanismes développés par les systèmes biologiques afin d'y faire face. Ces connaissances acquises sont par la suite employées pour développer de nouveaux bioproduits et bioprocédés dans divers champs tels que les industries de produits chimiques, pharmaceutiques, de produits de beauté, de textile, de papier et alimentaire (Antranikian, 2009) (Tableau 1).

Tableau 1. Produits potentiels des microorganismes extrêmophiles (Horikoshi et Bull, 2011).

Environnements extrêmes		T° élevée	T° basse	Pression élevée	Salinité élevée	Alcalinité élevée	Acidité élevée
Produits Thérapeutiques	Antibactériens	+	+	+	+	+	+
	Antifongiques	+	-	+	-	-	-
	Antiparasitaires	-	-	+	-	+	-
	Antitumoraux	+	+	+	-	+	+
Divers*		+	-	+	+	+	+
Biocatalyseurs	Carbohydrolases	+	+	-	+	+	+
	Protéases	+	+	-	+	+	-
	Lipases	+	+	-	+	+	+
	Autres	+	+	-	-	-	+

T°, température ; *, anti-salissures, anti-inflammatoires, antioxydants, pigments, acides gras polyinsaturés, cyclodextrines, biopolymères, osmolytes, etc.

2. Thermophiles

2.1. Classification

La température est une variable importante de chaque écosystème. Pour cette raison, la classification des organismes vivants sur la base de leur température optimale de croissance est considérée comme un aspect fondamental de la taxonomie microbiologique (Wiegel et Canganella, 2001).

La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles, sont des organismes vivants à des températures optimales de croissance comprises entre 50 et 80°C, les hyperthermophiles ont des optima au-dessus de 80 °C. 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. La frontière hyperthermophile est arbitraire mais sépare les organismes qui se développent aux températures élevées. Les hyperthermophiles sont également caractérisés par la présence de la gyrase reverse, une enzyme responsable de la stabilisation de l'ADN bicaténaire aux températures élevées (Holden, 2009).

2.2. Niches écologiques des thermophiles

Les biotopes les plus communs dans lesquels vivent les thermophiles sont d'origine géothermique généralement associés à des zones tectoniques actives mais on les trouve également dans des biotopes chauds artificiels (Calteau, 2005).

2.2.1. Biotopes naturels

Les environnements naturellement chauffés sont distribués entre les sites volcaniques terrestres (y compris les solfatares), les sources hydrothermales terrestres, les systèmes hydrothermiques sous-marins (sédiments, volcans submersibles, fumerolles, et passages), les sites souterrains, tels que les réserves de pétrole, et les sols chauffés par le soleil (Oshima et Moriya 2008) (Figure 2).

❖ Biotopes marins

Les biotopes marins des thermophiles sont les systèmes hydrothermaux localisés dans les zones côtières, les profondeurs abyssales, et au niveau des montagnes sous-marines actives comme Teahicya et Macdonald en Polynésie (Huber *et al.*, 2000). Ces écosystèmes sont caractérisés par de fortes concentrations en sel (environ 3%, p/v), et par des valeurs de pH variant de faiblement acides à faiblement alcalines (pH 5,0-8,5). Dans les zones volcaniques actives, de grandes quantités de vapeur contenant du dioxyde de carbone, du sulfure d'hydrogène et des quantités variables d'hydrogène, de méthane, d'azote, de monoxyde de carbone et des traces d'ammonium et de nitrate sont produites (Huber *et al.*, 2000). De plus, les composés soufrés majeurs présents dans les zones marines chaudes sont le soufre, le thiosulfate et le sulfate.

Il existe des systèmes hydrothermaux côtiers dans plusieurs régions du monde : Italie, Açores, Indonésie, Islande, etc. Les systèmes hydrothermaux océaniques quant à eux sont localisés au niveau des zones de fractures tectoniques. Au niveau des cheminées des fumeurs noirs, les émissions sont composées de fluide hydrothermal presque pur et peuvent atteindre une température de 350°C. Le long des parois des fumeurs, il existe un gradient de température dû au refroidissement par l'eau de mer à 3°C. Les thermophiles sont isolés dans la paroi poreuse des fumeurs et dans les sédiments chauds des alentours (Huber *et al.*, 2000).

❖ Biotopes terrestres

Dans les systèmes terrestres, lorsque l'eau surchauffée approche de la surface, la pression baisse et l'eau est projetée comme des jets ou bulles d'eau chaude connus sous le nom de geysers. Les systèmes thermiques terrestres sont retrouvés dans beaucoup d'endroits autour du monde (en Islande, dans le Parc de Yellowstone aux Etats-Unis, en Nouvelle-Zélande, au Japon, en Algérie, etc.) (Figure 2). Leur composition en minéraux, en nutriments et leur concentration en gaz diffèrent considérablement, le pH varie de 1 à 10. Par conséquent, les

communautés microbiennes habitant ces régions thermiques très variées par leurs conditions physiques et géochimiques sont également très diversifiées (Ferrera et Reysenbach, 2007).

Il existe sur le territoire algérien plus de 240 sources thermales, 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). Les températures mesurées à l'émergence varient de 22°C à 98°C (Kedaid, 2007 ; Saibi, 2009). 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 Meskhoutine (98°C) pour la région Est. Dans la région Sud, certaines sources chaudes dépassent parfois les 50°C (Saibi, 2009).

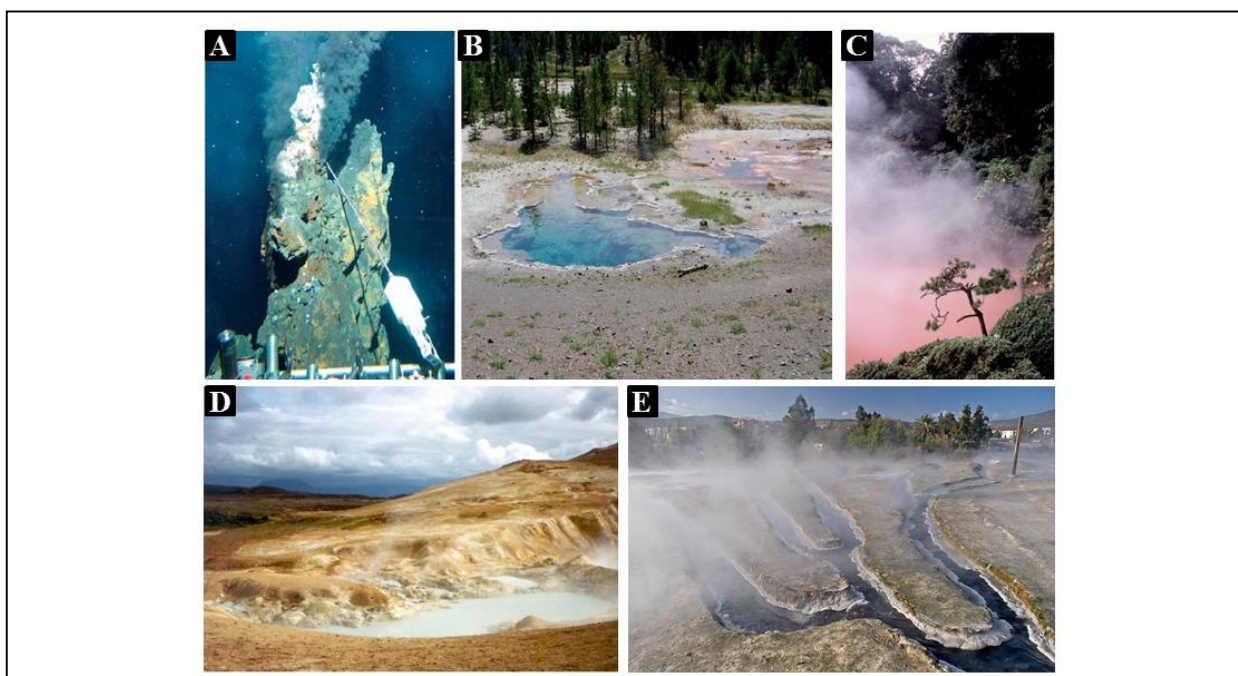


Figure 2. Exemples de biotopes naturels des thermophiles. **A.** Cheminée d'un passage hydrothermique sous-marin du Pacifique ; **B.** Octopus Spring, parc national de Yellowstone, Etats-Unis ; **C.** Sources chaudes, Beppu, Kyushu, Chine ; **D.** Sources chaudes, Krafla, N'amskard, Islande ; **E.** Source chaude, Meskhoutine, Guelma, Algérie [A-B (Ferrera et Reysenbach, 2007) ; C-D (Calteau, 2005) ; E (la présente étude)].

2.2.2. Biotopes artificiels

Les thermophiles habitent également les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puits et forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs (Ferrera et Reysenbach, 2007).

2.3. Diversité taxonomique et métabolique des thermophiles

Les thermophiles sont métaboliquement divers et incluent des phototrophes, des chimiotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes (Tableau 2). Dans les passages hydrothermiques sous-marins, les fluides hydrothermiques contiennent des gaz tels que le CO₂, et des éléments minéraux oxydo-réducteurs (H₂S, S, Fe²⁺) utiles pour les chimiolithotrophes. Les hétérotrophes sont également présents, prospérant sur le carbone organique produit dans cet écosystème. La lumière atteint les environnements hydrothermiques terrestres et marins peu profonds, ce qui rend possible le développement des phototrophes (Ferrera et Reysenbach, 2007).

Toutefois, il serait important de signaler que jusqu'à pas longtemps, l'abondance relative d'archées et de bactéries dans les environnements à hautes températures, a été principalement étudiée par des approches culturelles. Et en raison de l'isolement fréquent d'archées, il a été supposé que ces dernières dominent ces biotopes. Cependant, les méthodes moléculaires ont montré l'abondance des communautés bactériennes. Par ailleurs, une grande proportion des séquences détectées ne possèdent aucun représentant cultivé (Antranikian *et al.*, 2005).

Tableau 2. Exemples de la diversité métabolique des thermophiles (Ferrera et Reysenbach, 2007).

Processus	Source d'énergie	Source de carbone	Donneur d'électrons	Accépteur d'électrons	Exemples
Photosynthèse anoxygénique	Lumière	CO ₂	H ₂ S, S, S ₂ O ₃ ²⁻	CO ₂	<i>Thermochromatium</i> , <i>Chloroflexus</i>
Photosynthèse oxygénique	Lumière	CO ₂	H ₂ O	CO ₂	Algues et cyanobactéries, <i>Cyanidium</i> , <i>Synechococcus</i>
Oxydation du soufre	Chimique	CO ₂	H ₂ S, S, S ₂ O ₃ ²⁻	O ₂ , NO ₃ ⁻	<i>Aquificales</i> , certaines Epsilonproteobactéries
Oxydation du fer	Chimique	CO ₂	Fe ²⁺	NO ₃ ⁻	<i>Ferroglobus</i>
Réduction du Fer	Chimique	CO ₂	H ₂	Fe ³⁺	<i>Pyrobaculum</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Thermotoga</i>
Oxydation organique	Chimique	Organique	[CH ₂ O] _n	O ₂	Moisissures, <i>Thermus</i> , <i>Thermoplasma</i> , <i>Pyrobaculum</i> , <i>Rhodothermus</i> , <i>Picrophillus</i>
Oxydation de l'hydrogène	Chimique	CO ₂	H ₂	O ₂ , S	<i>Aquificales</i> , certaines Epsilonproteobactéries
Dénitrification	Chimique	CO ₂	H ₂	NO ₃ ⁻	<i>Aquifex</i> , <i>Persephonella</i> , <i>Ammonifex</i> , <i>Ferroglobus</i> , <i>Pyrobaculum</i> , <i>Pyrolobus</i>
Réduction du soufre	Chimique	Organique/ CO ₂	H ₂ , [CH ₂ O] _n	S	<i>Thermococcales</i>
Réduction du sulfate	Chimique	Organique/ CO ₂	H ₂ , [CH ₂ O] _n	SO ₄ ²⁻	Certaines Deltaproteobactéries, <i>Archaeoglobus</i>
Méthanogénèse	Chimique	Organique/ CO ₂	H ₂ , [CH ₂ O] _n	CO ₂	Méthanogènes, <i>Methanocaldococcus</i>
Fermentation	Chimique	Organique	[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	Moisissures, bacilles, <i>Clostridia</i> , <i>Thermococcales</i>

2.3.1. *Eucarya*

La thermophilie chez les eucaryotes n'est pas aussi extrême que chez les procaryotes. En général, les animaux multicellulaires et les plantes ne tolèrent pas des températures dépassant 50°C, et seules quelques espèces de mycètes et d'algues ont la capacité de prospérer à des températures modérément élevées (~60°C) (Gomes et Steiner, 2004 ; Ferrera et Reysenbach, 2007).

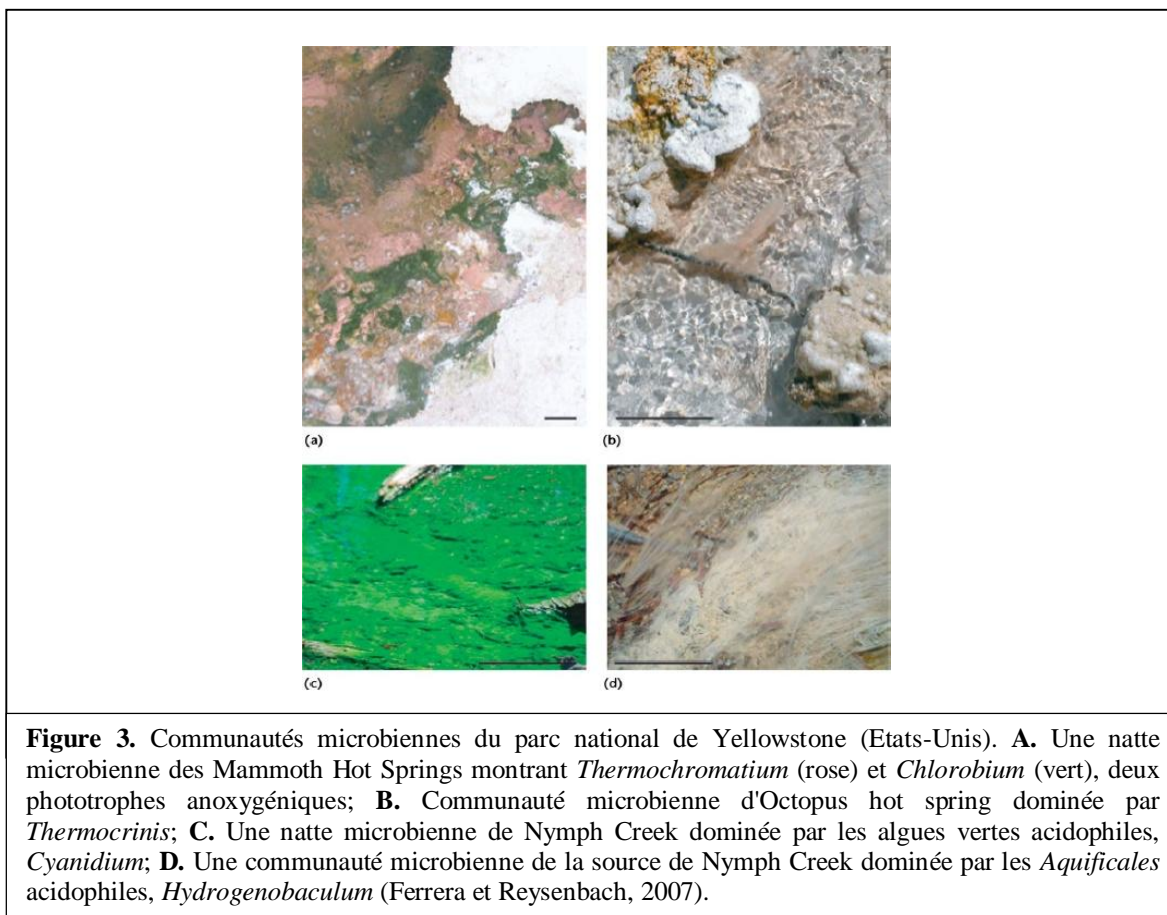
Le premier mycète faiblement thermophile *Mucor pusillus* a été isolé, il y a plus d'un siècle. Depuis, de nouvelles espèces fongiques thermophiles modérées (~62°C) ont été décrites. Elles ont été isolées d'environnements terrestres tels que les accumulations de matière organique où la chaleur, l'humidité et l'aérobiose fournissent les conditions de base pour leur développement. Dans ces environnements, les mycètes thermophiles seraient impliqués dans la minéralisation du carbone organique. Ainsi, dans le compost, ils succèdent aux mésophiles lorsque le compost se réchauffe où ils sont responsables de la dégradation des polysaccharides, essentiellement de la cellulose. Dans les sources hydrothermales terrestres, l'espèce *Dactylaria gallopava*, est souvent associée à l'algue acidophile, *Cyanidium*. Egalement, des espèces d'algues rouges unicellulaires thermophiles (*Cyanidium caldarium*, *Galdiera* sp. et *Cyanidiochyzon* sp.) ont été isolées d'environnements chauds et acides d'Amérique du Nord, d'Islande, d'Italie, du Japon, d'Indonésie et de la Nouvelle Zélande. Généralement, la température maximale pour la croissance des algues est autour de 60°C. Souvent ces organismes apparaissent comme l'unique groupe photosynthétique et oxygénique des bassins acides (pH < 5), où les cyanobactéries sont généralement absentes (Figure 3) (Ferrera et Reysenbach, 2007).

2.3.2. *Bacteria*

Les microorganismes thermophiles du domaine *Bacteria* peuvent prospérer à des températures supérieures à 80°C et incluent des phototrophes, des chimiolithotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes (Madigan *et al.*, 2010).

❖ Bactéries thermophiles phototrophes

Au sein des cyanobactéries, on trouve des espèces thermophiles prospérant à des températures relativement élevées (jusqu'à 74°C) et constituant ainsi l'unique groupe de phototrophes thermophiles. Ainsi *Synechococcus lividus* forme des nattes microbiennes épaisses aux températures variant de 60 à 74°C, souvent, en coexistence avec des bactéries photosynthétiques anaérobies comme *Chloroflexus* (Ferrera et Reysenbach, 2007).



D'autres photoautotrophes anoxygéniques, sont également retrouvés dans les sources thermales (Figure 3). Dans les environnements thermiques contenant du soufre, ces organismes oxydent cet élément en sulfure, qui est ensuite accumulé à l'intérieur de la cellule (*Proteobacteria*) ou à l'extérieur (*Chlorobi*), qui sera plus tard oxydé en sulfate. Des membres d'*Epsilonproteobacteria* et d'*Aquificales* fixent le CO₂ par le cycle des acides tricarboxyliques inversé. Les *Epsilonproteobacteria* sont généralement omniprésents dans beaucoup de cavernes terrestres et d'environnements marins, et particulièrement, dans les passages sous-marins profonds. À noter que la majorité des séquences d'ARNr 16S affiliées à ce groupe ont été récupérées à partir d'échantillons environnementaux. Les *Epsilonproteobacteria* sont modérément thermophiles (croissance au-dessous de 60°C) et souvent comme épibiontes des animaux des passages sous-marins (Ferrera et Reysenbach, 2007).

❖ Bactéries thermophiles chimiolithoautotrophes

Le groupe des chimiolithoautotrophes est représenté par l'ordre des *Aquificales*, répandu au niveau des passages sous-marins peu profonds, abyssaux et des sources thermales

terrestres. Ils utilisent l'hydrogène, le soufre et le thiosulfate comme donneurs d'électrons et l'oxygène et/ou les nitrates comme accepteurs d'électrons. Quelques membres de cet ordre peuvent également croître sur des composés organiques (Nakagawa *et al.*, 2005).

Dans les systèmes terrestres, les *Aquificales* constituent la composante principale (jusqu'à 95%) de la communauté microbienne (Figure 3).

Bien que la plupart de bactéries ayant été rapporté à partir des passages hydrothermiques appartiennent aux *Epsilonproteobacteria*, aux *Thermales*, aux *Thermotogales* et aux *Aquificales*, des *Gammaproteobacteria* et des *Thermodesulfobacteriales* sont également retrouvées dans ces écosystèmes (Ferrera et Reysenbach, 2007).

❖ Bactéries thermophiles hétérotrophes

La plupart des bactéries thermophiles isolées jusqu'à présent sont des hétérotrophes. Ils incluent les souches les plus thermophiles des sources hydrothermales abyssales appartenant aux genres *Thermotoga*, *Thermosipho* et *Marinitoga* (ordre des *Thermotogales*). Les températures optimales de ces microorganismes se situent vers 80°C. Les espèces du genre *Thermotoga* sont fermentatives et se développent mieux dans des conditions anaérobies en utilisant le thiosulfate comme accepteur final d'électrons (Ferrera et Reysenbach, 2007).

Des représentants de la classe des *Deltaproteobacteria* ont également été isolés d'écosystèmes thermiques. Ce sont des sulfato-réductrices qui utilisent des composés organiques comme donneurs d'électrons (*Desulfacinum hydrothermale*, *Thermodesulforhabdus norvegicus*) ou se développent en autotrophie avec H₂ et CO₂ comme donneurs d'électrons (*Desulfacinum infernus*) (Holden, 2009).

Des espèces thermophiles hétérotrophes aérobies appartenant au groupe *Thermus-Deinococcus* telles que les espèces de *Marinithermus*, *Oceanithermus*, *Thermus* et *Rhodothermus* ont été isolées des sources thermales terrestres, des passages hydrothermiques marins profonds, peu profonds et de composts (Mori *et al.*, 2004 ; Ferrera et Reysenbach, 2007).

Au sein des bactéries à Gram positif des espèces thermophiles sporulées appartenant à l'ordre des *Bacillales* et des *Clostridiales* ont été décrites. Elles sont responsables de la dégradation de la matière organique dans la plupart des environnements à températures modérément élevées. Très souvent, ces bactéries sont également acidophiles ou alcaliphiles (Ferrera et Reysenbach, 2007).

L'ordre des *Bacillales* regroupe les membres thermophiles aérobies appartenant aux genres *Geobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*,

Caldalkalibacillus, *Sulfobacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus*, et *Vulcanibacillus* (Logan et Allan, 2008 ; Cihan *et al.*, 2011; Tokuda, 2007). Egalement, suite à des études phylogénétiques du gène de l'ARNr 16S, la famille des *Thermoactinomycetaceae* a été remplacée par Matsuo *et al.* (2006) dans cet ordre. Elle est composée de genres thermophiles (*Thermoactinomyces*, *Laceyella*, *Planifilum*, *Thermoflavimicrobium*) (Goodfellow et Jones, 2009; Von Jan *et al.*, 2011).

Des représentants thermophiles aérobies de l'ordre des *Actinomycetales* ont été décrits. Ils appartiennent principalement aux genres *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Thermobifida*, et *Thermomonospora* (Uzel *et al.*, 2011).

2.3.3. Archaea

De nombreuses espèces cultivables thermophiles et hyperthermophiles appartiennent aux deux principaux phyla (ou règnes) du domaine *Archaea*: les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota*. Le premier comporte des groupes physiologiques divers, parmi lesquels les méthanogènes producteurs de méthane. Alors que le second contient les thermophiles les plus extrêmes dont l'isolat 121, capable de croître entre 85°C et 121°C (Kashefi et Lovley, 2003). L'existence d'un troisième phylum qui regroupe des espèces non cultivables, appelé *Korarchaeota* a été décrite (Barns *et al.*, 1996). Il a été mis en évidence par l'analyse des séquences des gènes codant l'ARNr 16S à partir d'échantillons de sédiments de sources chaudes (Gomes et Steiner, 2004 ; Gregoire *et al.*, 2009). Le phylum *Nanoarchaeota* a été proposé par Huber *et al.* (2002), incluant le plus petit organisme hyperthermophile, *Nanoarchaeota equitans* vivant en symbiose avec certaines *Crenarchaeota* des fumeurs noirs (Das *et al.*, 2006 ; Holden, 2009).

❖ *Crenarchaeota*

Au sein de ce règne, les ordres des *Thermoproteales* et des *Sulfolobales* sont spécifiques des habitats thermophiles terrestres alors que les *Desulfurococcales* colonisent les habitats volcaniques sous-marins. Les *Desulfurococcales* se développent en autotrophie en oxydant l'hydrogène et en réduisant le soufre, le thiosulfate, le nitrate ou le nitrite, ou en hétérotrophie par l'intermédiaire de la respiration ou de la fermentation des substrats organiques. *Aeropyrum* est le seul genre aérobie strict décrit au sein de cet ordre (Sako *et al.*, 1996). Les *Sulfolobales* sont extrêmement acidophiles et la plupart des espèces sont impliquées dans l'oxydation du soufre en acide sulfurique. *Acidianus* et *Sulfolobus* peuvent également oxyder le fer ferreux, et

seuls quelques membres des *Thermoproteales* se développent en aérobiose (Ferrera et Reysenbach, 2007).

❖ *Euryarchaeota*

Les méthanogènes ou *Methanoarchaea* hyperthermophiles appartiennent principalement à l'ordre des *Methanococcales*. Les membres de cet ordre ont été isolés d'environnements hydrothermaux sous-marins (*Methanocaldococcus*, *Methanopyrus*) ou terrestres (*Methanothermus*). Ils utilisent le dioxyde de carbone (ou les composés C-1 comme l'acétate) et oxydent l'hydrogène en produisant du méthane. A l'opposé, les espèces de l'ordre des *Methanosarcinales* préfèrent utiliser des substrats méthyliques (méthanol, méthylamine) ou l'acétate (Ni et Boone, 1998).

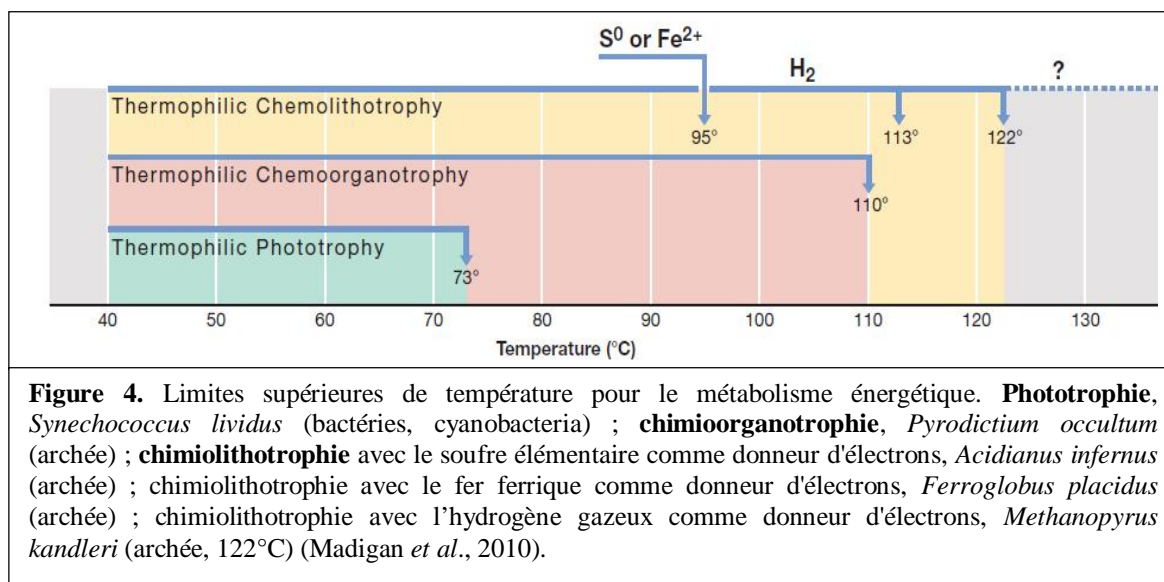
Les *Euryarchaeota* thermophiles et acidophiles comprennent les ordres des *Thermoplasmatales* incluant des genres aérobies et anaérobies facultatifs (*Thermoplasma*, *Ferroplasma* et *Picrophilus*) et celui des *Aciduliprofundales* (*Aciduliprofundum*). *Picrophilus* prospère à pH proche de 0 et jusqu'à 65°C alors que *Thermoplasma* se développe dans des milieux complexes à pH 2 et à 55°C par respiration aérobie et anaérobie du soufre (Huber et Stetter, 2006).

Des travaux menés avec des approches culturales et moléculaires ont confirmé la présence des membres des ordres des *Thermococcales* et des *Archaeoglobales*. Le premier inclue des espèces sulfato-réductrices hétérotrophes de *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Paleococcus* et dont certaines souches sont également capables d'oxyder en anaérobiose le monoxyde de carbone. Alors que les membres du second ordre réduisent le sulfate en H₂S (Ferrera et Reysenbach, 2007).

2.4. Grandes voies métaboliques des procaryotes thermophiles

2.4.1. Autotrophie

L'assimilation du CO₂ par les autotrophes est souvent associée au cycle de Calvin. Cependant, cette voie est peu fréquente chez les bactéries thermophiles et complètement absente chez les archées (Figure 4). Des voies alternatives d'assimilation du CO₂ existent chez ces organismes et incluent la voie du coenzyme A (CoA), le cycle d'acide citrique réducteur, le cycle du 3-hydroxypropionate, et le cycle du 4-hydroxybutyrate (Holden, 2009).



2.4.2. Hétérotrophie

La majorité des microorganismes thermophiles sont hétérotrophes ou autotrophes facultatifs. Les glucides et les peptides sont les plus assimilés par les thermophiles et hyperthermophiles et beaucoup de thermophiles utilisent également les hydrocarbures comme sources de carbone et d'électrons (Holden, 2009 ; Marchant et Banat, 2010).

2.4.3. Oxygène

La plupart des thermophiles et l'ensemble des hyperthermophiles sont des 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'O₂. Cependant, il existe plusieurs organismes qui sont aérobies obligatoires, microaérophiles, ou anaérobies facultatifs. Ces organismes sont généralement rencontrés dans les environnements géothermiques comme les sources thermales terrestres qui rentrent facilement en contact avec des environnements oxiques.

Lors de la respiration aérobie, les électrons portés par le cytochrome c sont transférés à l'O₂ par le biais de la cytochrome oxydase c. Diverses formes de cette enzyme sont trouvées chez *Aeropyrum* et *Pyrobaculum* tandis que des hydroquinones oxydases sont trouvées chez *Sulfolobus* et *Acidianus*. *Pyrobaculum oguniense* possède deux cytochromes a et o à hème-cuivre. Le complexe bc₁ et la cytochrome oxydase o sont présents dans les membranes cellulaires développées en conditions aérobies et anaérobies tandis que la cytochrome oxydase a, est présente uniquement en conditions aérobies (Holden, 2009).

2.5. Bases moléculaires de la thermophilie

Les microorganismes peuvent maintenir un gradient constant de pH ou de sel à travers la membrane, mais ne peuvent pas s'isoler de leur environnement chaud et aqueux. Pour prospérer dans de tels environnements, les thermophiles ont subis de nombreuses adaptations physiologiques et biochimiques qui maintiennent l'intégrité et la fonction de leurs cellules (Antranikian *et al.*, 2005 ; Ferrera et Reysenbach, 2007).

2.5.1. Acides nucléiques

L'une des premières questions posées est celle de la stabilité du matériel génétique en sachant que la composition des acides nucléiques des hyperthermophiles est identique à celle des mésophiles, et qu'à des températures élevées, l'ARN est dégradé et l'ADN est dénaturé *in vitro* (séparation des deux brins de la double hélice) puis dégradé (Quéréllou et Guézennec, 2010).

La thermostabilité et la réparation de l'ADN reposent principalement sur une enzyme, la gyrase reverse dont l'analyse de sa structure primaire suggère qu'elle comprend un domaine de type «hélicase» et un domaine «topoisomérase» (Declais et Duguet, 1997). La gyrase reverse introduit des superenroulements positifs (nombre d'enlacement augmenté, formation d'une super hélice gauche) dans l'ADN, qui parent la dénaturation de l'ADN sous l'effet de la chaleur en contraste avec les superenroulements négatifs de l'ADN retrouvés chez les mésophiles (nombre d'enlacement diminué, formation d'une super hélice droite). Les gyrases reverse sont retrouvées uniquement chez les hyperthermophiles archéens et bactériens (Jaenicke et Sterner, 2006). Elles font parties d'un plus large mécanisme de réparation de l'ADN. Elles identifient l'ADN entaillé, enrôle une protéine manteau à l'emplacement des dommages, et réduit le taux de rupture de l'ADN bicaténaire. Ainsi elles maintiennent l'ADN endommagé dans une conformation favorable à la réparation. Les hyperthermophiles possèdent également d'autres mécanismes de réparation de l'ADN (Jaenicke et Sterner, 2006). Ils contiennent jusqu'à dix copies de leurs génomes, ce qui peut aisément faciliter la réparation d'ADN par recombinaison homologue. Plusieurs membres des *Euryarchaeota* produisent des protéines like-histones ressemblant aux histones des eucaryotes qui compactent l'ADN en des structures ressemblant aux nucléosomes. Les *Crenarchaeota* possèdent d'autres types de protéines qui empaquettent et stabilisent l'ADN et augmentent sa température de fusion (Jaenicke et Sterner, 2006 ; Holden, 2009 ; Quéréllou et Guézennec, 2010).

Les thermophiles accumulent de larges quantités d'osmolytes variés qui contribuent à la stabilisation de l'ADN en augmentant sa température de fusion (Martins *et al.*, 1997). Ainsi, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermoproteus tenax*, *Thermoplasma acidophilum* et des membres de l'ordre des *Sulfolobales* accumulent du tréhalose, alors que *Methanothermus fervidus* et *Methanopyrus kandleri* accumulent du 2,3-diphosphoglycérate cyclique (DPGc) (Ferrera et Reysenbach, 2007).

D'autres types d'osmolytes sont rencontrés chez les hyperthermophiles tels que le di-myoinositol-1,19-phosphate (DIP) et les polyamines polycationiques. Des concentrations allant jusqu'à 0,4% (de la biomasse cellulaire) de putrescine, de spermidine, de norspermine, de thermospermine, et de spermine ont été détectées chez de nombreuses souches de *Sulfolobus* (Holden, 2009). Cependant, l'accumulation de solutés organiques n'a pas été observée chez d'autres hyperthermophiles isolés d'environnements non-salins (Santos *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il a été démontré que la thermodégradation de l'ADN est réduite en présence de concentrations de sels monovalents (50 à 500 mM de KCl ou de NaCl) ou divalents (1 à 25 mM de MgCl₂) (Quérellou et Guézennec, 2010).

Dans le cas des acides ribonucléiques, la modification chimique (méthylation post-transcriptionnelle de l'ARNr et de l'ARNt) et les liaisons avec des composants stabilisants extrinsèques (sels et protéines like-histones) peuvent être essentielles dans le maintien des mécanismes de transcription et de traduction à des températures proches ou même dépassant celles de la dégradation des acides nucléiques (Jaenicke et Sterner, 2006) (Tableau 3). Un contenu accru en G+C (Guanine + Cytosine) des ARN de transfert et des ARN ribosomiques pourraient stabiliser les conformations actives. A l'opposé, la teneur en G+C de l'ADN génomique des hyperthermophiles est souvent plus basse. Cette constatation suggère que la stabilité thermique des ARNr pourrait être un facteur important pour la vie dans des conditions hyperthermophiles (Madigan *et al.*, 2010).

