REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé :

Evaluation de l'activité enzymatique des souches thermophiles isolées à partir des sources hydrothermales de MEDEA et BOUIRA

Présenté par :

MAYOUF Amina

ARIBI Ferial

CHELGHAM Nacira

Soutenue publiquement le 21 Septembre 2020 devant les jurys composés de :

Président	**M. KHAMES M.**	**Maître de conférences B à l'Université de Médéa**
Examinatrice	**Mme BOUMEDIENE F.**	**Maître-assistante A à l'Université de Médéa**
Examinatrice	**Mme ZERGOUG A.**	**Maître de conférences B à l'Université de Médéa**
Promotrice	**Melle HOCEINI A.**	**Maître de conférences B à l'Université de Médéa**

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Le premier à être remercié C'est le Dieu Tout-Puissant, Un grand merci à lui de nous avoir donné la force, la patience et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous voulons tout d'abord exprimer notre profonde grativtude à notre promotrice ***Melle HOCEINI Amina*** *pour la confiance qu'elles nous accordée en acceptant cet encadrement, pour sa gentillesse, son soutien, ses précieux conseils, ses orientations et ses bon explication et surtout pour ses critiques et ses suggestion qui ont contribué à alimenter notre réflexion et nous permis de bien améliorer ce travail.*

Nous tenons à présenter nos plus vifs remerciements aux membres de jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce travail :

Mme BELKACEM I *qui d'avoir fait honneur de présider notre jury de soutenance*

Mme BOUMEDIENE F *et* ***Mme ZERGOUG A*** *qui ont accepté d'examiner notre travail de fin d'étude.*

Nous associons nos remerciements pour toute l'équipe du laboratoire deFaculté des sciences pour leur aide, leur conseils et leur compréhension.

Notre profonde gratitude va également à tous les enseignants et les Enseignantes de département de la nature et de la vie qui ont participé Le long de ces 5 années à notre formation et pour leurs très grands dévouements.

Et bien sûr sans oublier de remercie tous les étudiants de Master 2 Microbiologie Appliquée – Promotion 2019/2020.

Finalement, on remercie tous ceux qui ayant soutenu et pris part, tant moralement que financièrement de près ou de loin, de façon directe ou indirecte à la réalisation de ce mémoire.

Merci encore et encore.....

DEDICASE

Louange à Dieu qui m'a éclairé sur le chemin de la connaissance, m'a aidé à rédiger ce mémoire et m'a aidé dans ma carrière scientifique.

Du fond du ma cœur je dédie ce travail

À la source de mon bonheur, à la source de la tendresse, à celle dont les supplications étaient le paradis sous ses pieds , auxquelles les mots étaient insuffisants pour décrire mon amour, mon respect et ma gratitude envers elle, au plus merveilleux et au prénom prononcé par mes lèvres.

Ma chère mère que Dieu prolonge sa vie

À ce qui porte son nom avec fierté, à ce qui m'apporte générosité, amour et force sans attendre, à mon modèle de vie qui m'a encouragé à continuer malgré les difficultés et à qui Dieu a doté de dignité et de sagesse, à qui je préfère à moi même.

Mon père bien-aimé que Dieu te donne santé et longue vie

*A ceux dont son rire éclaire notre maison, mon frère Muhammad, et à mes sœurs **Aya, Lebna** et **Dalila** En témoignage de ma tendresse pour vous, je vous dédie ce travail avec mes voeux de bonheur et de réussite.*

*À ma soeur **Nawel,** son mari **Hamza** et leur petite fille **Batoul,** que j'espère que Dieu préserve et prend soin d'elle*

A tous mes chers enseignants du primaire à ce jour à eux beaucoup de gratitude et de remerciements, que Dieu les bénisse.

*A mes collégues **Nasira** et **Ferial,** qui étaient vrai amis, nous avons partagés d'agréables moments tout au long de la rédaction de cette trvail et de notre parcours universitaire.*



Amina

DEDICASE

Avant tout

Je remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et de m'avoir guidé, aidé et donne la foi et le courage pour accomplir ce travail.

A mes très chèrs parentes

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respecet, je ne vous remercierai jamais assez pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien tout au long de ma scolarité, pour tous vos sacrifices.

*A mon cher frère **BILAL** pour leur appui et leur encouragement.*

*A mes chères sœurs **LAMIA, RITADJ** et **ASSIL** qui ont cru en moi, qui m'ont encouragé et m'ont donné la force d'aller jusqu'au bout. Qu'Allah les protège.*

*A tout la famille **ARIBI et SEDDI.***

Sourtout mes grands pères et mères de mon père et de ma mère.

A mes chères : Naima, Achwak, Rekia, Nacira, Hamida, Dalila, Fatma el zahra, Ines , Sans oublier Djihan, Anfal, Ibrahim et Abouda.

A tous mes amis sourtout :

***AHLEM, AMEL, DALILA, KAIMA, SOUMIA, SAKINA, SOUMIA** et **SOUAD**.*

*A mes collégues **Nacira** et **Amina** pour son collaboration efficase.*

A tous ceux qui ont une relation de prés ou de loin avec la réalisation du présent rapport. Que Dieu vous protège et vous bénisse tous.



Ferial

DEDICASE

Avant tout

je remercié ALLAH qui reste toujours avec nous et qui

nous a donné la patience at la santé durant notre vie et sourtout en accomplissant ce travail.

Je dédie cr travail

A mes chers parents pout tout leurs sacrifiés, leur tendresse et leur amour, se sont le bon exemple des parentes et la source de ma force durent la vie, que Dieu le tout puissant les protèges avec une bonne santé et longe de vie, et sans lesqueles je ne serai jamais arrivée là ou j'en suis.

A ***ma sœur*** *et ses petites filles* ***Yasmine*** *et* ***Omayma*** *j'espère que Dieu les protèges.*

A mes collégues ***Amina*** *et* ***Ferial*** *pour votre collaboration durent ce travail.*

A mes amis : ***Amel, Ahlem, Dalila, Kaima, Sakina, Souad, Soumia et Soumia.***

Aux étudientes de Master Micribiologie Appliqée -Promotion 2019-2020.

A tous ceux j'aime



Nacira

Résumé

Les microorganismes thermophiles possèdent la capacité d'adaptations à des environnements chauds tels que les sources hydrothermales et la forte activité enzymatique traduire par la production des thermozymes, ces molécules hautement thermostables ont suscité un grand intérêt dans le secteur industriel en raison de leur haut potentiel d'application et sa forte spécificité d'action.

Dans le cadre de la recherche de ces molécules extracellulaires, Cette étude a pour objectif d'isolement et sélection des souches thermophiles productrices des enzymes à partir de hammam Elssalhin dans la région de MEDEA et hammam Ksana dans la région de BOUIRA. L'identification de ces isolats était basée sur les caractères morphologiques (étude macroscopique et microscopique) et sur des approches physiologiques et biochimiques favorisé par les tests disponibles au laboratoire suivi par la mise en évidence de certaines activités enzymatiques extracellulaires de ces souches. Dans cette étude 25 souches ont été isolées à partir des deux sources hydrothermales dont 16 souches isolés au niveau de Hammam Essalihine de MEDEA et 9 souches au niveau de Hammam K'sana de BOUIRA.

Mots clés : microorganismes thermophiles, les sources hydrothermales, thermozymes, hautement thermostables, molécules extracellulaires.

Abstract

Thermophilic microorganisms possess the capacity of adaptations to hot environments such as hydrothermal vents and the strong enzymatic activity resulting in the production of thermozymes, these highly thermostable molecules have aroused great interest in the industrial sector due to their high potential for application and its strong specificity of action.

As part of the search for these extracellular molecules, the objective of this study is to isolate and select a thermophilic strain producing enzymes from hammam Elsalhin in the region of MEDEA and hammam Ksana in the region of BOUIRA. The identification of these isolates was based on the morphological characters (macroscopic and microscopic study) and on physiological and biochemical approaches favored by the tests available in the laboratory followed by the demonstratin of certain extracellular enzymatic activities of these strains. In this study 25 strains were isolated from the two hydrothermal vents, including 16 strains isolated from Hammam Essalihine from MEDEA and 9 strains from Hammam K'sana from BOUIRA.

Keywords: thermophilic microorganisms, hydrothermal vents, thermozymes, highly thermostable, extracellular molecules.

ملخص

تمتلك الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة القدرة على التكيف مع البيئات الساخنة مثل الفتحات الحرارية المائية والنشاط الأنزيمي القوي الذي ينتج عنه إنتاج الترموزيمات، وقد أثارت هذه الجزيئات عالية الحرارة اهتمامًا كبيرًا بالقطاع الصناعي نظرًا لإمكانياتها العالية التطبيق وخصوصية عملها القوية.

كجزء من البحث عن هذه الجزيئات خارج الخلية، فإن الهدف من هذه الدراسة هو عزل واختيار سلالة محبة للحرارة تنتج إنزيمات من حمام الصالحين في منطقة المدية وحمام كسانا في منطقة البويرة. استند تحديد هذه العزلات إلى الصفات المورفولوجية (دراسة ماكروسكوبية وميكروسكوبية) وعلى المقاربات الفزيبولوجية والكيميائية الحيوية التي تسمح بها الاختبارات المتاحة في المختبر متبوعة بتوضيح بعض الأنشطة الأنزيمية خارج الخلية لهذه السلالات. في هذه الدراسة ، تم عزل 25 سلالة من فتحتين حراريتين ، بما في ذلك 16 سلالة معزولة من حمام الصالحين من المدية و 9 سلالات من حمام كسانة من بويرة.