Tableau 3. Principaux facteurs responsables de la thermostabilité des acides nucléiques (ADN et ARN) (Charlier et Droogmans, 2005).

ADN	ARN (ARNt, ARNr)
<ul style="list-style-type: none"> - cyclisation - superenroulement - association protéines-nucléotides - gyrase reverse - concentrations élevées en sel - polyamines linéaires - systèmes uniques de réparation - copies multiples du génome 	<ul style="list-style-type: none"> - contenu accru en G+C - polyamines ramifiés - affinité accrue des protéines ribosomales - méthylation des bases - modifications post-transcriptionnelles accrues

2.5.2. Protéines

Une remarquable spécificité des thermophiles et des hyperthermophiles est la grande thermostabilité de leurs protéines et tout particulièrement de leurs enzymes (Madigan *et al.*, 2010).

Généralement, chaque protéine est le résultat d'une évolution propre qui optimise son repliement et les interactions externes avec les solvants (Jaenicke, 2000). Par ailleurs, les stratégies adoptées ne sont pas nécessairement utilisées toutes simultanément pour conférer à une protéine une thermostabilité accrue et beaucoup de dispositifs impliqués dans la thermostabilisation des enzymes et des protéines solubles n'apparaissent pas dans le cas des protéines membranaires (Schneider *et al.*, 2002 ; Trivedi *et al.*, 2006). Néanmoins, les mécanismes intrinsèques les plus fréquemment rencontrés font appel à :

- une augmentation des interactions de Van der Waals et des interactions ioniques ;
- une hydrophobicité accrue ;
- une extension du nombre et de la taille des réseaux de liaisons hydrogène ;
- une densité de compaction plus élevée ;
- une diminution de la longueur des boucles de surface ;
- une oligomérisation des protéines (Holden, 2009 ; Quérellou et Guézennec, 2010).

De plus, les travaux de protéomique comparée ont permis d'établir que la thermostabilité d'une protéine est liée à une augmentation du nombre des résidus acide glutamique (E) et lysine (K) combinée à une réduction des résidus glutamine (Q) et histidine (H). Un rapport $(E + K)/(Q + H)$ supérieur à 4,5 signifierait la présence d'un hyperthermophile.

Le nombre de résidus chargés aurait un impact sur la solubilité tandis que leur position serait importante pour la stabilité. Il semblerait également que les ponts disulfures aient un rôle important dans la stabilisation des protéines thermostables (Beeby *et al.*, 2005 ; Ladenstein et Ren, 2008).

En plus de ces facteurs intrinsèques, il existe de nombreux facteurs extrinsèques qui contribuent à la thermostabilité des protéines. Ils incluent des protéines chaperonnes (thermosomes) rencontrées chez les archées hyperthermophiles. Elles sont thermostables et résistantes à la protéolyse. Les chaperonnes de *Sulfolobus solfataricus* empêchent l'agrégation de la protéine-cible dénaturée et catalysent son repliement par addition d'ions K^+ . Les hyperthermophiles produisent également des osmolytes de nature non protéique ayant un rôle thermoprotecteur sur les protéines cytoplasmiques (DPGc, DIP...) (Santos *et al.*, 2011). Il a été aussi démontré qu'une pression élevée stabiliserait de nombreuses enzymes des hyperthermophiles. Elle serait responsable d'une plus grande compacité de la protéine et

confèrerait ainsi une rigidité et une thermostabilité structurale plus accrue (Gomes et Steiner, 2004 ; Holden, 2009 ; Synowiecki, 2010).

2.5.3. Membrane cellulaire

Les membranes cellulaires sont des structures complexes se composant de lipides et de protéines agissant comme barrières entre le cytoplasme et l'environnement extracellulaire (Jaenicke et Sterner, 2006). L'entretien de la fluidité membranaire, essentiel pour un fonctionnement cellulaire normal, et les mécanismes de maintien de la stabilité et de l'adaptabilité membranaire diffèrent chez les archées et les bactéries hyperthermophiles (Holden, 2009).

Généralement, les bactéries et les eucaryotes contiennent des di-esters de glycérol et deux chaînes d'acyles gras, formant une membrane à double couche lipidique. Le maintien de la structure membranaire à température élevée implique chez les bactéries une augmentation du degré de saturation, de la longueur des chaînes d'acides gras et du rapport de ramification *iso/antéiso* (Konings *et al.*, 2002). Une composition plus élevée en acides gras saturés a comme conséquence une hydrophobicité plus forte contribuant à la stabilité des membranes aux températures élevées (Ferrera et Reysenbach, 2007).

À la différence des deux domaines précédents, les archées contiennent des lipides à liaisons éther entre une variété d'alcools (glycérol, nonitol) et des chaînes latérales d'isoprènes méthylées et dans lesquelles des anneaux de cyclopentane sont incorporées. Ces groupes latéraux méthyliques limitent la mobilité des chaînes, les stabilisent et de ce fait diminuent la perméabilité ionique. Cette configuration forme une structure membranaire en monocouche lipidique qui est plus rigide que les bicouches lipidiques à liaison ester présentes chez les eucaryotes et les bactéries à l'exception de la bactérie hyperthermophile *Thermotoga maritima* (Ferrera et Reysenbach, 2007).

Par ailleurs, les liaisons éthers sont plus résistantes que les liaisons esters aux effets de la température, de l'oxydation et de la dégradation enzymatique (Jaenicke et Sterner, 2006).

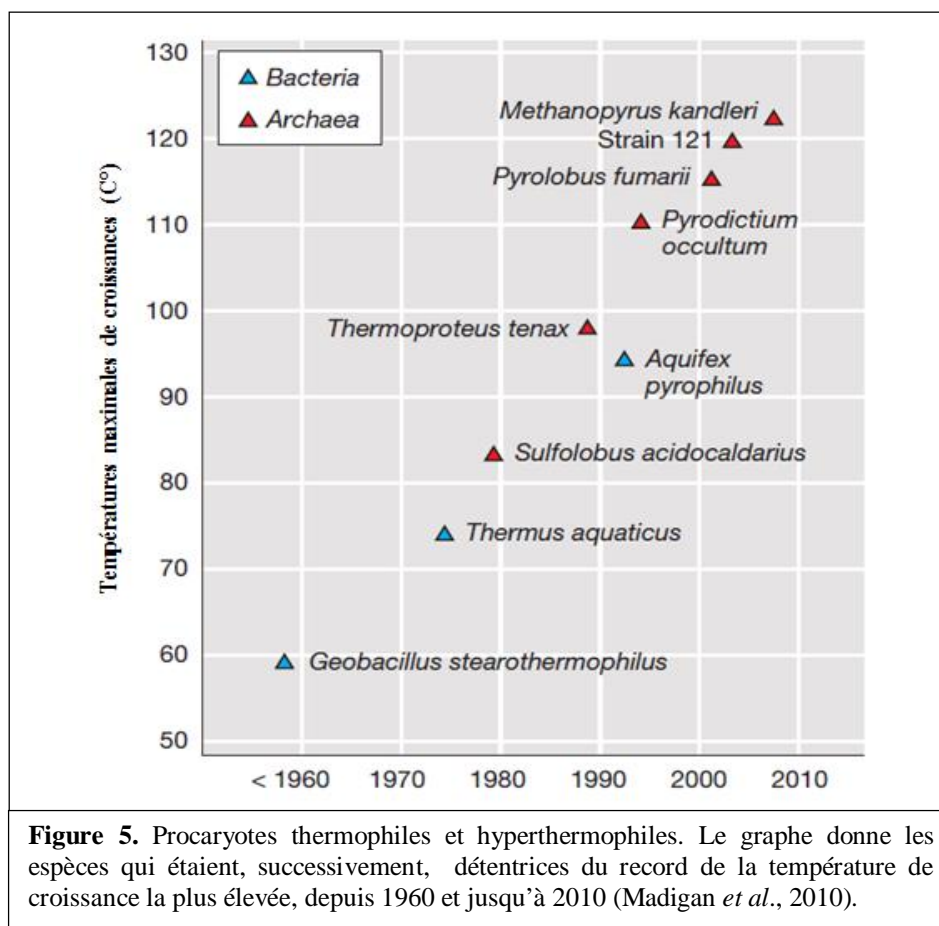
Des différences sont également observées dans la composition des protéines membranaires des thermophiles et des mésophiles. Ainsi, la comparaison des génomes séquencés de certaines archées (espèces de *Methanococcus*, de *Pyrococcus* et de *Archaeoglobus*) et de bactéries hyperthermophiles (*Thermotoga maritima* et *Aquifex aeolicus*), avec ceux des mésophiles a montré une préférence pour les transporteurs primaires chez les hyperthermophiles. En général, les génomes hyperthermophiles contiennent un nombre plus élevé de gènes codant pour les transporteurs ABC (adenosine triphosphate binding cassette).

Plusieurs de ces transporteurs sont impliqués dans l'assimilation de solutés organiques, et peuvent opérer à très faibles concentrations en raison de leur grande affinité. En effet, les environnements hydrothermiques sont pauvres en substrats et la présence de beaucoup de transporteurs ABC (ATP-binding cassette) peut être une stratégie optimisant le transport de ces nutriments peu disponibles (Ferrera et Reysenbach, 2007).

2.5.4. Limite supérieure de la vie à haute température

Le détenteur du record actuel de la limite supérieure de température de croissance est l'archée méthanogène *Methanopyrus kandleri* (Figure 5) avec une capacité de se développer à 122°C et de survivre durant des périodes appréciables à des températures encore plus élevées. Le rythme actuel de découverte laisse à envisager que des archées plus hyperthermophiles que *Methanopyrus* peuvent exister mais il faudra d'abord pouvoir les isoler (Madigan *et al.*, 2010).

Il existe sûrement une limite supérieure à la vie mais qui reste encore inconnue, et relève de plusieurs défis biochimiques que l'évolution n'a pas résolu. Cette limite biochimique de la viabilité dépend non seulement de l'organisation intacte des composants standards à haut poids moléculaire des cellules, mais également des composés à faibles poids moléculaires tels que les coenzymes et les métabolites (Jaenicke et Sterner, 2006). Un autre paramètre lié à la limite supérieure de la température de la vie est la pression. N'importe quelle vie au-dessus de 100°C exige une pression supérieure à 0,1 MPa pour maintenir un environnement liquide. La plupart des hyperthermophiles marins sont des piézophiles, présents dans des sites des passages hydrothermiques abyssaux où la pression *in situ* est de 20 à 45 MPa (la pression augmente de 0,1MPa par 10m de profondeur). Généralement, une augmentation de pression peut augmenter leur optimum de croissance de plusieurs degrés ainsi que leur taux de croissance (Holden, 2009).



2.5.5. Thermophiles et origine de la vie

Le positionnement des hyperthermophiles près de la racine de l'arbre phylogénétique (ARNr 16S) a favorisé l'hypothèse que le milieu prébiotique était chaud, suggérant que les thermophiles aient précédés les mésophiles dans l'histoire des premières formes de vie (Woese *et al.*, 1990; Jaenicke et Sterner, 2006; Mulkidjanian *et al.*, 2012).

Cependant, l'avènement des séquences génomiques complètes a montré que l'arbre phylogénétique possédait des racines plus complexes que celles de l'arbre construit à partir d'un seul marqueur génétique (ARNr 16S). Plus confondant, les génomes peuvent contenir un mélange d'ADN, une partie liée aux archées, tandis que l'autre partie est proche des bactéries, de sorte qu'un microorganisme donné, selon le gène marqueur, finit par être localisé dans différents placements phylogénétiques. Il semble alors que chaque gène ait sa propre histoire, probablement en raison de certains mécanismes tels que les transferts horizontaux de gènes (Nelson *et al.*, 1999 ; Ochman *et al.*, 2000; Jaenicke et Sterner, 2006).

Bien que le mécanisme de permutation des gènes soit toujours inconnu, il semblerait qu'il n'y ait pas meilleure explication pour l'observation que 17 sur 34 familles de protéines eucaryotes qui remontent à des stades précoces d'évolution cellulaire semblent provenir des bactéries, et

que seulement 8 familles montrent une plus grande similitude à celles des archées, le supposé ancêtre des eucaryotes. Malgré ces contradictions, les séquences génomiques disponibles concordent toujours avec l'hypothèse de trois domaines d'organismes vivants (Jaenicke et Sterner, 2006) (Figure 6).

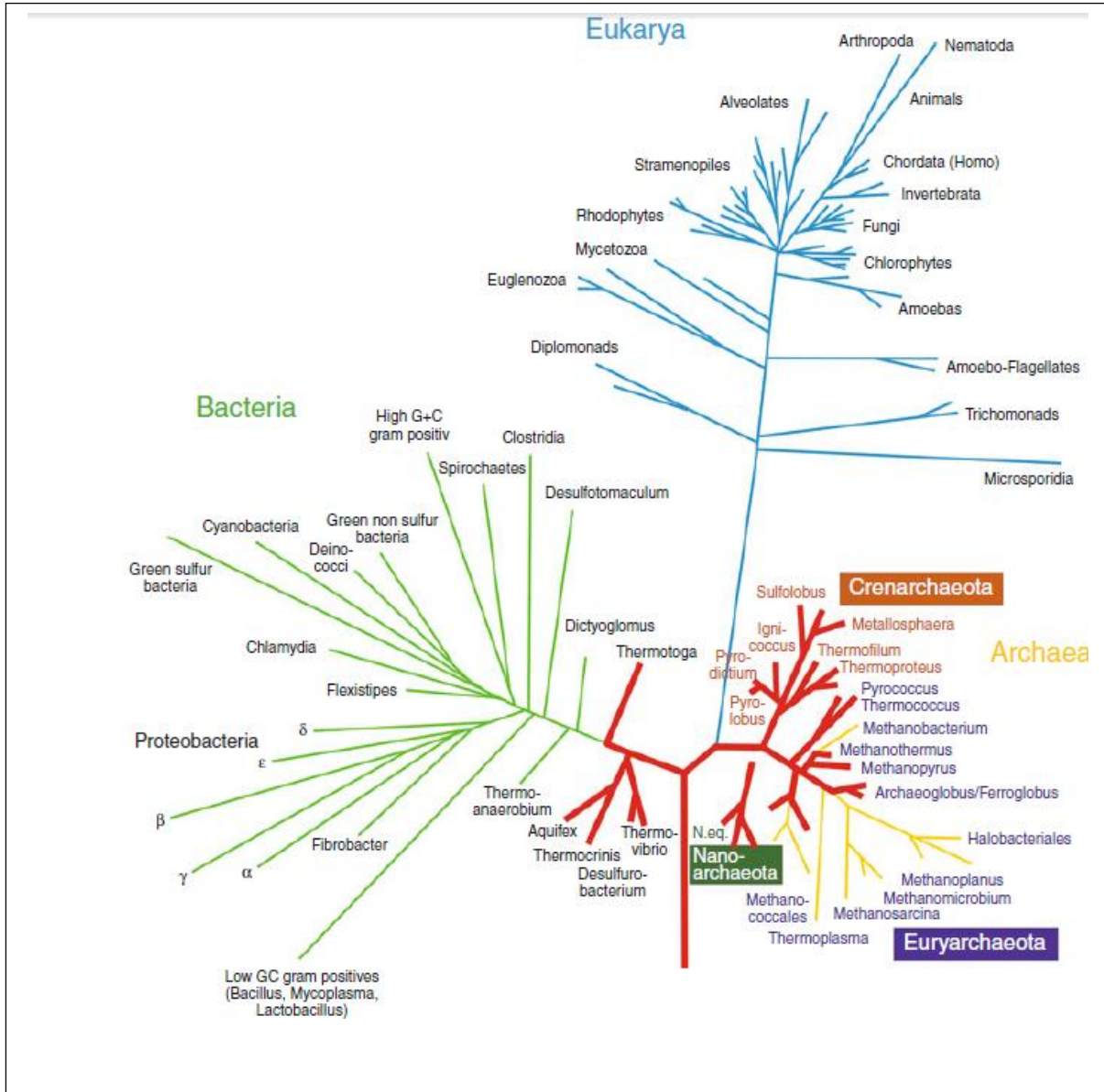


Figure 6. Arbre phylogénétique universel basé sur les petites sous unités de l'ARN ribosomal. Les branches de l'arbre en rouge gras représentent les hyperthermophiles (Stetter, 2011)

Chapitre 2. Applications des thermophiles et de leurs biomolécules

Les extrémophiles et spécialement les thermophiles, représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie. Les travaux de recherche sur ces organismes sont pour une grande part motivés par les applications biotechnologiques. Deux types d'applications différentes peuvent être distingués. Le premier repose sur l'utilisation directe des organismes et le second sur leur biomolécules. Ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les osmolytes (thermolytes) et une grande diversité de métabolites secondaires. L'ensemble constitué des cellules, des ressources génétiques et des biomolécules est regroupé sous le terme général d'actifs biotechnologiques (Quérellou et Guézennec, 2010).

1. Evolution des méthodes d'obtention des actifs biotechnologiques

La méthodologie pour identifier et obtenir des actifs reposait sur l'isolement et les cultures des espèces de thermophiles, 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).

1.1. Applications basées sur les cellules entières

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. Parmi les applications des thermophiles :

1.1.1. Agents de minéralisation

Dans les traitements industriels de minéraux, des microorganismes oxydant le soufre et le fer sont employés pour libérer l'or inclus dans les minéraux sulfurés et dans la concentration des métaux lorsque les procédés chimiques conventionnels ne sont pas

rentables. Parmi les archées réductrices de fer, *Pyrobaculum islandicum* et *Pyrobaculum furiosus*, ont la capacité de transformer le chlorure d'or en or insoluble (Lloyd *et al.*, 2003). Alors que les acidothermophiles comme *Sulfolobus metallicus* et *Metallosphaera sedula* sont utilisées dans l'extraction du cuivre à partir de minéraux sulfurés ou encore dans le traitement de certains minerais sulfurés tels que la pyrite (Norris *et al.*, 2000 ; Rawlings et Johnson, 2007).

La manipulation et la réutilisation des pneus épuisés posent de sérieux problèmes et le recyclage des matériaux en caoutchouc est préférable d'un point de vue économique et environnemental. L'espèce *Pyrobaculum furiosus* est capable de désulfurer le caoutchouc en donnant un produit avec de bonnes propriétés mécaniques (Bredberg *et al.*, 2001).

En outre, les sols contaminés avec des alcanes linéaires et ramifiés (C20-C40), des hydrocarbures aromatiques (phénol, toluène, pyrène, phenanthrène, anthracène) insolubles à basses températures, peuvent être décontaminés avec les microorganismes thermophiles (Antranikian, 2009, Banat et Marchant, 2011).

1.1.2. Piles à combustible microbiennes

Le principe est d'utiliser des microorganismes capables d'oxyder des composés organiques ou inorganiques en couplage avec la réduction d'une électrode dans une pile à combustible pour produire un courant électrique (Quérellou et Guézennec, 2010). Les thermophiles constituent un gisement très largement inexploré dans ce domaine. Une étude réalisée a démontré qu'une communauté microbienne thermophile isolée de sédiments marins était capable de produire un courant électrique dans une pile à combustible fonctionnant à 60°C en utilisant de l'acétate comme carburant (Mathis *et al.*, 2008).

1.1.3. Production d'hydrogène

Il y a un intérêt croissant pour l'utilisation des sources renouvelables afin de satisfaire les besoins énergétiques mondiales de plus en plus conséquentes. Les produits de la fermentation anaérobie incluent l'éthanol, le méthane et l'hydrogène. La recherche sur la production biologique d'hydrogène est devenue attrayante pour des utilisations possibles du biohydrogène comme source d'énergie propre. La voie de production du biohydrogène dépend de l'approvisionnement en substrats organiques et pourrait idéalement être adaptée à une production d'énergie accouplée avec un traitement des déchets organiques (Antranikian, 2008). Des hydrogénases archéennes ont été la cible de recherche intensive. Une NiFe-hydrogénase cytoplasmique issue de l'hyperthermophile *Thermococcus kodakaraensis* est

active de façon optimale à 90°C pour la production d'hydrogène avec le méthylviologène comme substrat (Kanai *et al.*, 2003). La même enzyme membranaire est identifiée chez la bactérie *Thermotoga tengcongensis* (Soboh *et al.*, 2002 ; Soboh *et al.*, 2004) et autres membres de l'ordre des *Thermotogales* (Van Ooteghem *et al.*, 2002 ; Kadar *et al.*, 2003 ; Van Ooteghem *et al.*, 2004).

1.2. Applications basées sur les biomolécules

Elles représentent la voie la plus commune d'utilisation des thermophiles, ces biomolécules comprennent essentiellement des enzymes, mais également d'autres substances de nature diverse.

1.2.1. Enzymes

Les avantages que rapporte la conduite des processus industriels à températures élevées (solubilité des substrats augmentée, viscosité diminuée, disponibilité biologique importante, vitesses de transfert et de réaction plus élevées, risque de contamination microbienne diminué, etc.) ont poussé les recherches vers l'exploitation des enzymes des thermophiles (Gomes et Steiner, 2004 ; Ferrera et Reysenbach, 2007). En effet, les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles constituent une source d'enzymes supérieures aux biocatalyseurs traditionnels par leurs propriétés uniques : thermostables, thermoactives, actives en présence des solvants organiques (jusqu'à 99%), résistantes aux agents protéolytiques et aux valeurs extrêmes de pH (Egorova et Antranikian, 2005). Leur exploitation a mené à l'élaboration de produits de haute valeur, utilisés dans les industries chimiques, pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, de papiers et de textiles. Les thermophiles ont également révolutionné la biotechnologie avec leur exploitation dans différentes applications comprenant la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés et l'étude des structures protéiques (Kumar et Nussinov, 2001; Sterner et Liebl, 2001; Antranikian, 2008).

1.2.1.1. Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides

❖ Enzymes dégradant la lignocellulose

La cellulose est le biopolymère organique le plus abondant dans la nature. Elle est contenue dans la paroi des cellules végétales et est accessible à faible coût dans les résidus d'exploitation forestière, les chaumes de céréales, et autres déchets agricoles.

La cellulose se compose d'unités de glucose liées par liaison β -1,4-glycosidique avec un degré de polymérisation allant jusqu'à 15.000 unités de glucose. Elle est constituée de régions

amorphes hydrolysables et de régions ordonnées (cellulose cristalline) récalcitrantes à l'hydrolyse enzymatique. Ce polymère peut être hydrolysé au moyen de l'action combinée d'au moins trois enzymes: une endoglucanase (cellulase), une exoglucanase (cellobiohydrolase) et une β -glucosidase (cellobiase) (Quérellou et Guézennec, 2010) (Figure 7). Plusieurs enzymes dégradant la cellulose issues d'organismes thermophiles comprenant des archées et des bactéries ont été étudiées et rapportées dans la bibliographie (Tableau 4-Annexe 1).

Des endoglucanases thermostables, dégradant les liaisons β -1,4 ou β -1,3 des β -glucanes de la cellulose sont plus fréquentes chez les bactéries (*Thermotoga*, *Thermobifida*, *Rhodothermus* et *Clostridium*) (Liebl, 2001 ; Ando *et al.*, 2002) que chez les archées (*Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii* et *Sulfolobus solfataricus*) (Egorova et Antranikian, 2005). À la différence des endoglucanases, plusieurs β -glucosidases ont été caractérisées chez les archées. De nombreuses souches bactériennes et archéennes thermophiles utilisent le xylane, composé principal de l'hémicellulose, comme source de carbone et d'énergie grâce à plusieurs xylanases (Vieille et Zeikus, 2001) (Figure 7). D'autres hémicellulases (glucuronidase, β -mannanase, β -mannosidase, galactosidase, acétyl xylane estérase, feruloyle estérase, α -arabinofuranosidase), isolées à partir des thermophiles, sont des enzymes efficaces pour la saccharification des parois cellulaires végétales (Tableau 4-Annexe 1) (Antranikian, 2008).

La capacité des microorganismes de dégrader des polysaccharides telle que la cellulose est une caractéristique d'intérêt considérable en termes d'écologie microbienne et du point de vue industriel. La bioconversion de la cellulose en glucose ouvre des horizons pour l'application des processus enzymatiques microbiens afin d'obtenir du biocarburant, des protéines unicellulaires (SCP), des oligosaccharides, ainsi que des sucres simples purs. Les enzymes cellulolytiques sont utilisées pour éliminer les substances phénoliques des jus, dans les détergents, dans le blanchiment de la pulpe de papier et également dans la dégradation des déchets de cette industrie. Les hémicellulases thermostables comme les xylanases ont offert une avancée importante dans le bio-blanchiment de la pulpe de papier et en permettant la diminution de la pollution environnementale par les halogènes (Rath *et al.*, 2009).

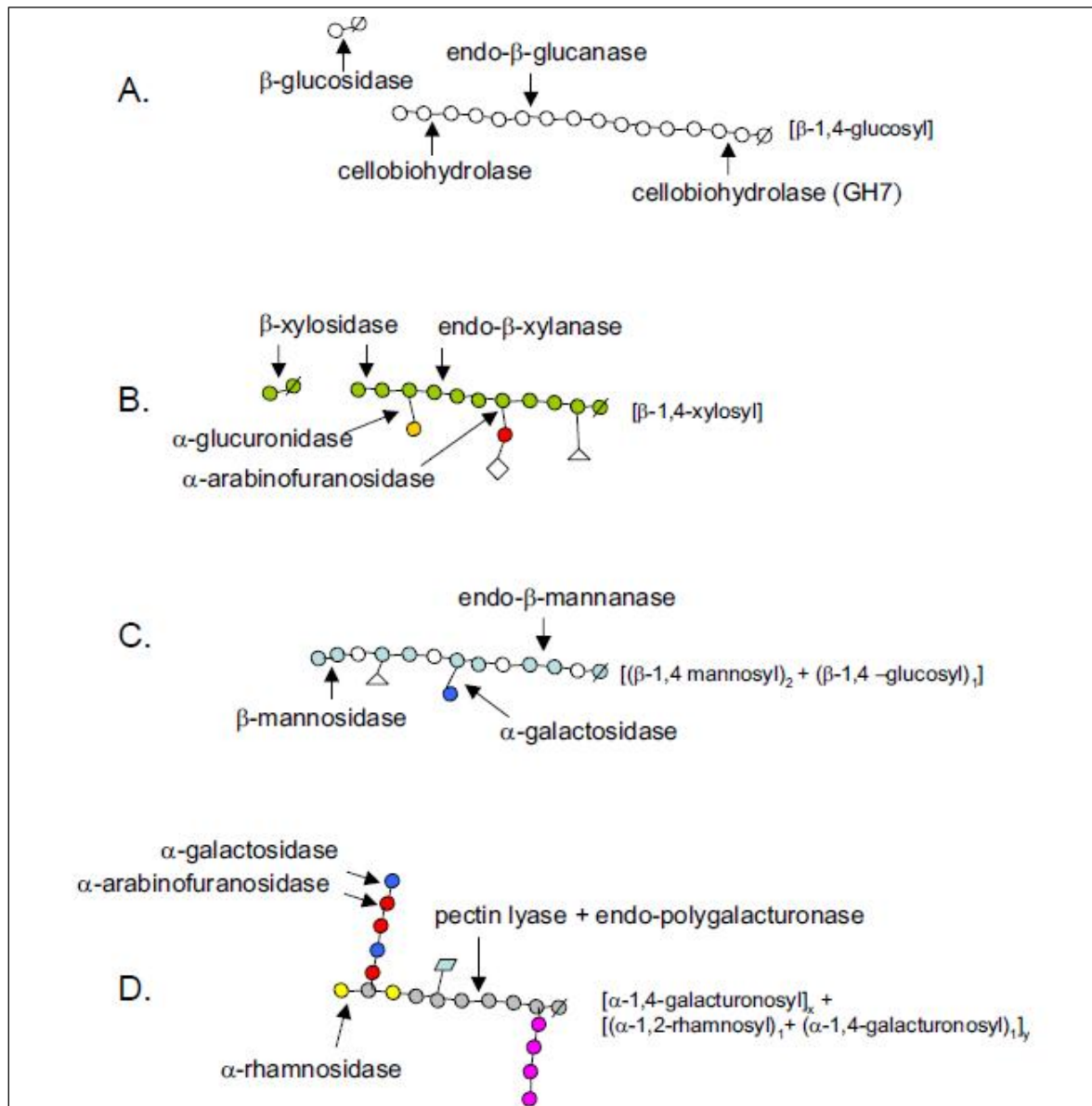


Figure 7. Structures et sites simplifiés d'attaque enzymatique sur la lignocellulose. Un fragment de chaîne cellulosique (A) est montré, avec des fragments hypothétiques du xylane d'hémicellulose (B), de glucomannane (C), et de pectine (D). Les sites d'attaque d'une partie des principales enzymes agissant sur le matériel respectif sont indiqués par des flèches. Le type de lien glycosidique de la chaîne principale est indiqué entre parenthèses à droite de chaque fragment de polymère. Les glucides sont indiqués en cercles, et l'extrémité réductrice de chaque chaîne est marquée par une ligne traversant un cercle. Blanc: glucose, vert: xylose, jaune: acide glucuronique, rouge: arabinose, bleu-clair: mannose, bleu-foncé: galactose, gris: acide galacturonique, et rose: résidus de sucres non déterminés. Les groupes d'acétate sont montrés en triangles, les groupes phénoliques en diagonales, et les groupes méthyliques en losanges (Turner *et al.*, 2007).

❖ Enzymes modifiant l'amidon

L'amidon, composé par l'amylose et l'amylopectine, est le polymère d'origine végétale qui a l'application la plus commune et la plus durable en biotechnologie. L'industrie de la transformation de l'amidon en produits plus précieux tels que les dextrines, le glucose, le fructose, le maltose, et le tréhalose, utilise les enzymes thermostables microbiennes. Dans tous les processus de conversion de l'amidon, des températures élevées sont requises pour liquéfier l'amidon et le rendre accessible à l'hydrolyse enzymatique (Antranikian, 2009). L'action synergétique des enzymes amylolytiques thermostables apporte un grand avantage à ces processus, abaisse le coût de production des sirops de sucre et peut mener à d'autres produits recherchés (Figure 8), avec lesquels il faut inclure les additifs alimentaires à base d'amidon ayant des caractéristiques semblables à celles de la gélatine et des dextrines linéaires, qui peuvent être employées en tant que produits de substitutions des corps gras, d'agents de texture, de stabilisateurs d'arômes, et de prébiotiques (Gupta *et al.*, 2003). Les enzymes amylolytiques sont également employées dans l'industrie du textile, du papier et en panification (Gomes et Steiner, 2004). Une vue d'ensemble sur les enzymes de modification d'amidon archéennes et bactériennes thermophiles est donnée dans le tableau 4 en annexe 1.

Des préparations commercialisées d' α -amylases (EC 3.1.1.1) issues de souches thermophiles de *Bacillus*, et d'archées hyperthermophiles agissant à des températures supérieures à 100°C, sont utilisées pour la liquéfaction de l'amidon et le désencollage des textiles (Ponzano *et al.*, 2011). Des β -amylases (EC 3.2.1.2) et des glucoamylases (EC 3.2.1.3) thermostables ont été introduites dans la saccharification de l'amidon liquéfié en sirops de maltose et de glucose, respectivement. Rendant le processus économiquement plus rentable (Turner *et al.*, 2007). L'amidon gélatinisé a pu être modifié par des amylomaltes archéennes thermostables (EC 2.4.1.25) en un gel thermoréversible, le cycloamylose, contenant l'amylopectine et exempt d'amylose. Ce polymère a plusieurs applications dans l'industrie alimentaire et en cosmétique et peut substituer la gélatine obtenue à partir de la moelle osseuse d'origine bovine, suspectée d'être un agent de contamination de l'encéphalopathie spongiforme bovine (Turner *et al.*, 2007).

Les pullulanases purifiées et caractérisées à partir des thermophiles sont remarquablement thermostables même en absence d'ions Ca^{+2} et de substrats (leurs substrats étant le pullulane, les oligosaccharides ramifiés et les polysaccharides) (Egorova et Antranikian, 2005). Elles constituent des candidats prometteurs pour la bioconversion de l'amidon à des pH plus acides et des températures plus élevées que ceux des enzymes actuellement utilisées (Harris *et al.*, 2010).

La synthèse enzymatique de sucres dérivés d'amidon peut être une alternative bien plus utile aux méthodes de chimie organique classique, mais les concentrations élevées des produits organiques utilisés portent préjudice souvent aux enzymes conventionnelles ; les enzymes thermostables peuvent dans ce cas être une option prometteuse (Ponzano *et al.*, 2011). Un exemple est donné par les cyclodextrine glucosyltransférases (CGTase ; EC 2.4.1.19). Elles convertissent les α -glucanes en cyclodextrines qui sont des polymères cycliques de différentes tailles montrant un noyau apolaire, pouvant agir comme porteurs de différentes molécules (peptides, protéines, oligonucléotides, petites molécules pharmaceutiques, etc.). Cette propriété peut être exploitée dans une série d'applications telles que les médicaments, les matériaux d'emballage, les adhésifs, les aliments, les produits de beauté, et le textile (van der Veen *et al.*, 2000). Les CGTases isolées d'archées et de bactéries thermophiles ont montré d'excellentes prédispositions à être utilisées dans cette synthèse (Horikoshi, 1999 ; Tachibana *et al.*, 1999 ; Rashid *et al.*, 2002).

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse du tréhalose attirent également l'attention pour leur exploitation potentielle. Ce soluté compatible, qui permet aux organismes de s'adapter à différents stress, tels que le froid, la chaleur, la dessiccation, la déshydratation, le stress oxydatif et/ou osmotique, peut être exploité pour préserver des composés bioactifs tels que les produits nutraceutiques, les médicaments, etc. Plusieurs voies de biosynthèse du tréhalose ont été identifiées chez les archées hyperthermophiles (Ponzano *et al.*, 2011).

Les enzymes de ramification thermoactives (EC 2.4.1.18) qui catalysent la formation de points de branchement α -1,6 à partir d'oligo- et de polysaccharides linéaires, sont utilisées pour stabiliser les solutions d'amidon et améliorer le volume et la durée de conservation des produits de panification (Thiemann *et al.*, 2006). Les β -glycosidases sont des exoenzymes qui hydrolysent les liaisons β glycosidiques des sucres (Ichikawa *et al.*, 1992). Celles des thermophiles ont des avantages biotechnologiques importants comme la synthèse d'oligosaccharides (Harris, 2010).

La conversion biocatalytique de l'amidon du maïs en glucose puis en fructose pour la production de sirop de maïs à haute concentration de fructose (HFCS) par la xylose (glucose) isomérase représente une importante application industrielle des enzymes immobilisées. Des glucose isomérases de plusieurs hyperthermophiles ont été testées dans des processus opérant à des températures proches de 100°C. Elles ont permis l'obtention d'un rendement en fructose de 55% et l'élimination de l'étape chromatographique très onéreuse (Brown *et al.*, 1993; Bandlish *et al.*, 2002). Cependant plusieurs problèmes concernant l'immobilisation des enzymes, les réactions secondaires potentielles des sucres à températures élevées, et des

autorisations réglementaires qui pourraient être exigées dans la production d'une substance pour la consommation humaine doivent être surmontés avant d'augmenter la température de fonctionnement du processus (Meng *et al.*, 1993 ; Park *et al.*, 1997).

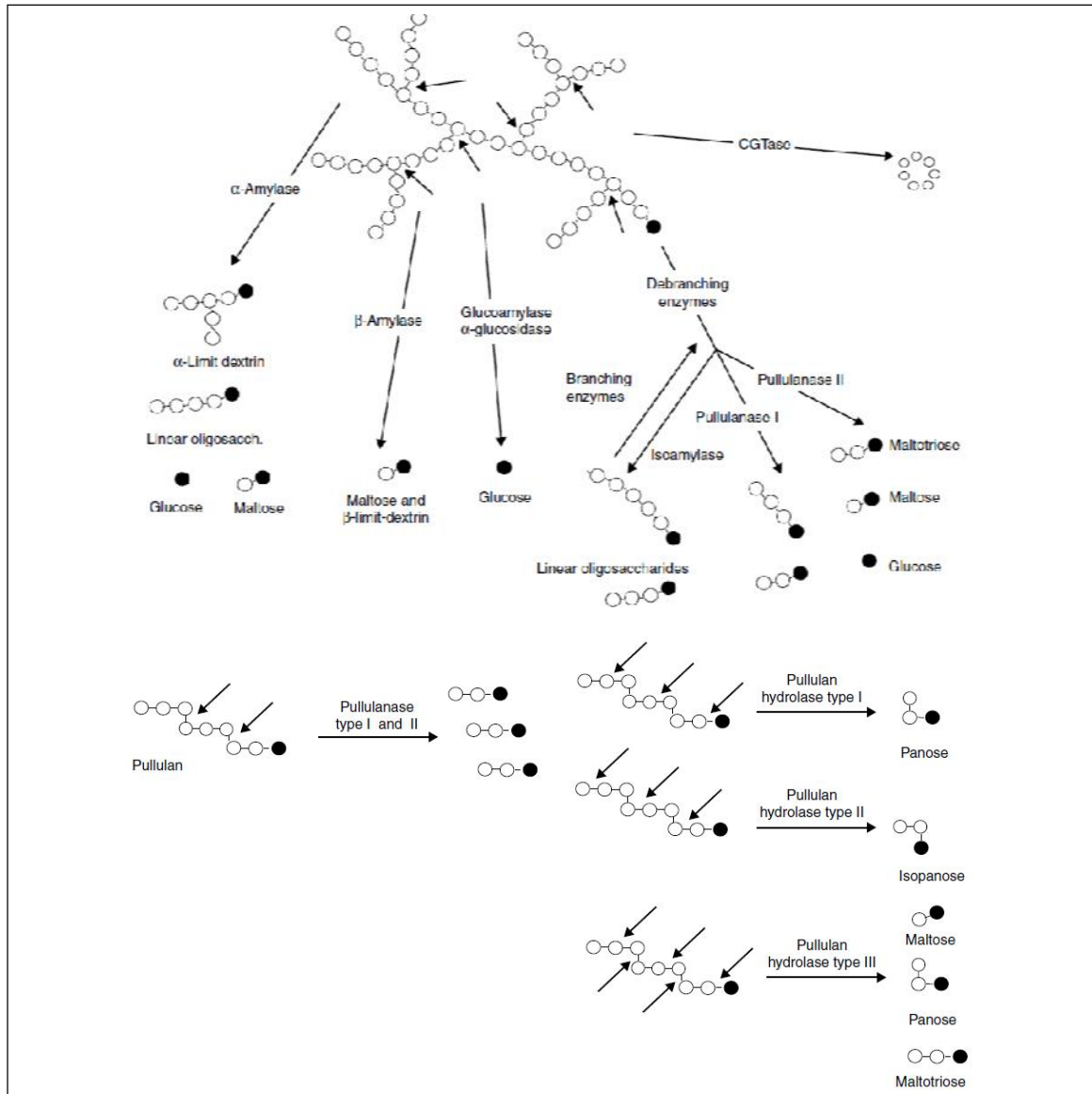


Figure 8. Présentation schématique de l'action des enzymes amylolytiques et pullulytiques. Les pullulanases type I attaquent les liaisons α -1,6-glycosidiques des oligosaccharides et polysaccharides. Les pullulanases type II attaque les liaisons α -1,4- dans divers oligosaccharides et polysaccharides. Les cercles noirs indiquent des sucres réducteurs (Bertoldo et Antranikian, 2001).

❖ Enzymes dégradant la pectine

La pectine est présente dans la partie intermédiaire des parois cellulaires végétales. Ce biopolymère est un hétéro polysaccharide ramifié se composant d'une chaîne principale de α -1,4-D-polygalacturonate partiellement méthylés. Tout au long de la chaîne, des résidus de l-rhamnopyranose sont présents et jouent le rôle d'accepteurs de chaînes latérales composées de sucres neutres.

La pectine est dégradée par des enzymes pectinolytiques classées en deux grands groupes : les méthylestérases, dont la fonction est d'éliminer les groupes méthoxy, et les dépolymérase (hydrolases et lyases), qui attaquent la pectine et le pectate (acide polygalacturonique). La production de telles enzymes n'a été rapportée que chez les bactéries anaérobies thermophiles (Tableau 4-Annexe 1). Ces enzymes agissent habituellement à pH alcalin et ont besoin d'ions Ca^{2+} .

La dégradation enzymatique de la pectine est largement appliquée dans des processus de technologie alimentaire, comme dans l'extraction des jus de fruit et la fabrication de vin, afin d'augmenter le rendement en jus, de réduire sa viscosité, d'éclaircir sa couleur et de macérer les tissus des fruits et des légumes (Antranikian, 2008).

❖ Enzymes dégradant la chitine

La chitine est l'élément structural principal de la plupart des mycètes et de quelques invertébrés (crustacées, insectes) (Antranikian *et al.*, 2005). C'est un homopolymère linéaire de N-acétyl-D-glucosamine à liaison β (1-4). Dans les environnements marins, la chitine est produite en grande quantité et sa conversion est assurée par des enzymes chitinolytiques qui sont des chitine endo-hydrolases (EC 3.2.1.14), des oligomères exo-hydrolases (EC 3.2.1.52) et la N-acétyl-D-glycosaminidase (chitobiase; EC 3.2.1.30). La présence d'enzymes chitinolytiques a été observée chez les archées (Gao *et al.*, 2003 ; Andronopoulou et Vorgias, 2004 ; Tanaka *et al.*, 2004) et les bactéries hyperthermophiles. Les gènes codant ces enzymes ont été isolés, clonés et caractérisés (Antranikian, 2008).

Les enzymes chitinolytiques sont employées pour une large action sur plusieurs substrats et dérivés chitineux (Tableau 4-Annexe 1) (Antranikian, 2008).

1.2.1.2. Enzymes produisant des sucres rares

Les sucres rares, produits intermédiaires du métabolisme cellulaire, n'existent qu'en infimes quantités dans la nature (Harris *et al.*, 2010). Ces sucres incluent le D/L-allose, D/L-altrose, L-glucose, D/L-psicose, D/L-tagatose, L-fructose, et D-sorbose (Izumori, 2002 ; Leang *et al.*, 2004). Ils trouvent leur application dans l'industrie alimentaire, en tant qu'édulcorants hypocaloriques, inhibiteurs de croissance microbienne, en industrie pharmaceutique comme agents antiviraux et inhibiteurs de glycosidase (Ahmed, 2001). Des arabinose isomérases (AI) thermophiles sont utilisées pour produire des sucres rares à partir de substrats peu coûteux : par exemple du D-tagatose à partir du D-galactose et du L-ribulose à partir du L-arabinose (Cheetham et Wootton, 1993 ; Roh *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2004).

L'efficacité et la fidélité catalytique des AI a également été exploitée industriellement pour la production du D-tagatose, un édulcorant naturel (Kim, 2004). Aussi les AI thermoactives ont été incorporées dans des procédés biologiques pour la production de D-tagatose à partir de D-galactose issu du lactose du lait par une β -galactosidase (Jorgensen *et al.*, 2004).

2.2.1.3. Protéases

Comparées aux autres enzymes utilisées en biotechnologie, les protéases sont les plus quantitativement produites et employées. Les protéases sont impliquées dans la conversion des protéines en acides aminés et en peptides. Elles sont classées selon la nature de leur site catalytique en trois groupes : sérine, cystéine, aspartique ou metalloprotéases. La plupart des protéases des archées et des bactéries thermophiles appartiennent au type sérine, et sont stables à températures élevées et en présence de concentrations élevées de détergents et d'agents dénaturants (Antranikian, 2009) (Tableau 4-Annexe 1).

Actuellement, peu de protéases thermostables sont commercialisées (Synowiecki, 2010). L'alcalase isolée de *Bacillus licheniformis*, est utilisée dans l'hydrolyse de la farine de soja en hydrolysats solubles et non-amers, comme composante des boissons non alcoolisées fortifiées et des aliments diététiques. Elle est également utilisée dans la revalorisation des protéines des sous-produits de l'industrie de viande et de poissons et des déchets des coquilles crustacéennes par la production de chitine (Synowiecki, 2008). En outre, des protéases thermostables résistantes aux agents tensio-actifs anioniques ou non ioniques actives à des températures supérieures à 60°C trouvent leurs applications comme composantes des détergents de vaisselle (Banerjee *et al.*, 1999 ; Niehaus *et al.*, 1999). De telles enzymes peuvent être également employées dans des membranes d'ultrafiltration de nettoyage à températures élevées, augmentant ainsi l'efficacité de ce processus (Bruins *et al.*, 2001).

L'autre application potentielle des protéases thermoactives est l'attendrissage de la viande. En effet, l'utilisation d'enzymes actives uniquement pendant la cuisson permet l'interruption de la protéolyse juste après le refroidissement (Synowiecki, 2010). La thermostabilité des protéases en milieu aqueux/organique et non aqueux mène à la modification des équilibres de réaction, avec la création de nouvelles liaisons peptidiques. De telles réactions d'inversion peuvent être employées afin d'améliorer la qualité et la fonctionnalité alimentaires des hydrolysats protéiques et réduire leur amertume. Parmi les protéases thermostables industriellement utilisées, la thermolysine immobilisée de *Bacillus thermoproteolyticus* qui est impliquée dans la synthèse de l'ester méthylique de l'aspartyl-phénylalanine, connu sous le nom d'aspartame

(De Martin *et al.*, 2001). Ce produit est encore utilisé comme édulcorant dans beaucoup d'aliments et de boissons hypocaloriques (Synowiecki, 2010).

Des protéases kératinolytiques (kératinases) et collagénolytiques thermoactives ont été utilisées dans diverses applications comme dans la revalorisation de certains déchets (plumes, collagène, élastine, albumine) en acides aminés et en peptides à haute valeur ajoutée (Matsui *et al.*, 2009). Les protéases collagénolytiques membranaires de la bactérie thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1 ont été utilisées pour augmenter l'administration de médicaments dans certains tissus (Miyake *et al.*, 2005). En raison de leur compatibilité avec les conditions opératoires, des protéases thermoactives sont utilisées dans certaines techniques de biologie moléculaire, tels que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et le séquençage de l'ADN (Vieille et Zeikus, 2001; Synowiecki, 2010).

1.2.1.4. Lipases et estérases

Les lipases hydrolysent des triglycérides en glycérol et en acides gras et peuvent également catalyser la réaction inverse en présence de solvants organiques. Les lipases sont un groupe d'enzymes important d'un point de vue biotechnologique et elles trouvent leurs applications dans l'industrie alimentaire, les détergents, et les industries pharmaceutiques. Les estérases sont utilisées dans la biosynthèse organique. Dans une solution aqueuse, les estérases catalysent l'hydrolyse des esters pour former des acides et des alcools constitutifs, tandis que dans les solutions organiques, la réaction de transestérification est favorisée. Plusieurs gènes codant des estérases archéennes et bactériennes thermophiles sont clonés et exprimés dans des hôtes mésophiles (Tableau 4-Annexe 1). Ces enzymes affichent une bonne thermostabilité et une activité optimale à des températures comprises entre 70 et 100°C (Antranikian, 2008 ; Quérellou et Guézennec, 2010).

1.2.1.5. Enzymes de manipulation des acides nucléiques

Les technologies de l'ADN recombinant reposent sur l'utilisation d'enzymes très diverses : enzymes de restriction (coupant l'ADN en des sites précis), ADN polymérases, ADN ligases, etc. Les ADN polymérases thermostables jouent un rôle fondamental dans les techniques d'ingénierie du vivant grâce à leur aptitude à amplifier un gène donné en des millions de copies au moyen de la PCR.

Les enzymes les plus utilisées en amplification de gènes sont la Taq polymérase (70 % du marché) isolée de *Thermus aquaticus*, suivie des ADN polymérases isolées des archées hyperthermophiles des genres *Pyrococcus* et *Thermococcus* (Tableau 4-Annexe 1). Toutes ces

enzymes comportent plusieurs domaines aux fonctions complémentaires. La Taq polymérase comporte un domaine polymérase, chargé de la synthèse du brin d'ADN complémentaire du brin matrice, ainsi qu'un domaine exonucléase 5'-3' capable de déplacer le brin d'ADN ou les amorces situés en aval de la polymérase. Cette combinaison de propriétés est à la base du procédé de PCR en temps réel ou quantitative qui permet de suivre l'évolution du nombre de copies des fragments néosynthétisés et de déterminer l'abondance relative de matrices initiales. Toutefois, la Taq polymérase, ainsi que toutes les polymérases de *Thermus*, sont dépourvues d'exonucléase 3'-5', au contraire des polymérases archéennes des *Thermococcales*. La fonction de cette exonucléase est celle de correction d'erreur. De ce fait, la fidélité des ADN polymérases de la famille B des *Thermococcales* est de 2 à 10 fois meilleure que celle de la Taq. Elles constituent les enzymes de référence dès lors que la fidélité du produit final est essentielle, comme dans le cas de la production de protéines recombinantes. Les similarités de séquences entre les ADN polymérases de *Thermococcales* sont très élevées. En revanche, si elles remplissent les mêmes fonctions, elles ont des propriétés qui varient de manière importante : thermostabilité, fidélité, processivité (nombre de nucléotides incorporés au cours d'un seul cycle d'attachement de la polymérase à la matrice), paramètres cinétiques, taille des fragments amplifiés en PCR, etc. En outre, utilisées en combinaison avec la Taq, les ADN polymérases de *Pyrococcus* et de *Thermococcus* peuvent en PCR longue distance produire des fragments de grande taille, jusqu'à 20 kb à partir d'ADN génomique (Quérellou et Guézennec, 2010).

Les ADN polymérases thermostables jouent également un rôle important dans la création de copies d'ADN (ADNc) à partir d'ARN. Ainsi l'ADN polymérase de *Thermus thermophilus* HB8, a permis la constitution de bibliothèques d'ADNc, ressources inépuisables d'information biologiques largement disponibles et commercialisées (Harris *et al.*, 2010).

Le séquençage d'ADN par la méthode de Sanger a subi d'innombrables améliorations grâce à l'introduction des ADN polymérases thermostables dans le procédé de séquençage cyclique, une méthode qui emploie des cycles répétés de dénaturation thermique (Antranikian, 2008).

1.2.1.6. Autres enzymes

De nombreuses autres enzymes issues des thermophiles présentent un intérêt biotechnologique potentiel :

- ✓ l'alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1) utilisée dans les réductions énantio sélectives ; oxydation des alcools secondaires ;

- ✓ les décarboxylases (EC 4.1.1) catalysent la formation et le clivage des liaisons C-C ; réaction clé dans la production de blocs chiraux dans la synthèse de produits pharmaceutiques ;
- ✓ les cytochromes P450 oxydoréductases (EC 1.6.2.4) effectuent le transfert d'électrons aux cathodes dans les piles à combustibles ;
- ✓ les hydroxylases aromatiques (EC 1.14.13.) produisent des composés phénoliques réactifs à partir de substances aromatiques ;
- ✓ les nitrilases (EC 3.5.5.1) : dans la conversion de nitriles en acides carboxyliques ;
- ✓ les phytases hydrolysent l'acide phytique (phytate), un facteur antinutritionnel des céréales et des graines oléagineuses et libérant de ce fait du phosphore digestible ;
- ✓ les aminoacylases (EC 3.5.1.14) à spécificité chirale dans la synthèse des acides aminés acylés ;
- ✓ la β -galactosidase thermostable de *Pyrococcus woesei* est potentiellement utilisable dans la préparation du lait dé lactosé et d'autres produits laitiers ou comme catalyseur dans la synthèse des galacto-oligosaccharides, en utilisant le lactose comme substrat (Gomes et Steiner, 2004; Antranikian, 2008 ; Quérellou et Guézennec, 2010).

2.2.2. Solutés compatibles

L'accumulation des substances osmotiquement actives, appelées solutés compatibles, (thermoplytes ou extrêmolytes) par import ou synthèse, permet aux microorganismes de réduire la différence entre les potentiels osmotiques du cytoplasme cellulaire et de l'environnement extracellulaire (Antranikian, 2008). Ces composés sont des sucres fortement hydrosolubles, des sucres alcools, des alcools, des acides aminés, ou leurs dérivés. Ils ont gagné une attention croissante en biotechnologie suite à leur action comme stabilisateurs de biomolécules (enzymes, ADN, membranes, tissus) et agents protecteurs contre les facteurs de stress cellulaire (Borges *et al.*, 2002). En plus, les solutés compatibles augmentent les rendements de production de protéines recombinées actives et fonctionnelles exprimées dans différents hôtes (Barth *et al.*, 2000) (tableau 5).

2.2.3. Lipides et peptides

Les liposomes sont des vésicules artificielles sphériques se composant d'une ou plusieurs bicouches lipidiques. Ceux fabriqués à partir des phospholipides d'éther ont été étudiés intensivement comme modèle de membranes artificielles thermostables douées d'une étanchéité remarquable contre la fuite de corps dissous (Antranikian, 2008). D'où l'intérêt

pour l'application des liposomes en médecine, y compris leur utilisation en tant qu'agents de diagnostic, comme des véhicules porteurs de vaccin, de médicaments, de gènes ou d'agents provocants des cancers (Sprott *et al.*, 2003). Généralement les archaéosomes (liposomes des archées) montrent une stabilité plus élevée aux stress oxydatif et thermique, aux pH alcalins, à l'attaque des phospholipases, aux sels biliaires, et aux protéines sériques. Quelques formulations d'archaéosomes peuvent être stérilisées par autoclavage sans qu'il y ait fusion ou agrégation des vésicules. La prise des archaéosomes par les cellules phagocytaires peut être 50 fois plus élevée que celle des liposomes conventionnels (Patel et Sprott, 1999).

Les couches cristallines externes des cellules (S-layers) composées de protéines et de sous-unités glycoprotéiques sont fréquemment observées chez les bactéries et les archées (Antranikian, 2008). Elles sont produites en grandes quantités par culture continue des microorganismes porteurs et utilisées en tant que membranes isoporeuses d'ultrafiltration ou comme matrices d'immobilisation de macromolécules biologiquement actives comme les enzymes, les ligands ou les anticorps. Ces couches S se sont avérées d'excellents agents de structuration en nanotechnologie moléculaire en raison de leur grande organisation moléculaire (Sleytr *et al.*, 1997) (tableau 5).

La production de peptides et de bactériocines chez les thermophiles est peu étudiée, à l'exception des archaéocines produites par une souche thermoacidophile de *Sulfolobus* (O'Connor et Shand, 2002).

Tableau 5. D'autres exemples d'applications des thermophiles, et de leurs biomolécules (Antranikian, 2008).

Produit	Souche	Application
Chaperones, chaperonines, Protéines à liaison-maltodextrine, peptidyl-prolyl cis-transisomerase	<i>Methanothermococcus sp.</i> <i>Pyrococcus spp.</i> <i>Pyrococcus horikoshii</i> <i>Sulfolobus shibatae</i> <i>Thermococcus spp.</i> <i>Thermus spp.</i>	Stabilisation et solubilisation des protéines recombinées
Solutés compatibles (mannosylglycérate, mannosylglyceramide, diglycérol phosphate, di-myo-inositol-phosphate, N-acetyl- β -lysine, tréhalose, 2-sulfotréhalose, 2,3-Bisphosphoglycerate cyclique)	<i>Aeropyrum pernix</i> <i>Archaeoglobus spp.</i> <i>Methanococcus igneus</i> <i>Methanopyrus kandleri</i> <i>Methanosarcina thermophila</i> <i>Methanothermus fervidus</i> <i>Pyrobaculum aerophilum</i> <i>Pyrococcus spp.</i> <i>Pyrodictium occultum</i> <i>Pyrolobus fumarii</i> <i>Rhodothermus marinus</i> <i>Thermococcus spp.</i> <i>Thermus spp.</i>	Cosmétiques, stabilisateurs de tissus et de biomolécules
Cytochrome P450	<i>Sulfolobus solfataricus</i> <i>Thermus thermophilus</i>	Hydroxylation sélective dans les synthèses chimiques
H ₂ (Ni-Féhydrogénase)	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> <i>Carboxydotherrnus hydrogenoformans</i> <i>Fervidobacterium pennavorans</i> <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> <i>Thermotoga elfii</i> <i>Thermotoga neapolitana</i>	Production d'H ₂
La couche S protéique, lipases, liposomes	<i>Methanobrevibacter smithii</i> <i>Methanococcus spp.</i> <i>Methanothermus spp.</i> <i>Staphylothermus marinus</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i>	Développement de vaccins, diagnostics, biomimétique, médicaments, nanotechnologie
Cellules entières	<i>Thermococcus barophilus</i> <i>Pyrococcus furiosus</i>	Formation de gels et d'amidon granuleux Recyclage du caoutchouc

Chapitre 3. Taxonomie polyphasique et notion d'espèce

La taxonomie est la science qui étudie les relations entre les organismes. Elle englobe l'identification, la classification et la nomenclature. Ces trois parties consistent respectivement à identifier des organismes inconnus pour déterminer s'ils appartiennent aux groupes déjà définis, à classer et à arranger les organismes dans des groupes sur la base de similarités (classification), et enfin à donner des noms aux groupes trouvés (nomenclature) (Vandamme *et al.*, 1996). La taxonomie des procaryotes moderne se base sur plusieurs techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (protéines, acides gras, ADN etc.). Elle est de ce fait appelée taxonomie polyphasique ou mixte (Colwell *et al.*, 1990).

L'espèce est la catégorie taxonomique la plus basse et sert d'unité pour la description de la biodiversité et de l'évolution. Selon Rosselló-Mora et Amann (2001), l'espèce procaryote peut être définie comme « un groupe monophylétique et génomiquement cohérent d'organismes individuels présentant un niveau de similitude globalement élevé pour de nombreuses caractéristiques indépendantes, et détectables par une propriété phénotypique discriminante ».

1. Taxonomie phénotypique

Elle fait appel aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des procaryotes en utilisant des techniques standardisées. Les tests phénétiques classiques utilisés pour l'identification constituent la base de la description formelle des taxa. Le développement des systèmes miniaturisés et automatisés tels que les API ou BIOLOG, la généralisation du traitement des données par ordinateur et l'analyse numérique ont rendu plus aisée la classification des microorganismes par l'approche phénotypique. Cependant pour certains groupes de bactéries, le manque de caractéristiques phénotypiques pose souvent des problèmes pour leur description ou leur différenciation. Dans ces cas, les méthodes génétiques, les méthodes chimiotauxonomiques (techniques d'analyses des lipides polaires, des acides gras membranaires et constituants de la paroi, etc.) sont nécessaires pour identifier de manière sûre les souches (Zakhia et De Lajudie, 2006).

2. Taxonomie numérique

La taxonomie numérique définie par Sneath et Sokal (1963) permet de comparer les microorganismes sur la base de caractères phénétiques et de représenter leurs degrés de similitudes sous la forme de dendrogrammes (Rosselló-Mora et Amann, 2001).

La taxonomie numérique consiste à convertir les caractéristiques des entités taxonomiques en formes digitales couplées grâce à un ordinateur et ceci après avoir donné des valeurs égales à tous les caractères. Cette approche inclue la sélection de souches se rapprochant de souches types issues d'une collection culturelle. Après avoir sélectionné les souches appropriées à la comparaison, un ensemble de tests de routine doit être effectué (Prakash *et al.*, 2007). La standardisation des traitements et des conditions d'inoculation et d'incubation est essentielle à la réalisation de ces tests (Colwell et Austin, 1981). Les données obtenues sont généralement sous forme binaire (0/1) (Prakash *et al.*, 2007).

3. Taxonomie génotypique

Il s'agit de techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Elles sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne. Ceci est la conséquence des progrès technologiques, mais également et surtout du fait que la nouvelle conception de la taxonomie est qu'elle doit refléter les similarités entre les génomes (Zakhia et De Lajudie, 2006 ; Kampf, 2012).

Ainsi, il a été reconnu que la classification des procaryotes doit également refléter le plus fidèlement possible les relations naturelles entre ces organismes. En effet, ils présentent entre eux des relations de parenté ou de phylogénie. Ces relations phylogénétiques ont été difficiles à appréhender, mais les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'estimer l'évolution des procaryotes à l'aide de molécules qualifiées «d'horloges moléculaires universelles». Il s'agit de molécules présentes partout, avec la même fonction, très conservées et qui accumulent les mutations (variations de séquences) au cours du temps, permettant d'établir la phylogénie entre des organismes éloignés (Zakhia et De Lajudie, 2006).

Les ARN ribosomiques remplissent ces conditions par leurs gènes, en particulier celui de l'ARNr 16S, qui ont l'avantage de contenir des séquences de différents niveaux de conservation entre organismes, allant de séquences très conservées à des séquences très variables.

De nombreuses techniques basées sur l'approche moléculaire présentant différents niveaux d'expression et de discrimination ont été développées : détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G + C), hybridation ADN-ADN, caractérisation plasmidique, séquençage du gène codant l'ARNr 16S et autres gènes, séquençage du génome complet, méthodes de typage basées sur la PCR, etc. (Vandamme *et al.*, 1996).

Ainsi la combinaison de plusieurs techniques permet de révéler à la fois des diversités génétiques au sein des communautés procaryotes considérées jusqu'alors comme homogènes et des relations taxonomiques entre groupes très éloignés. Les caractéristiques phénotypiques et chimiotaxonomiques devant être en accord avec cette définition (Zakhia et De Lajudie, 2006).

Matériel et Méthodes

1. Sources thermales étudiées

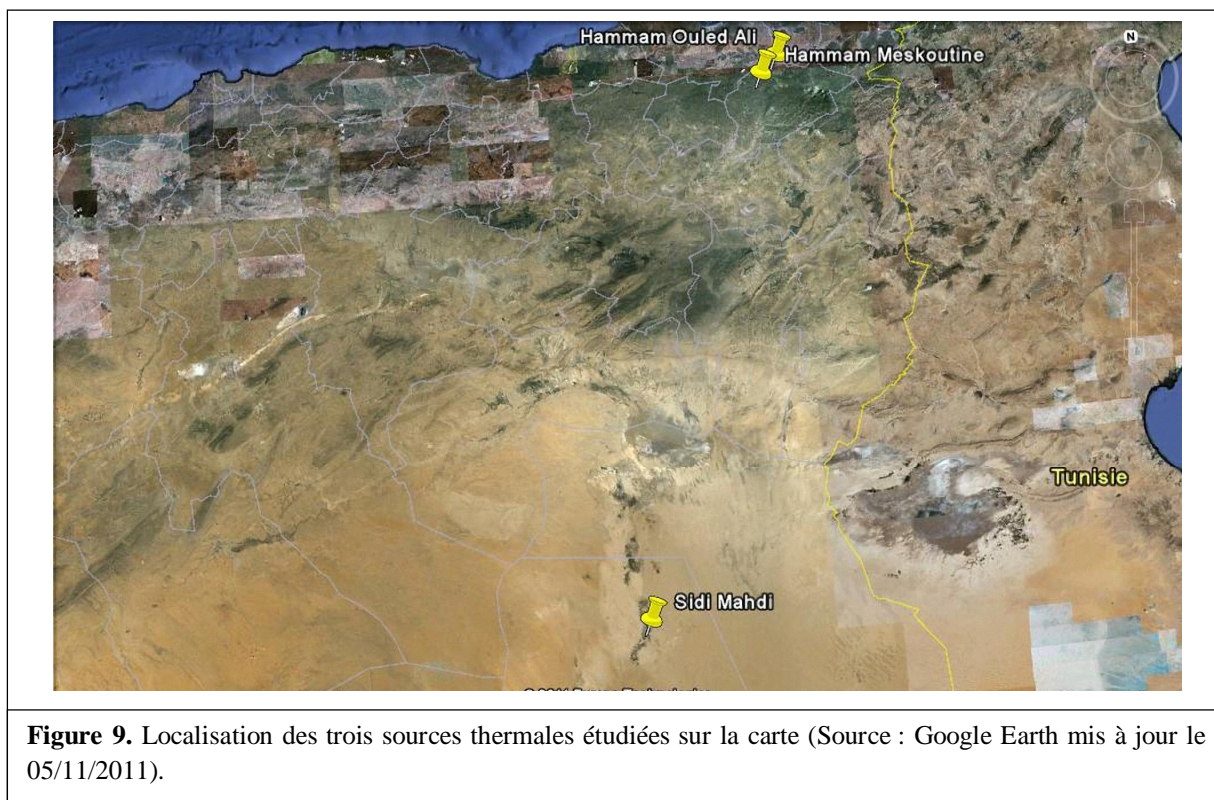
Les échantillons d'eau et de sédiments étudiés ont été prélevés sur des sites répartis entre les sources thermales situées dans les Wilayas de Guelma et de Ouargla (Figure 9).

- Hammam Debagh (Meskhoutine) est situé à 20 km au Sud du Chef-lieu de la Wilaya de Guelma (36°27'N, 7°16'E) et à 320m d'altitude. 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 (Boughlali, 2003).

- Hammam Ouled Ali est situé à 10 km au Nord-Est de Guelma (36°34'N, 7°24'E). Trois sources thermales alimentent les stations constituant le site. Le faciès chimique de ses eaux est chloruré calcique (Bahri *et al.*, 2010).

- La région de Sidi Mahdi est située dans la banlieue Sud de la ville de Touggourt-Ouargla (33°3'N, 6°5'E). Le site est constitué par plusieurs forages d'exploitation et de Sebkhass. Les eaux thermales sont de nature saline, le faciès chimique est chloruré sulfaté calcique et magnésien (Tabouche et Achour, 2004).

La caractérisation physico-chimique des 3 environnements est répertoriée dans le tableau 6-Annexe 2.



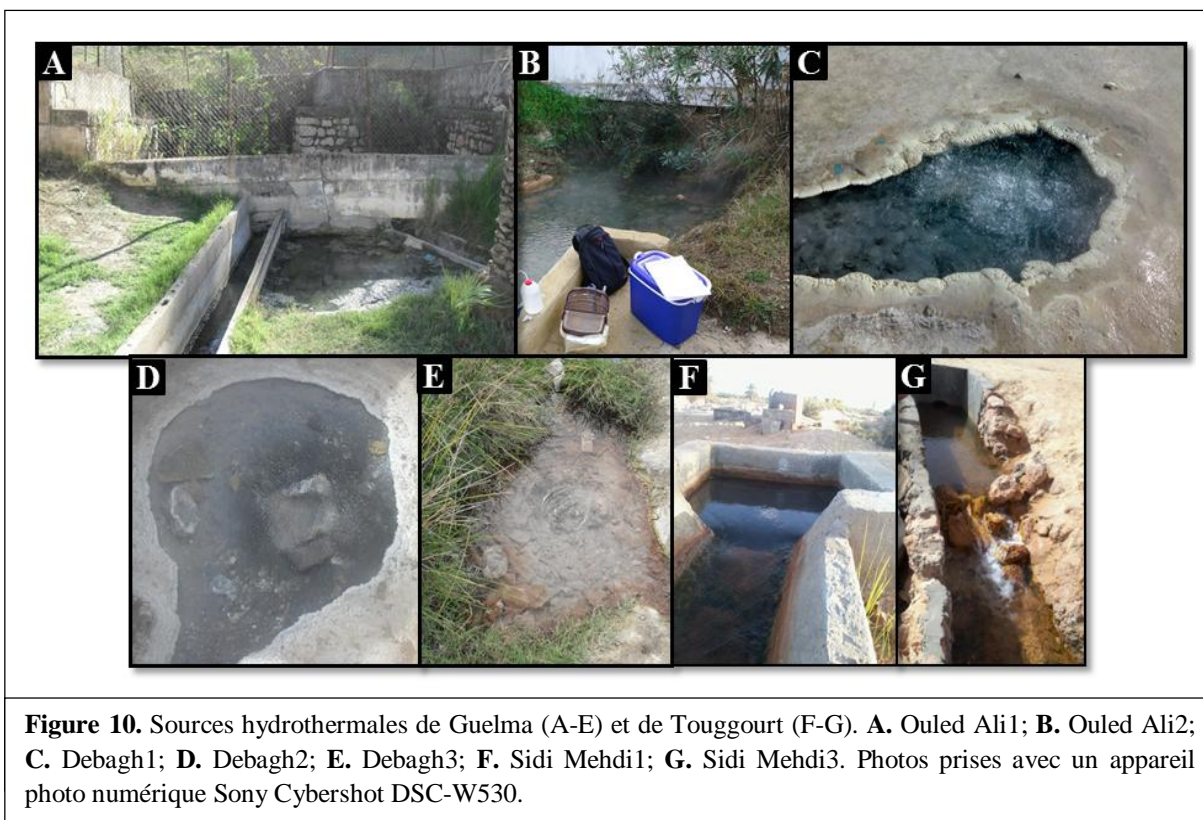
2. Echantillonnage

Les échantillons d'eaux et de sédiments ont été prélevés entre Mars et Mai 2011 à partir de huit points, répartis entre les sources thermales de hammam Debagh (3 points), de Ouled Ali (2 points) et de la région de Sidi Mahdi (3 points). Le choix des échantillons à traiter est réalisé de façon à varier la nature et le lieu de prélèvement de ces derniers.

Les échantillons d'eaux sont prélevés à 10-20cm de la surface dans des flacons stériles de 250ml. Ceux des sédiments sont récupérés depuis le fond de la source ou des alentours puis emballés dans du papier d'aluminium stérile.