الكلمات المفتاحية: الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة ، الفتحات الحرارية المائية ، الترموزيمات ، عالية الحرارة ، الجزيئات خارج الخلية.

Table De Matière

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....**1**

Partie Bibliographique

Chapitre I : Le monde extrêmophile

I.1-Notion des extrêmophiles.....4

I.2-La diversité des extrêmophiles 8

I.2.1-Les thermophiles et les hyperthermophiles.....8

I.2.2-Les acidophiles et les alcaliphiles.....9

I.2.3-Les halophiles.....10

I.3-Les sources hydrothermales 11

I.4. Les bactéries des sources hydrothermales.....12

Chapitre II: Les bactéries thermophiles

II.1-Notion des thermophiles 14

II.2- Phylogénie des thermophiles.....15

II.2.1-Bactéries 15

II.2.2-Archaea.....16

II.3.3-Eucarya 16

II.4-La taxonomie et le métabolisme des thermophiles 17

II.4.1-Concernant la source de carbone.....18

II.4.1.1-Bactéries thermophiles hétérotrophe.....18

II. 4.1.2-Bactéries thermophiles autotrophes 18

II.4.2-Concernant la source d'Energie 19

II.4.2.1-Bactéries thermophiles phototrophe 20

II.4.2.2-Bactéries thermophiles chimiolithotrophe 20

II.5-Les biotopes écologiques des thermophiles 20

II.5.1-Biotopes naturels 21

II.5.1.1-Biotopes marins 22

II.5.1.2- Biotopes terrestres 22

II.5.2- Biotopes artificiels 23

II.6-les bases physiologiques des thermophiles 23

II.6-1-les lipides 24

II.6-2-les acides nucléiques 25

II.6-3-les protéines 26

II.7-Les besoins nutritifs des Bactéries thermophiles 27

II.8-Application des thermophiles 28

II.9-Quelques travaux d'isolement des bactéries thermophiles 32

II.9.1-En Algérie 32

II.9.2-Dans d'autre pays 34

Chapitre III : Les thermozymes

III.1-Généralité sur les thermozymes 37

III.2-Les principales thermozymes 39

III.2.1-Enzymes de dégradation des hydrolases 39

III.2.1.1-Les amylases 40

III.2.1.2-Les protéases 40

III.2.1.3- Les cellulases 42

III.2.1.4-Les xynlases 42

III.2.1.5-Lipases et estérases 43

III.2.2-Enzymes de manipulation des acides nucléiques 44

III.2.2.1- ADN polymérases 44

III.2.2.2-ADN ligases 45

III.3-Application des thermozymes 46

III.4-Stabilité des thermozymes 47

Partie Expérimentale

I.Matériel et Méthodes

I.1-Sources thermales étudiées 51

I.1.2-Source thermale de MEDEA (Hammam Essalihine) 51

I.1.3-Source thermale de BOUIRA (Hammam K'sana) 51

I.2. Echantillonnage 52

I.2.1- Prélèvement des échantillons 52

I.2.1.1-Eau 52

I.2.1.2-Sédiment 53

I.2.2-Transport et conservation des échantillonnes 53

I.3- Enrichissement des isolats 53

I.4-Isolement des bactéries thermophiles 53

I.5- Purification des isolats 54

I.6- Conservation des isolats 54

I.4 I.6.2- A court terme 54

I.7-Identification des isolats 54

I.7.1-Caractérisation morphologique et culturale 54

I.7.1.1-Examen macroscopique 54

I.7.1.2- Examen microscopique 54

I.7.2-Caractérisation biochimique 55

I.7.2.1-Test de Catalase 55

I.7.2.2-Test d'oxydase.....55

I.7.2.3-Identification des espèces par Galeries API 56

I.8-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....56

I.8.1-Amylase 56

I.8.2-Protéases 56

I.8.3-Cellulase ou xylanase 56

I.8.4-Lipase et estérase.....57

I.8.4.1-Hydrolyse des Tween 20 et 80.....57

I.8.4.2- l'hydrolyse de l'huile d'olive.....57

II.Résultats Et Discussion

II.1-Isolement et purification des isolats 59

II.2-Identification des isolats 59

II.2.1-Observation macroscopique.....59

Conclusion et perspectives 64

Références bibliographiques

Annexes

Liste
Des tableaux
Des figures
Des abréviations

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements	**6**
Tableau 2	Classification des extrêmophiles et exemples des applications de certaines de leurs enzymes	**7**
Tableau 3	Classification des micro-organismes thermophiles	**14**
Tableau 4	Exemples de la diversité métabolique des thermophiles	**17**
Tableau 5	Principaux facteurs responsables de la thermostabilité des acides nucléiques (ADN et ARN)	**26**
Tableau 6	Enzymes thermophiles et leurs rôles potentiels	**29**
Tableau 7	Brevets récents sur les thermophiles et leurs applications potentielles	**30**
Tableau 8	Avantages de l'utilisation des thermophiles dans les applications biotechnologiques	**32**
Tableau 9	Rapports récents sur les macromolécules produites par des thermophiles ayant des applications biotechnologiques connues ou potentielles	**46**
Tableau 10	Les températures des sources thermales étudiées.	**53**
Tableau 11	Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam Essalihine de MEDEA	**30**
Tableau 12	Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam K'sana de BOUIRA	**62**

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifiée par un code de couleur.	**5**
Figure 2	Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température et du pH	**10**
Figure 3	Exemple d'un écosystème hypersalé : le lac Retba du Sénégal	**11**
Figure 4	Schéma de formation des sources hydrothermales acides en contexte basaltique ou mixte.	**12**
Figure 5	Classification des bactéries, selon leurs températures optimales de croissance	**16**
Figure 6	Limites supérieures de température pour le métabolisme énergétique.	**19**
Figure 7	Exemples de biotopes naturels des thermophiles.	**22**
Figure 8	Lipides des archées et des bactéries.	**24**
Figure 9	Différentes applications de micro-organismes thermophiles	**31**
Figure 10	localisation de site d'étude: Hammam Essalihine- MEDEA sur la carte géographique.	**51**
Figure 11	localisation de site d'étude: Hammam Ksana -BOUIRA sur la carte géographique.	**52**
Figure 12	Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam Essalihine de MEDEA	**60**
Figure 13	Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam K'sana de BOUIRA	**63**

A : Adénine

AAF : Aeroanaérobie facultatif

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

API : Analytical Profile Index

Arg : Arginine

ARNr SSU : Acide RiboNucléique ribosomique Smale Sous Unites

AS : Aérobie Stricte

Asn : Aspargine

ATP : Adénosine Triphosphate

BN : Bouillon Nutritive

C : Cytosine

Chl : Chlorophylle

CIT : Citrate

CMC : Carboxyméthylcellulose

CoA : Coenzyme A

Cys : Cystéine

DPGc : diphosphoglycérate cyclique

FAP : Phototrophes Anoxygéniques Filamenteux

G : Guanine

GEL : Gélatine

Gln : Glutamine

IND : Indole

LDC : Lysine Décarboxylase

Lys : Lysine

Met : Methionine

MT162M : MODIFIED THERMUS 162 MEDIUM

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

ODC : Ornithine Décarboxylase

OGT : Température de croissance optimale modérée

p/v : poids par volume

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : potentiel d'hydrogène

T : Thiamine

T162M : THERMUS 162 MEDIUM

TDA : Tryptophane Désaminase

TTM : THERMUS THERMUPHILUS

Tyr : Tyrosine

U : Uracile

URE : Uréase

VP : Vogues Proskauer

Introduction

Les micro-organismes sont les formes de vie les plus abondantes et les plus diverses sur Terre **(Panda et *al.*, 2019),** se trouvent dans tous les emplacements possibles, allant de ceux qui offrent des conditions idéales de croissance et de reproduction aux environnements extrêmes **(Arya et *al.*, 2015).**

Au cours des dernières décennies, il est devenu clair que les communautés microbiennes peuvent être trouvées dans les plus divers conditions, y compris extrêmes de température, pression, salinité et pH **(Van den Burg, 2003).** Les micro-organismes qui prospèrent dans des conditions environnementales extrêmes, des déserts froids aux sources géothermiques, **(Seackbach 2000; Staley et Reysenbach 2002)** appelés extrémophiles, produisent des biocatalyseurs fonctionnels dans des conditions extrêmes (**Van den Burg, 2003)**. Ces microorganismes tombent dans un certain nombre de classes différentes tels que les thermophiles, les psychrophiles et les halophiles **(Amjad, 2011).**