Des mesures *in situ* de la température et du pH sont réalisées, respectivement à l'aide d'un thermomètre à immersion totale avec mercure et d'un pH mètre portatif (Lutron pH-201). La mesure du pH est revérifié au laboratoire par un pH mètre Jenway 3505. Les prélèvements sont transportés dans une glacière à 4°C (Figure 10).

Toute la partie expérimentale a été effectuée au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), université Mentouri-Constantine.



3. Isolement, purification et conservation des isolats

L'isolement des souches a été effectué sur six milieux de culture différents (Tableau 7-Annexe 3). A base d'eau de source filtrée, ces derniers sont peu sélectifs et conçus pour cultiver le plus grand nombre de procaryotes thermophiles aérobies possible. Sauf indication, le pH des milieux de culture est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH 4M et l'incubation est faite à 55°C. Ces conditions sont les plus couramment utilisés pour l'études des bactéries thermophiles hétérotrophes (Yavuzl *et al.*, 2004 ; Goodfellow et Jones, 2009 ; Logan *et al.*, 2009b).

Les milieux de culture solides sont obtenus par addition de 3% (p/v) d'Agar-Agar. Pour les échantillons de sédiments, 0,1g sont d'abord enrichis en microorganismes avec 9ml de bouillon d'enrichissement pendant 24heures (Tableau 7-Annexe 3).

L'isolement est effectué par étalement de 0,1 ml de l'échantillon ou de ses dilutions. L'incubation des boites de Pétri a lieu pendant 24 à 48 heures. De chaque milieu, environ une dizaine de colonies d'aspect différent est prélevée et purifiée par repiquages successifs sur les mêmes milieux solides. Les souches pures sont conservées à 4°C.

4. Souches contrôle

En absence de souches bactériennes thermophiles de référence, deux souches types appartenant à la collection américaine (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) et une souche isolée au niveau du CHU de Constantine (*Bacillus cereus* CHU) ont été utilisées comme souches contrôle lors des essais effectués (observation microscopique, tests biochimiques, etc.) (Tableau 8-Annexe 3). Ces souches ont été généreusement offertes par le service d'épidémiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine.

5. Identification des isolats

L'identification des isolats est faite en suivant les méthodes citées par Tindall *et al.* (2007) et également sur la base des tests proposés pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales* (Logan *et al.*, 2009a) et des recommandations faites par Tindall *et al.* (2010) pour la caractérisation de nouvelles souches procaryotes.

Le milieu 1 a servi de base pour la caractérisation et la conservation des isolats (Tableau 7-annexe 3).

5. 1. Caractérisations culturelle et morphologique

L'aspect macroscopique des colonies (forme, pigmentation, taille, etc.) est déterminé après croissance sur milieu solide après une incubation de 24 à 48 heures à l'aide d'une loupe binoculaire.

La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram des isolats sont déterminés sur des cultures de 24 heures par la technique de coloration différentielle décrite par Gram (1884) à l'aide d'un microscope photonique (modèle Motic phase contrast microscope).

Les endospores sont mises en évidence dans le corps bactérien sur des cultures âgées en faisant une coloration négative par application, après fixation, d'une solution au bleu de méthylène pendant 5 minutes (Harley et Prescott, 2002).

5.2. Caractérisation physiologique et biochimique

La composition chimique des milieux de culture pour l'analyse biochimique est rapportée dans le tableau 9-Annexe 3.

5.2.1. Température, pH et NaCl

L'influence sur la croissance de la température, du pH et de la concentration en NaCl est déterminée sur milieu solide 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.

Les milieux solidesensemencés sont incubés à 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ou 70°C. La tolérance au NaCl est étudiée en faisant varier la concentration finale de ce paramètre à 0 ; 0,5 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7,5 ; 8,5 ; 10 ; 12,5 et 15% (p/v) (Nazina *et al.*, 2001). L'intervalle de pH permettant la croissance est déterminé en variant ce dernier de 5 à 10 (Harley et Prescott, 2002).

5.2.2. Utilisation de substrats carbonés

L'utilisation des substrats-tests comme source unique de carbone, d'énergie et/ou d'azote a été testée sur le milieu 1 dépourvu de toute source organique et additionné de NH₄Cl (0,5 g.l⁻¹), et de KH₂PO₄ (0,005 g.l⁻¹). Les substrats sont rajoutés à une concentration finale de 1 % pour les sucres et de 0,1 % pour les alcools, les acides organiques et l'acide aminé (Gordon *et al.*, 1973).

Les substrats testés sont : le glucose, le fructose, le galactose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le saccharose, le mannitol, le glycérol, l'oxalate, l'acétate, le lactate et la glycine.

5.2.3. Utilisation du citrate

L'habilité des souches à utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie est testée sur le milieu au citrate de Simmons. Le virage au bleu du milieu indique une réaction positive (Harley et Prescott, 2002).

5.2.4. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d'H₂S et de CO₂ sont appréciées sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI) (Harley et Prescott, 2002).

5.2.5. Test Mannitol-Mobilité

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu semi-solide Mannitol-Mobilité. La mobilité de l'isolat est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la piqure d'inoculation et la fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (Harley et Prescott, 2002).

5.2.6. Mise en évidence des enzymes respiratoires

✓ Cytochrome oxydase

La cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne respiratoire pour catalyser la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Sa production est mise en évidence par des disques « Ox » imprégnés d'oxalate N-N-diméthylparaphénylène. Une quantité suffisante de culture est déposée sur le disque imbibé d'eau distillée. Une couleur bleu violacée se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive (Joffin et Leyral, 2006).

✓ Catalase

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par la souche. Sa recherche consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée à 10 volumes. Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de cette enzyme (Joffin et Leyral, 2006).

5.2.7. Caractérisation du type fermentaire

✓ Réaction au rouge de méthyle (RM)

La production d'acides mixtes par les souches est mise en évidence par ensemencement du bouillon glucosé de Clark et Lubs. La lecture se fait par addition de quelques gouttes de

réactif au rouge de méthyle et le virage de la couleur du bouillon au rouge indique la production d'acides mixtes (Harley et Prescott, 2002).

✓ Réaction de Vogues Proskauer (VP)

La production d'acétylméthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer) par les isolats est révélée par l'apparition d'une coloration rose du bouillon de Clark et Lubs après addition de 0,5 ml d' α -naphtol et le même volume de soude à 40% (p/v) (réaction de Barrit) (Harley et Prescott, 2002).

5.2.8. Recherche de la β -galactosidase

A une suspension dense des bactéries testées en eau distillée stérile, un disque imprégné d'Ortho-Nitro-phényl- β -Galactoside (ONPG) est ajouté puis incubée à 55°C pendant 30 à 60 minutes. L'apparition d'une couleur jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et donc la présence d'une β -galactosidase (Joffin et Leyral, 2006). Le test a été effectué pour 32 isolats.

5.2.9. Recherche de l'uréase

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur une gélose à l'urée de Christensen. La production de l'uréase libère le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu d'où virage de l'indicateur coloré de l'orange en rose ou en rouge-violacé (Harley et Prescott, 2002).

5.2.10. Dégradation des acides aminés

✓ Utilisation du tryptophane

La recherche de la tryptophanase, complexe enzymatique permettant la production d'indole à partir du tryptophane, est réalisée par inoculation d'un tube d'eau peptonée exempte d'indole. La production d'indole est mise en évidence par ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs (para-diméthyl-aminobenzaldéhyde/N-amyl ou isoamyl alcool/HCl pur) et une réaction positive est interprétée par l'apparition d'un anneau rouge à la surface (Joffin et Leyral, 2006).

✓ Production de décarboxylases et de l'arginine dihydrolase

Les activités enzymatiques de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) sont examinées en aérobiose, sur le bouillon de Moeller à partir d'une suspension dense de culture. Une activité positive est interprétée par une couleur violette (alcalinisation du milieu) et l'absence d'enzyme est exprimée par un virage au jaune (acidification du milieu) (Joffin et Leyral, 2006).

6. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les isolats sont soumis à une recherche qualitative d'hydrolases extracellulaires à 55°C. Le milieu 1 solide est modifié par réduction de la source organique (milieu de base) et l'addition du polymère-test (Demirjian *et al.*, 1999 ; Tholey et Heinzle, 2002). La composition des milieux modifiés utilisés est rapportée dans le tableau 10-Annexe 3.

6.1. Amylase

L'activité amylolytique est examinée en ajoutant 1% (p/v) d'amidon soluble au milieu de base. L'incubation est effectuée pendant 1 à 3 jours et la lecture se fait par inondation des boîtes avec une solution de lugol (Annexe 3). La présence de zones claires autour de l'ensemencement témoigne de la production d'amylases (Gordon *et al.*, 1973).

6.2. Protéases

✓ Hydrolyse de la gélatine

Le milieu de base est additionné de 0,4% (p/v) de gélatine. L'incubation est effectuée pendant 1 à 2 jours et la lecture se fait en rinçant les boîtes avec le réactif de Frazier. L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par l'apparition de zones claires autour des stries (Frazier, 1926).

✓ Hydrolyse de la caséine

Le milieu de base est modifié par addition de 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les souches testées sont incubées pendant 1 à 2 jours. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies suite à l'hydrolyse de ce polymère (Priest *et al.*, 1988).

6.3. Activités lipolytiques

L'estérase est recherchée par le test d'hydrolyse des Tween 20 et 80, le test d'hydrolyse de l'huile d'olive permet la recherche de lipase.

✓ Hydrolyse des Tween 20 et 80

Les Tween 20 ou 80 stériles sont rajoutés à une concentration de 1% (v/v) au milieu de base stérile en surfusion. Les boîtes de Pétri ensemencées sont incubées pendant 1 à 3 jours. Une lecture positive est traduite par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de lipases (Sierra, 1957).

✓ Hydrolyse de l'huile d'olive

Le milieu de base est stérilisé et additionné de 2,5% (v/v) d'huile d'olive stérilisé séparément. Le mélange est homogénéisé par agitation. Après ensemencement par touches et incubation pendant 1 à 3 jours. Une lecture positive est notée lorsqu'il y a apparition de zones claires autour des touches (Sigurgísladóttir *et al.*, 1993).

6.4. Cellulase

Le milieu de base est supplémenté par 0,5% (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC). Après incubation, 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 55°C. La solution de rouge congo est remplacée par une solution à 1M de NaCl et les boîtes sont laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production de cellulase ou de xylanase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (Bragger *et al.*, 1989).

7. Taxonomie numérique

L'analyse numérique des données est effectuée après codification des résultats des tests : 1 pour « positif ou présent », 0 pour « négatif ou absent ». La matrice contient 105 souches dont 22 sont des souches de référence (Tableau 11) et 73 caractères. Pour le calcul des similitudes entre souches, les données ont été traitées en utilisant le coefficient de corrélation « Simple Matching » de Sokal et Michener (1958). Les regroupements (clustérisation) des isolats par la méthode UPGMA ont été effectués sur un ordinateur LENOVO 3000 N200 qui utilise le programme TAXAN (The Numerical Taxonomy Program) Version 2, développé par l'Institut de Biotechnologie de Maryland, aux Etats-Unis. C'est un programme de classification taxonomique basé sur les caractéristiques semblables.

UPGMA utilise un algorithme de clustérisation séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité et la reconstruction de l'arbre se fait pas à pas grâce à cet ordre. Il y a d'abord une identification des deux individus « OTU » (Operational Taxonomic Units) les plus proches et ce groupe est ensuite traité comme un tout, puis une recherche de l'individu le plus proche et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que deux groupes. Cet algorithme permet de calculer un arbre ultra métrique (Luchetta *et al.*, 2005).

La construction graphique des dendrogrammes a été effectuée avec le logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Version 5.0 de Tamura *et al.* (2011).

Les souches de référence utilisées, mentionnées dans le tableau 11, correspondent aux principaux taxa thermophiles, hétérotrophes et aérobies isolées à partir d'environnements

chauds terrestres et autres. Leurs caractères phénétiques exploités pour l'analyse numérique (tirés de la bibliographie), sont mentionnés dans le tableau 12-Annexe 4.

Tableau 11. Souches de références utilisées pour la taxonomie numérique.

Souche	Origine	Auteur
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 22 ^T	Aliments en conserves	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Geobacillus jurassicus</i> DSM 15726 ^T	Eaux d'un champ pétrolier (Chine)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> Sharp 12643	Source thermale terrestre (Thaïlande)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Geobacillus thermoglucosidans</i> DSM 2542 ^T	Sol (Japan)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Geobacillus thermantarcticus</i> DSM 9572 ^T	Sol du Mont Melbourne (Antarctique)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Geobacillus toebii</i> DSM 14590 ^T	Compost (Corée du sud)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Caldibacillus debilis</i> DSM 16016 ^T	Sol (Irlande)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i> DSM 15730 ^T	Boues (Singapour)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Anoxybacillus tepidamans</i> DSM 16325 ^T	Source thermale terrestre (Etats-Unis)	(Coorevits <i>et al.</i> , 2012)
<i>Anoxybacillusvoinovskiensis</i> TH13 ^T	Source thermale terrestre (Russie)	(Yumoto <i>et al.</i> , 2004)
<i>Anoxybacillus rupiensis</i> DSM 17127 ^T	Source thermale terrestre (Bulgarie)	(Derekova <i>et al.</i> , 2007)
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> DSM 2641 ^T	Source thermale terrestre (Nouvelle-Zélande)	(Pikuta <i>et al.</i> , 2000)
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> K4	Source thermale terrestre (Turquie)	(Dulger <i>et al.</i> , 2004)
<i>Ureibacillus terrenus</i> DSM 12654 ^T	Sol (Italie)	(Fortina <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Geobacillus caldioxysilyticus</i> DSM 12041 ^T	Sol (Australie)	(Fortina <i>et al.</i> , 2001a)
<i>Saccharococcus thermophiles</i> DSM 4749 ^T	Mélasse de betterave	(Nystrand, 1984)
<i>Thermaerobacter litoralis</i> DSM 17372 ^T	Passage hydrothermal (côtes du Japon)	(Tanaka <i>et al.</i> , 2006)
<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM 3670 ^T	Source thermale terrestre (Mexique)	(Minana-Galbis <i>et al.</i> , 2010)
<i>Thermobacillus xylanilyticus</i> XE ^{TP}	Sol (France)	(Touzel <i>et al.</i> , 2000)
<i>Caldimonas hydrothermale</i> DSM 18497 ^T	Source thermale terrestre (Tunisie)	(Bouraoui <i>et al.</i> , 2010)
<i>Kroppenstedtia eburnean</i> DSM 45 196 ^T	Surface en plastique (Allemagne)	(Von Jan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Laceyella tengchongensis</i> DSM 45262 ^T	Sol volcanique (Chine)	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)

T : type.

Résultats et discussion

1. Analyse physico-chimique des échantillons

Les valeurs de température et de pH enregistrées pour les eaux des sources thermales étudiées sont notées dans le tableau 13.

Les eaux thermales de Guelma, possèdent un pH légèrement acide à neutre (pH 6,45 à 7,11), alors que celles des sources de Sidi Mahdi tendent légèrement vers l'alcalinité (pH 7,60 à 7,74). La nature chimique chloruro-calcique de ces eaux accompagnée d'une salinité relativement élevée due probablement à la composition lithologique des sites étudiés (Tableau 6-Annexe 2), peut expliquer ces valeurs de pH. Une étude sur la caractérisation et la classification de 41 sources thermales algériennes réparties sur 14 zones géographiques, comprenant les sites de la présente étude, a révélé des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 8,8 et une salinité relativement élevée (550 mg/l à 5500 mg/l) comparée à celle de l'eau potable (Bahri *et al.*, 2010).

Des températures comprises entre 49,5°C et 57°C ont été enregistrées aux points de prélèvement Db₃, OA₁, OA₂, SM₁, SM₂ et SM₃. Une présence de végétation plus ou moins dense ainsi que celle d'algues autour et au niveau de ces points a été observée ce qui suggérerait que ces températures modérément élevées ont permis leur croissance. A l'inverse, les points de prélèvements Db₁ et Db₂ enregistrent des températures de 90°C et de 96°C, respectivement, avec un environnement dégagé et la présence moins évidente, de formes de vie macroscopique (Figure10). Il est évident que la température influence la biodiversité de ces biotopes.

Tableau 13. Valeurs de température et de pH enregistrées au niveau des points de prélèvements d'eau.

Sites		Date du prélèvement	T° source (°C)	pH
Hammam Debagh -Guelma-	Point de prélèvement 01 (Db ₁)	18/03/2011	90	6,83
	Point de prélèvement 02 (Db ₂)	18/03/2011	96	6,74
	Point de prélèvement 03 (Db ₃)	18/03/2011	50	6,45
Hammam Ouled Ali -Guelma-	Point de prélèvement 01 (OA ₁)	18/03/2011	52	7,11
	Point de prélèvement 02 (OA ₂)	18/03/2011	57	6,62
Sidi Mahdi -Ouargla-	Point de prélèvement 01 (SM ₁)	04/05/2011	49,5	7,67
	Point de prélèvement 02 (SM ₂)	04/05/2011	55	7,60
	Point de prélèvement 03 (SM ₃)	04/05/2011	52°C	7,74

2. Isolement et purification des isolats

Les six milieux de cultures utilisés ont permis l'isolement de plus d'une centaine de souches à partir des différents sites (hammam Debagh, hammam Oued Ali, Sidi Mahdi) et échantillons (eau, sédiments). Au final, quatre-vingt trois (83) isolats sont retenus pour cette étude et désignés selon un code composé de lettres et de numéros. Sur ce total, 40 isolats sont issus de la région de hammam Debagh (Meskhoutine), 17 isolats de la région de Ouled Ali et 26 isolats de la région de Sidi Mahdi (Tableau 14).

Les observations des premiers isolements ont montré une croissance importante et rapide sur les milieux de culture 1, 2 et 4 par rapport aux milieux 3, 5 et 6. En effet, les premières colonies sont apparues après 18 à 24 heures d'incubation. Cependant, il y avait peu de diversité dans l'aspect macroscopique des colonies sur le premier lot de milieux, comparativement avec le deuxième lot.

Par la suite, les souches purifiées sont repiquées et conservées sur le milieu 1. Ce choix peut être justifié par le fait que la croissance de tous les isolats, était meilleure et plus rapide sur ce milieu (les colonies apparaissaient après 12 à 24 heures d'incubation à 55°C).

3. Caractérisation phénétique des isolats

La caractérisation phénétique des isolats a été réalisée après avoir déterminé les conditions optimales de croissance (température, pH et salinité).

3.1. Caractérisations culturelle et cellulaire des isolats

Dans le tableau 15 sont présentés les résultats des caractères cultureux et cellulaires des isolats.

3.1.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des souches sur le milieu 1, a permis de dégager trois aspects différents de colonies (Figure 11) :

- ✓ Colonies de type lisse (L)

Ce type cultural est le plus rencontré, caractérisé par des colonies de forme ombiliquée, de consistance crémeuse, translucide à opaque à la lumière, transparente dans certains cas. Leur surface est lisse, bombée et les bords sont réguliers.

- ✓ Colonies de type rugueux (R)

Dix-huit souches présentent ce type de formation. Les colonies ont une surface rugueuse, lobée, à bords dentelés ou filamenteux, de consistance sèche, opaque à la lumière. Les colonies présentent un mycélium aérien abondant 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. A noter que parmi ces 18 souches, 17 ont été isolées des sources thermales de Guelma (Tableaux 14 et 15).

✓ Colonies de type muqueux (M)

Colonies muqueuses et bombées, translucides voir transparentes, à bords réguliers ou ondulés. Une seule souche est pigmentée en jaune, il s'agit de Db17 isolée des sédiments récupérés du point de prélèvement Debagh 2.

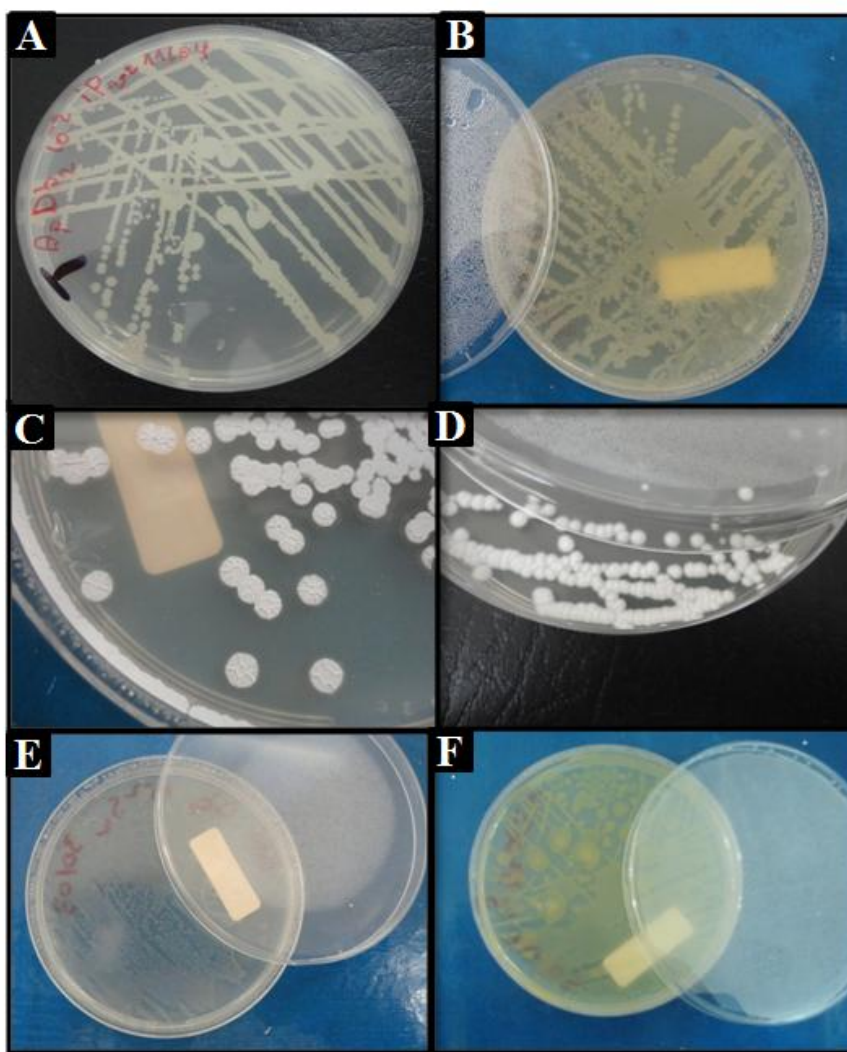


Figure 11. Aspects macroscopique des souches isolées cultivées sur le milieu (1). **Type L** : **A.** souche Db56, **B.** souche OA48. **Type R** : **C.** souche Db8, **D.** souche Db26. **Type M** : **E.** souche Db55, **F.** souche Db17. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cybershot DSC-W530 (zoom x2).

Tableau 14. Répartition des isolats par origine et par milieu de culture utilisé.

Milieux de culture	Point de prélèvement														Total
	Hammam Debagh (Db)						Hammam Ouled Ali (OA)				Sidi Mahdi (SM)				
	Db1		Db2		Db3		OA1		OA2		SM1	SM2		SM3	
	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	E	S	E	
1	Db8, Db9, Db10	Db7	Db18, Db19	Db17	Db32, Db33, Db34, Db35, Db36	Db31	OA42, OA43, OA44	OA41	OA51, OA52, OA53	OA50	SM66		SM72, SM73, SM74, SM75	SM78, SM79	28
2			Db20, Db21, Db22								SM65	SM67, SM68, SM69		SM80, SM81	9
3	Db1, Db2, Db3, Db4, Db5		Db11, Db12, Db13, Db14, Db15, Db16		Db26, Db27, Db28, Db29, Db30		OA37, OA38, OA39, OA40		OA49		SM61, SM62, SM63, SM64				25
4			Db23, Db24, Db25				OA45, OA46, OA47, OA48				SM58, SM59, SM60			SM82, SM83	12
5	Db54		Db55, Db56, Db 57									SM70, SM71		SM76, SM77	8
6	Db6														1
Tot.	11		18		11		12		5		9	9		8	83

E : eau, S : sédiments, Tot. : Total.

3.1.2. Aspect microscopique

✓ Souches à Gram positif

La coloration de Gram, effectuée sur des cultures jeunes sur milieu 1, a révélé que 79 souches sont à Gram positif. Les formes cellulaires observées en microscopie photonique sont les suivantes :

- Des bâtonnets parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangés en longues chaînes ou en chaînettes selon les isolats. Une fois âgées (cultures de 72 heures), quelques souches forment une endospore par cellule en position terminale ou subterminale (Figure 12). Ce type cellulaire a été observé avec les souches formant des colonies de types Lisse ou Muqueux.

- L'aspect coccobacille est rencontré uniquement chez la souche OA40 qui forme des chaînes plus ou moins longues alors que la forme coccoïde avec un mode de formation en grappe est observée chez la souche Db6.

- L'observation microscopique des mycéliums aériens des 18 souches de type Rugueux a révélé des structures filamenteuses arborescentes, avec présence de spores (Figure 12-A).

✓ Souches à Gram négatif

Quatre souches (Db10, Db30, Db31 et OA45) sont à Gram négatif. Les cellules se présentent sous forme de bâtonnets sans mode de formation particulière.

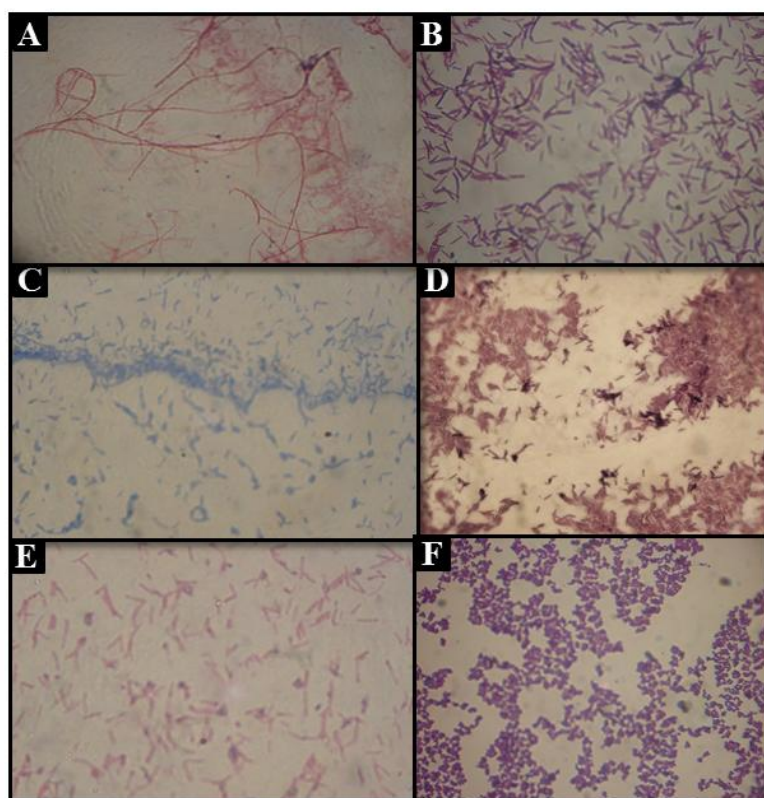


Figure 12. Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). **A.** Coloration de Gram de la souche Db54 ; **B.** Coloration de Gram de la souche SM69 ; **C.** Coloration au bleu de méthylène de la souche Db19 ; **D.** Coloration de Gram de la souche OA43 ; **E.** Coloration de Gram de la souche Db10 ; **F.** Coloration de Gram de la souche Db6. Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber shot DSC-W530 (zoom x4).

Tableau 15. Caractérisations culturelle et cellulaire des isolats.

Souche	Gram	Forme des cellules	Endospore	Aspect colonies	Couleur	Souche	Gram	Forme des cellules	Endospore	Asp colonies	Couleur
Db1	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème	OA39	+	Filaments	-	R	Blanche
Db2	+	Bâtonnets	Terminale	M	Crème	OA40	+	Coccobacilles	Subterminale	M	Trans
Db3	+	Bâtonnets	-	L	Trans	OA41	+	Bâtonnets en chaine	-	L	Crème
Db4	+	Filaments	-	R	Blanche	OA42	+	Bâtonnets	-	L	Crème
Db5	+	Bâtonnets	-	L	Crème	OA43	+	Bâtonnets	Subterminale	M	Trans
Db6	+	Coccoïdale	-	M	Trans	OA44	+	Filaments	-	R	Blanche
Db7	+	Bâtonnets	-	M	Crème	OA45	-	Bâtonnets	-	L	Trans
Db8	+	Filaments	-	R	Blanche	OA46	+	Bâtonnets	-	L	Trans
Db9	+	Bâtonnets	Terminale	M	Crème	OA47	+	Bâtonnets en chaine	Subterminale	L	Trans
Db10	-	Bâtonnets	-	M	Crème	OA48	+	Bâtonnets	Terminale	L	Trans
Db11	+	Filaments	-	R	Blanche	OA49	+	Filaments	-	R	Blanche
Db12	+	Filaments	-	R	Blanche	OA50	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
Db13	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème	OA51	+	Filaments	-	R	Blanche
Db14	+	Bâtonnets	-	L	Crème	OA52	+	Filaments	-	R	Blanche
Db15	+	Bâtonnets	-	L	Crème	OA53	+	Filaments	-	R	Blanche
Db16	+	Filaments	-	R	Blanche	SM58	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
Db17	+	Bâtonnets	-	M	Jaune	SM59	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
Db18	+	Filaments	-	R	Blanche	SM60	+	Bâtonnets	-	L	Crème
Db19	+	Bâtonnets	-	M	Trans	SM61	+	Bâtonnets en chaine	-	L	Crème
Db20	+	Bâtonnets	-	L	Trans	SM62	+	Bâtonnets en chaînette	-	L	Trans
Db21	+	Bâtonnets	Terminale	L	Trans	SM63	+	Bâtonnets	-	L	Crème
Db22	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Trans	SM64	+	Bâtonnets en chaînette	Subterminale	L	Crème
Db23	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Trans	SM65	+	Filaments	-	R	Blanche
Db24	+	Bâtonnets	-	M	Trans	SM66	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
Db25	+	Filaments	-	R	Blanche	SM67	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
Db26	+	Bâtonnets	-	L	Crème	SM68	+	Bâtonnets	-	L	Crème
Db27	+	Filaments	-	R	Blanche	SM69	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
Db28	+	Bâtonnets	-	M	Trans	SM70	+	Bâtonnets en chaînette	Subterminale	L	Crème
Db29	+	Filaments	-	R	Blanche	SM71	+	Bâtonnets	-	L	Crème
Db30	-	Bâtonnets	-	L	Crème	SM72	+	Bâtonnets	-	M	Trans
Db31	-	Bâtonnets	-	M	Trans	SM73	+	Bâtonnets	-	M	Trans
Db32	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Trans	SM74	+	Bâtonnets	Subterminale	M	Trans
Db33	+	Bâtonnets	-	L	Crème	SM75	+	Bâtonnets en chaînette	Subterminale	M	Trans
Db34	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème	SM76	+	Bâtonnets en chaînette	Subterminale	L	Crème
Db35	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème	SM77	+	Bâtonnets	-	L	Crème
Db36	+	Bâtonnets en chaînette	-	M	Trans	SM78	+	Bâtonnets en chaînette	Subterminale	L	Crème
Db54	+	Filaments	-	R	Blanche	SM79	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
Db55	+	Bâtonnets	Terminale	L	Trans	SM80	+	Bâtonnets	-	L	Trans
Db56	+	Bâtonnets	-	M	Trans	SM81	+	Bâtonnets	-	L	Crème
Db57	+	Bâtonnets	Subterminale	M	Trans	SM82	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
OA37	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Trans	SM83	+	Bâtonnets	Subterminale	L	Crème
OA38	+	Filaments	-	R	Blanche						

L : Type lisse. M : Type muqueux. R : Type rugueux. +: Gram positif. -: Gram négatif ou absence. Trans: colonies transparentes.

3.2. Caractérisation physiologique des isolats

3.2.1. Température de croissance

La gamme de températures explorée varie de 30 à 70°C. Au-delà de 70°C l'agar devient instable et l'évaporation de l'eau est très importante ce qui rend la culture impossible, d'autres polymères plus thermostables comme la Gelrite (gellan gum) ou bien le poly silicate devraient être utilisés (Volkl *et al.*, 1993). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16. Généralement, la croissance de l'ensemble des souches est optimale entre 55°C et 60°C, ce qui correspondait à la température initiale de l'isolement de la plus part des souches.

Selon les intervalles de croissance obtenus, 3 groupes différents peuvent être dégagés. Le premier groupe correspond aux souches ayant une température minimale comprise entre 40 et 55°C et pouvant se développer à 70°C, le deuxième est celui des souches qui ont une température maximale de croissance de 65°C et un minimum variant entre 35°C et 45°C voir même 50°C. Enfin le dernier groupe, numériquement le plus important, inclue les souches possédant un intervalle de température plus large (de 30 à 70°C). Il comprend toutes les souches isolées des sources de Sidi Mahdi.

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont désormais classés surtout selon leur optimum de température de croissance, et les classifications précédentes, basées sur le concept de thermophilie, de thermotolérance et des intervalles minimal et maximal de croissance étant trop restrictives, ont été écartées (Mesbah et Wiegel 2008 ; Wagner et Wiegel 2008). Ils sont ainsi classés en thermophiles modérés (T_{opt} de 50° à 70°C), thermophiles extrêmes (T_{opt} de 70°C à 80°C) et hyperthermophiles ($T_{opt}>80°C$) (Stetter, 1996). En se basant sur cette définition, nos souches dont l'optimum de croissance est situé entre 55 et 60°C, sont qualifiées de thermophiles modérées. Généralement, c'est le cas de la majorité des bactéries hétérotrophes aérobies isolées jusqu'à maintenant (Logan et Halket, 2011).

3.2.2. Tolérance au NaCl et spectre de pH

Les spectres de salinité et de pH enregistrés figurent dans le tableau 16. Toutes les souches étudiées peuvent se développer en absence de NaCl et la plupart sont incapables de croître au-delà de 5% (p/v) de NaCl et présentent une gamme de pH de croissance relativement réduite (pH 6 à pH 8). Cependant, un groupe formé de 11 souches a pu se développer au-delà de ces limites. En effet, les souches Db6, Db13, Db19, Db32, Db55, OA40, SM74 croissent (mais faiblement) à des concentrations en NaCl de 12,5% (p/v) et possèdent un intervalle de pH plus considérable que les autres isolats et tolèrent ainsi des variations de pH de 5,5 à 10 avec un optimum autour de 7,5. Ce sont des neutrophiles mais

qui peuvent être qualifiées également d'halotolérantes et d'alcalitolérantes selon Larsen (1986) et Krulwich et Guffanati (1989), respectivement. Ces deux caractères sont souvent conjugués et il a été prouvé que l'alcali-résistance voir même l'alcaliphilie exigeait la présence intracellulaires d'ions sodium pour le métabolisme et la régulation, c'est la raison pour laquelle la plupart des organismes alcaliphiles sont au moins halotolérants. Cette tolérance peut s'étendre sur de larges intervalles de pH, ce qui signifie qu'elles peuvent se développer également à des pH acides grâce à d'autres mécanismes, d'acidotolérance cette fois-ci (accumulation de solutions compatibles et de protons H⁺) (Lewinson *et al.*, 2004).