Les micro-organismes thermophiles sont les plus largement étudiés et reconnu comme source de métabolites secondaires avec une grande diversité structurelle et fonctionnelle pour les applications en biotechnologies **(Selvarajan et *al.*, 2017).** Ces micro-organismes ont attiré l'attention de la communauté scientifique en raison de leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques thermostables. Les enzymes extracellulaires microbiennes avec une activités optimale à haute température offrent la possibilité d'étudier l'adaptation de la vie dans les sources thermale et le potentiel d'exploitation biotechnologique **[(Sikdar et *al.*, 2015) ; (Verma et *al.*, 2014) ; (Yadav et *al.*, 2015a)].** L'un des habitats naturels des bactéries thermophiles est la source chaude où la température de l'eau se situe entre 70 et 100°C **(Verma et *al.*, 2015).**

Les sources chaudes sont reconnues comme des environnements naturels qui conviennent à la colonisation des thermophiles. Celles-ci les environnements varient en fonction des caractéristiques géologiques et propriétés physico-chimiques, y compris les gradients de température. Outre la diversité et l'évolution, les thermophiles ont également été reconnus pour sa capacité à produire des enzymes thermostables pour les applications biotechnologiques **(Pandey et *al.*, 2015).** La majorité des enzymes industrielles actuellement utilisées sont hydrolytique en action, utilisé pour la dégradation des diverses substances naturelles **(Kirk et *al.*, 2002).**

Dans le scénario actuel de changement climatique mondial, il existe une demande colossale de processus industriels durables et enzymes des thermophiles. De manière

plausible, les thermozymes sont une boîte à outils importante, car ils sont connus pour être de nature poly-extrémophile **(kumar et a*l*., 2019).** La thermostabilité est une caractéristique de la plupart de ces enzymes disponibles pour une utilisation industrielle **(Asad et *al*., 2011).** Ces enzymes sont non seulement thermostables, mais aussi plus résistants aux produits chimiques que leurs homologues mésophiles qui les rendent extrêmement intéressant pour les procédés industriels **(Aissaoui et *al*., 2018).**

L'objectif principal de notre thème intitulé par « L'évaluation de l'activité enzymatique des souches thermophiles isolées à partir d'une source hydrothermale » est l'isolement et l'identification des bactéries thermophiles provenant des sources hydrothermales tell que les Hammams dans notre cas (hammam Elsalhin dans la région de MEDEA et hammam Ksana dans la région de BOUIRA), et la mise en évidences des activités enzymatiques de ces bactéries.

A cet égard notre mémoire est formé par deux parties :

1-Une partie bibliographique, divisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre intitulé par « Le monde extrémophiles », présente une généralité sur les extrémophiles, leurs diversités ainsi que une notion des sources hydrothermales avec les principales bactéries présentes dans ces sources.
- Le second chapitre nommé par « Les bactéries thermophiles », joindre tout ce qui concernant les microorganismes thermophiles, leurs phylogénies, leurs taxonomie leurs métabolismes, leurs écologie ainsi que leur besoins avec exposition des différentes applications des thermophiles et de leurs molécules.
- Le troisième chapitre intitulé par « Les thermozymes », rassemble les principales enzymes des thermophiles et leurs mécanismes de stabilité à des conditions extrêmes suivi de description des différentes applications des thermozymes en biotechnologie.

2- Une partie expérimentale consacré à l'adoptassions de plan suivante :

- Présentation des sites d'étude.
- Méthodes de prélèvements et échantillonnages.
- Isolement et identification des souches isolées.
- La mise en évidence des activités enzymatiques.

Après on savoir les résultats obtenus et leurs discussion, Et enfin, on termine par une conclusion générale.

Chapitre I : Le monde extrêmophile

I.1-Notion des extrêmophiles

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) **(Gomri, 2012).** Alors qu'extrême est un terme relatif, qui est considéré par rapport à ce qui est normal pour les êtres humains. Les environnement extrême comprennent haute température, pH, pression, concentration de sel et basse température, nutriment la concentration et la disponibilité de l'eau, ainsi que ayant des niveaux élevés de rayonnement, des métaux et composés toxiques (solvants organiques) **(Satyanarayana et *al*., 2005).**

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante : pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPa, température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels supérieures à 3-4 % en NaCl jusqu'à saturation (35 % en NaCl) **(Gregoire et *al*., 2009).**

De nombreux environnements extrêmes, tels que les sources acides ou chaudes, lacs salés et / ou alcalins, déserts et fonds océaniques se trouvent également dans la nature, qui sont trop dures pour la normal de la vie pour exister. Toute condition environnementale pouvant être perçu comme au-delà de la plage acceptable normale est une condition extrême **(Satyanarayana et *al*., 2005).**

Jusqu'à récemment, la plupart des environnements extrêmes ont également été pris en compte hostile à soutenir toute forme de vie, mais au cours des dernières décennies, il est devenu évident qu'ils fournissent en fait un habitat de certains micro-organismes **(Arya et *al*., 2015).** Les micro-organismes vivant dans ces habitats ont développé divers mécanismes qui leur permettent de faire face avec les changements spectaculaires dans leurs habitats **(Antranikian, 2009)**. Membres de cette groupe des micro-organismes, appelé extrémophiles, prospèrent dans des environnements dont les paramètres physiques tels que la température, la salinité, le pH ou la pression étaient auparavant considérés comme hostiles à forme de vie.

Une grande partie de ces extrémophiles appartiennent au royaume des archées, mais les bactéries et les eucaryas peuvent également tolérer certains de ces extrêmes conditions **(Albers et *al*., 2001)**. Les micro-organismes extrémophiles sont adaptés pour vivre à 100°C dans les sources volcaniques, à basse température dans les mers polaires froides, à haute pression en haute mer (au-dessus 300 bar), à des pH très bas et très élevés (pH 0–1 ou pH 10–11) ou à des concentrations de sel très élevées (10–35%). De plus, certains extrémophiles peuvent tolérer des concentrations d'évent, rayonnement et dessiccation. La majorité des organismes qui poussent dans ces environnements extrêmes appartiennent à un groupe aux caractéristiques distinctes **(Antranikian, 2009).** Les Microorganismes extrémophiles inclure des membres des trois domaines de la vie, Archaea, Bactéries et Eukarya **(Anniz et *al*., 2015).**

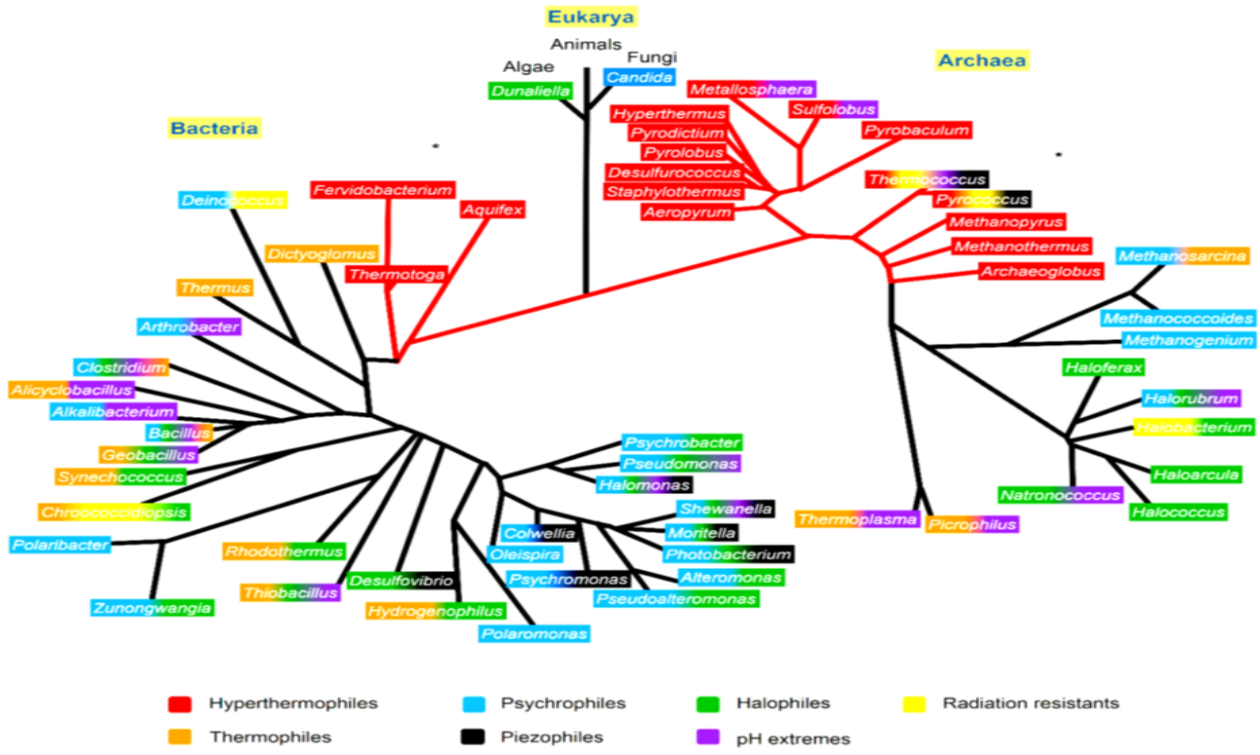


Figure 1: Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifiée par un code de couleur. L'arbre phylogénétique était basé sur les travaux de **Woese et *al*., 1990, Dereeper et *al*., 2008 et Lang et *al*., 2013.**