Par ailleurs, de nombreux polyextrêmophiles « alcali-thermophiles et halophiles » ont été déjà isolés (Mesbah et Wiegel 2008 ; Canganella et Wiegel, 2011). A l'image de cette espèce de l'ordre des *Thermotogales* (*Thermopallium natronophilum*), thermophile extrême, halophile et alcaliphile (Duckworth *et al.*, 1996).

3.2.3. Utilisation des substrats carbonés

Les résultats de croissance sur les différents substrats testés comme unique source de carbone, d'énergie et/ou d'azote sont présentés dans le tableau 17. Les sucres sont les plus assimilés par les isolats et il en ait de même du mannitol. Alors que le glycérol et la glycine le sont faiblement. Le citrate est le seul acide organique assimilé par quelques isolats.

3.3. Caractérisation biochimique des isolats

Les résultats de la caractérisation biochimique des souches sont représentés dans le tableau 18.

3.3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires

Toutes les souches bactériennes étudiées possèdent au moins l'une des deux enzymes respiratoires recherchées, et 66 d'entre elles sont oxydase et catalase positives. La plupart des microorganismes aérobies possèdent ces enzymes y compris les bactéries thermophiles.

3.3.2. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron

Le milieu Triple Sugar Iron (TSI) renseigne sur la capacité à dégrader le glucose, le lactose et/ou le saccharose. L'oxydation du lactose et/ou du saccharose est observée chez plus de souches que la fermentation du glucose. Par ailleurs, cette fermentation n'est pas accompagnée d'une production de CO₂ et d'H₂S.

Tableau 16. Caractérisation physiologique des isolats.

Souche	T (°C) [min-max[NaCl (%) [min-max]	pH [min-max]	Souche	T (°C) [min-max[NaCl (%) [min-max]	pH [min-max]
Db1	55-70	0-1	7-8	OA39	40-70	0-5	6,5-8
Db2	55-70	0-1	7-8	OA40	35-70	0-12,5	5,5-9
Db3	45-65	0-1	6-10	OA41	40-65	0-1	6,5-8
Db4	45-65	0-5	6,5-7,5	OA42	35-65	0-5	6,5-9
Db5	40-65	0-5	5,5-10	OA43	35-65	0-3	5,5-9
Db6	35-65	0-12,5	5,5-10	OA44	35-65	0-3	6,5-8,5
Db7	40-65	0-3	6,5-10	OA45	40-70	0-1	7-7,5
Db8	45-65	0-5	6,5-10	OA46	40-70	0-3	7-7,5
Db9	55-70	0-5	7-10	OA47	40-70	0-3	7-7,5
Db10	35-70	0-10	5,5-10	OA48	40-70	0-1	7-7,5
Db11	55-70	0-3	6,5-10	OA49	40-65	0-3	6,5-8,5
Db12	40-70	0-7,5	6,5-10	OA50	40-65	0-1	6,5-9
Db13	35-65	0-12,5	5,5-10	OA51	40-65	0-3	6,5-9
Db14	35-65	0-3	6,5-10	OA52	40-65	0-3	6,5-9
Db15	35-65	0-10	5,5-10	OA53	40-65	0-3	6,5-8,5
Db16	55-70	0-3	6,5-8	SM58	30-70	0-0,5	6-8
Db17	40-65	0-3	7-9	SM59	30-70	0-0,5	6-8
Db18	45-70	0-3	6,5-8	SM60	30-70	0-3	6,5-8
Db19	35-65	0-12,5	5,5-10	SM61	30-70	0-1	6-8
Db20	40-70	0-0,5	7-7,5	SM62	30-70	0-3	6-8
Db21	40-70	0-0,5	7-7,5	SM63	30-70	0-3	6,5-8
Db22	40-70	0-0,5	7-7,5	SM64	30-70	0-1	6-8
Db23	40-70	0-3	7-7,5	SM65	30-70	0-3	6,5-10
Db24	40-70	0-5	7-10	SM66	30-70	0-3	6,5-8
Db25	40-70	0-3	7-7,5	SM67	30-70	0-1	6-8
Db26	40-65	0-3	6,5-9	SM68	30-70	0-3	6,5-8
Db27	50-65	0-3	6,5-7,5	SM69	30-70	0-0,5	6-8
Db28	40-65	0-3	6,5-9	SM70	30-70	0-3	6-8
Db29	50-65	0-0,5	6,5-7,5	SM71	30-70	0-3	6-8,5
Db30	50-70	0-3	6,5-7,5	SM72	30-70	0-3	6-8
Db31	45-70	0-3	6,5-9	SM73	30-70	0-10	6-9
Db32	35-70	0-12,5	5,5-10	SM74	30-70	0-12,5	6-10
Db33	40-70	0-3	6,5-9	SM75	30-70	0-7,5	6-9
Db34	35-65	0-12,5	5,5-9	SM76	30-70	0-3	6-8,5
Db35	40-65	0-1	6,5-10	SM77	30-70	0-3	6-8
Db36	35-65	0-10	5,5-10	SM78	30-70	0-3	6-8
Db54	30-70	0-1	6,5-8,5	SM79	30-70	0-3	6-8
Db55	30-70	0-12,5	6-10	SM80	30-70	0-3	6-8
Db56	30-70	0-0,5	6,5-8	SM81	30-70	0-3	6-8
Db57	30-70	0-0,5	6,5-8	SM82	30-70	0-3	6,5-8
OA37	40-65	0-5	6,5-9	SM83	30-70	0-3	6-8
OA38	40-65	0-3	6,5-8				

3.3.3. Test Mannitol-Mobilité

La fermentation du mannitol a été observée chez 36 souches. Un virage faible de l'indicateur au jaune a également été noté. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est, en général insuffisante face à l'importance du pouvoir tampon du milieu (Joffin et Leyral, 2006).

La plupart des souches sont immobiles. En effet, 12 souches seulement ont donné un résultat positif pour ce caractère sur le milieu mannitol-mobilité.

3.3.4. Caractérisation du type fermentaire

Seules quelques souches ont réagi positivement au test au rouge de méthyle, indicateur de la production d'acides mixtes, et au test du Voges-Proskauer, indicateur de la production d'acétoïne par fermentation du glucose. Il faut noter que 6 isolats sont positifs aux deux tests.

3.3.5. Recherche de la β -galactosidase

Sur les 32 souches testées pour l'hydrolyse de l'ONPG, 12 possèdent une β -galactosidase. Parmi ces dernières, 10 isolats peuvent aussi utiliser le lactose comme unique source de carbone et d'énergie. L'absence d'une β -galactoside-perméase responsable du transport du lactose à l'intérieur de la cellule serait responsable parfois du résultat négatif de la β -galactosidase (Joffin et Leyral, 2006).

3.3.6. Recherche de l'uréase

Quarante-trois souches se sont révélées uréase positives en se basant sur l'alcalinisation plus ou moins importante du milieu de Christensen.

3.3.7. Utilisation du tryptophane

La mise en évidence de l'indole, et donc de la tryptophanase, a été négative pour toutes les souches de cette étude.

3.3.8. Production de décarboxylases (LDC, ODC) et arginine dihydrolase (ADH)

Les résultats de la recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et de l'arginine dihydrolase sont donnés dans le tableau 18. Sur l'ensemble des souches, 31 sont ADH positive, 21 sont ODC positive et 9 sont LDC positive.

Tableau 17.Utilisation des substances organiques.

Souche	Glc	Fru	Gal	Mél	Mal	Sac	Lac	Man	Gly	Acétate	Oxalate	Lactate	Glycérol	Citrate
Db1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Db2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Db3	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db6	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db7	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Db8	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db9	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Db10	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Db11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db13	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Db14	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db15	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Db16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db17	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Db18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db19	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Db20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Db21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Db22	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Db23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Db24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Db25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db26	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db27	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Db28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Db29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Db31	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Db32	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Db33	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Db34	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Db35	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db36	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db54	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Db55	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Db56	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Db57	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
OA37	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
OA38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Présence de croissance. - : Absence de croissance. Glc: glucose. Fru: fructose. Gal: galactose. Mél : mélibiose. Sac : saccharose. Lac : lactose. Man : mannitol. Gly : glycine

Tableau 17.Utilisation des substances organique (Suite).

Souche	Glc	Fru	Gal	Mél	Mal	Sac	Lac	Man	Gly	Acétate	Oxalate	Lactate	Glycérol	Citrate
OA39	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OA40	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
OA41	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OA42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OA43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OA44	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OA45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OA46	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OA47	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OA48	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
OA49	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OA50	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
OA51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OA52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM59	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
SM61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM62	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
SM63	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SM64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
SM65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM67	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM68	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM69	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM70	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM71	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM72	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM73	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
SM74	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
SM75	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SM76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM77	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM79	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SM80	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM81	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
SM82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SM83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-

+ : Présence de croissance. - : Absence de croissance. Glc: glucose. Fru: fructose. Gal: galactose. Mél : mélibiose. Sac : saccharosse. Lac : lactose. Man : mannitol. Gly : glycine

Tableau 18. Caractérisation biochimique des isolats.

Souche	Sac/lac*	Glc*	H ₂ S*	Gaz*	Mob**	Man**	Catalase	oxydase	RM	VP	β-gal	Urée	Indole	ADH	ODC	LDC
Db1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	Nd	+	-	+	-	-
Db2	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
Db3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
Db4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Nd	+	-	+	+	-
Db5	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
Db6	+	+	-	-	F	+	+	+	-	+	Nd	+	-	+	-	-
Db7	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	Nd	F	-	-	-	-
Db8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db9	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Db10	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Db11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Nd	+	-	+	+	-
Db12	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
Db13	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Db14	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
Db15	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Db16	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
Db17	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
Db18	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
Db19	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Db20	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	Nd	-	-	-	+	-
Db21	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Db22	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Db23	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	Nd	+	-	-	-	-
Db24	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	Nd	+	-	-	+	+
Db25	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
Db26	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Db27	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	+	-	-
Db28	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Nd	F	-	-	-	-
Db29	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Db30	+	-	-	-	F	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Db31	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
Db32	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Db33	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	+	-	-
Db34	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Db35	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db36	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Db54	-	-	-	-	-	F	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Db55	+	+	-	-	-	F	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Db56	F	-	-	-	-	F	-	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
Db57	F	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
OA37	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
OA38	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-

+ : réaction positive. - : réaction négative. F : faible. Nd : Non déterminée. * : résultats du milieu TSI. ** : Résultats du milieu Mannitol-Mobilité. β-gal : β-galactosidase. Mob : mobilité. RM : rouge de méthyl. VP : Vosges-Proskauer.

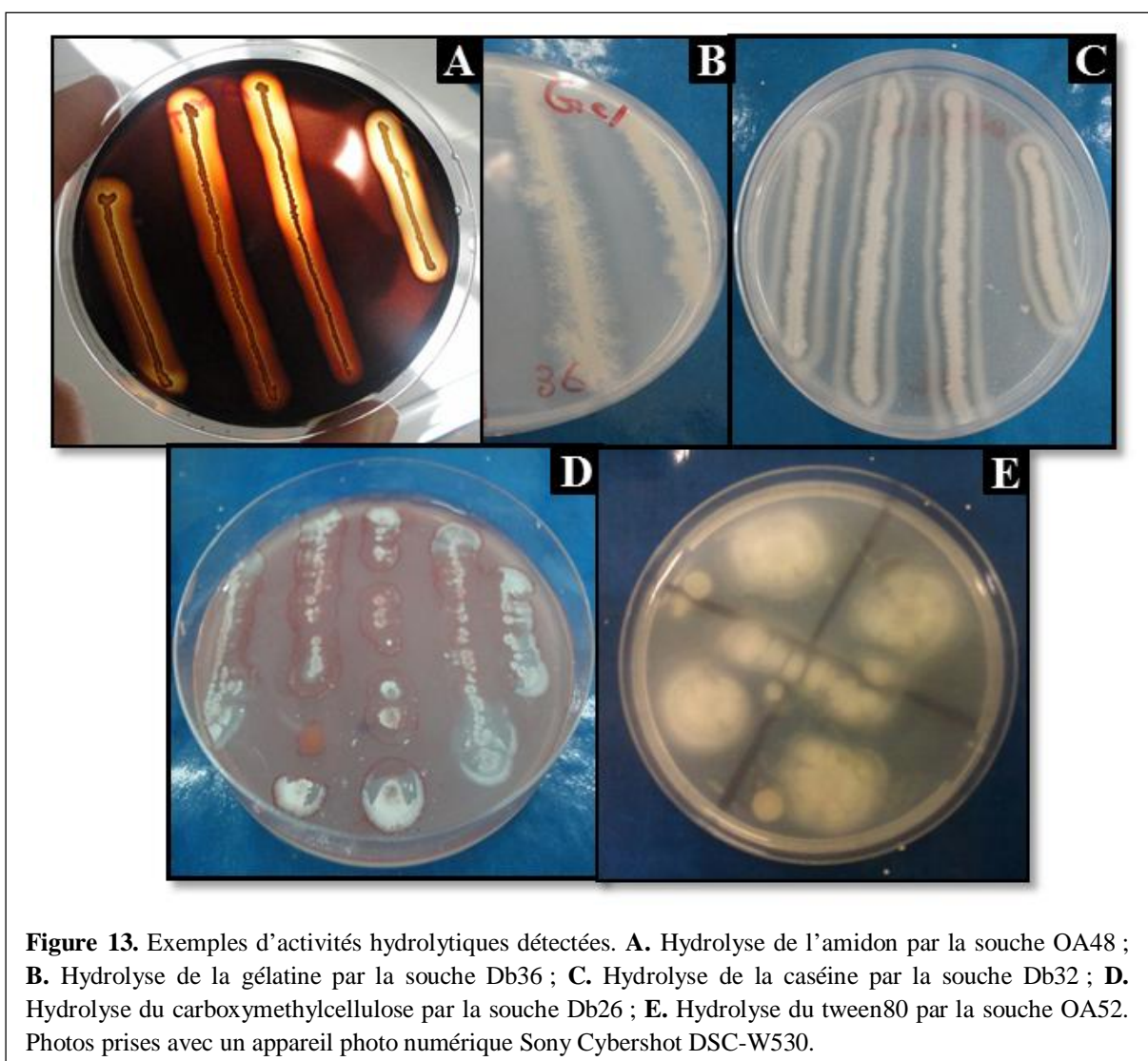
Tableau 18. Caractérisation biochimique des isolats (Suite).

Souche	Sac/lac*	Glc*	H ₂ S*	Gaz*	Mob **	Man**	Catalase	oxydase	RM	VP	β-gal	Urée	Indole	ADH	ODC	LDC
OA39	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
OA40	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
OA41	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
OA42	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
OA43	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
OA44	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	+	+	-
OA45	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
OA46	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	Nd	+	-	+	+	-
OA47	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	+	+	-
OA48	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
OA49	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
OA50	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
OA51	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
OA52	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	-	-	-
OA53	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
SM58	F	-	-	-	-	F	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
SM59	F	F	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
SM60	+	F	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	+	-	-	+	+
SM61	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
SM62	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	+	+	-
SM63	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	+	-	+
SM64	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	+
SM65	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	F	-	-	-	-	-
SM66	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	+	+	-
SM67	-	-	-	-	-	F	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
SM68	+	-	-	-	-	F	+	+	-	-	Nd	+	-	-	+	+
SM69	F	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	+	+	-
SM70	+	-	-	-	-	F	+	+	-	-	Nd	F	-	-	-	-
SM71	F	-	-	-	-	F	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
SM72	F	-	-	-	-	-	+	+	-	-	F	-	-	-	-	+
SM73	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
SM74	+	F	-	-	-	F	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
SM75	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	Nd	F	-	+	-	-
SM76	F	-	-	-	-	F	+	+	-	-	Nd	-	-	-	-	-
SM77	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	Nd	-	-	+	+	-
SM78	+	F	-	-	-	-	+	+	+	+	Nd	+	-	-	-	-
SM79	F	-	-	-	-	F	+	+	-	-	Nd	-	-	+	-	-
SM80	+	F	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
SM81	+	-	-	-	+	F	+	+	-	+	Nd	-	-	-	+	-
SM82	+	F	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SM83	+	F	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+

+ : réaction positive. - : réaction négative. F : faible. Nd : Non déterminée. * : résultats du milieu TSI. ** : Résultats du milieu Mannitol-Mobilité. β-gal : β-galactosidase. Mob : mobilité. RM : rouge de méthyl. VP : Vosges-Proskauer.

4. Profils des activités hydrolytiques extracellulaires des souches isolées

Un screening des activités amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques et cellulolytiques a été effectué. La présence de ces activités a été détectée en utilisant les substrats, amidon, gélatine, caséine, tween 20, tween 80, huile d'olive et carboxyméthylcellulose (CMC), respectivement (Figure 13). Les résultats présentés dans le tableau 19 représentent ceux obtenus après plusieurs essais. A l'exception de 6 souches (2 de debagh, 4 de Sidi Mahdi) qui n'ont présenté aucune activité hydrolytique, le reste des isolats soit, environ 93% des souches étudiées possèdent au moins une activité hydrolytique.



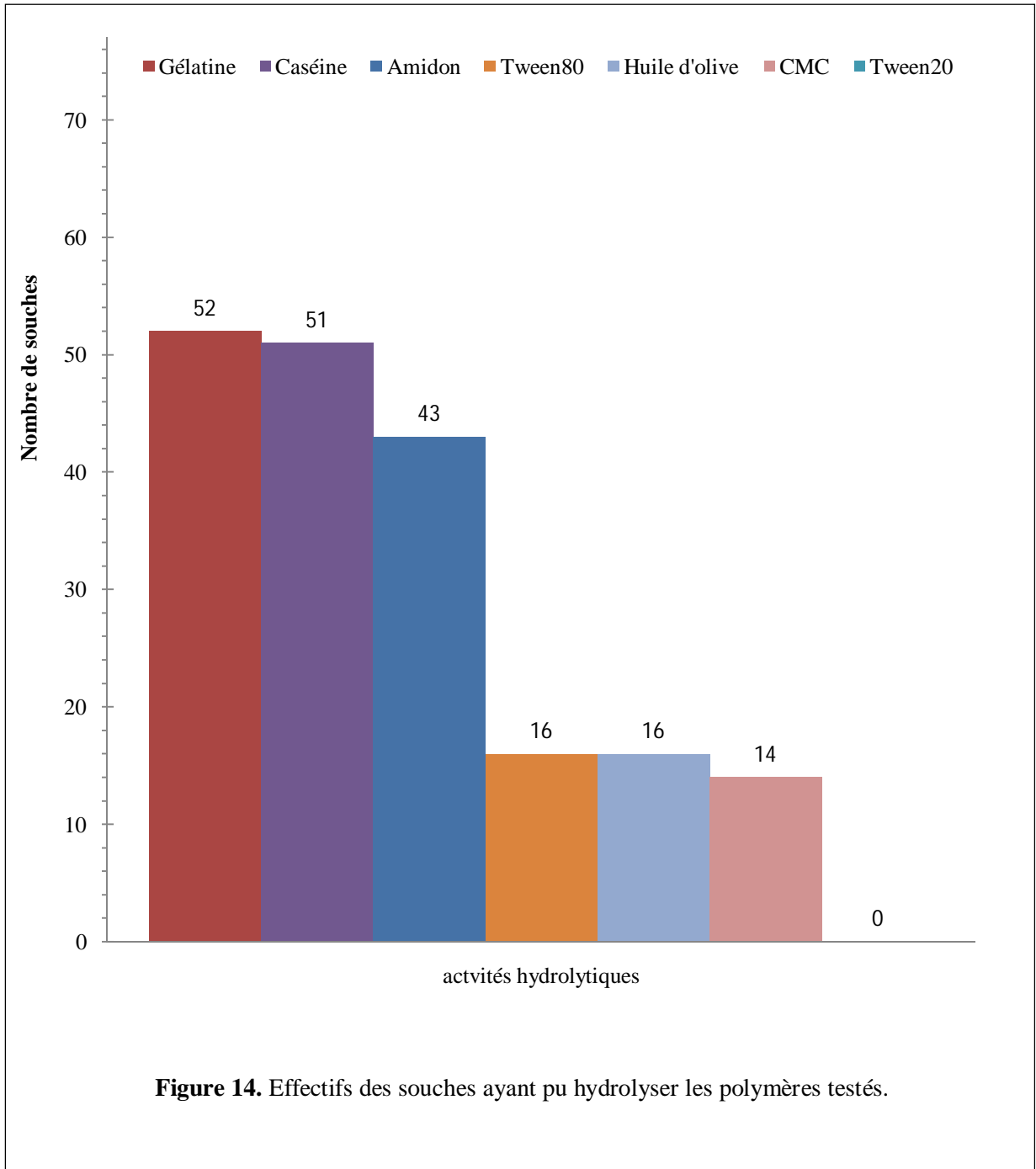


Figure 14. Effectifs des souches ayant pu hydrolyser les polymères testés.

Des 77 souches hydrolases positives, 52 hydrolysent la gélatine, 51 hydrolysent la caséine et 43 peuvent hydrolyser l'amidon. Le tween 80 et l'huile d'olive sont hydrolysés par le même nombre de souches. Le carboxymethylcellulose (CMC) a été hydrolysé par 14 souches alors qu'aucune souche n'était capable d'utiliser le tween 20. D'après ces résultats, il est clair que l'activité protéolytique est prédominante (Figure 14).

La comparaison des profils de production enzymatique selon la provenance des isolats est présentée dans la figure 15. Les six activités enzymatiques sont présentes chez les isolats de hammam Debagh. Ils se démarquent des autres isolats, spécialement, par leur capacité d'hydrolyse de la gélatine. Quant aux isolats de hammam Ouled Ali, ils sont plutôt amyolytiques et dépourvus de toute activité enzymatique vis-à-vis du carboxymethylcellulose. Ils sont caractérisés aussi par une activité hydrolytique plus élevée envers le Tween 80 que ceux issus de hammam Debagh. Aucune activité lipolytique n'a pu être détectée chez les souches du site de Sidi Mahdi. En revanche, ces mêmes souches sont dotées d'activités cellulolytiques et protéolytiques représentées, particulièrement, par une hydrolyse de la caséine.

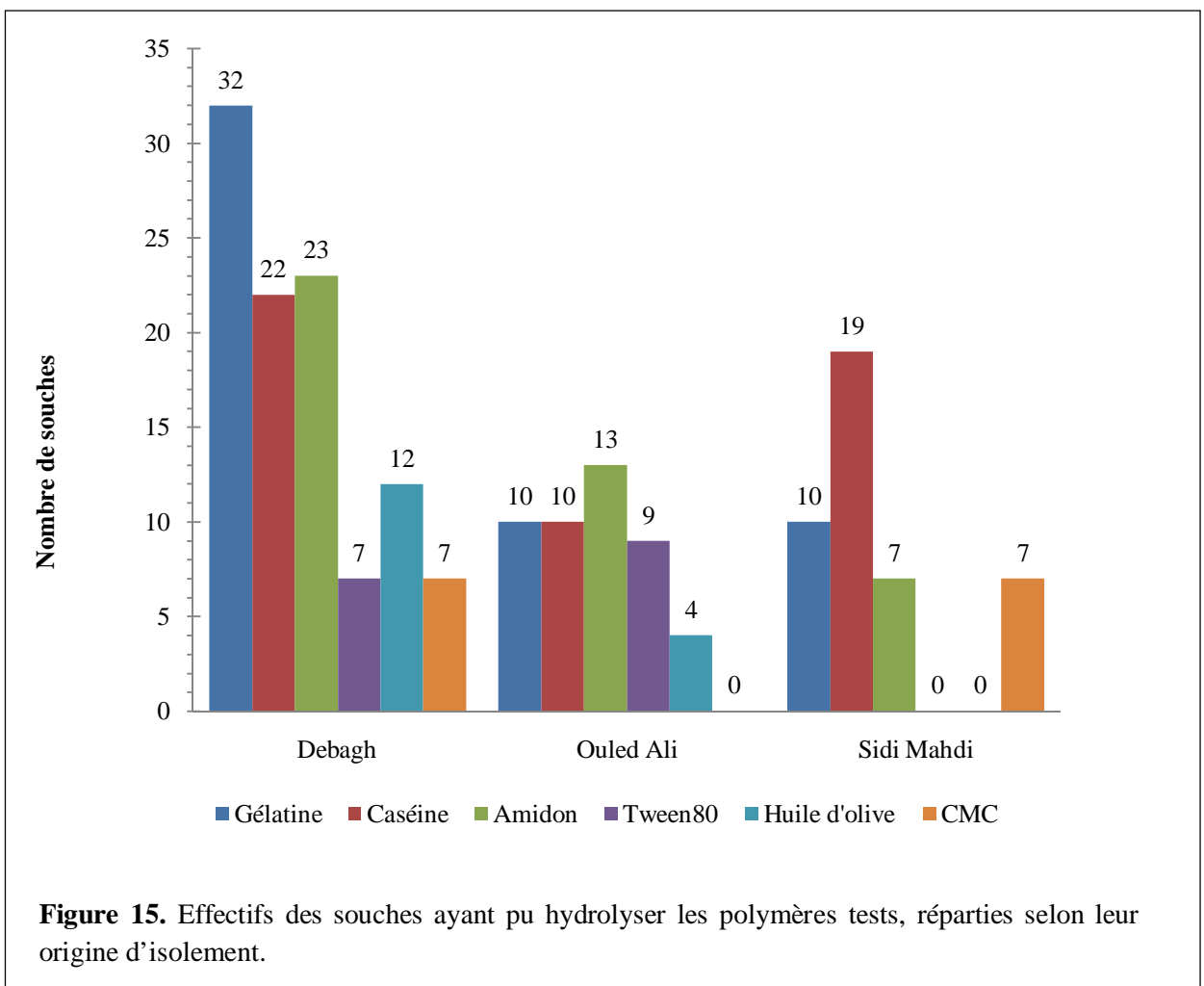


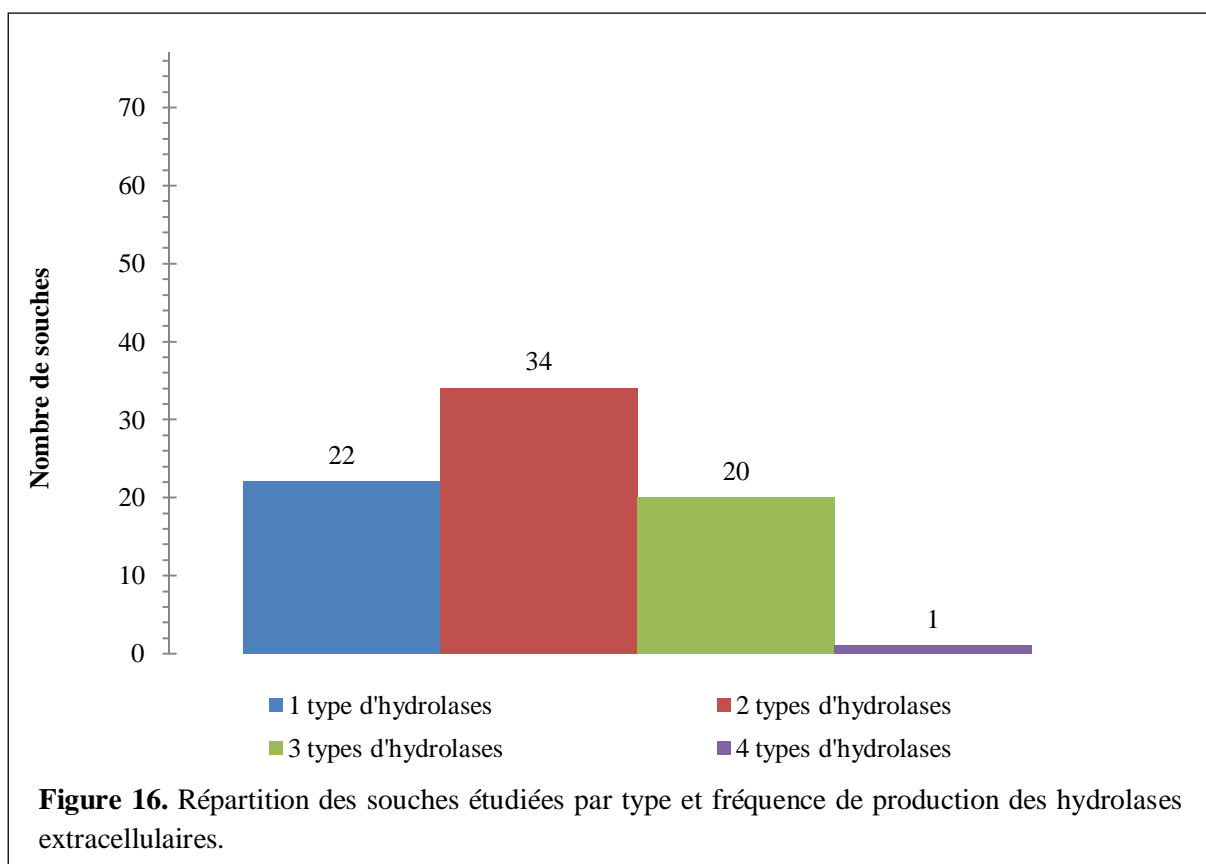
Tableau 19. Activités hydrolytiques des souches étudiées.

Souche	Ami	Gél	Cas	Tw20	Tw80	H.O	Cell	Souche	Ami	Gél	Cas	Tw20	Tw80	H.O	Cell
Db1	-	+	+	-	+	-	-	OA39	+	-	-	-	+	-	-
Db2	-	-	-	-	+	+	-	OA40	+	+	+	-	-	+	-
Db3	-	+	+	-	-	-	-	OA41	-	-	+	-	-	-	-
Db4	-	+	+	-	-	-	+	OA42	-	+	+	-	-	-	-
Db5	-	+	+	-	-	-	-	OA43	+	+	+	-	-	-	-
Db6	+	-	+	-	-	+	-	OA44	+	-	-	-	+	+	-
Db7	-	+	-	-	-	-	-	OA45	+	-	+	-	-	-	-
Db8	+	+	+	-	-	F	+	OA46	+	+	+	-	+	-	-
Db9	+	+	+	-	-	F	-	OA47	+	+	+	-	-	-	-
Db10	+	+	+	-	-	-	-	OA48	+	-	+	-	-	-	-
Db11	-	+	+	-	-	-	-	OA49	+	+	-	-	+	-	-
Db12	-	+	-	-	-	+	-	OA50	-	+	-	-	+	-	-
Db13	+	+	+	-	-	-	-	OA51	+	+	-	-	+	+	-
Db14	-	-	-	-	+	-	-	OA52	+	+	-	-	+	-	-
Db15	+	+	+	-	-	+	-	OA53	+	-	-	-	+	+	-
Db16	+	+	+	-	-	-	-	SM58	+	-	+	-	-	-	-
Db17	-	+	-	-	+	-	-	SM59	+	-	+	-	-	-	-
Db18	+	+	+	-	-	-	-	SM60	-	-	-	-	-	-	-
Db19	+	+	+	-	-	+	-	SM61	+	-	+	-	-	-	-
Db20	+	+	-	-	+	-	-	SM62	-	-	+	-	-	-	-
Db21	+	+	+	-	-	-	-	SM63	-	-	+	-	-	-	+
Db22	+	+	+	-	-	+	-	SM64	+	-	+	-	-	-	-
Db23	-	-	-	-	-	-	-	SM65	+	+	+	-	-	-	-
Db24	-	+	-	-	+	-	+	SM66	-	-	+	-	-	-	-
Db25	+	+	-	-	-	+	-	SM67	-	-	-	-	-	-	-
Db26	+	+	-	-	-	-	+	SM68	-	-	-	-	-	-	-
Db27	-	-	-	-	+	F	-	SM69	-	F	+	-	-	-	-
Db28	-	+	-	-	-	-	+	SM70	-	-	+	-	-	-	F
Db29	-	-	-	-	-	-	-	SM71	-	-	+	-	-	-	F
Db30	+	+	+	-	-	-	-	SM72	-	F	+	-	-	-	F
Db31	+	-	+	-	-	-	-	SM73	+	+	-	-	-	-	F
Db32	+	+	+	-	-	-	-	SM74	-	-	-	-	-	-	+
Db33	+	+	-	-	-	+	-	SM75	-	F	-	-	-	-	+
Db34	+	+	+	-	-	-	-	SM76	-	+	+	-	-	-	-
Db35	+	+	-	-	-	+	-	SM77	+	+	+	-	-	-	-
Db36	+	-	+	-	-	-	-	SM78	-	+	+	-	-	-	-
Db54	+	+	+	-	-	-	+	SM79	-	-	+	-	-	-	-
Db55	+	+	-	-	-	-	+	SM80	-	-	+	-	-	-	-
Db56	-	+	-	-	-	-	-	SM81	-	-	-	-	-	-	-
Db57	-	+	-	-	-	-	-	SM82	-	F	+	-	-	-	-
OA37	-	+	+	-	-	-	-	SM83	-	F	+	-	-	-	-
OA38	+	-	+	-	+	-	-								

+ : réaction positive - : réaction négative F : Activité décelée mais faible. Ami : hydrolyse de l'amidon. Gél : hydrolyse de la gélatine. Cas : hydrolyse de la caséine. Tw20, 80 : hydrolyse des tween 20 et 80. H.O : hydrolyse de l'huile d'olive. Cell : hydrolyse de la cellulose.

Il est à noter que parmi les souches productrices d'hydrolases, 22 ne produisent qu'un seul type (18 souches protéolytiques, 3 souches lipolytiques et une souche cellulolytique), certaines combinent deux à trois activités hydrolytiques, quant à la souche Db₈ isolée de hammam Debagh, elle possède les quatre activités enzymatiques (Figure 16).

Concernant toujours l'hydrolyse des polymères testés, certaines souches ont montré des activités enzymatiques faibles par estimation de la surface de la zone d'hydrolyse produite (Tableau 19), ce qui peut être expliqué par le fait que ces tests de mise en évidence ne donnent pas une appréciation quantitative de l'activité enzymatique.



5. Taxonomie numérique

Les résultats de l'étude numérique des caractéristiques phénétiques des 83 isolats et des 22 souches de référence groupées par le coefficient de corrélation simple (S_{SM}) et l'algorithme de clustérisation UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) ont donné le dendrogramme présenté dans la figure 17. Un autre coefficient, l'indice de Jaccard (S_J) a été utilisé mais les positions à l'intérieur des clusters n'ont été que légèrement affectées.

Deux principaux groupes séparés à un niveau de similarité de 74% ont émergé depuis ce dendrogramme. Le premier groupe inclue 43 souches, distribuées sur deux principaux clusters (phénons), les souches de ce groupe sont liées aux souches de référence du genre *Geobacillus* à 76% de similarité. Les souches du cluster A sont groupées à 87% de similitude, ce même cluster est lié au cluster B à 79% de similarité. 3 paires de souches ont formé des clusters singuliers à l'intérieur du groupe 1, alors que la souche Db1 est à $\geq 99\%$ de similarité avec *Caldomonas hydrothermale*. Toutes les souches de Sidi Mahdi appartiennent au groupe 1, tandis que le groupe 2 est constitué uniquement des souches isolées de la région de Guelma. A noter que les deux souches de référence appartenant à la famille des *Thermoactinomycetaceae* (*Laceyella tengchongensis* DSM 45262^T et *Kroppenstedtia eburnean* DSM 45 196^T) ne présentent que 72% de similitude avec l'ensemble des souches. Les caractéristiques des 3 clusters sont présentées dans le tableau 20, qui résume par le même biais leurs caractéristiques différentielles.

Le cluster A (phénon A) ($S_{SM} \geq 87\%$) qui contient 24 souches est le plus homogène puisqu'il est défini à 87% de similitude. Ces souches sont des bâtonnets à Gram positif arrangés parfois en chaînette, une endospore subterminale lorsqu'elle est présente et généralement immobiles. Présence de catalase et de cytochrome oxydase et se développent sur un intervalle de température de 30°C à 70°C, entre pH 6,5 et 8 et la majorité à 3% (p/v) de NaCl. Elles sont capables d'utiliser les sucres et les alcools comme seule source de carbone et d'énergie. Elles ne produisent pas de CO₂, d'H₂S et d'indole, n'hydrolysent pas les Tween 20 et 80 et l'huile d'olive mais hydrolysent la caséine. Les souches du cluster A sont liées à un niveau de similarités de 85% avec 4 autres souches de référence du genre *Anoxybacillus* (Figure 17).

Le cluster B (phénon B) ($S_{SM} \geq 80\%$) contient 12 souches, parmi lesquelles sont comptées deux à Gram négatif (Db30, Db31). Elles se développent entre 45°C et 70°C et le pH optimum est compris entre 7 et 7,5, généralement croissent aux dessous de 3% (p/v) de NaCl. Présence de catalase et souvent de cytochrome oxydase. Tous les isolats ne produisent pas d'indole, de CO₂ et d'H₂S mais la plus part hydrolysent l'amidon et la gélatine. Ce cluster est

plus proche des souches de référence du genre *Anoxybacillus* ($S_{SM} \geq 77\%$) qu'avec celles de *Geobacillus* et des genres apparentés ($S_{SM} \geq 74\%$).

Le groupe 2, est représenté par le cluster C (phénon C) ($S_{SM} \geq 74\%$), qui inclue 40 souches isolées des sources de Guelma. Il est constitué de bâtonnets, et de filaments, majoritairement à Gram positif (Db10 et OA45 sont les seules souches à Gram négatif incluses dans ce phénon). Elles sont généralement oxydase positive, assez variables physiologiquement et biochimiquement, souvent les intervalles de température et de pH sont situés entre 50°C et 65°C et 7 et 7,5, respectivement (Figure 17).

Les 3 clusters singuliers placés entre les phénons A et B et constitués respectivement par les paires de souches Db57-OA37, SM74-SM75 et Db55-Db56 ont plus de similarités avec les isolats de Sidi Mahdi et les souches de référence du genre *Anoxybacillus*.

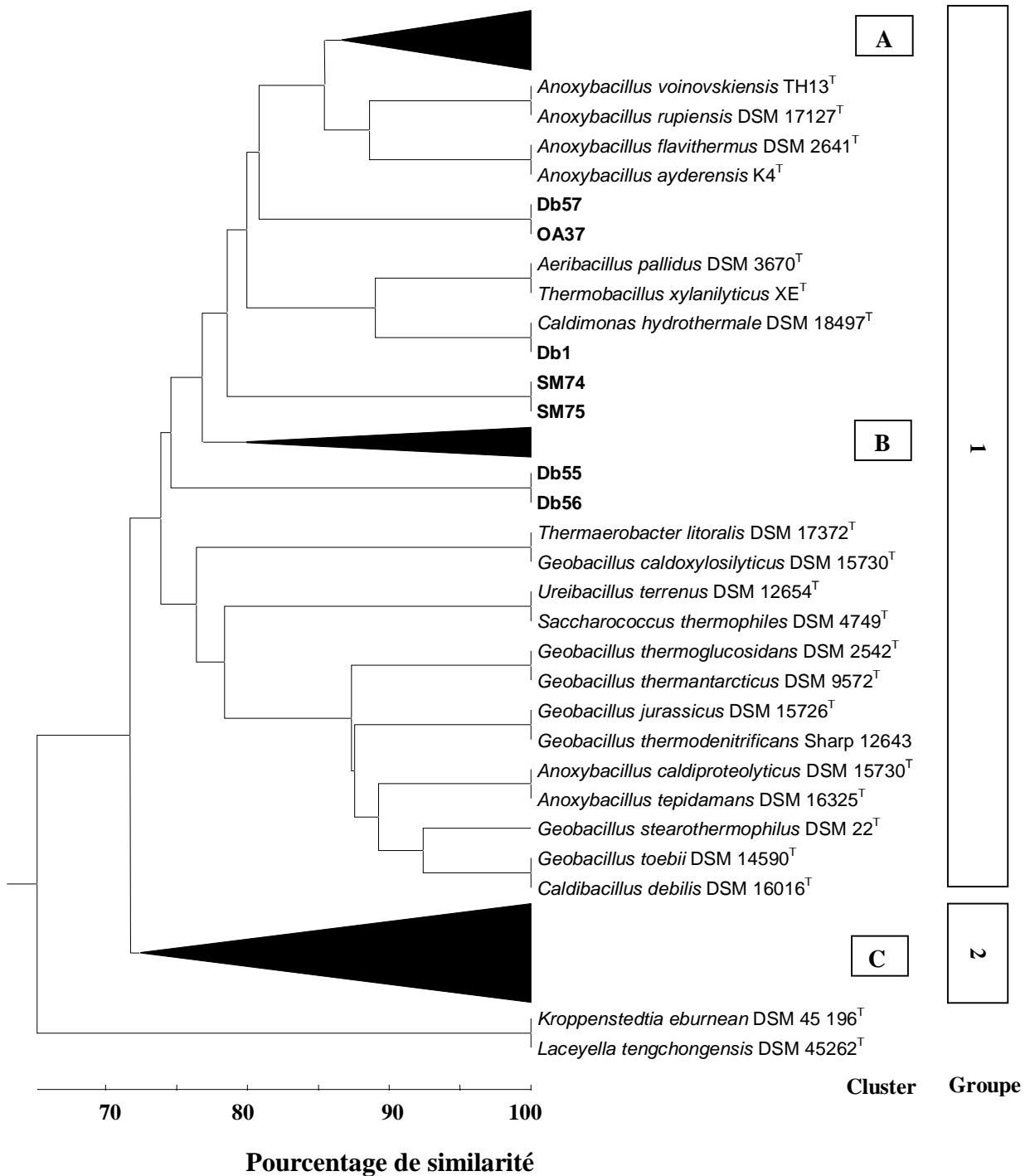


Figure 17. Dendrogramme simplifié basé sur le coefficient « simple matching » (S_{SM}) montrant les relations phénotypiques entre les 83 isolats et les 22 souches de référence. **Phénon A.** SM58, SM59, SM60, SM61, SM62, SM63, SM64, SM65, SM66, SM67, SM68, SM69, SM70, SM71, SM72, SM73, SM76, SM77, SM78, SM79, SM80, SM81, SM82, SM83. **Phénon B.** Db30, Db31, Db24, D25, Db20, Db21, Db22, Db23, OA46, OA47, OA48, OA49. **Phénon C.** Db10, Db11, Db32, Db33, Db34, Db35, Db36, Db54, Db6, Db7, Db14, Db15, Db40, Db41, Db2, Db3, Db4, Db5, Db12, Db13, Db8, Db9, Db16, Db17, Db18, Db19, OA42, OA43, OA44, OA45, Db28, Db29, Db26, Db27, OA50, OA51, OA38, OA39, OA52, OA53.

Tableau 20. Fréquences des principaux caractères positifs pour chaque cluster exprimées en pourcentages calculés pour chaque test.

Groupe (S_{SM})	1		2
Cluster (S_{SM})	A	B	C
Nombre de souche	24	12	40
Gram positif	100	83	95
Gram négatif	0	17	5
Forme des cellules			
- Bâtonnets	100	83	73
- Filaments	0	17	25
- Cocci	0	0	2
Mobilité +	10	33	18
Mobilité -	92	67	82
Température (°C)			
30	100	0	3
35	100	0	33
40	100	83	75
45	100	92	85
50	100	100	90
55	100	100	100
60	100	100	100
65	100	100	100
70	100	92	33
pH			
5,5	0	0	28
6	71	0	30
6,5	100	75	90
7	100	100	100
7,5	100	100	100
8	100	25	90
8,5	17	25	75
9	5	17	68
10	5	10	40
NaCl % (p/v)			
0	100	100	100
0,5	100	100	100
1	88	75	98
3	71	67	83
5	5	10	43
7,5	5	0	28
8,5	5	0	25
10	5	0	25
12,5	0	0	15
15	0	0	0
Catalase	100	100	73
Oxydase	100	90	93

+ : positif, - : négatif, 0 : absence.

Tableau 20 (suite). Fréquences des principaux caractères positifs pour chaque cluster exprimées en pourcentages calculés pour chaque test.

Groupe (S_{SM})	1		2
Cluster (S_{SM})	A	B	C
Nombre de souche	24	12	40
Utilisation de :			
- Glucose	88	87	45
- Galactose	92	90	43
- Fructose	92	87	25
- Mélibiose	92	67	33
- Maltose	92	87	40
- Saccharose	92	87	43
- Lactose	88	87	33
- Acétate	0	0	0
- Lactate	0	0	0
- Oxalate	0	0	0
- Citrate	13	10	5
- Mannitol	92	75	23
- Glycérol	92	10	15
- Glycine	54	42	5
Production d'acides à partir			
- Saccharose /lactose	75	50	28
- Glucose	33	10	28
- Mannitol	38	58	38
Production de gaz	0	0	0
Production d'H ₂ S	0	0	0
RM	8	10	15
VP	13	10	10
Uréase	17	58	70
Indole	0	0	0
ADH	33	33	38
ODC	38	50	13
LDC	25	8	5
Hydrolyse de :			
- Amidon	29	83	63
- Cellulase	21	10	13
- Caséine	79	58	63
- Gélatine	38	75	65
- Tween 20	0	0	0
- Tween 80	0	33	28
- Huile d'olive	0	17	35

+ : positif, - : négatif, 0 : absence.

6. Discussion

La première étape de ce travail a consisté à établir une collection de 83 souches de bactéries thermophiles, aérobies et hétérotrophes à partir d'échantillons d'eau et de sédiments de sources thermales de Debagh, de Ouled Ali et de Sidi Mahdi.

Les milieux de culture ayant servis à leur isolement sont utilisés pour l'étude d'une large panoplie de microorganismes thermophiles aérobies appartenant à plusieurs groupes taxonomiques (*Archaea*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Actinomycetales*, etc.).

L'application de la taxonomie numérique a permis de noter que les souches sont séparées phénotypiquement en deux principaux groupes, constitués eux-mêmes de sous-groupes. Le premier groupe est proche des espèces de références du genre *Anoxybacillus* ainsi qu'à d'autres genres apparentés (*Thermobacillus*, *Aerobacillus*). Ces genres appartiennent au groupe 5 de bacilles selon la classification numérique de Priest (1988). Ce groupe est composé essentiellement de thermophiles et d'acidophiles à Gram positif mais peuvent cependant, donner une coloration négative, ils sont également décrits comme aérobies facultatifs ou obligatoires, endosporogènes, isolés à partir des sources chaudes terrestres, des fonds océaniques, champs pétroliers, du sol et des mélasses de betteraves (Burgess *et al.*, 2010).

Le deuxième groupe est constitué d'un ensemble d'isolats aux caractères dispersés, le nombre de tests déjà effectués semble ne pas être assez suffisant pour les séparer, cependant ce groupe possède des similarités avec le groupe 4 de la classification de Priest (1988), dans lequel sont regroupés des espèces morphologiquement et physiologiquement hétérogènes.

Selon les résultats du tableau 20, les principaux caractères qui séparent les différents phénons sont surtout d'ordre physiologique (gamme de température et de pH, spectre salin et utilisation des substrats organiques comme unique source de carbone et d'énergie). Ce qui suggère que l'utilisation d'un plus grand nombre de tests phénétiques contribuera probablement à une meilleure distinction entre les isolats.

Sur l'ensemble des phénons, la température optimale de croissance des souches est située entre 55°C et 60°C, qu'on peut qualifier de thermophiles modérés en suivant la classification établie par Stetter (1996). Cependant, beaucoup de ces souches peuvent se développer sur un intervalle de température de 40°C, cas des souches de Sidi Mahdi. Le terme de « thermophile température-tolérant » a été inventé par Wiegel (1990), pour désigner ce type de microorganismes. Et un exemple à cela est donné par les isolats thermophiles de l'antarctique, dont leur température optimale de croissance est de 65°C mais qui peuvent se développer aussi à 3°C (Logan et Allan, 2008).

Il est intéressant de signaler que parmi le soucier constitué, quelques membres proviennent de sites ayant des températures beaucoup plus élevées que leur température maximale de croissance. Il est probable que ces isolats ne peuvent pas se trouver en état actif en sachant que la température est facteur important conditionnant leur prolifération. Le même raisonnement peut expliquer l'isolement de certains organismes à des températures beaucoup plus basses que leur minimum de croissance (Niehaus *et al.*, 1999). Selon Weigel (1986), il est également possible d'isoler des organismes thermophiles à partir de la glace arctique. Les endospores survivent aisément au transfert d'un environnement vers un autre.

Tous les isolats sont neutrophiles (pH optimum entre 7,0 et 7,5) mais quelques-uns sont capables de croître sur une large gamme de pH. Les groupes taxonomiques regroupant les bactéries thermophiles hétérophiles, en plus de membres alcaliphiles et acidophiles comprennent beaucoup de membres neutrophiles, isolés principalement de sources chaudes terrestres (Logan *et al.*, 2009). Le genre *Anoxybacillus* est formé d'espèces acidophiles (*Anoxybacillus amylolyticus* ; pH optimum de 5,0), alcaliphiles (*Anoxybacillus ayderensis* ; pH de 11,0) et alcalitolérantes (Pikuta, 2009).

La croissance de l'ensemble des isolats ne requiert pas la présence de NaCl mais leur halotolérance est variable, et peut aller jusqu'à 12,5% (p/v) de NaCl. Ce résultat a été rapporté par d'autres auteurs et notamment pour l'espèce *Aeribacillus pallidus* qui se développe en présence de 10% (p/v) de NaCl (Minana-Galbis *et al.*, 2010).

Les souches isolées lors de ce travail sont généralement oxydase et catalase positives et environ une trentaine forment des endospores ; c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et anaérobies facultatives thermophiles (Dinsdale *et al.*, 2001 ; Nazina *et al.*, 2001). Par ailleurs, la plupart des bactéries aérobies formatrices d'endospores décrites sont chimioorganotrophes appartenant à divers groupes phylogénétiques. Elles sont capables de se développer sur des milieux usuels comme la gélose nutritive ou la gélose trypticase soja. Cependant, certains isolats, particulièrement ceux issus des environnements pauvres en nutriments, comme les sources chaudes terrestres, ont une croissance médiocre sur ces milieux de culture « standard », en raison de l'inadaptabilité de ces milieux (pH, salinité, composition du milieu) (Logan et Allan, 2008).

Des études antérieures ont montré la capacité des bactéries thermophiles à croître sur le glucose et/ou les sucres fermentescibles comme unique source de carbone et d'énergie, c'est le cas des espèces du genre *Geobacillus*. Les sources organiques et inorganiques d'azote (sels d'ammonium, urée et acides aminés) sont également utilisées (Nazina *et al.*, 2001; Marchant *et al.*, 2002). Cependant, l'assimilation des composés organiques par les bactéries

thermophiles hétérotrophes reste médiocre, comparativement à leurs contreparties mésophiles, ce constat peut s'expliquer par les différentes adaptations provoquées par les restrictions de leurs milieux naturels.

L'analyse numérique établie sur des caractères phénotypiques a montré une homogénéité au sein des isolats de Sidi Mahdi, caractérisée par un pourcentage de similitude élevé. En revanche, il existe un certain nombre de variations (morphologie cellulaire, physiologie, biochimie) entre les souches de la région de Guelma. Ainsi différents types phénotypiques ont été retrouvés dans les échantillons de la source de Debagh à 96°C, comme dans ceux d'Ouled Ali à 50°C. C'est ce qui nous laisse supposer que la température n'est pas l'unique facteur qui joue sur la diversité des organismes présents dans ce type d'environnement, d'autres facteurs comme la composition minérale et organique, la localisation géographique des sites géothermaux peuvent également entrer en jeu.

Une étude de biodiversité menée par des techniques de biologie moléculaire sur l'eau d'une source chaude de hammam Debagh (Meskhoutine), à une température à l'émergence de 98°C, a permis la caractérisation phylogénétique de la flore indigène aérobie thermophile. Elle est composée principalement des espèces de *Geobacillus* et d'*Anoxybacillus*. Quant aux isollements menés en conditions anaérobies, ils ont mis en évidence des espèces thermophiles appartenant aux familles des *Clostridiaceae* et des *Thermoanaerobacteriaceae* (Grégoire *et al.*, 2009 -résultats non-publiés).

L'analyse de la biodiversité bactérienne des sources thermales terrestres à travers le monde, et dont beaucoup partagent les caractères physico-chimiques des sources algériennes permet de mettre en évidence, particulièrement, deux genres bactériens thermophiles aérobies communs à ces sources : *Thermus* et *Geobacillus* spp. Ces microorganismes apparaissent comme des représentants notoires des sources hydrothermales terrestres ou sub-terrestres, et communs aux écosystèmes chauds de la planète que ce soit sur le continent européen, américain, africain ou asiatique. Ils peuvent être considérés comme des marqueurs biologiques des sources thermales qu'elles soient terrestres ou sub-terrestres (Adiguzel *et al.*, 2009 ; Ferrera et Reysenbach, 2007 ; Grégoire *et al.*, 2009).

Parmi les souches isolées, 77 sont productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Sur une vue d'ensemble des souches productrices d'enzymes, et en recensant les activités enzymatiques produites à 55°C, ces souches sont dotées d'activités protéolytiques et amylolytique avec une utilisation plus fréquente de la gélatine. Quant aux activités lipolytiques et cellulase, elles sont moins fréquentes.

Toutefois, une comparaison entre les différents phénons obtenus à partir de l'analyse numérique donne une autre vision des profils de production d'enzymes. Ainsi, on constate que les souches du phénon A (cluster A) affichent une préférence très notable pour la dégradation de la caséine comparée à celle de la gélatine, de l'amidon et de la cellulose avec une absence totale des activités lipolytiques (lipase et estérases). A l'opposé, le phénon B contient des souches plutôt amylolytiques que protéolytiques et une plus grande préférence pour la gélatine que pour la caséine. Quant au phénon C, plus hétérogène phénotypiquement, les profils d'activités positives se rapprochent de ceux de l'ensemble des 77 souches.

L'environnement à partir duquel les souches ont été isolées différencie également entre les souches productrices d'enzymes. Ainsi, toutes les souches d'Ouled Ali possèdent des activités hydrolytiques, 38 sur les 40 de Debagh et 22 sur 26 pour Sidi Mahdi avec différents profils de production, comme il a été mentionné précédemment.

Le bagage enzymatique des microorganismes est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement direct, et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel. Autre point important, il semble qu'une plus grande adaptabilité de certaines souches aux conditions de température, de pH et de salinité a une relation avec la capacité de ces mêmes souches à produire des enzymes extracellulaires : une plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés, comparativement à des organismes qui en sont dépourvus (Cohen, 2011). Ces derniers seront confrontés à un milieu moins favorable, lorsqu'ils sont exposés aux mêmes conditions environnementales.

Les bactéries thermophiles ont développé une variété de stratégies moléculaires pour survivre aux conditions environnementales extrêmes. Pour l'utilisation des substrats naturels, l'amidon par exemple, un nombre de bactéries thermophiles, produisent une gamme d'enzymes amylolytiques (α -amylase, α -glucosidase, glucoamylase, pullulanases, cyclodextrine glycosyltransferase). Elles sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides, tels que le glycogène, fourni par des cellules animales ou microbiennes (Bertoldo et Antranikian, 2001), les composés polyphénoliques, les n-alcanes, et même certains polymères synthétiques comme le plastique (Pinzón-Martínez *et al.*, 2010).

Les bactéries à Gram positif représentent une bonne source d'amylases, et les espèces des différents groupes de *Bacillus* fournissent un large panel d'optima de pH et de températures pour ces enzymes (Vieille *et al.*, 2000). Des souches de *Geobacillus* ont été étudiées également pour leur capacité de dégrader plusieurs polysaccharides, notamment la cellulose. Leurs enzymes ont été proposées pour des applications industrielles et environnementales

(Marchant et Banat, 2010). En outre, les membres thermophiles des *Bacillaceae* fournissent d'importantes protéases thermostables à l'industrie, cas de la thermolysine, une métalloprotéase produite par *Geobacillus stearothermophilus* avec une demi-vie d'une heure à 80°C (Rao *et al.*, 1998 ; Haaki and Rakshit, 2003). Les lipases sont également produites par les espèces du genre *Geobacillus*, comme *Geobacillus thermoleovorans* qui possède des activités lipolytiques extracellulaires avec des taux de croissance élevés sur des substrats comme l'huile d'olive, l'huile de soja, la tributyrine et les tween 20, 40 et 80 (Lee *et al.*, 1999). En revanche, le genre *Anoxybacillus* englobe des espèces à activités saccharolytiques, protéolytiques et lipolytiques (Pikuta, 2009). En somme, les membres des genres thermophiles des *Bacillales* sont connus pour leur capacité à produire des enzymes d'hydrolyse et des biofilms (Burgess *et al.*, 2010).

Conclusion générale

et perspectives

Les extrêmophiles sont des microorganismes qui possèdent des possibilités d'applications dans plusieurs domaines, incluant l'agriculture, l'industrie, la pétrochimie et la bioremédiation des sols. Les microorganismes thermophiles se développant de façon optimale à des températures supérieures à 50°C, sont parmi les extrêmophiles les mieux étudiés, isolés de différents environnements, leurs enzymes extrêmement thermostables ont trouvés plusieurs applications à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles.

Dans cette étude, un screening de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été effectué sur 83 souches bactériennes aérobies thermophiles, isolées à partir d'échantillons d'eau et de sédiments récupérés de 3 sources thermales terrestres de hammam Debagh et de hammam Ouled Ali situées dans la région de Guelma, et de Sidi Mahdi située dans la région de Touggourt-Ouargla. Six milieux de cultures ont servi à l'isolement. Les souches pures ont subi une caractérisation de type phénétique suivie d'une analyse numérique qui a engendré un dendrogramme les regroupant en clusters.

Les températures de ces sources, mesurées au niveau des points d'émergence de l'eau chaude varient entre 50°C et 96°C, le pH est proche de la neutralité.

La majorité des souches se présentent sous forme de bâtonnets ou filaments à Gram positif, possédant généralement une cytochrome oxydase et une catalase. Elles sont physiologiquement et biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères, comme la capacité à croître en absence de NaCl, de se développer entre 55 et 65°C avec un optimum proche de ces deux valeurs et à pH neutre mais dont l'intervalle peut être large pour quelques isolats. Certaines souches sont capables d'utiliser plusieurs sucres et alcools comme seule source de carbone et d'énergie mais sont incapables d'utiliser les acides organiques. Elles sont indole, H₂S et CO₂ négatifs. Et la plupart sont immobiles et négatives aux réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer.

Ces souches ont été étudiées pour la présence de 4 types d'hydrolases extracellulaires, importantes industriellement. Dans ce but, 7 différents substrats ont été utilisés : amidon, carboxyméthylcellulose, caséine, gélatine, Tween 20, Tween 80 et l'huile d'olive, pour la détermination des activités amylolytique, cellulolytique, protéolytiques et lipolytiques, respectivement. Les résultats du screening ont montré que 77 souches possédaient une ou plusieurs activités hydrolytiques dominées par les activités protéolytiques et amylolytique. Elles combinent également plusieurs activités hydrolytiques. Aucune souche n'a cependant pu hydrolyser le Tween 20.

L'analyse numérique réalisée par les logiciels Taxan 2.0 et MEGA 5.0 en utilisant le coefficient de corrélation simple « S_{SM} » et la méthode de clustérisation «UPGMA», a permis la construction d'un dendrogramme dans lequel, les 83 souches de l'étude et les 22 souches de référence étaient clustérisées en deux groupes subdivisés en 3 principaux clusters (phénons). Les principaux critères de différenciations sont surtout physiologiques.

Cette étude n'est qu'un tout premier essai d'isolement et de caractérisation de bactéries thermophiles, productrices d'hydrolases capables de mener à bien des processus sous des conditions physico-chimiques extrêmes.

Cette contribution à l'étude du potentiel biotechnologique des thermophiles peut être complétée d'abord par une identification polyphasique plus poussée des souches isolées, en combinant l'approche phénotypique dont la chimiotaxonomie à l'approche moléculaire. L'intérêt d'une approche polyphasique intégrant les données génotypiques et phénotypiques est la détermination de la position exacte des souches parmi les autres taxons sans aucune ambiguïté. Concernant leurs enzymes, l'étude de leurs propriétés doit être menée à bout afin de pouvoir déterminer la rentabilité de leur exploitation. Ainsi, déterminer les conditions optimales de production, les limites physiologiques d'excrétion de ces enzymes, mais aussi les paramètres de culture pouvant affecter l'activité enzymatique. L'isolement, la purification, et la caractérisation biochimique et biophysique des enzymes feront suite.

L'identification et le clonage de leurs gènes, permettront le design, le développement et la production d'enzymes recombinées à grande échelle.

Le but ultime serait de constituer une enzymothèque, une galerie de souches extrêmophiles, isolées, identifiées et répertoriées à partir des différents environnements extrêmes que recèle le territoire algérien.

Références

Bibliographiques

- 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. of Microbiol. Meth.*, 79:321-328.
- AHMED Z. (2001).** Production of natural and rare pentoses using microorganisms and their enzymes. *Electron. J. Biotechnol.*, 4(2): 103-110.
- ALBERS, S.J., VAN DE VOSSENBERG J.L., DRIESSEN A.J., KONINGS W.N. (2000).** Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. *Front. Biosci.*, 5:813-820.
- ANDO S., ISHIDA H., KOSUGI Y., ISHIKAWA K. (2002).** Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:430-433.
- ANDRONOPOULOU E., VORGIAS C.E. (2004).** Isolation, cloning, and over expression of a chitinase gene fragment from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*: semi-denaturing purification of the recombinant peptide and investigation of its relation with other chitinases. *Protein. Expr. Purif.*, 35:264-271.
- ANTRANIKIAN G., VORGIAS G.C., BERTOLDO C. (2005).** Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 96: 219-262.
- ANTRANIKIAN G. (2008).** Industrial relevance of thermophiles and their enzymes in: *Thermophiles, biology and technology at high temperatures*. Ed. Robb F., Antranikian G., Grogan D., Driessen A. 8:114-147. CRC Press, New York.
- ANTRANIKIAN G. (2009).** Extremophiles and Biotechnology in: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; P: 1-5.
- ATLAS R.M. (2005).** *Handbook of media for environmental microbiology*; sec. Ed. Taylor and Francis Informa Ed., 663P.
- BAHRI F., SAIBI H., CHERCHALI M.H. (2010).** Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arab. J. Geosci.*, 1-13.
- BANAT M.I., MARCHANT R. (2011).** *Geobacillus* activities in soil and oil contamination remediation in: *Endospore-forming soil bacteria, soil biology*. Ed. Logan N.A. and De Vos P., P:254-266. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- BANDLISH R.K., HESS J.M., EPTING K.L., VIELLE C., KELLY R.M. (2002).** Glucose to fructose conversion at high temperatures with D-xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and two hyperthermophilic *Thermotoga* species. *Biotechnol. Bioeng.*, 80: 185-194.
- BANERJEE V., SAANI K., AZMI W., SONI R. (1999).** Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry additive. *Proc. Biochem.*, 35: 213-219.

- BARNS S.M., DELWICHE C.F., PALMER J.D., PACE N.R. (1996).** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.*, 93: 9188-9193.
- BARTH S., HUHN M., MATTHEY B., KLIMKA A., GALINSKI E., ENGERT A. (2000).** Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:1572-1579.
- BEEBY M., O'CONNOR B.D., RYTTERSGAARD C. et al. (2005).** The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *Public Library of Science Biology* 3:309.
- BERTOLDO C., ANTRANIKIAN G. (2001).** Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods., Enzymol.*, 330:269-289.
- BORGES N., RAMOS A., RAVEN N.D., SHARP R.J., SANTOS H. (2002).** Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosyl glycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles*; 6:209-216.
- BOUANANE-DARENFED A., FARDEAU M.L., GREGOIRE P., JOSEPH M., KEBBOUCHE-GANA S., BENAYAD T., HACENE H., CAYOL J.L., OLLIVIER B. (2011).** *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. a new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Curr. Microbiol.*, 62:826-832.
- BOUGHLALI M. (2003).** Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. *Press. Therm. Climat.*, 140: 161-165.
- BOURAOUI H., BOUKARI I., TOUZEL J.P., O'DONOHUE M., MANAI M. (2010).** *Caldimonas hydrothermale* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from roman hot bath in south Tunisia. *Arch. Microbiol.*, 192:485-491.
- BRAGGER J.M., DANIEL R.M., COOLBEAR T., MORGAN H.W. (1989).** Very stable enzymes from extremely thermophilic archae bacteria and eubacteria. *Appl. Microbiol. and Biotech.*, 31:556-561.
- BREDBERG K., PERSSON J., CHRISTIANSSON M., STENBERG B., HOLST O. (2001).** Anaerobic desulfurization of ground rubber with the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*-a new method for rubber recycling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55:43-48.
- BROWN S.H., SJOHOLM C., KELLY R.M. (1993).** Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 878-886.
- BRUINS M.E., JANSSEN A.E.M., BOOM R.M. (2001).** Thermozyms and their applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 90: 155-186.
- BURGESS S.A., LINDSAY D., STEVE H. FLINT S.H. (2010).** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Intern. J. of Food Microbiol.*, 144:215-225.

CALTEAU A. (2005). Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de doctorat en microbiologie, université de Bretagne occidentale, France. P:21-23.

CANGANELLA F., WIEGEL J. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*; 98:253-279.

CHARLIER D., DROOGMANS L. (2005). Microbial Life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62: 2974-2984.

CHEETHAM P.S.J., WOOTTON A.N. (1993). Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. *Enzy. Microb. Technol.*, 15(2):105-108.

CIHAN A.C., OZCAN B., TEKIN N., COKMUS C. (2011). *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov., a thermophilic and α -glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 57, 83-92.

COHEN G.N. (2011). *Microbial Biochemistry*, 2nd Edition. Springer, New York. 545pp.

COLWELL R.R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio species*. *J. Bacteriol.*, 104:410-433.

COLWELL R.R., AUSTIN B. (1981). Numerical taxonomy in: *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Soc. for Microbiol., P: 444-449.

COOREVITS A., DINSDALE A.E., HALKET G., LEBBE L., De VOS P., Van LANDSCHOOT A., LOGAN N.A. (2012). 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 as *G. thermantarcticus*; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, P:1-40. (Sous presse).

DANIEL R.M., COWAN D. A. (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell.Molec. Life Sci.*, 57:250-264.

DAS S., PAUL S., BAG SK., DUTTA C. (2006). Analysis of *Nanoarchaeum equitans* genome and proteome composition: indications for hyperthermophilic and parasitic adaptation. *B.M.C Genomics*;7:186.

De MARTIN L., EBERT C., GARDOSSI L., LINDA P. (2001). High isolate yields in thermolysin catalyzed synthesis of Z-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in toluene at controlled water activity. *Tetrahedron Lett.*, 42: 3395-3397.

DECLAIS A C., DUGUET M. (1997). Etude mécanistique de la gyrase reverse de *Sulfolobus acidocaldarius*, une topoisomérase I hyperthermophile. Thèse de doctorat ; Ecole centrale des arts et manufactures, Chatenay-Malabry, France ; 205P.

DEMIRJIAN D.C., SHAH P.C., MORIS-VARAS F. (1999). Screening for novel enzymes. *Topics Curr. Chem.*, 200:1-29.

DEREKOVA A., SJOHOLM C., MANDEVA R., KAMBOUROVA M. (2007). *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria). *Extremophiles*; 11:577-583.

DINSDALE A.E., HALKET G., COOREVITS A., Van LANDSCHOOT A., BUSSE H.J., De VOS P., LOGAN N.A. (2011). Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus*. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 61, 1802–1810.

DUCKWORTH A.W., GRANT W.D., JONES B.E., VAN STEENBERGEN R. (1996). Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *F.E.M.S Microbiol. Ecol.*, 19:181-191.

DULGER S., DEMIRBAG Z., BELDUZ A.O. (2004). *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 54:1499-1503.

EGOROVA K., ANTRANIKIAN G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8: 649–55.

FERRERA I., REYSENBACH A.L. (2007). Thermophiles in: encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons; P:1-9.

FORTINA M.G., MORA D., SCHUMANN P., PARINI C., MANACHINI P.L. STACKEBRANDT E. (2001). Reclassification of *Saccharococcus caldxylosilyticus* as *Geobacillus caldxylosilyticus* comb. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 51:2063-2071.

FORTINA M.G., PUKALL R., SCHUMANN P, MORA D.,PARINI C., MANACHINI P.L.STACKEBRANDT E. (2001). *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus*, emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 51:447-455.

FRAZIER W.C. (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Infect. Dis.* 39:302-309.

GAO J., BAUER M.W., SHOCKLEYK. R., PYSZ M.A., KELLYR.M. (2003). Growth of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* on chitin involves two family 18 chitinases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3119–28.

GODFREY T. (1996). Textiles. In: Godfrey E, West S (eds) *Industrial enzymology*, 2nd edn. Macmillan Press, London, P:361-371.

GOMES J., STEINER W. (2004). Extremophiles and extremozymes, *Food Technol. Biotechnol.*,42 (4) 223–235.

GOODFELLOW M., JONES A.L. (2009). *Thermoactinomycetaceae* in Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd Edition; Volume 3: The Firmicutes. Ed. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. P:144-461. Springer, New York.