Les extrémophiles sont des micro-organismes uniques qui sont adaptés pour survivre dans des niches écologiques telles que des températures élevées ou basses, des pH extrêmes, concentrations de sel et haute pression **(Antranikian et *al*., 2005).** Le terme extrémophile

s'applique collectivement à une grande variété de bactéries et d'archées qui se développent de manière optimale dans des conditions «extrêmes» ou «anormales»; tel que pH acide ou alcalin, haute ou basse température, exemple extrêmes de pression atmosphérique et extrêmes de sel ou les concentrations d'ions organiques. Les extrémophiles sont les meilleurs caractérisés en fonction de leurs profils de croissance, données marginales, dans certaines cultures ou telles que la gamme NaCl (NaCl opt, NaCl min, NaCl max) ou profil de température (T opt, T min, T max). Les exemples d'extrémophiles incluent, mais ne sont pas limités aux catégories suivantes: thermophiles (haute température), psychrophiles (basse température), acidophiles (pH bas), alcaliphiles (pH élevé), piézophiles (haute pression, anciennement appelés barophiles), halophiles (concentration élevée en sel), osmophiles (concentration élevée concentration de solutés organiques), les oligotrophes (faible concentration de solutés et / ou de nutriments) et xérophiles (environnement très sec). Il est important de noter que les critères définissant un extrémophile diffèrent pour les procaryotes et les eucaryotes. En général, un eucaryote est considéré comme extrême dans des conditions beaucoup moins difficiles qu'un procaryote **(Mesbah et Wiegel, 2008).**

Tableau 1: Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements Adapté **(Horikoshi et Bull, 2011).**

Microorganismes extrêmophiles	**Environnement favorable à la croissance**
Acidophile	pH optimum de croissance < 3
Alcaliphile	pH optimum de croissance > 10
Halophile	Nécessite au moins 1M de sel pour la croissance
Hyperthermophile	Croissance optimale à des températures> 80°C
Thermophile	Croissance à des températures entre 60°C et 85°C
Eurypsychrophile (psychrotolérant)	Croissance à des températures>25°C, mais également<15°C
Stenopsychrophile (psychrophile)	Croissance à des températures entre 10°C et 20°C
Piezophile	Croissance sous haute pression—> 400 atm (40 MPa)
Endolithique	Croissance à l'intérieur des roches
Hipolithe	Croissance sur les roches et les déserts froids
Oligotrophe	Capable de croitre dans des environnements faibles en nutriments

Radiorésistant	Tolérance aux fortes concentrations de métaux lourds
Toxitolérant	Tolérance aux fortes concentrations d'agents toxiques (solvants organiques)
Xerophile	Croissance en présence d'une faible disponibilité d'eau, résistance à la dessiccation

Les extrémophiles avec ses différentes catégories, thermophiles (haute température), acidophiles (basse pH), les alcaliphiles (pH élevé), les halophiles (haute salinité) et psychrophiles (basse température) **(Tango et Islam, 2002)** ont fasciné les chercheurs dans de nombreux domaines, en raison de leur capacité à résister et à fonctionner dans des conditions extrêmes. Les micro-organismes thermophiles (température de croissance optimale de 50°C ou plus) ont attiré une grande attention chez les extrémophiles car ce sont des sources thermostables des enzymes (telles que les amylases, les cellulases, les chitinases, les pectinases, xylanases, protéases, lipases et ADN polymérases) **(Mohammad et *al*., 2017).**

Tableau 2 : Classification des extrêmophiles et exemples des applications de certaines de leurs enzymes **(Van den Burg, 2003).**

Type	**Caractéristiques de croissance**	**Enzymes**	**Applications**
Thermophiles	Hyperthermophiles T°>80°C et thermophiles T° entre 60 et 80°C	Protéases Glycosyl hydrolases Chitinases Xylanases Lipases, esterases ADN polymerases Dehydrogenases	Détergents, hydrolyse en nourriture et alimentation, brassage, faisant cuire au four Amidon, cellulose, chitine, pectine, traitement, textiles Biologie moléculaire (par exemple ACP) - Réactions d'oxydation
Psychrophiles	T°<1 5°C	-protéase -Amylase -cellulase -Dehydrogenases	-Détergents, applications de nourriture (par exemple produits laitiers -Détergents et boulangerie Détergents, alimentation et textiles Biodétecteurs
Halophiles	Haut sel, (par	-Protéases -Dehydrogenases	-Synthèse de peptide -Biocatalysis dans des médias organiques

	exemple NaCI de 2-5 M)		
Aikaliphiles	pH >9	-Proteases, cellulases	-Détergents, nourriture et alimentation
Acidophiles	pH <2-3	Amylases, glucoamylases Protéases, cellulases Oxydases	- Traitement de l'amidon - Composant d'alimentation -Désulfuration du charbon
Piezophiles	Aimant la pression jusqu'à 130 MPa	-Pour être défini	-Traitement des denrées alimentaires des produits alimentaires et production Antibiotiaue

I.2-La diversité des extrêmophiles

Il en existe différents groupes de milieux extrêmes .Tous sont répartis en fonction des paramètres physiques (pression, température…) ou chimiques (acidité, salinité …). Température, pH et salinité interagissent très fortement dans un biotope extrême. Au moins, sept principaux biotopes naturels peuvent être reconnus quand un de ces trois facteurs se trouve dans l'extrême. Les habitats extrêmes les mieux étudiés sont ceux qui sont caractérisés par une forte température, pH élevé ou faible et une forte salinité **(Larbi, 2015).**

I.2.1-Les thermophiles et les hyperthermophiles

L'existence de la vie à des températures élevées est assez fascinante. Aux deux aux extrémités de la plage de températures compatibles avec la vie, seuls les micro-organismes de croissance et de survie. Une grande variété de microbes survit et se développe à des températures élevées. Celles-ci les organismes tolèrent non seulement ces températures élevées, mais en ont généralement besoin pour leur croissance et leur survie et sont appelés thermophiles/microbes thermophiles, qui comprennent une grande variété de procaryotes (bactéries et archées) ainsi que eucaryotes. Ces organismes ont évolué plusieurs adaptations structurelles et chimiques qui leur permettent de survivre et de croître à températures élevées **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

La plupart des organismes vivant à OGT de 24 à 40°C sont mésophiles. Les organismes vivant à un OGT supérieur de 50°C à 70°C sont thermophiles et à un Les OGT de plus de 80°C sont des hyperthermophiles, y compris les membres des domaines Archaea et Eubactéries **(Trivedi et *al*., 2006).**

Les thermophiles sont la classe des organismes aptes à croître à des niveaux élevés des températures. En fonction de la plage de température de leur croissance, ils ont été largement divisés en thermophiles modérés (50–60°C), thermophiles extrêmes (60–80°C) et hyperthermophiles (> 80°C) **(kumar et *al*., 2019).** Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles vivent à des températures optimales de croissance de l'ordre de 60°C et 80°C, respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives **(Gregoire et *al*., 2009).**

Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles habitant les environnements aqueux chauds tels que les sources chaudes terrestres ont capacités uniques d'adaptation moléculaire et peut être une source de molécules bioactives **(Gomri et *al*., 2018).**

I.2.2-Les acidophiles et les alcaliphiles

Eaux souterraines alcalines, lacs de soude et port des déserts portent des micro-organismes capables de croître au-dessus de pH 9 (alcaliphiles). Certains alcaliphiles sont capables de survivre à des conditions alcalin et températures élevées, par exemple dans le lac Bogoria (Afrique) et sont appelés thermoalcaliphiles. Cependant, les bers de micro-organismes extrêmement acidophiles (acidophiles; croissance optimale de pH 0 à 4,0) se trouvent généralement dans champs solfatariques terrestres et marins. Beaucoup de microbes des communautés de ces environnements sont adaptées pour pH bas et températures élevées (par exemple pH 0–3,5 et 60–85°C) et sont désignés comme thermoacidophiles **(Antranikian, 2009).**

Les environnements où sont retrouvés les micro-organismes acidophiles ont généralement un pH<4, et sont souvent riches en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome…) et métalloïdes. La plupart de ces micro-organismes sont des chimiolithotrophes acidophiles dont le métabolisme cellulaire est basé sur l'oxydation des composés ferreux et soufrés.