GORDONR E., HAYNESW C., PANG C.H.N. (1973). The Genus *Bacillus* (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC: United States Department of Agriculture.

GREGOIRE P., FARDEAU ML., GUASCO S., BOUANANE A., MICHOTEY V., BONIN P., DUBOURG K., CAMBAR J., OLLIVIER B. (2009). Les microorganismes de l'extrême. Press. Therm. Climat.,146:49-61.

GUPTA R., GIGRAS P., MOHAPATRA H., GOSWAMI V., CHAUHAN B. (2003). Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem., 38:1599-1616.

HAAKI G.D., RAKSHIT S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. Bioresour. Technol., 89: 17-23.

HARLEY J.P., PRESCOTT L.M. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed., 449P.

HARRIS J.M., ADAMS M., KELLY R.M. (2010). Enzymes, extremely thermophilic. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. P:1-17.

HOLDEN J.F. (2009). Extremophiles: Hot Environments in Encyclopedia of microbiology, 3rd Ed., Schaechter M. P: 127-146. Elsevier.

HORIKOSHI K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63:735-50.

HORIKOSHI K., BULL A.T. (2011). Prologue: definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles in: Extremophiles Handbook. Ed. Horikoshi K. P: 1-12. Springer.

HORVATH I.T., HORVATH I. (2002). Encyclopedia of catalysis, John Wiley & Sons Ed. 4772 P.

HUBER H., HOHN M.J., RACHEL R. et al. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nano sized hyperthermophilic symbiont. Nature; 417: 63-67.

HUBER H., STETTER K.O. (2006). The *Thermoplasmatales* in: The prokaryotes. Ed. Dworkin M. 3:101-112. Springer, Singapore.

HUBER R., HUBER H., STETTER K. O. (2000). Towards the ecology of hyperthermophiles : biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. F.E.M.S. Microbiol. Rev., 24(5), 615–23.

ICHIKAWA Y., LOOK G.C., WONG C.H. (1992). Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. Anal. Biochem., 202 (2): 215-238.

IZUMORI K. (2002). Bioproduction strategies for rare hexose sugars. Natur wissenschaften; 89(3): 120-124.

- JAENICKE R. (2000).** Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biotechnol.*, 79 (3):193-203.
- JAENICKE R., STERNER R. (2006).** Life at high temperatures in: The prokaryotes. Ed. Dworkin M. 2:167–209. Springer, Singapore.
- JOFFIN J.N., LEYRAL G. (2006).** Microbiologie technique, tome 1 : dictionnaire des techniques 4ème édition. 361P.
- JORGENSEN F., HANSEN O.C., STOUGAARD P. (2004).** Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64(6): 816-822.
- KADAR Z., De VRIJE T., BUDDÉ M.A., SZENGYEL Z., RECZEY K., CLAASSEN P. A. (2003).** Hydrogen production from paper sludge hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 557-566.
- KAMPFER P. (2012).** Systematics of prokaryotes: the state of the art. *Antonie van Leeuwenhoek*; 101:3-11
- KANAI T., ITO S., IMANAKA T. (2003).** Characterization of a cytosolic NiFe-hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.*, 185:1705-11.
- KASHEFI K., LOVLEY D.R. (2003).** Extending the upper temperature limit for life. *Science*; 301: 934.
- KECHA M., BENALLAOUA S., TOUZEL J.P. (2007).** Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles*; 11:65-73.
- KEDAID F.Z. (2007).** Database on the geothermal resources of Algeria. *Geothermics*; 36: 265-275.
- KIM P. (2004).** Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65(3): 243–249.
- KONINGS W.N., ALBERS S.V., KONING S., DRIESSEN A.J. (2002).** The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and Archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 81: 61-72.
- KRISTJANSSON J.K., HREGGVIDSSON G.O. (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. *World J. of Microbiol. and Biotech.*, 11:17-25.
- KRULWICH T.A., GUFFANATI A.A. (1989).** Alkaliphilic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 43:435-463.
- KUMAR S., NUSSINOV R. (2001).** How do thermophilic proteins deal with heat. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58:1216-1233.

LADENSTEIN R., REN B. (2008). Reconsideration of an early dogma, saying « there is no evidence for disulfide bonds in proteins from archaea ». *Extremophiles*; 12(1): 29-38.

LARSEN, H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspective, *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, 39: 3-7.

LEANG K., TAKADA G., FUKAI Y., MORIMOTO K., GRANSTROM T.B., IZUMORI K. (2004). Novel reactions of L-rhamnose isomerase from *Pseudomonas stutzeri* and its relation with D-xylose isomerase via substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Sub.*, 1674(1): 68-77.

LEE D.W., JANG H.J., CHOE E.A., KIM B.C., LEE S.J., KIM S.B., HONG Y.H., PYUN Y.R. (2004). Characterization of a thermostable L-arabinose (D-galactose) isomerase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(3): 1397-1404.

LEE D., KOH Y., KIM K., KIM B., CHOI H., KIM D., SUHARTONO M.T., PYUN Y. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 179:393-400.

LEWINSON O., PADAN E., BIBI E. (2004). Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *P.N.A.S*; 101 (39): 14073-14078.

LIEBL W. (2001). Cellulolytic enzymes from *Thermotoga* species. *Methods Enzymol*; 330: 290-300.

LLOYD, J., LOVELEY D. R., MACASKIE E. L. (2003). Biotechnological application of metal-reducing microorganisms. *Adv. Appl. Microbio.*, 53: 85-128.

LOGAN N.A., ALLAN R.N. (2008). Aerobic, endospore-forming bacteria from antarctic geothermal soils in microbiology of extreme soils. *Soil Biology*; 13: 155-173.

LOGAN N.A., BERGE O., BISHOP A.H., BUSSE H.J., De VOS P., FRITZE D., HEYNDRIKX M., KAAMPFER P., SALKINOJA-SALONEN M.S., SELDIN L., RABINOVITCH L., VENTOSA A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:2114-2121.

LOGAN N.A., De VOS P., DINSDALE A. (2009). *Geobacillus* in: Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd Edition; Volume 3: The Firmicutes. Volume 3: The Firmicutes. Ed. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. P:144-160. Springer, New York.

LOGAN N.A., HALKET G. (2011). Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria in Endospore-forming Soil Bacteria, *Soil Biology*; 27: 1-29.

LUCHETTA P., MAUREL M. C., HIGUET D. (2005). Evolution moléculaire. Dunod. Paris. 330 P.

MACELROY R.D. (1974). Some comments on evolution of extremophiles. *Biosystems* 6:74-75.

MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., STAHL D.A., CLARK D.P. (2010). Brock's biology of microorganisms, 13th ed., 18:577-780. Pearson.

MARCHANT R. BANAT I.M. (2010). The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization in: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Timmis K.N., P:1888-1894. Springer.

MARCHANT R., BANAT I.M., RAHMAN T.J.S., BERZANO M. (2002). The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Env. Microbiol.*, 4:595-602.

MARTINS L.O., HUBER R., HUBER H. (1997). Organic solutes in hyperthermophilic Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*; 63: 896-902.

MATHIS B. J., MARSHALL C. W., MILLIKEN C. E., MAKKAR R. S., CREAGER S. E., MAY H. D. (2008). Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78:(1):147-155.

MATSUI T., YAMADA Y., MITSUYA H., SHIGERI Y., YOSHIDA Y., SAITO Y., MATSUI H., WATANABE K. (2009). Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 941-950.

MATSUO Y., KATSUTA A., MATSUDA S., SHIZURI Y., YOKOTA A., KASAI H. (2006). *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *Mechercharimyces asporophorigenens* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of *Thermoactinomycetaceae* fam. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 56:2837-2842.

MENG M., BAGDASARIAN M., ZEIKUS J. (1993). Thermal stabilization of D-xylose isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*. *Biotech.*, 11:1157-1161.

MESBAH N.M., WIEGEL J. (2008). Life at extreme limits. The anaerobic halophilic alkali thermophiles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125:44-57.

MINANA-GALBIS D., PINZO D.L., LORE J.G., MANRESA A., OLIART-ROS R.M. (2010). Reclassification of *Geobacillus pallidus* as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 60:1600-1604.

MIYTAKE R., SHIGERI Y., TATSU Y., YUMOTO N., UMEKAWA M., TSUJIMOTO Y., MATSUI H., WATANABE K. (2005). Two oligopeptidase-like Pz peptidases produced by a collagen-degrading thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *J. Bacteriol.* 187: 4140-4148.

MORI K., KAKEGAWA T., HIGASHIY., NAKAMURAK., MARUYAMA A., HANADA S. (2004). *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfide chimney in Suiyo Seamount. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 54:1561-1566.

MULKIDJANIANA A.Y., BYCHKOV A.Y., DIBROVA D.V., GALPERINE M.Y., KOONINE E.V. (2012). Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields. *Earth, atmospheric, and planetary sciences. PNAS ed.*, P:1-10.

NAKAGAWA S., SHTAIH Z., BANTA A. (2005). *Sulfurihydrogenibiumyellowstonense* sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park and amended descriptions of the genus *Sulfurihydrogenibium*, *S. subterraneum*, and *S. azorense*. Int. J. of Syst. and Evo. Microbio., 55: 2263–2268.

NAZINA T.N., TOUROVA T.P., POLTARAUS A.B., NOVIKOVA E.V., GRIGORYAN A.A., IVANOVA A.E., LYSENKO A.M., PETRUNYAKA V.V., OSIPOV G.A., BELYAEV S.S., IVANOV M.V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearotherophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int., J., Syst., Evol., Microbiol., 51:433-446.

NELSON K.E., CLAYTON R. A., GILLS R., GWINN M. L., DODSON R. J., HAFT D. H., HICKEY K., PETERSON J. D., NELSON W. C., KETCHUM K. A., MCDONALD L., UTTERBACK T. R., MALEK J. A., LINHERK D., GARRETT M.M., STEWART A.M., COTTON M.D., PRATT M.S., PHILLIPS C.A., RICHARDSON D., HEIDELBERG J., SUTTON G.G., FLEISCHMANN R.D., EISEN J.A., WHITE O., SALZBERG S.L., SMITH H.O., FRASER C.M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from gene sequence of *Thermotoga maritima*. Nature; 399:323-329.

NI S., BOONE D. (1998). Extremophilic, methanogenic Archaea and their adaptation mechanisms. In: Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments. Ed. Horikoshi K., Grant W.D., P: 211-232.

NIEHAUS F., BERTOLDO C., KAHLER M., ANTRANIKIAN G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51: 711-729.

NORRIS P., BURTON N., FOULIS N. (2000). Acidophiles in bioreactor mineral processing. Extremophiles; 4:71-76.

NYSTRAND R. (1984). *Saccharococcus thermophilus* gen. nov., sp. nov. isolated from beet sugar extraction. Syst. Appl. Microbiol., 5: 204-219.

O'CONNOR, E. AND R. SHAND. (2002). Halocins and sulfobacilins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. J. Indust. Microbiol. Biotechnol., 28, 23-31.

OCHMAN H., LAWRENCE J.G., GROISMAN E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature; 405:298-304.

OSHIMA T., MORIYA T. (2008). A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high-temperature compost. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1125:338-344.

OUALI S., KHELLAF A., BADDARI K. (2007). Etude des ressources géothermiques du sud algérien. Revue des Energ. Renouv., 10 (3) : 407-414.

PARK B.C., KOH S., CHANG C., SUH S.W, LEE D.S, BYUN S.M. (1997). Cloning and expression of the gene for D-xylose isomerase from *Thermus flavus* AT62 in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 61: 15-27.

PATEL G.B., SPROTT G.D. (1999). Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 19:317-57.

PIKUTA E., LYSENKO A., CHUVILSKAYA N., MENDROCK U., HIPPE H., SUZINA N., NIKITIN D., OSIPOV G., LAURINAVICHUS K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 50, 2109-2117.

PIKUTA E.V. (2009). The genus *Anoxybacillus* in Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd Edition; Volume 3: The Firmicutes. Volume 3: The Firmicutes. Ed. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. P:134-142. Springer, New York.

PINZÓN-MARTÍNEZ D.L, RODRÍGUEZ-GÓMEZ C., MIÑANA-GALBIS D., CARRILLO-CHÁVEZ J.A., VALERIO-ALFARO G., OLIART-ROS R. (2010). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environ. Techn.*, 31(8-9) 957-966.

PONZANO B.C., ROSSI M., MORACCI M. (2011). Carbohydrate-Active Enzymes from Hyperthermophiles: Biochemistry and Applications in: *Extremophiles Handbook*. Ed. Horikoshi K. 4:430-440. Springer.

PRAKASH O. VERMA M. SHARMA P. KUMAR M. KUMARI K. SINGH A. KUMARI H. JIT S. GUPTA S.K. KHANNA M. R. LAL R. (2007). Polyphasic approach of bacterial classification, an overview of recent advances. *Indian J. Microbiol*; 47:98-108.

PRIEST G.F., FERGUS G., GOODFELLOW M., TODD C. (1988). A Numerical Classification of the genus *Bacillus*. *J. of general microbiol.*, 134:1847-1882.

QUÉRELLOU J., GUÉZENNEC J. (2010). *Biotechnologie des extrêmophiles*. Editions Tech. Ing. BIO580; P : 1-13.

RAMADE F. (2008). *Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité*. Dunord Ed ; 728P.

RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S., DESHPANDE V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.

RASHID N., CORNISTA J., EZAKI S., FUKUI T., ATOMI H., IMANAKA T. (2002). Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. *J. Bacteriol.*, 184:777-84.

RATH C.C., MOHANTA H.S., DASH S.K. (2009). *Extremophiles as Novel Cell Factories in: Biotechnology Applications*; 15:283-285. Springer.

RAWLINGS D.E., JOHNSON D.B. (2007). The microbiology of biomining : development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiol.*, 153(2): 315-324.

ROBERTSON D.E., MATHUR E.J., SWANSON R.V., MARRS B.L. (1996). The Discovery of New Biocatalysts from Microbial Diversity. *Short J.M., SIM News* 46.

ROH H.J., YONG C.P., CHOI J.H. (2000). Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31: 1-4.

ROSSELLÓ-MORA R., AMANN R. (2001). The species concept for prokaryotes. *F.E.M.S Microbiol. Rev.*, 25:39-67.

SAIBI H. (2009). Geothermal resources in Algeria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*; 13:2544–2552.

SAKO Y., NOMURA N., UCHIDA A., ISHIDA Y., MORII H., KOGA Y., HOAKI T., MARUYAMA T. (1996). *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100°C. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, P:1070-1077.

SANTOS H., LAMOSA P., BORGES N., GONÇALVES L.G., PAIS T., RODRIGUES M.V. (2011). Organic compatible solutes of prokaryotes that thrive in hot environments: the importance of ionic compounds for thermostabilization in: *Extremophiles Handbook*. Ed. Horikoshi K. 4:511. Springer.

SCHNEIDER D., LIU Y., GERSTEIN M., ENGELMANN D.M. (2002). Thermostability of membrane protein helix-helix interaction elucidated by statistical analysis. *F.E.B.S. Lett.* 532: 231-236.

SIERRA G.A. (1957). Simple method for the selection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*; 23:15-22.

SIGURGISLADOTTIR S., KONRAOSDOTTIR M., JONSSON A., KRISTJANSSON J.K., MATTHIASSEN E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. *Volume 15, Number 4*, 361-366.

SLEYTR U.B., BAYLEY H., SARA M., BREITWIESER A., KUPCU S., MADER C., WEIGERT S., UNGER F.M., MESSNER P., JAHN-SCHMID B., SCHUSTER B., PUM D., DOUGLAS K., CLARK N.A., MOORE J.T., WINNINGHAM T.A., LEVY S., FRITHSEN I., PANKOVIC J., BEALE P., GILLIS H.P., CHOUTOV D.A., MARTIN K.P. (1997). Applications of S-layers. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, 20:151-75.

SOBOH B., LINDER D., HEDDERICH R. (2002). Purification and catalytic properties of a CO-oxidizing:H₂-evolving enzyme complex from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Eur. J. Biochem.*, 269:5712-5721.

SNEATH P.H.E., SOKAL R.R. (1963). Principles of Numerical Taxonomy. Freeman & Co., San Francisco.

SOBOH B., LINDER D., HEDDERICH R. (2004). A multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase and an NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Microbiol.*, 150, 2451–63.

SOKAL R., MICHENER C. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*; 38: 1409-1438.

SPRING S. (2006). Preservation of Thermophilic Microorganisms in: *Methods in microbiology Volume 35, extremophiles*. Elsevier ed., P: 349.

SPROTT G.D., PATEL G.B., KRISHNAN L. (2003). Archaeobacterial ether lipid liposomes as vaccine adjuvants. *Methods Enzymol.*, 373:155-172.

STERNER R., LIEBL W. (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 36: 39-106.

STETTER K.O. (1996). Hyperthermophilic prokaryotes. *F.E.M.S. Microbiol., Rev.*, 18:149-158.

STETTER K.O. (2011). History of Discovery of Hyperthermophiles in: *Extremophiles Handbook*. Ed. Horikoshi K. P: 414. Springer.

SYNOWIECKI J. (2008). Thermostable enzymes in food processing, in: *Recent Research Developments in Food Biotechnology. Enzymes as additives or processing aids*, research Signpost, Kerala.

SYNOWIECKI J. (2010). Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing; *African J. of Biotechnol.*, 9:42:7020-7025.

TABOUCHE N., ACHOUR S. (2004). Etude de la qualité des eaux souterraines de la région orientale du Sahara septentrional algérien. *Larhyss J.*, 3:99-113.

TACHIBANA Y., KURAMURA A., SHIRASAKA N., SUZUKI Y., YAMAMOTO T., FUJIWARA S., TAKAGI M., IMANAKA T. (1999). Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomalto-dextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1991-1997.

TOKUDA H. (2007). Characteristics of *Alicyclobacillus* in: A. Yokota, T. Fujii, K. Goto (Eds.). *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli; (3):9-42. Springer.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molec. Biol. and Evol.*, 28:2731-2739.

TANAKA R., KAWAICHI S., NISHIMURA H., SAKO Y. (2006). *Thermaerobacter litoralis* sp. nov., a strictly aerobic and thermophilic bacterium isolated from a coastal hydrothermal field. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 56:1531-1534.

TANAKA T., FUKUI T., FUJIWARA S., ATOMI H., IMANAKA T. (2004). Concerted action of diacetylchitobiosedeacetylase and exo-beta-D-glucosaminidase in a novel

chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. J. Biol. Chem., 279:30021-7.

THIEMANN V., SAAKE B., VOLLSTEDT A., SCHAFFER T., PULS J., BERTOLDO C., FREUDL R., ANTRANIKIAN G. (2006). Heterologous expression and characterization of a novel branching enzyme from the thermoalkaliphilic anaerobic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12:1-12.

THOLEY A., HEINZLE E. (2002). Methods for Biocatalyst Screening. Adv. in Biochem. Engin/Biotechn., 74:1-19.

TINDALL B. J., SIKORSKI J., SMIBERT R.M. KRIEG, N. R. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: Methods for General and Molecular Microbiology; P: 330-393.

TINDALL B.J., ROSSELLO-MORA R., BUSSE H.J., LUDWIG, W., KAMPFER P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60:249-266.

TORREBLANCA M., RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G., VENTOSA, A., KAMEKURA, M., KATES, M. (1986). Classification of non halophilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarculagen. nov.* and *Halopherax gen.nov.* Sys. Appl. Microbiol., 8:89-99.

TOUZEL J.P., O'DONOHUE M., DEBEIRE P., SAMAIN E., BRETON C. (2000). *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan degrading bacterium isolated from farm soil. Int. J. of Syst. and Evo. Microbio., 50: 315-320.

TRIVEDI S., GEHLOT H.S., RAO S.R. (2006). Protein thermostability in archaea and eubacteria. Genet. Mol. Res., 5: 816-827.

TURNER P., MAMO G., KARLSSON E.N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microb. Cell. Fact., 6:9-32.

UZEL A., HAMEŞ KOCABAŞ E.E., BEDİR E. (2011). Prevalence of *Thermoactinomyces thalophilus* and *T. sacchari* strains with biotechnological potential at hot springs and soils from West Anatolia in Turkey. Turk. J. Biol., 35: 195-202.

Van de VOSSENBERG J.L., DRIESSEN A. J., KONINGS W. N. (1998). The essence of being extremophilic: The role of the unique archaeal membrane lipids. Extremophiles. 2:163-170.

Van DER VEEN B.A., UITDEHAAG J.C., DIJKSTRA B.W., DIJKHUIZEN L. (2000). Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. Biochim. Biophys. Acta., 1543:336-360.

Van OOTEGHEM S.A., BEER S. K., YUE P.C. (2002). Hydrogen production by the thermophilic bacterium *Thermotoga eapolitana*. Appl. Biochem. Biotechnol., 89-98.

- Van OOTEGHEM, S.A., JONES A., Van DER LELIE D., DONG B., AND MAHAJAN D. (2004).** H₂ production and carbon utilization by *Thermotoga eapolitana* under anaerobic and microaerobic growth conditions. *Biotechnol. Lett.*, 26, 1223–32.
- VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DE VOS P., KERSTERS K., SWINGS, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60 (2): 407-438.
- VIELLE C., SAVCHENKO A., ZEIKUS G. (2000).** Microbial amylases in : *Encyclopedia of microbiology*, volume1; P :171-177.
- VIELLE C., ZEIKUS G.J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65:1-43.
- VOLKL P., HUBER R., DROBNER E., RACHEL R., BURGGRAF S., TRINCONE A., STETTER KO. (1993).** *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 59:2918-2926.
- Von JAN M., RIEGGER N., POTTER G, SCHUMANN P., VERBARG S., SPROER C, ROHDE M., LAUER B., LABEDA D.P., KLENK H.P. (2011).** *Kroppenstedtia eburnea* gen. nov., sp. nov., a thermoactinomycete isolated by environmental screening, and emended description of the family *Thermoactinomycetaceae*. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 61:2304-2310
- WAGNER I.D., WIEGEL J. (2008).** Diversity of thermophilic anaerobes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1125:1-43.
- WIEGEL J. (1986).** Methods for isolation and study of thermophiles. In: Brock (ed), *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology*; P: 17-37.
- WIEGEL J. (1990).** Temperature spans for growth: a hypothesis and discussion. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.*, 75:155-170.
- WIEGEL J. (1998).** Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles* ; 2:257-267.
- WIEGEL J., CANGANILLA F. (2001).** Extreme Thermophiles in; *Encyclopedia of life sciences*. Wiley Ed. 12P.
- WOESE C. R., KANDLER O., WHEELIS M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains of archaea, bacteria and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4576-4579.
- YAVUZ E., GUNES H., HARSA S., YENIDUNYA A.F. (2004).** Identification of extracellular enzyme producing thermophilic bacilli from Balçova (Agamemnon) geothermal site by ITS rDNA RFLP. *J. of Appl. Microbiol.*, 97:810-817.
- YUMOTO I., HIROTA K., KAWAHARA T, NODASAKA Y, OKUYAMA H, MATSUYAMA H, YOKOTA Y, NAKAJIMA K., HOSHINO T. (2004).** *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 54:1239-1242.

ZAKHIA F., DE LAJUDIE P. (2006). La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses. *Can. J. Microbiol.*, 52: 169-181.

ZHANG J., TANG S.K., ZHANG Y.Q, YU L.Y., KLENK H.P., AND LI W.J. (2010). *Laceyella tengchongensis* sp. nov., a thermophile isolated from soil of a volcano. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbio.*, 60:2226-2230.

Annexes

Annexe 1. Tableau 4. Exemples d'applications possibles des enzymes des (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzyme	Souche productrice	PM (KDa)	T _{opt} (C°)	pH _{opt}	Thermostabilité (demi-vie)	Applications
1. Traitement de l'Amidon α-Amylase (EC 3.2.1.1)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	136	75	3,0		Panification, liquéfaction et saccharification d'amidon, production de glucose, désencollage de textile, industrie du papier, synthèse des oligosaccharides, application détersive, gélification, épaississants dans l'industrie alimentaire
	<i>Anaerobranca gottschalkii (AmyA)</i>	58	70	8,0	48h à 70°C	
	<i>Anaerobranca gottschalkii (AmyB)</i>	108	55	6–6,5	0,2h à 70°C	
	<i>Desulfurococcus mucosus</i>		100	5,5		
	<i>Dictyoglomus thermopilum</i>	75	90	5,5		
	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>		120	5–8	50h à 100°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (intracell.)	76	92	7,0		
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (extracell.)	100	100	5,5–6	13h à 98°C	
	<i>Pyrococcus woesei</i>	68	100	5,5	11h à 90°C	
	<i>Pyrodictium abyssi</i>		100	5,0		
	<i>Rhodothermus marinus</i>		85	6,5		
	<i>Staphylothermus marinus</i>		100	5,0		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	240				
	<i>Thermococcus aggregans</i>		95	6,5		
	<i>Thermococcus celer</i>		90	5,5		
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	49	75–85	5–5,5	4h à 90°C	
	<i>Thermococcus profundus</i> (amyS)	43	80	5–6	3h à 80°C	
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	49,5	90	6,5	24h à 70°C	
	<i>Thermotoga maritima</i> (AmyA)	61	85	7,0	4h à 80°C	
	<i>Thermotoga maritima</i> (AmyC)		90	8,5		
<i>Thermus filiformis</i>	60	95	6,0	8h à 65°C		
β-Amylase (EC 3.2.1.2)	<i>Thermoanaerobacter thermosulfurigenes</i>	180	70	6,0	2h à 80°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>		95	4–5,5	0,5h à 90°C	
Glucoamylase (EC 3.2.1.3)	<i>Bacillus</i> sp.		70	5,0	3,8h à 70°C	
	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>		75	4–6	1h à 85°C	
	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	75	70	5,0	>6h à 70°C	
	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>		80	6,5		
	<i>Picrophilus oshimae</i> (extracell.)	140	90	2,0	20h à 90°C	
	<i>Picrophilus torridus</i> (extracell.)	133	90	2,0	24h à 90°C	
	<i>Picrophilus torridus</i> (intracell.)	312	50	5,0	4h à 55°C	
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	75	60	6,8	0,5h à 60°C	
	<i>Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum</i>	75	65	4–5,5	8h à 65°C	
	<i>Thermoplasma acidophilum</i> (extracell.)	141	90	2,0	24h à 90°C	
	<i>Thermoplasma acidophilum</i> (intracell.)	140	75	5,0	40h à 60°C	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	250	90	5,5–6		

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souche productrice	PM	T opt	pH _{opt}	Demi-vie	Applications
α-Glucosidase (EC 3.2.1.20)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	57	55-60	2,4-3,5		
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	125	115	5,5	6h à 80°C	
	<i>Pyrococcus woesei</i>	90	110	5-5,5	39h à 85°C	
	<i>Sulfolobus shibatae</i>	313	85	5,5		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	80	105	4,5		
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>		75	5-5,5		
	<i>Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum</i>	60	65	5,5		
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	57	120	5,5		
	<i>Thermococcus sp. AN1</i>	63	120	7,0	48h à 50°C	
	<i>Thermococcus zilligii</i>		75	7,0		
	<i>Thermotoga maritima</i>	110	90	7,5	22h à 70°C	
Pullulanase (EC 3.2.1.41)				8,0		
	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	98	70	6,0	1h à 90°C	
	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	96	85	5,6-6	0,8h à 85°C	
	<i>Clostridium thermo hydrosulfuricum</i>		85	5,0	2h à 80°C	
	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	74	85	7,0		
	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	190	80	6,0	2h à 95°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	90	105	5,0		
	<i>Pyrococcus furiosus(pullulane-hydrolase)</i>	77	90	6,0		
	<i>Pyrococcus woesei</i>	90	100	9,0		
	<i>Pyrodictium abyssi</i>		100			
	<i>Rhodothermus marinus</i>		80		0,5h à 65°C	
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	109	90	5-5,5	2h à 80°C	
	<i>Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum</i>	150	65	6,0	2,5h à 100°C	
	<i>Thermoanaerobacter thermosulfurigenes</i>	100	75	6,0		
	<i>Thermococcus aggregans</i>	180	95	6,5		
	<i>Thermococcus celer</i>		90	5,5		
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	128	95	5,5	6,7h à 90°C	
	<i>Thermococcus litoralis</i>	119	98	5,5		
	<i>Thermococcus profundus (amyL)</i>	43	90	5,5	3,5h à 90°C	
	<i>Thermococcus sp. ST489</i>		80-95	8,0	4,5h à 95°C	
<i>Thermotoga maritima</i>	93	90	6,4	72h à 78°C		
<i>Thermus aquaticus</i>	83	80-95	5,5			
<i>Thermus caldophilus</i>	65	75				
<i>Thermus thermophilus</i>	80	70				
Cyclodextrine glucosyltransférase (EC 2.4.1.19)	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	78	65-70	6-9	0,5h à 100°C	
	<i>Thermoanaerobacter sp.</i>		90-95	6,0	0,33h à 100°C	
	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	68	80-85	4,5-7	0,66h à 110°C	
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	77	80	5,5-6		
	<i>Thermococcus sp.</i>	83	90-110	5-5,5		

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souche productrice	PM	T opt	pH opt	Demi-vie	Applications
Amylomaltase (EC 2.4.1.25)	<i>Dictyoglomus thermophilus</i>	75	80	6,0	20h à 90°C	
	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>		95	6,7		
	<i>Thermococcus aggregans</i>	80	100	6,8	2,5h at 90°C	
	<i>Thermococcus litoralis</i>	87	90	6,0	24h à 80°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>	53	55–80	6,0		
	<i>Thermus aquaticus</i>	57	75	5,5–6		
Cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	66		5.5		
	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	66	65	6,0		
Enzymes de ramification (EC 2.4.1.18)	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	72	50	7,0	>0,5h à 70°C	
	<i>Aquifex aeolicus</i>	74	75	7,5–8		
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	78	50	7,5	16h à 80°C	
	<i>Rhodothermus obamensis</i>	72	65	6–6,5	> 90°C	
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>		70	7,0		
2. Dégradation des polymères ligno-cellulosiques Enzymes dégradant la cellulose Endoglucanase (EC 3.2.1.4)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (CelA)	58	70	5.5	0,5h à 75°C	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 hétérosaccharides purs
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (CelB)	100	80	4.0	1h à 80°C	
	<i>Anaerocellum thermophilum</i>	230	95–100	5–6,0	0,8h à 100°C	
	<i>Aquifex aeolicus</i>	39	80	7,0	2h à 100°C	
	<i>Clostridium cellulovorans</i>	79	40–50	5–6		
	<i>Clostridium thermocellum</i>	56		6,0		
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (EglA)	36	100	6,0	40h à 95°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (LamA)	31	100	6–6,5	19h à 100°C	
	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	43–52	97	5,6	>3h à 97°C	
	<i>Rhodothermus marinus</i>	30	85	7,0		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT4	40	65	6,0		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	37	80	1,8	8h à 80°C and pH 1.8	
	<i>Thermobifida fusca</i>		77	8,2	>24h à 60°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>	27–29	95	6–7,5	>6h à 80°C	
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	29–30	95–106	6–6,6	>2h à 106°C	
β-Glucosidase (EC 3.2.1.21)	<i>Microbispora bispora</i>	52	60	6,2	<48h à 60°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	232	102	5,0	13h à 110°C	
	<i>Pyrococcus horikoshii</i>		>100	6,0	15h à 90°C	
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	224		7–8		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	240	95	6,5	15h à 85°C	
	<i>Thermosphaera aggregans</i>				>130h à 80°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>					
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	56	95	5–7	3,6h à 100°C	
	<i>Thermus caldophilus</i>		80	6,0		
	<i>Thermus nonproteolyticus</i>	49	90	5,6	48h à 85°C	

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souche productrice	PM	T opt	pH opt	Demi-Vie	Applications
Cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)	<i>Clostridium stercorarium</i>	102	75	5,0	1-2h à 75°C	Blanchiment du papier, alimentation des animaux
	<i>Clostridium thermocellum</i>	75	65	6,6		
	<i>Thermomonospora fusca</i>	60	55	7-8	>16h à 55°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>		95	6-7,5	0,5h à 95°C	
	<i>Thermotoga sp. FjSS3-B.1.</i>	36	105	7-8	1,2h à 108°C	
Enzymes dégradant le xylane Endo-1,4-β-xylanase (EC 3.2.1.8)	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	41	65	5,0		
	<i>Caldicellulosiruptor sp.</i>	36	70	7,0	>12h à 70°C	
	<i>Clostridium cellulovorans</i>	57	60	5,0		
	<i>Clostridium thermocellum</i>	110	70		0,6h à 70°C	
	<i>Dictyoglomus thermophilus</i>		70-85	6,5		
	<i>Pyrodictium abyssi</i>		110	5,5		
	<i>Rhodothermus marinus</i>	48	80	7,5	1,6h à 80°C	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	57	100	7,0	0,8h à 90°C	
	<i>Thermoactinomyces sacchari</i>		50	8,5		
	<i>Thermoactinomyces thalophilus</i>		65	8,5-9	2h à 65°C	
	<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i>	130	70	5,5	1h à 75°C	
	<i>Thermoanaerobacterium sp.</i>	180	80	6,2		
	<i>Thermobifida fusca</i>	36	70	7,0	>3h à 70°C	
	<i>Thermococcus zilligii</i> AN1	95		6,0	4h à 95°C	
	<i>Thermotoga maritima</i> (XynA)	120	92-105	5-6	22h à 90°C	
<i>Thermotoga maritima</i> (XynB)		87	6,5	8h à 90°C		
<i>Thermotoga neapolitana</i>	119	102	5,5	2h à 100°C		
<i>Thermus thermophilus</i>		100	6,0			
Acetylxylanesterase (EC 3.1.1.6)	<i>Clostridium cellulovorans</i>		50	6,0		
	<i>Clostridium stercorarium</i>	33	65	8,0	0,1h à 75°C	
	<i>Thermoanaerobacterium sp. JW/SL (A)</i>	195	80	7,0	1h à 75°C	
	<i>Thermoanaerobacterium sp. JW/SL (B)</i>	106	84	7,5	1h à 100°C	
	<i>Thermomonospora fusca</i>	80		5,7		
1,4-β-xylosidase (EC 3.2.1.37)	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	165	82	5-5,5	0,25h à 85°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>					
β-D-Mannosidase (EC 3.2.1.25)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	240	105	7,4	60h à 90°C	
	<i>Thermobifida fusca</i>	94	53	7,2	30h à 40°C	
β-Mannanase (EC 3.2.1.78)	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	40	80	5,0	>16h à 80°C	
	<i>Rhodothermus marinus</i>	113	85	5,4	>1h à 90°C	
	<i>Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum</i>	120	65-75	5,8		
	<i>Thermomonospora fusca</i>	38	80			