Les bactéries alcaliphiles vivent à un pH≥9. Parmi celles-ci, on reconnaît les alcalitolérantes capables de se développer à pH≥9 mais avec un pH optimum de croissance proche de la neutralité et les alcaliphiles dont le pH optimum de croissance est ≥9 **(Gregoire et *al*., 2009).**

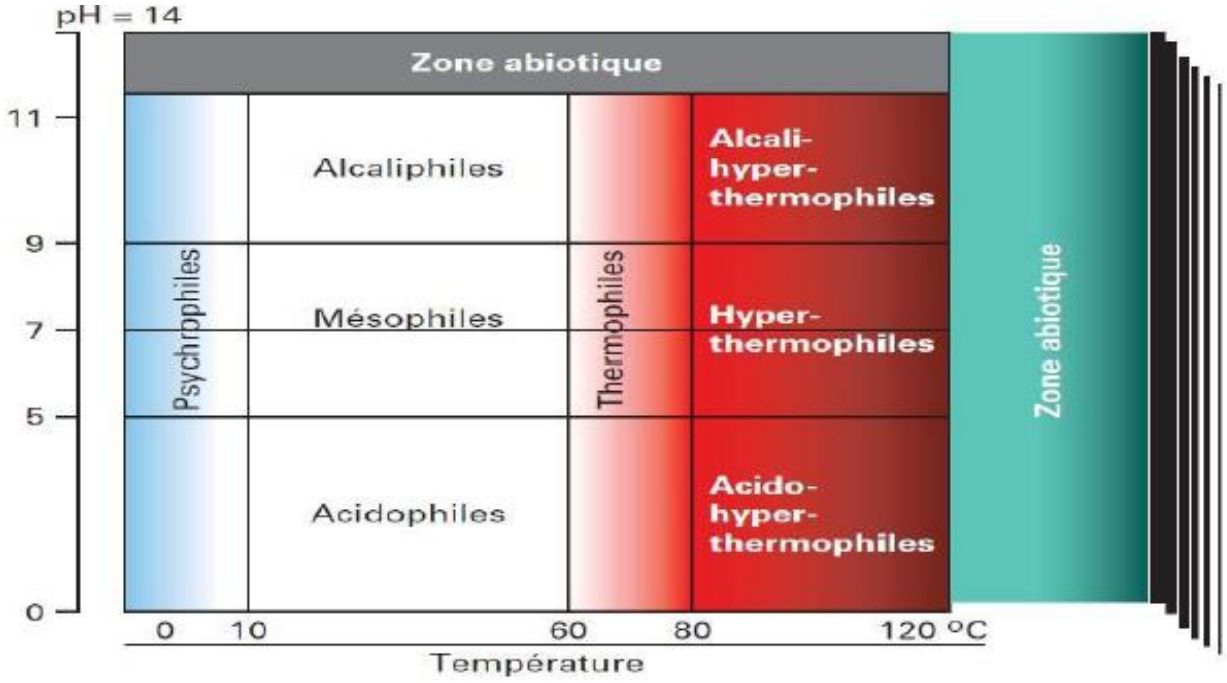


Figure 2 : Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température et du pH **(Morozkina et *al* , 2010).**

I.2.3-Les halophiles

Les bactéries halophiles sont des bactéries qui ne peuvent croître qu'en présence de sel généralement sous forme de chlorure de sodium (NaCl). Les bactéries halophiles sont classées en trois catégories : les légèrement halophiles (optimum de croissance entre 2 et 5 % de NaCl), les modérées halophiles (optimum de croissance entre 5 et 20 % de NaCl) et les halophiles extrêmes (optimum de croissance entre 20 et 30 % de NaCl). La majorité de ces microorganismes habitent le milieu marin où la concentration est voisine de 3,5 % en sel. Il existe cependant des habitats plus spécifiques et plus localisés tels que les marais salants ou les lacs salés colonisés par les micro-organismes hyperhalophiles (figure 3). Les micro-organismes halophiles appartiennent aux trois domaines du vivant (Bacteria, Archaea, Eucarya) **(Gregoire et *al*., 2009).**

Les micro-organismes halophiles colonisent les environnements salins, où la salinité peut aller de la salinité de l'eau de mer (3%) aux solutions saturées (35% par exemple mer morte, lacs et sols salins). Ces microbes peuvent également être isolés des environnements artificiels tels que les aliments salés **(Antranikian, 2009).**



Figure 3: Exemple d'un écosystème hypersalé : le lac Retba du Sénégal **(Gregoire et *al.*, 2009).**

I.3-Les sources hydrothermales

Lors de l'étude des sources hydrothermales, les scientifiques ont découvert que les phénomènes d'extension et d'accrétion des plaques tectoniques étaient à l'origine de la remontée de magma (≈1200°C) et de roches du manteau supérieur (péridotites…etc.) à quelques kilomètres de profondeur du plancher océanique. Ces processus tectoniques et le refroidissement du magma forment des anfractuosités au niveau de la croûte océanique (épaisse de 5 à 15 km) permettant l'infiltration d'eau de mer. La résurgence de ces poches magmatiques et des roches du manteau supérieur est à l'origine de formation des systèmes hydrothermaux **(Pillot, 2018).**

L'origine des sources hydrothermales profondes est une conséquence de la dérive des continents. La surface du globe est divisée en sept plaques de croûte terrestre principales rigides et en une série de plaques, plus petites, qui sont en mouvements et s'écartent les unes des autres. Ces plaques sont séparées par des dorsales divisées en de multiples segments séparés par des zones de fracture. La zone de fracture est caractérisée par une très forte activité volcanique. La coulée de lave monte en surface, se refroidit et se solidifie. Ces sites sont le siège des principales manifestations hydrothermales. L'eau de mer s'infiltre dans les fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique (ou roches profondes du manteau ou ultramaphiques) en fusion, pouvant atteindre des températures très élevées (jusqu'à 400°C)

puis, par d'autres fissures, remonte en surface. Ce fluide hydrothermal est riche en composés réduits tels que H_2S, CH^4, NH^{4+} ainsi qu'en éléments métalliques tels que Mn^{2+}, Fe^{2+}, Li^+, $Cd^{2+,}$ Cu^{2+} et Zn^{2+} **(Minic et *al.*, 2006).**

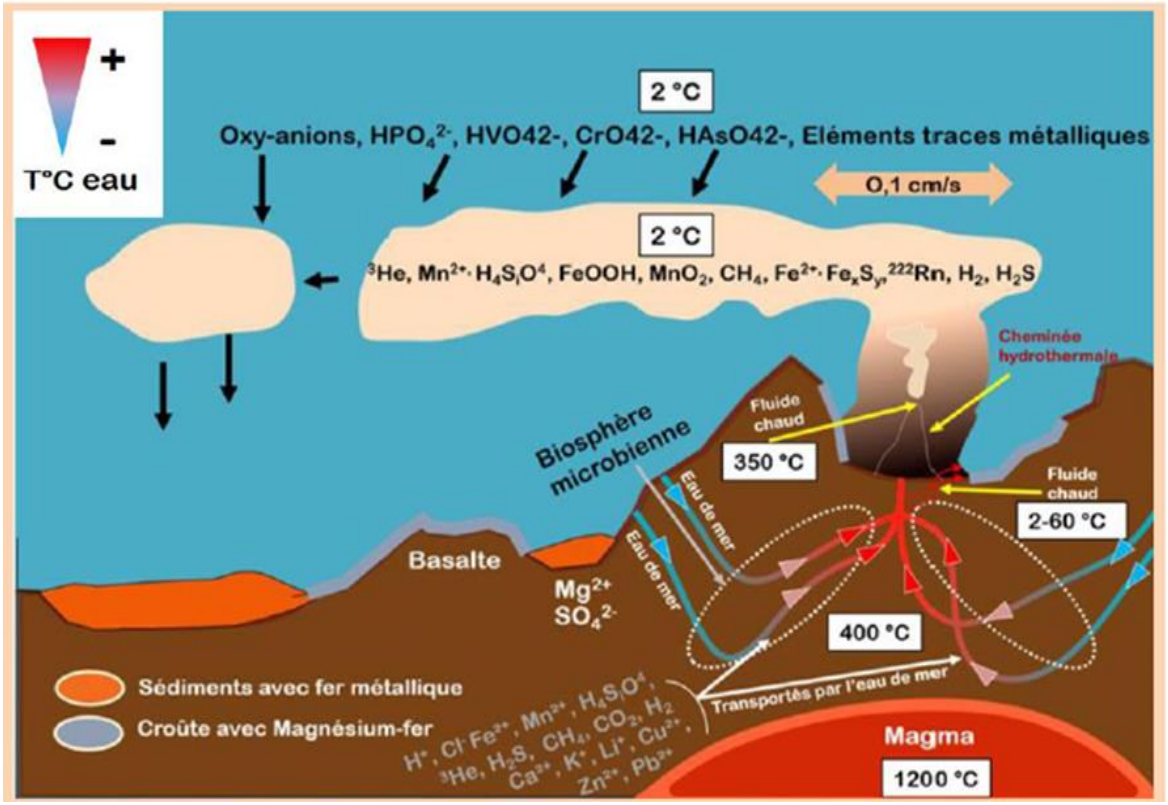


Figure 4: Schéma de formation des sources hydrothermales acides en contexte basaltique ou mixte **(Pillot, 2018).**

I.4. Les bactéries des sources hydrothermales

Autour des sources hydrothermales, la température varie selon un gradient fluctuant, où se retrouvent différentes populations de bactéries. Certaines se développent à la température normale du fond des mers à environ 2°C (bactéries psychrophiles adaptées au froid), d'autres, les mésophiles, à des températures moyennes (10–30°C), enfin, certaines souches, dites thermophiles ou hyperthermophiles, se développent aux alentours de 60°C et 100°C respectivement. La plupart des bactéries de ces écosystèmes sont des Archaea. Dans les écosystèmes des sources hydrothermales profondes, on trouve des bactéries de type sulfo-oxydantes *(Beggiatoa, Pyrodictium, Thermococcus, Pyrococcus, Thiothrix*), des bactéries sulfatoréductrices (*Archaeglobus*), des bactéries méthanogènes (*Methanococcus*) ; et quelques autres ayant des actions nitrifiantes, dénitrifiantes ou encore manganooxydantes **(Minic et *al.*, 2006).**

Chapitre II: Les bactéries thermophiles

II.1-Notion des thermophiles

En fonction de leur température de croissance optimale, les bactéries sont classées dans les quatre groupes suivants (plage de température de croissance optimale entre parenthèses): psychrophiles (5 à 20°C), mésophiles (15–45°C), thermophiles (45–80°C) et hyperthermophiles (ou thermophiles extrêmes) (80 °C) **(Vieille et Zeikus, 2001).**

Le mot «thermophile» est dérivé de deux mots grecs "thermotita" (qui signifie chaleur) et "philia" (qui signifie amour). Les thermophiles sont des organismes qui aiment la chaleur, qui tolèrent non seulement les températures élevées mais en ont généralement besoin pour leur croissance et leur survie. Un thermophile tel que défini de Brock (1978) est «un organisme capable de vivre à des températures égales ou proches de maximum pour le groupe taxonomique dont il fait partie. » **(Mehta et Satyanarayana, 2013).** Ces organisme peuvent être classés en thermophiles modérés (croissance optimale, 50–60°C), thermophiles extrêmes (croissance optimale, 60–80°C) et hyperthermophiles (optimum de croissance, 80–110°C) **(Gupta et *al*., 2014).**

Tableau 3 : Classification des micro-organismes thermophiles **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

Catégorie	T_{Opt} (°C)	Exemples
Thermophile Modéré	40 à 60 °C	*Tepidibacter , Clostridium , Exiguobacterium , Caminibacter , Lebetimonas , Hydrogenimonas , Nautilia , Desulfonauticus , Sulfurivirga , Caminicella , Vulcanibacillus , Marinotoga , Caldithrix , Sulfobacillus , Acidimicrobium , Hydrogenobacter , Thermoplasma , Mahella , Thermoanaerobacter , Desulfovibrio*
Thermophile Extrême	60 à 85 °C	*Methanocaldococcus , Thermococcus , Palaeococcus , Methanotorris , Aeropyrum , Thermovibrio , Methanothermococcus , Thermosipho , Caloranaerobacter , Thermodesulfobacterium , Thermodésulfatateur , Deferribacter , Thermosipho , Desulfurobacterium , Persephonella , Kosmotoga , Rhodothermus , Desulfurobacterium , Balnearium , Acidianus , Thermovibrio , Marinithermus , Oceanithermus , Petrotoga , Vulcanithermus , Carboxydobrachium , Thermaerobacter , Thermosul fi dibacter , Metallosphaera*
Hyperthermophile	> 85 °C	*Geogemma , Archaeoglobus , Methanopyrus , Pyrococcus , Sulfolobus , Thermoproteus , Methanothermus , Acidianus , Ignisphaera ,Ignicoccus , Geoglobus*

Les thermophiles ont été isolés de différentes zones écologiques (par exemple, des sources chaudes et mer profonde) de la terre. Les organismes les plus riches des températures de croissance (103–110 °C) appartiennent aux genres *Thermotoga* maritime et *Aquifex pyrophilus* présentent les températures de croissance les plus élevées de 90 et 95°C, respectivement **(Kumar et *al.*, 2014).** Les micro-organismes thermophiles peuvent être classés Gram positif ou Gram négatif, ils peuvent existent dans des conditions aérobies ou anaérobies, et certains elles peuvent former des spores. En raison de leur importance accrue, applications potentielles et rôles dans différents domaines scientifiques, ont concentré leurs études pour découvrir de nouveaux genres et espèces à travers le monde **(Yoneda et *al.*, 2013., Aanniz et *al.*, 2015).** Ils ont acquis une importance mondiale en raison de leur énorme potentiel de production d'enzymes thermostables qui ont de larges applications dans les secteurs pharmaceutique et industriel **(Panda et *al.*, 2013).**

Les thermophiles contiennent une variété de mécanismes qui leur permettent de survivre à des températures plus élevées aucun autre organisme ne peut prospérer **(Singh et *al.*, 2020).** En plus d'avoir des protéines membranaires thermostable, ces micro-organismes contiennent également des protéines stabilisées, ADN et ARN **(Ladenstein et Ren, 2006).** De plus, les études génomiques des thermophiles ont démontré que leurs l'évolution dépend du niveau de variation héréditaire (c.-à-d taille génomique, mutations géniques, transcriptionnelle et protéome **(Singh et *al.*, 2020).**

II.2- Phylogénie des thermophiles

Les thermophiles sont principalement représentés dans domaine procaryote des bactéries et des archées avec quelques eucaryotes capables de pousser jusqu'à 60°C. Des thermophiles sont signalés dans les genres bactériens de *Thermus, Bacillus, Clostridium, Rhodothermus* et *Thermoanaerobacter* avec les genres archéens de *Methanobacterium* et *Thermoplasma, Aquifex, Thermotoga* et *Hydrogenobacter* **(kumar et *al.*, 2019).**

II.2.1-Bactéries

Les bactéries sont omniprésentes et très diverses. Ils peuvent survivre dans toutes sortes d'environnements inhospitaliers. Les bactéries thermophiles sont des microbes qui habitent principalement des sources chaudes, vivent et survivent à des températures supérieures à 70°C. Ils ont été moins explorés en raison des difficultés d'isolement et de maintien de la culture pure (**Panda et *al.*, 2013).** Le défi majeur pour ces bactéries est la survie et la

production d'enzymes thermostables et d'autres molécules bioactives à des températures élevées **(Alrumman et *al*., 2018).**

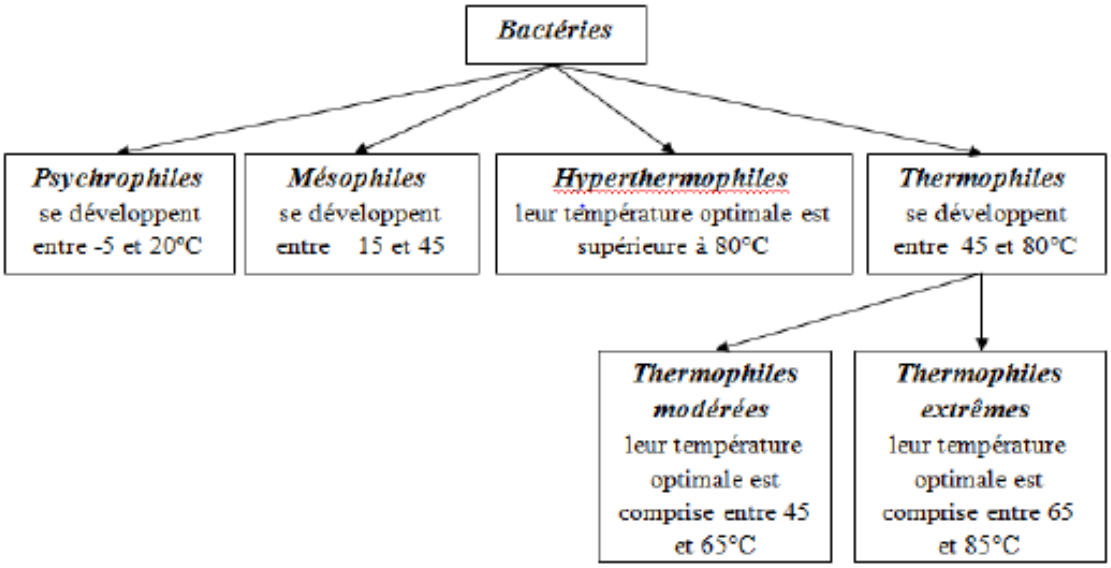


Figure 5 : Classification des bactéries, selon leurs températures optimales de croissance **(Vieille et Zeikus, 2001 ; Demirjian et *al*., 2001).**

II.2.2-Archaea

Les archées constituent un groupe de micro-organismes procaryotes qui constituent le troisième domaine phylogénétique de la vie avec le plus Bactéries et Eukarya bien connus. Quelques années seulement Jadis, on pensait que les archées se limitaient principalement à environnements extrêmes et anoxiques, mais il a récemment été établi que la biodiversité archéologique, abondante, la danse et les capacités métaboliques sont plus grand que le supposé précédemment **(Casamayor, 2009).**

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 **(GOMRI, 2012).**

II.3.3-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) **(GOMRI, 2012).**

II.4-La taxonomie et le métabolisme des thermophiles

Les thermophiles sont métaboliquement divers et incluent des phototrophes, des chimiotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes (Tableau 4). Dans les passages hydrothermiques sous-marins, les fluides hydrothermiques contiennent des gaz tels que le CO_2, et des éléments minéraux oxydo-réducteurs (H_2S, S, Fe^{2+}) 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 **(Gomri et *al*., 2018).**

Tableau 4 : Exemples de la diversité métabolique des thermophiles (Ferrera et Reysenbach, 2007).