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souche productrice	PM	T opt	pH opt	Demi-vie	Applications
α-L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	<i>Rhodothermus marinus</i>		85	5,5–7	8,3h à 85°C	Utilisation des microorganismes des environnements marins
	<i>Thermomicrobia sp.</i>	350	70	6,0	>1h à 70°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>	332	90	7,0	2,7h à 100°C	
Enzymes dégradant la chitine Endochitinase (EC 3.2.1.14)	<i>Clostridium thermocellum</i>	53	60	4,5–6,5	10h à 60°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (ChiA)	40	90–95	6,0	1h à 120°C	
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>		80	9,0		
	<i>Thermococcus chitonophagus</i> (Chi70)	70	70	7,0		
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> (ChiA)	134	85	5,0		
Exochitinase (EC 3.2.1.52)	<i>Microbispora sp. V2</i>	35	60	3,0	24h à 50°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (ChiB)	55	90–95	6,0		
	<i>Rhodothermus marinus</i>	42	70	4,5–5	3h à 90°C	
	<i>Thermococcus chitonophagus</i> (Chi50)	50	80	6,0		
Chitobiase (EC 3.2.1.30)	<i>Thermococcus chitonophagus</i> (Chi90)	90				
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> (GlmA)	193	80	6,0		
Diacetylchitobiose Deacetylase	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> (Tk-Dac)	160	75	8,5		
Enzymes dégradant la Pectine (EC 3.1.1.11)	<i>Clostridium stercorarium</i>	135	65	7,0	0,2h à 70°C	
	<i>Clostridium thermosulfurigenes</i>		75	5,5	0,5h à 70°C	
	<i>Thermoanaerobacter italicus</i> (PelA)	135	80	9,0	>1h à 80°C	
	<i>Thermoanaerobacter italicus</i> (PelB)	251	80	9,0	>1h à 80°C	
	<i>Thermomono sporafusca</i>	56	60	10,45		
	<i>Thermotoga maritima</i> (PelA)	151	90	9,0	2h à 95°C	
	<i>Thermotoga maritima</i> (PelB)		80			
	<i>Thermotoga maritima</i> (exo-PG)	51	95	6,0	>5h à 90°C	
3. Enzymes protéolytiques Sérine protéase (EC 3.4.21)	<i>Aeropyrum pernix</i>	34	90	8–9	1h à 100°C	Détergents, panification, brassage, productions d'acides aminés
	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	37		3,9		
	<i>Aquifex aeolicus</i>	54	80	8–8,5	>0,5h à 110°C	
	<i>Aquifex pyrophilus</i>	43	85	7–9	6h à 105°C	
	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	43–54	95	7,5	4,3h à 95°C	
	<i>Fervidobacterium islandicum</i>		80	8,0		
	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	>200	100	9,0	1,5h à 100°C	
	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	58	80	10,0		
	<i>Geobacillus caldoproteolyticus</i>		70–80	8–9,0	1h à 80°C	
	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	401	>100	7–9		
	<i>Pyrococcus abyssi</i>	60	95	9,0		
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	150	115	6–9	0,33h à 105°C	
	<i>Staphylothermus marinus</i>	150	90	9,0		

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souches productrices	PM	T opt	pH opt	Demi-vie	Applications
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	46–51	90	2,0		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	118	>90	6,5–8		
	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	31	85	11,0		
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	279	60–65	7,5–9		
	<i>Thermoanaerobacter keratinophilus</i>		70	6,8		
	<i>Thermoanaerobacter yonseiensis</i>		92	9,0		
	<i>Thermococcus aggregans</i>		90	7,0		
	<i>Thermococcus celer</i>		95	7,5		
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	44	80	9,5		
	<i>Thermococcus litoralis</i>		95	9,5		
	<i>Thermococcus stetteri</i>	142	85	8,5–9	22h à 90°C	
	<i>Thermomono sporafusca</i>	21,7	80	8,5	0,3h à 85°C	
	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	120	65	8,5		
	<i>Thermotoga maritima</i>	>669	90–93	6–9,0		
	<i>Thermus aquaticus</i>	281	80	10,0		
	<i>Thermus</i> sp.	178	70	8,0		
Protéase acide	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	46–51	90			
Thiol protéase	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	45	110		1h à 100°C	
Métalloprotéase	<i>Aeropyrum pernix</i>	52	100			
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	128	100			
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	79	75			
	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	95	>95			
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	320	75			
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	170	85			
	<i>Thermococcus</i> sp. NA1	37	100		>1,5h à 80°C	
4. Autres enzymes à intérêt industriel						
Alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1)	<i>Aeropyrum pernix</i>		90			Transformation stéréosélective des cétones en alcools chiraux purs
	<i>Methanoculleus thermophilicus</i>		70			
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	55	90	7,5	150h à 80°C	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	71	95	7,5		
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	80,5	80	7,5	0,25h à 80°C	
	<i>Thermococcus litoralis</i>	192	80	8,8	2h à 85°C	
	<i>Thermococcus</i> sp. AN1	200	85	7,0		
	<i>Thermococcus</i> sp. ES-1					
	<i>Thermococcus zilligii</i>	184	85	7,0	0,25h à 80°C	
	<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	160				
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	160	90		1,7h à 90°C	
	<i>Thermomicrobium roseum</i>	86	70	10,0		
Aldolase (EC 4.1.2.13) (EC 4.1.2.14)	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	271	80	7–8,5	24h à 80°C	Synthèse de glucides

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souches productrices	PM	T opt	pH opt	Demi-vie	Applications
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	272	50			
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	133	100		2,5h à 100°C	
	<i>Thermoproteus tenax</i>	245	50			
	<i>Thermus aquaticus</i>	165	80		>1h à 97°C	
Amidase (EC 3.5.1.4)	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	108	70	4-8	1,2h à 70°C	Production de composés chimiques
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	56	95	7,5	25h à 80°C	
Aminoacylase (EC 3.5.1.14)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	170	100	6,5		Production de stéréoisomères
	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	95	95	7,5	>48h à 90°C	
	<i>Thermococcus litoralis</i>	172	85	8,0	1,7h à 85°C	
Arabinose isomérase (EC 5.3.1.3)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	224	65	6-6,5	10h à pH5.0	Edulcorants alimentaires
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	225	80	7,5		
	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	212	65	8,0		
	<i>Thermotoga maritima</i>	232	90	7,5	4h à 80°C	
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	230	85	7,5		
Catalase (EC 1.11.1.6)	<i>Thermus brockianus</i>	178	90	8,0	3h à 90°C	Blanchiment industriel
Cystéine synthase (EC 4.2.1.22)	<i>Aeropyrum pernix</i>	65	>60	7,5-8	>6h à 100°C	Synthèse de composés organiques sulfurés
Estérase (EC 3.1.1.1)	<i>Aeropyrum pernix</i>	18	90		1h à 100°C	Biotransformation dans des solvants organiques
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	35,5	70	7,0		
	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>		70	9,5		
	<i>Picrophilus torridus</i>	21	70-80	6,5		
	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	35	90	7,0	2h à 100°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	128	100		2h à 120°C	
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>		90			
	<i>Sulfolobus shibatae</i>	33	90	6,0	0,33h à 120°C	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P1	34	100	5-6		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2		80	7,4	0,66h à 80°C	
	<i>Sulfolobus tokadaii</i>	43	70	7,5-8		
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>		70	9,0	>10h à 50°C	
α-Galactosidase (EC 3.2.1.22)	<i>Thermotoga maritima</i>		90-95	5-5,5	1,2h à 90°C	Traitement des sucres
	<i>Thermus sp.</i>	54	75		1h à 70°C	
β-Galactosidase (EC 3.2.1.23)	<i>Pyrococcus woesei</i>	61	90	4,0		Synthèse d'oligosaccharides, production de produits laitiers diététiques
	<i>Thermotoga maritima</i>		80	5,3		
	<i>Thermussp. A4</i>	75	70	6,5	>2h à 85°C	

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souches productrices	PM	T opt	pH opt	Demi-vie	Applications
β-Glucuronidase (EC 3.2.1.31)	<i>Thermotoga maritima</i>		85	6,5	3h à 85°C	Synthèse d'oligosaccharides Edulcorants alimentaires
Glucose isomérase(EC 5.3.1.5)	<i>Clostridium thermosulfurigenes</i>	200	65	7,0	0,6h à 85°C	
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>		70	7–7,5		
	<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	200	80	6,8	1h à 80°C	
	<i>Thermoanaerobacterium sp.</i>		80	7,0	0,2h à 120°C	
	<i>Thermotoga maritima</i>	200	>100	7,1	2h à 90°C	
	<i>Thermotoga neapolitana</i>		97	5,5	240h à 70°C	
	<i>Thermus aquaticus</i>	200	70			
	<i>Thermus caldophilus</i>		90	7,0	2h à 95°C	
	<i>Thermus flavus</i>	185	90	7,0		
<i>Thermus thermophilus</i>	200	90				
β-Fructosidase (EC 3.2.1.26)	<i>Thermotoga maritima</i>		90–95	5,5		Confiseries
Laccase (EC 1.10.3.2)	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	53	92	4,5–5,5	>14h à 80°C	Synthèse de biosondes, biopolymères
Lipase (EC 3.1.1.3)	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	28	75	7,0	2h à 80°C	Biotransformation
	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	28	75	8,0	2h à 85°C	
N-Méthyltransférase (EC 2.1.1.17)	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	23	90–100	8,5	>2h à 100°C	Synthèse de phosphatidylcholine à usage médical et alimentaire
Maltooligosyl trehalosesynthase (EC 5.4.99.15)	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	84	75	5,0	72h à 80°C	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	87	75	5,0	2h à 85°C	
Nitrilase (EC 3.5.5.1)	<i>Pyrococcus abyssi</i>	60	60–90	6–8	6h à 90°C	Production de mononitriles
5. Enzymes opérant sur l'ADN						
ADN Polymérase (EC 2.7.7.7)	<i>Aeropyrum pernix</i> (pol I)	108			0,5h à 85°C	
	<i>Aeropyrum pernix</i> (pol II)	88			0,5h à 100°C	
	<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>		60–70			
	<i>Pyrobaculum islandicum</i>	90	70–80		>5h à 90°C	
	<i>Pyrococcus abyssi</i>	90	70–80	7,3	5h à 100°C	
Pfupol	<i>Pyrococcus furiosus</i>	90	72–78	9,0	4h à 95°C	
	<i>Pyrococcus sp.</i> GB-D	90,6	70–80	8–9	8h à 100°C	
	<i>Pyrococcus woesei</i>	90				
Deep Vent pol	<i>Rhodothermus marinus</i>	104	55		2min à 90°C	
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	100	65–75		0,25h à 87°C	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	101	75	7,5	0,1h à 90°C	

Annexe 1. Tableau 4 (suite). Exemples d'applications possibles des enzymes (hyper) thermophiles (Antranikian, 2008).

Enzymes	Souches productrices	PM	T opt	pH opt	Demi-vie	Applications
Tay	<i>Thermoanaerobacterium</i>	97				
	<i>Thermococcus aggregans</i>	90	70–80	6,8	1,2h à 90°C	
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	90	75	7,5	12h à 95°C	
Vent pol	<i>Thermococcus litoralis</i>	98	70–80	6,5	2h à 100°C	
9°N-7 pol	<i>Thermococcus sp. 9°N-7</i>	90	70–80	8,8	6,7h à 95°C	
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>		75	9,0		
Tca	<i>Thermus caldophilus</i>		75	8,7		
Tfi	<i>Thermus filiformis</i>					
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>		70–75	8,8		
ADN topoisomérase type I-group B	<i>Methanopyrus kandleri</i>	87				
ADN Ligase (EC 6.5.1.1)	<i>Aquifex pyrophilus</i>	82	65		>1h à 95°C	
	<i>Pyrococcus furiosus</i>		45–80		>1h à 95°C	
	<i>Rhodothermus marinus</i>	80	>55		0,1h à 90°C	
	<i>Sulfolobus shibatae</i>	62	50–70		0,15h à 90°C	
	<i>Thermococcus fumicolans</i>		65			
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	52	100			
	<i>Thermus scodoductus</i>		65		0,5h à 90°C	
Phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1)	<i>Pyrococcus abyssi</i>	108	70			
	<i>Thermotoga maritima</i>		65		5h à 90°C	
	<i>Thermotoga neapolitana</i>		85		4h à 90°C	
	<i>Thermus sp. 3041</i>					
	<i>Thermus yunnanensis</i>	104	70–80			
Pyrophosphatase inorganique (EC 3.6.1.1)	<i>Aquifex pyrophilus</i>	105	80–95			
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	80	56			
	<i>Thermoplasma acidophilum</i>					
Protéines de liaisons ss-ADN	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>					
	<i>Methanocaldococcus jannashii</i>					
	<i>Methanothermobacter</i>					
	<i>thermoautotrophicum</i>					

Annexe 2

Tableau 6. Composition ionique des eaux des sources thermales étudiées (Tabouche et Achour, 2004 ; Bahri *et al.*, 2010).

Site	pH	Conductivité (mS/cm)	TH (°F)	Ca ²⁺ (mg/l)	Mg ²⁺ (mg/l)	Na ⁺ (mg/l)	K ⁺ (mg/l)	HCO ₃ ⁻ (mg/l)	Cl ⁻ (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	F ⁻ (mg/l)	DS (mg/l)	Faciès chimique
Debagh 1	7,29	1,973	61	308	37	151	32	330	355	260	0,163	1,150	Chloruré calcique
Debagh 2	7,07	0,806	64	142	30	95	4	354	348	240	0,19	1,450	Chloruré calcique
Ouled Ali 1	7,08	1,503	75	39	43	35	6	366	43	310	0,152	1,600	Chloruré calcique
Ouled Ali 2	6,69	1,347	68	33	45	39	8	378	50	260	0,09	800	Chloruré calcique
Ouled Ali 3	6,78	0,852	55	36	48	41	9	378	71	270	0,075	950	Chloruré calcique
Touggourt 1	8,24	5,09	194	796	166	455	30	146	1744	900	2,70	-	chloruré et sulfaté calcique et magnésien
Touggourt 2	8,30	7,78	194	768	373	775	35	155	3224	2310	3,01	-	chloruré et sulfaté calcique et magnésien

TH : Titre Hydrométrique. DS : degré de salinité (solides dissous totaux)

Annexe 3

Tableau 7. Milieux utilisés pour l'isolement et la purification des souches, à pH 7,4±0,2								
Milieu	1	2	3	4	5	6	Bouillon d'enrichissement (pour les sédiments)	Solution saline mère (30%)*
Constituant	Quantités (% p/v, v/v)							
NaCl	0,2		0,5				0,2	23,4
NaNO ₃				0,2				
MgSO ₄ .7H ₂ O				0,05				6
MgCl ₂ .6H ₂ O								4,2
KCl				0,05				0,6
Fe ₂ (SO ₄). 3H ₂ O				0,001				
CaCl ₂ . 2H ₂ O								0,1
NaHCO ₃								0,02
NaBr								0,07
KH ₂ PO ₄				0,014				
K ₂ HPO ₄				0,12				
Na ₂ SO ₃					0,1			
Glucose						0,1		
Amidon soluble		0,1						
carboxyméthycellulose								
Huile d'olive								
Tween 20								
Tween 80								
Caséine								
Gélatine								
Extrait de levure	0,4	0,1	0,25	0,002	0,1	0,5	0,4	
Peptone	0,8	0,5	0,5		0,1	0,5	0,8	
Extrait de viande			0,1					
Solution saline					1	7,5		
Agar	3	3	1,5	3	3	3		
Eau distillée **	100	100	100	100	100	100	100	100

*Les solutions salines des milieux 5 et 6 sont les dilutions de la solution mère à 30% de salinité (Torreblanca *et al.*, 1986). ** l'eau distillée a été remplacée par de l'eau de source filtrée pour les milieux 1, 2, 3 et 4.

Milieu 1, milieu 2, Milieu 3(Gélose nutritive), milieu 4 (Atlas, 2005), Milieu 5 (Sako *et al.*, 1996), Milieu 6 (Torreblanca *et al.*,1986).

Annexe 3

Tableau 8. Résultats des essais réalisés avec les souches tests (incubées à 37°C).			
Souche	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Bacillus cereus</i> CHU	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213
Gram	-	+	+
Forme des cellules	Coccobacilles	Bâtonnets	Cocci en grappe
Aspect des colonies	Type M	Type L	Type L
Couleur des colonies	Crème	Crème	Jaune doré
Oxydase	-	+	+
Catalase	+	+	+
β-galactosidase	+	-	-
Citrate de Simmons	-	+	+
Milieu TSI		NE	NE
- Saccharose/Lactose	+		
- Glucose	+		
- Production d'H ₂ S	-		
- Production de gaz	+		
Milieu Mannitol-mobilité-nitrate			
- Mannitol	+	+	+
- Mobilité	+	-	-
RM	+	-	-
VP	-	+	+
Uréase	-	+	+
Indole	+	-	-
ADH	-	NE	+
ODC	-	NE	-
LDC	+	NE	NE
Hydrolyse de l'amidon	-	+	NE
Hydrolyse de la caséine	-	+	NE
Hydrolyse de la gélatine	-	+	NE

NE : essai Non Effectué, seuls les caractères vérifiés ont été testés. L : lisse. M : muqueux. +: Gram positif/présence. -: Gram négatif/absence.

Annexe 3

✓ Colorants et réactifs (Harley et Prescott, 2002)

Réactif de Barritt (réaction de Vogues Proskauer).

Solution 1: 6 g d' α -naphthol dans 100 ml d'alcool éthylique à 95%,

Solution 2: 40 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml d'eau (à conserver au réfrigérateur).

Réactif au rouge de méthyl (Recherche d'acides) (pour 500 ml). 0.1 g de rouge de méthyl dans 300 ml d'alcool éthylique à 95%, compléter jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée.

Colorant au bleu de méthylène (coloration simple). 0,3g de Bleu de méthylène dans 100 ml d'eau distillée.

Réactifs de la coloration de Gram :

- Solution de violet de gentiane : 1g de violet de gentiane ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 2g de phénol ajoutés à 100ml d'Eau distillée ;
- Solution de lugol de Gram : 1 d'iodure de potassium ; 1gd'iode ajoutés à 300 ml d'eau distillée ;
- Solution de fuschine de ziehl (Guiraud et Galzy, 1980). 1 g de Fuschine ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 5g de phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée.

Réactif de Kovacs (pour le test d'indole). 150 ml de N-amyl/isoamyl alcool ; 50 ml d'acide hydrochlorique concentré et 10 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde.

Réactif de Frazier (pour le test d'hydrolyse de la gélatine). 15g d' HgCl_2 , 20 ml d' HCl concentré ajoutés à 100 ml d'eau distillée.

Annexe 4.

Souche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gram	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Forme des cellules	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Aspect des colonies	Type L	Type M	Type L	Type M	Type M	Type M	Type L	Type L	Type L	Type L	Type L
Couleur des colonies	Crème	-	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème
Température°C[<u>min-max</u>]	30-70	45-65	50-70	40-<60	37-80	37-70	50-70	37-70	40-65	40-65	35-67
pH [<u>min-max</u>]	6-9	5-9	6-9	7-9	5,5-9	6-9	7-9,5	5-9	6-9	7-8	5,5-8,5
NaCl% [<u>min-max</u>]	0-3	0-7	0-0,5	0-0,5	0-3%	0-1	0-2,5	0-0,5	0-2	0-3	ND
Utilisation de : Glucose		+			+					+	+
- Acétate		+				-					
- Lactate		+				-					
- Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Fructose											+
- Saccharose										+	-
- Lactose											-
- Mannitol											+
- Galactose											-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Production d'acides à partir											ND
- Saccharose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
- Lactose	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	
- Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
- Mannitol	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	
Production de gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
β-galactosidase	-	-	-	ND	ND	ND	+	-	+	ND	ND
RM	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
VP	+	-	+	-	+	+	-	+	+	ND	-
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	ND
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
Hydrolyse de la caséine	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Hydrolyse de la gélatine	+	+	+	ND	+	+	+	+	-	-	-

L : lisse. M : muqueux. R : rugueux. +: Gram positif/présence. -: Gram négatif/absence. ND : non déterminé

Tableau 12. Caractères phénotypiques des souches de référence utilisées pour la taxonomie numérique.
1. *Geobacillus stearothermophilus*, 2. *Geobacillus jurassicus*, 3. *Geobacillus thermodentriticans*, 4. *Geobacillus thermoglucosidans*, 5. *Geobacillus thermantarcticus*, 6. *Geobacillus toebii*, 7. *Calditbacillus debilis*, 8. *Anoxybacillus caldiproteolyticus*, 9. *Anoxybacillus tepidamans*, 10. *Anoxybacillus voynovskiensis*, 11. *Anoxybacillus rupertensis*.

Annexe 4.

Souche	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Gram	+	+	-	+	+	+/-	+	-	-	+	+
Forme des cellules	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Cocci	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Filament	Filament
Mobilité	+	+	+	+	-	+	+	-	+		
Aspect des colonies	Type L	Type L	Type M	Type L	Type M	ND	Type L	Type L	Type L	Type R	Type R
Couleur des colonies	Jaune	Crème	-	Crème	-	ND	Crème	Crème	Crème	Blanche	Blanche
Température°C[<i>min-max</i>]	30-72	30-70	42-65	42-70	50-78	52-78	30-70	30-63	30-60	25-50	28-70
pH [<i>min-max</i>]	5,5-9	6-11	7-9	6-10	ND	5,5-9	6-8,5	6,5-8,5	6-9	5-8,5	6-8
NaCl% [<i>min-max</i>]	0-2,5	0-2,5	0-5	0-1	ND	0-5	0-10	0-3	0-3	ND	ND
Utilisation de :											
- Glucose	+	+	-		+	-			+	+	+
- Acétate			-			+			-		
- Lactate	-	-	-			-					
- Citrate	-	-	-	+		-	-				
- Fructose		+	-		+	-	-		+	+	+
- Maltose	+	+	-		+	-		+			
- Saccharose	+	+	-		+	-			+	+	+
- Lactose			-	+	-	-		+	+		
- Mannitol			-		+	-				+	+
- Galactose			-	+	+	-		+	+		
Catalase	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	+
Production d'acides à partir	ND	ND				ND		ND	ND	ND	ND
- Saccharose			-	+	+						
- Lactose			-	+	+						
- Glucose			-	+	+		-				
- Mannitol			-		+						
Production de gaz	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	ND
Production d'H ₂ S	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
β-galactosidase	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
RM	-	ND	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND
VP	+	ND	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	-
Uréase	-	-	+	-	-	ND	-	-	-	+	-
Indole	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-	-
ADH	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
ODC	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
LDC	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
Hydrolyse de l'amidon	+	+	-	+	-	ND	+	+	+	-	-
Hydrolyse de la caséine	+	-	-	+	ND	ND	-	-	ND	+	+
Hydrolyse de la gélatine	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+

L : lisse. M : muqueux. R : rugueux. +: Gram positif/présence. -: Gram négatif/absence. ND : non déterminé

Tableau 12 (suite). Caractères phénotypiques des souches de référence utilisées pour la taxonomie numérique. 12. *Anoxybacillus flavithermus*, 13. *Anoxybacillus ayderensis*, 14. *Ureibacillus terrenus*, 15. *Geobacillus caldaxyloxyticus*, 16. *Saccharococcus thermophilus*, 17. *Thermaerobacter litoralis*, 18. *Aeribacillus pallidus*, 19. *Thermobacillus xylanilyticus*, 20. *Caldimons hydrothermale*, 21. *Kroppenstedtia eburnea*, 22. *Laceyella tengchongensis*.

GLOSSAIRE

(Ramade, 2008)

Algorithme. Suite finie et non-ambiguë d'opérations ou d'instructions permettant de résoudre un problème.

Anoxygénique. Fait référence à un type de photosynthèse sans production d'Oxygène. Il est souvent associé à la libération d'Hydrogène sulfuré (H₂S).

Anthropocentrisme. Attitude qui consiste à faire de l'Homme le centre de l'Univers et de ce fait le propriétaire de la biosphère.

Autotrophe. Désigne un organisme capable de subvenir à ses besoins métaboliques en utilisant comme seule source de carbone le CO₂ présent dans l'air ou dissous dans l'eau, des matières nutritives exclusivement minérales et en employant comme source d'énergie celle du rayonnement solaire (photosynthèse), ou chez certaines bactéries celle produite par des réactions d'oxydation de composés minéraux (chimiosynthèse).

Biotope. Composante d'un écosystème constituée par ses dimensions physico-chimiques et spatiales.

Carboxyméthyle cellulose (CMC). Nom commun d'un acide éther, dérivé de la cellulose par une réaction entre la cellulose et l'acide chloroacétique. Il est souvent commercialisé sous la forme d'un sel de sodium hydrosoluble, il est utilisé comme un agent émulsifiant et stabilisant.

Chaperone. Une protéine utilisée pour prévenir l'agrégation de protéines dénaturées et faciliter leur reconformation.

Chimolithotrophe. Organisme qui tire son énergie métabolique de phénomènes d'oxydoréduction à partir de substrats inorganiques servant de donneurs d'électrons.

Cluster. Terme utilisé en informatique pour désigner un ensemble de données ou d'éléments présentant des similarités dans un partitionnement de données.

Compost. Mélange de matières organiques et végétales utilisé comme engrais.

Dendrogramme. Diagramme représentant les relations existant entre groupes taxonomiques avec le taxon ancestral situé à la base d'une ligne verticale à partir de laquelle se diverticulisent les taxa inférieurs et ainsi de suite en remontant aux divers niveaux successifs. On en distingue deux types : les phénogrammes qui sont fondés uniquement sur une parenté établie à partir de critères de ressemblance morphologique et anatomique et les cladogrammes qui reconstituent réellement la phylogenèse puisqu'ils sont établis à partir de seuls critères génétiques.

Epibionte. Organismes vivant fixés sur un substrat aérien ou aquatique de nature minérale ou vivante.

Faciès. En géologie, ce terme peut désigner soit un type de terrain défini par l'ensemble des caractéristiques d'une roche à partir desquelles peuvent être déduites les conditions

Glossaire

environnementales qui ont conditionné son dépôt et son histoire ultérieure ; soit une catégorie dans laquelle on peut classer un dépôt ou une roche à partir de critères lithologiques et/ou paléontologiques.

Fumerolle. Dégagements de vapeur d'eau et de gaz toxiques, en particulier sulfureux et de chlorure d'ammonium, émis à une température supérieure à celle de l'air ambiant dans des zones de volcanisme.

Hétérotrophes (chimioorganotrophes). Ensemble des organismes dont la nutrition nécessite des substances biochimiques afin de produire leur énergie cellulaire. Il réunit à la fois les décomposeurs (bactéries et champignons) et les animaux. Certains Protistes pourtant pourvus de chloroplastes peuvent être hétérotrophes si les conditions écologiques conviennent.

Isolat. Population séparée des autres populations de la même espèce par une barrière géographique et (ou) écologique et dont de ce fait les individus se reproduisent entre eux.

Monophylétique. Désigne un groupe d'espèces descendant d'un ancêtre commun.

Niche écologique. Place et spécialisation d'une espèce à l'intérieur d'un peuplement. Elle correspond à l'ensemble des paramètres qui caractérisent les exigences écologiques (climatiques, alimentaires, reproductives, etc.) propres à une espèce vivante et qui la différencient des espèces voisines d'un même peuplement. Une confusion fréquente est faite entre niche écologique et habitat. Ce dernier correspond aux emplacements particuliers où l'espèce considérée se rencontre. La niche, elle, représente la fonction de l'espèce dans un écosystème.

Nutraceutique. Un aliment nutraceutique est un produit isolé ou purifié à partir d'aliments, il est habituellement vendu sous formes galéniques comme des capsules qui ne sont pas généralement associées à des aliments, et a potentiellement un effet physiologique bénéfique ou assure une protection contre des maladies chroniques.

Organotrophe. Organisme qui obtient son énergie métabolique à partir de matières organiques. Ils sont confondus à tort avec les hétérotrophes. En effet, certaines bactéries phototrophes, tout en étant capables de photosynthèse, sont organotrophes.

Oxique. Terme désignant la présence d'oxygène.

Photohétérotrophe. Désigne une catégorie d'organismes phototrophes qui utilisent des composés organiques comme source de carbone.

Phylogénie. Étude des relations de parentés entre différents êtres vivants en vue de comprendre l'évolution des organismes vivants.

Protéines unicellulaires (SCP). Protéines produites par des microorganismes, levures en particulier. Elles sont utilisées comme aliments ou comme additifs alimentaires.

Rouge Congo. Molécule diazoïque, c'est-à-dire qui possède deux fois la structure de l'azobenzène. Le rouge Congo est à la fois un colorant organique, pas très utilisé du fait de sa toxicité, et un indicateur de pH. Ce colorant a reçu son nom en hommage à l'exploration du Congo par Stanley l'année de sa découverte.

Glossaire

Screening. Tout test utilisé afin de détecter la présence d'un agent donné dans un large nombre de spécimens, de tels tests sont typiquement simples et peu coûteux mais ne sont pas complètement spécifiques. Un certain pourcentage de faux tests positifs peut être toléré comme screening positif mais doivent être relayés par d'autres tests plus spécifiques. Une autre définition interprète ce terme comme étant tout test qui permet d'assigner un organisme inconnu à un possible rang taxonomique.

Sebkha. Vastes étendues plates entourant une lagune côtière, fréquentes sur les rivages du golfe Persique, caractérisées par l'accumulation en surface d'évaporites.

Souche. Une souche bactérienne est constituée par une succession de cultures dérivées d'une culture pure (le plus souvent une colonie parfaitement isolée). Le nombre de cellules ayant permis la constitution de la culture pure (la formation d'une colonie isolée) est le plus souvent inconnu. Une souche n'est pas obligatoirement un clone (population de cellules dérivée d'une unique cellule).

Sulfatare. Terrain volcanique qui dégage des fumerolles de soufre.

Taxon. Groupe taxonomique (systématique) de rang varié qui est représenté par l'ensemble des entités qui répondent à des caractéristiques communes. Un taxon est constitué par la réunion des diverses populations et, si c'est le cas, d'unités taxonomiques de rang inférieur, dont l'ensemble présente des caractéristiques suffisamment distinctes des autres groupes voisins pour qu'il soit érigé en un groupe séparé.

Tween (20, 60, 80...). Ou esters de sorbitan, agents tensioactifs non ionique connus et très fréquemment utilisés en chimie et en biologie, mais on utilise aussi des esters de saccharose. Ces membres de la famille des esters de sucre sont constitués d'un groupement osidique hydrophile et d'une chaîne grasse hydrophobe.

Phénon (singulier et pluriel phéna, souvent écrit « phénons »). Unité morphologique minimale, non divisible, constituée d'individus, utilisée pour étudier la spéciation.

Photoautotrophe. Terme général désignant les organismes capables d'activités photosynthétiques.

Communications scientifiques

Les résultats de la présente étude ont été le sujet d'une communication internationale, et de 2 communications nationales. Les résumés de ces travaux sont présentés ci-dessous.

**Séminaire d'Echange International Aux Interfaces du Développement Durable
Environnement, Développement durable, Eau, Industrie Agro-alimentaire, Santé et Economie**

**Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Les 21 et 22 juin 2011**



Mise en évidence d'enzymes exocellulaires chez des bactéries thermophiles isolées de sources chaudes algériennes

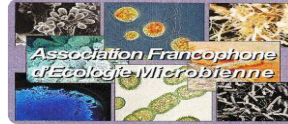
Mohamed Amine GOMRI, Rima AYAD, Karima KHARROUB

Résumé

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles autochtones des environnements chauds tels que les sources thermales terrestres possèdent des capacités d'adaptations moléculaires intéressantes et constituent ainsi une importante source de molécules bioactives peu conventionnelles issues de mécanismes biochimiques et moléculaires uniques, et des enzymes exocellulaires en particulier. Dans la perspective d'étudier une partie de leur potentiel enzymatique, des souches bactériennes thermophiles ont été isolées à partir d'échantillons d'eau, de sédiments et de roches prélevés sur plusieurs sites géothermales de l'est Algérien. La caractérisation phénétique réalisée a permis d'avoir accès aux propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces microorganismes. Par ailleurs, la mise en évidence de certaines enzymes exocellulaires, essentiellement des hydrolases a permis d'obtenir des résultats encourageants.

V^{ème} Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM) organisé en collaboration avec l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T. BIOTECH)

Hôtel Riu Marco Polo, Hammamet, Tunisie
Du 14 au 16 novembre 2011



Mise en évidence d'enzymes hydrolytiques extracellulaires chez des bactéries thermophiles aérobies isolées de sources chaudes algériennes

Mohamed Amine GOMRI, Rima AYAD et Karima KHARROUB.

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles autochtones des environnements chauds tels que les sources thermales terrestres possèdent des capacités d'adaptations moléculaires intéressantes et constituent ainsi une importante source de molécules bioactives peu conventionnelles issues de mécanismes biochimiques et moléculaires uniques. Les enzymes hydrolytiques de ces organismes offrent des avantages majeurs et fournissent de nouvelles possibilités soit de l'amélioration ou de la création de nouveaux procédés biotechnologiques. Dans la perspective d'étudier une partie de leur potentiel enzymatique, une galerie de souches microbiennes thermophiles aérobies a été isolée à partir d'échantillons d'eau, de sédiments et de roches prélevés au niveau de plusieurs sites géothermaux répartis entre les régions de Guelma et de Ouargla situés respectivement aux Nord-Est et Sud-Est de l'Algérie. La caractérisation phénétique réalisée a permis d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces microorganismes. Par ailleurs, la mise en évidence des activités hydrolytiques a permis d'obtenir des résultats encourageants.

Colloque FRD2011 sur la production et la productivité de l'agriculture dans le cadre du développement durable

**Du 12 au 14 décembre 2011
Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen**



Mise en évidence d'activités hydrolytiques chez des bactéries thermophiles isolées à partir des sources chaudes de la région de Touggourt-Wilaya de Ouargla, Algérie.

Mohamed Amine GOMRI, Rima AYAD, Karima KHARROUB.

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles autochtones des environnements chauds tels que les sources thermales terrestres possèdent des capacités d'adaptations moléculaires intéressantes et constituent ainsi une importante source de molécules bioactives peu conventionnelles issues de mécanismes biochimiques et moléculaires uniques. Les enzymes hydrolytiques de ces organismes offrent des avantages majeurs et fournissent de nouvelles possibilités soit de l'amélioration ou de la création de nouveaux procédés biotechnologiques. Dans la perspective d'étudier une partie de leur potentiel enzymatique, une galerie de souches bactériennes thermophiles aérobies a été isolée à partir d'échantillons d'eau, de sédiments et de sols prélevés au niveau de plusieurs sites géothermaux de la région de Sidi Mahdi, située dans la banlieue sud de la ville de Touggourt-Ouargla. La caractérisation phénétique réalisée a permis d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces microorganismes. Par ailleurs, la mise en évidence des activités hydrolytiques a permis d'obtenir des résultats encourageants.