Processus	Source d'énergie	Source de carbone	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Exemples
Photosynthèse Anoxygénique	Lumière	CO2	H2S, S, $S2O3^{2}$-	CO2	*Thermochromatium*, *Chloroflexus*
Photosynthèse Oxygénique	Lumière	CO2	H2O	CO2	Algues et cyanobactéries, *Cyanidium*, *Synechococcus*
Oxydation du Soufre	Chimique	CO2	H2S, S, $S2O3^{2-}$	O2, NO3-	*Aquificales*, certaines Epsilonproteobactéries
Oxydation du Fer	Chimique	CO2	Fe2+	NO3-	*Ferroglobus*
Réduction du Fer	Chimique	CO2	H2	Fe3+	*Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Thermotoga*
Oxydation del'hydrogène	Chimique	CO2	H2	O2, S	*Aquificales*, certaines Epsilonproteobactéries
					Aquifex, *Persephonella*, *Ammonifex*,

Dénitrification	Chimique	CO2	H2	NO3-	*Ferroglobus, Pyrobaculum, Pyrolobus*
Réduction du Soufre	Chimique	Organique /CO2	H2, [CH2O] n	S	*Thermococcales*
Réduction du Sulfate	Chimique	Organique /CO2	H2, [CH2O] n	$SO4^{2-}$	Certaines Deltaproteobactéries, *Archaeoglobus*
Méthanogénèse	Chimique	Organique /CO2	H2, [CH2O] n	CO2	Méthanogènes, *Methanocaldococcus*
Fermentation	Chimique	Organique	H2, [CH2O] n	[CH2O] n	Moisissures, bacilles, *Clostridia*, *Thermococcales*

II.4.1-Concernant la source de carbone

Outre l'aspect énergétique, les microorganismes ont besoin d'une source de carbone, d'azote, de Phosphore, de Soufre et de macro et micronutriments pour la production des différents constituants cellulaires via leur anabolisme. Concernant la source de carbone, on distingue deux mécanismes d'assimilation L'hétérotrophie et L'autotrophie **(Pillot, 2018).**

II.4.1.1-Bactéries thermophiles hétérotrophe

L'hétérotrophie est un mode de croissance où les composés à teneur réduite en carbone peuvent fournir tout le carbone biosynthèse **(Hooper et DiSpirito, 2013).** Ce mécanisme consiste à l'utilisation de carbone organique comme source de carbone. On trouve parmi ces sources organiques des carbohydrates, des acides aminés, des acides gras, des alcools…etc.

Les communautés microbiennes thermophiles des fumeurs acides sont composées de microorganismes hétérotrophes, tel que les Firmicutes, Thermales, Thermotogales, Deferribacterales, α-γ- et δ-Proteobacteria **(Pillot, 2018).**

II.4.1.2-Bactéries thermophiles autotrophes

L'autotrophie, Ce mécanisme consiste à la fixation de carbone inorganique, tel que le CO, CO2 et les ions carbonates HCO3 **(Pillot, 2018).** 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 absentes chez les archées (Figure 6). Des voies alternatives d'assimilation du CO2 existent chez ces organismes et incluent la voie du CoA, le cycle d'acide citrique réducteur, le cycle du 3-hydroxypropionate, et le cycle du 4-hydroxybutyrate **(Holden, 2009).**

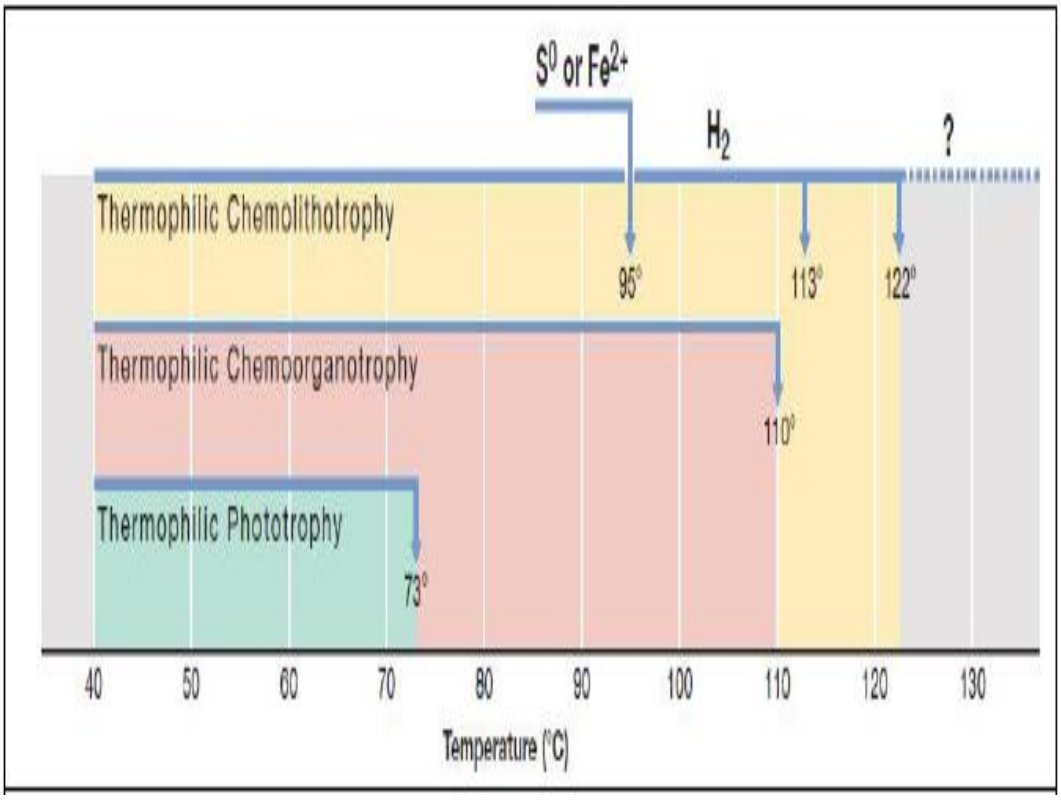


Figure 6: Limites supérieures de température pour le métabolisme énergétique. Phototrophie, Synechococcus lividus (bactéries, cyanobacteria) ; chimioorganotrophie, Pyrodictium occultum (archée) ; chimiolithotrophie avec le soufre élémentaire comme donneur d'électrons, Acidianus infernus (archée) ; chimiolithotrophie avec le fer ferrique comme donneur d'électrons, Ferroglobus placidus (archée) ; chimiolithotrophie avec l'hydrogène gazeux comme donneur d'électrons, Methanopyrus kandleri (archée, 122°C) **(Madigan et *al.*, 2010).**

II.4.2-Concernant la source d'Energie

Les microorganismes peuvent être classés selon trois types de métabolismes énergétiques différents en fonction de la source d'énergie utilisée : la phototrophie, la chimioorganotrophie et la chimiolithotrophie **(Pillot, 2018).** Mais pour les thermophiles les métabolismes les plus fréquentes sont la phototrophie et la chimiolithotrophie.

II.4.2.1-Bactéries thermophiles phototrophe

Les microorganismes phototrophes utilisent l'énergie lumineuse comme source d'énergie grâce à des pigments photosensibles (chlorophylle ou bactériochlorophylle). Ce type métabolique est absent des sources hydrothermales profondes plongées dans l'obscurité **(Pillot, 2018).** Les organismes définis comme phototrophes sont capables d'activer de manière chlorique une chlorophylle interne à un potentiel réducteur plus faible. Ces organismes nécessitent une source d'électrons externe, telle que H_2O, pour biosynthèse.

Les bactéries phototrophes peuvent utiliser des substances organiques ou réducteurs inorganiques (par exemple, H_2 ou H_2S) et sont appelés photoorganotrophes ou des photolithotrophes, respectivement **(Hooper et DiSpirito, 2013).**

Les tapis microbiens souvent observés dans les sources chaudes neutres et alcalines sont généralement formés par des bactéries phototrophes. Ces thermophiles formant des tapis comprennent des phototrophes oxygénés, à savoir les cyanobactéries qu'ils contiennent de la Chl a et phycobiline en tant que porc photosynthétique (et regardez vert foncé). Les cyanobactéries sont principalement organismes oxygénique génétiques phototrophes qui effectuent la photosynthèse avec dégagement d'oxygène, comme les plantes supérieures et les algues. Et l'autre groupe de bactéries phototrophes, appelées FAP. Les FAP contiennent des bactériochlorophyll (s) comme pigments photosynthétiques et conduire la photosynthèse sans produire d'oxygène **(Satoshi, 2003).**

II.4.2.2-Bactéries thermophiles chimiolithotrophe

Un mode de croissance bactérienne dans lequel le substrat réducteur pour la production d'énergie et pour la biosynthèse est un inorganique ou un carbone unique composé, Ces bactéries sont chimiololithotrophes. Ces micro-organismes chimiolithotrophes utilisent des composés inorganiques réduits comme source d'énergie, tel que l'H2, H2S, S0, Fe2+, Mn2+, NO2-, CH4 **(Pillot, 2018).**

La chimiolithotrophie contraste avec l'organootrophie ou phototrophie dans laquelle la génération d'énergie se produit par l'oxydation de molécules organiques complexes ou absorption de lumière, respectivement **(Hooper et DiSpirito, 2013).**

II.5-Les biotopes écologiques des thermophiles

Les environnements thermophiles se caractérisent par une température élevée et la diversité des habitudes telles que les bassins océaniques profonds, sources marines chaudes

peu profondes, réservoirs de pétrole et eaux profondes évents hydrothermaux (**Adiguzel et *al*., 2009).** Les sources chaudes sont parmi les endroits les plus chauds du monde, et ces régions sont les principaux habitats des bactéries thermophiles **(Sen et *al*., 2010),** La caractéristique attrayante ces sources est l'organisation complète de l'écosystème et la diversité des micro-organismes **(Gomri et *al*., 2018)** et la stabilité moléculaire des composants biochimiques **(Genc et *al*., 2015).** Les températures sont souvent supérieures à 40°C. Dans ces conditions de vie les organismes doivent faire face à des températures extrêmes, l'humidité et la faible disponibilité des composés nutritionnels **(Mohammad et *al*., 2017).**

II.5.1-Biotopes naturels

Des biotopes naturels pour la présence de micro-organismes thermophiles sont distribués à l'échelle mondiale **(Mehta et Satyanarayana, 2013**). Ces sources naturelles comprennent les plans d'eau chaude, les évents hydrothermaux (haute température), les zones à basse température dans les régions arctiques, les océans, les sédiments origine marine **(Mazzoli et *al*., 2017).**

La plupart des extrêmes actuellement connus thermophiles et hyperthermophiles ont été récupérés dans ces régions par approches dépendantes de la culture et indépendantes de la culture. Géothermie et volcaniques comprennent les fumerolles terrestres (par exemple, les solfataras), les sources chaudes terrestres et geysers. Parmi les autres biotopes naturels, citons le pétrole et le pétrole chauffés par géothermie revoir et sols / sédiments chauffés par le soleil **(Mehta et Satyanarayana, 2013)**. Celles-ci les environnements varient en fonction des caractéristiques géologiques et propriétés physico-chimiques, y compris les gradients de température **(Pandey et *al*., 2015).**

La diversité des thermophiles dans ces sites a été attribuée à plusieurs facteurs tels que la température, pH et niveaux de sulfure d'hydrogène dissous **(Purcell et *al*., 2007),** la biogéographie **(Whitaker et *al*., 2003; Valverde et *al*., 2012)** et l'histoire géologique **(Takacs-Vesbach et *al*., 2008).**

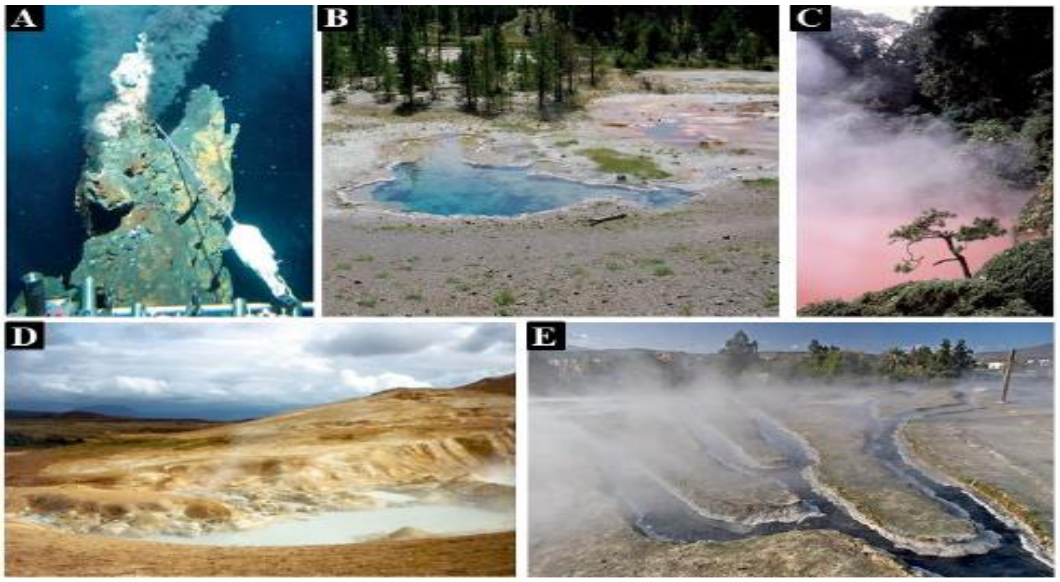


Figure 7 : Exemples de biotopes naturels des thermophiles. A. Cheminée d'un passage hydrothermique sousmarin du Pacifique ; B. Octopus Spring, parc national de Yellowstone, Etats-Unis ; C. Sources chaudes, Beppu, Kyushu, Chine ; D. Sources chaudes, Krafla, N´amaskard, Islande ; E. Source chaude, Meskhoutine, Guelma, Algérie **[A-B (Ferrera et Reysenbach, 2007) ; C-D (Calteau, 2005) ; E (GOMRI, 2012)].**

II.5.1.1-Biotopes marins

Les systèmes hydrothermaux marins sont situés dans des profondeurs peu profondes et abyssales et se composent de fumerolles, sources et évents en eau profonde " fumeurs noirs " avec des températures jusqu'à 400°C. En raison de la présence de gaz réducteurs, la plupart des biotopes de thermophiles ne contiennent de l'oxygène et sont anaérobies. La plupart de ces micro-organismes appartiennent à Archaea et sont capables de se développer à des point d'ébullition de l'eau, la limite de température supérieure à vie semble être entre 110°C et 130°C **(Antranikian, 2009).**

II.5.1.2- Biotopes terrestres

Les habitats thermiques tels que les sources terrestres ou côtières sont caractérisés par des températures comprises entre 50 et 90°C, larges gamme de pH et de concentrations variables de sulfate, bicarbonate, sodium ou chlorure **(Canganella et Wiegel, 2011).** De plus, ces habitats présentent de multiples micro niches, qui peut potentiellement être habité par des divers micro-organismes **(Singh et *al.*, 2016; Urbieta et *al.*, 2015).** Une source chaude est une source produite par l'émergence de chaleur géothermique des eaux souterraines de la croûte terrestre. Les systèmes géothermiques sont présents dans de paramètres logiques et pas

nécessairement liés au volcanisme. L'eau provenant d'une source chaude est soit chauffée par la chaleur géothermique, c'est-à-dire la chaleur de l'intérieur de la Terre, dans une zone non volcanique, ou en entrant en contact avec du magma (roche en fusion) **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

Les sources géothermiques naturelles, y compris les sources chaudes terrestres, sont largement réparties dans diverses régions de notre planète et offrent une nouvelle source de micro-organismes fascinants aux propriétés uniques **(Hreggvidsson et *al.*, 2012; Deepika et Satyanarayana, 2013; Saxena et *al.*, 2017).**

II.5.2- Biotopes artificiels

Les habitats thermophiles artificiels comprennent le drainage minier acide et les fluides acides, tas de compost auto-chauffés, déchets biologiques et usines de traitement des déchets (Les déchets sont des déchets qui ont été éliminés de manière incorrecte, en particulier les déchets qui ont été négligemment éliminés à la vue). Ceux-ci sont des habitats à température relativement plus basse que les habitats naturels, et sont idéales pour l'isolement des thermophiles modérés et extrêmes **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

Une vaste gamme de thermophiles a été isolée de différents déchets anthropiques et usines de traitement. Des micro-organismes ont été décrits dans diverses eaux sources, telles que les eaux usées des installations industrielles, les fluides d'usine et les eaux usées usines de traitement **(Singh et *al.*, 2020).**

II.6-Les bases physiologiques des thermophiles

De nombreuses Bactéria et Archaea thermophiles et hyperthermophiles vivent au contact et même à l'intérieur des cheminées des sources hydrothermales profondes à des températures pouvant excéder 100°C. L'adaptation de ces micro-organismes implique de nombreuses modifications de leurs composants qui doivent résister et fonctionner à ces températures. Cette adaptation moléculaire a été examinée au niveau des protéines et enzymes, ainsi qu'à celui des membranes et des acides nucléiques **(Robinson-Rechavi et *al.*, 2006 ; Kumar et *al.*, 2000).**

La structure et les activités cellulaires sont affectées par divers facteurs, dont la température. Pour que tout microbe croisse à haute température, ses principaux composants, y compris protéines acides nucléiques et lipides, doivent pouvoir résister à la chaleur. Par

conséquent, les thermophiles ont accumulé diverses adaptations qui leur permettent de prévaloir et de prospérer à haute températures **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

II.6-1-les lipides

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 chaines d'acides gras et du rapport de ramification iso/antéiso. Une composition plus élevée en acides gras saturés a comme conséquence une hydrophobicité plus forte contribuant à la stabilité des membranes aux températures élevées **(GOMRI, 2012).**

En revanche, les lipides archéens sont constitués de deux chaînes de phytanyles qui sont liés par une liaison éther au glycérol ou à d'autres alcools comme le nonitol. Ces lipides diéther en C 20 forment également une bicouche membranaire, tout comme leurs homologues bactériens et eucaryales faire. Dans certaines archées extrémophiles, les lipides éthérés peuvent être trouvés dans lequel les chaînes de phytanyle sont fusionnées ensemble à un Noyau C 40. Ces lipides sont appelés lipides tétraéther. Elles forment une monocouche dans laquelle les lipides tétraéther couvrent l'ensemble membrane **(Albers et *al*., 2001).**

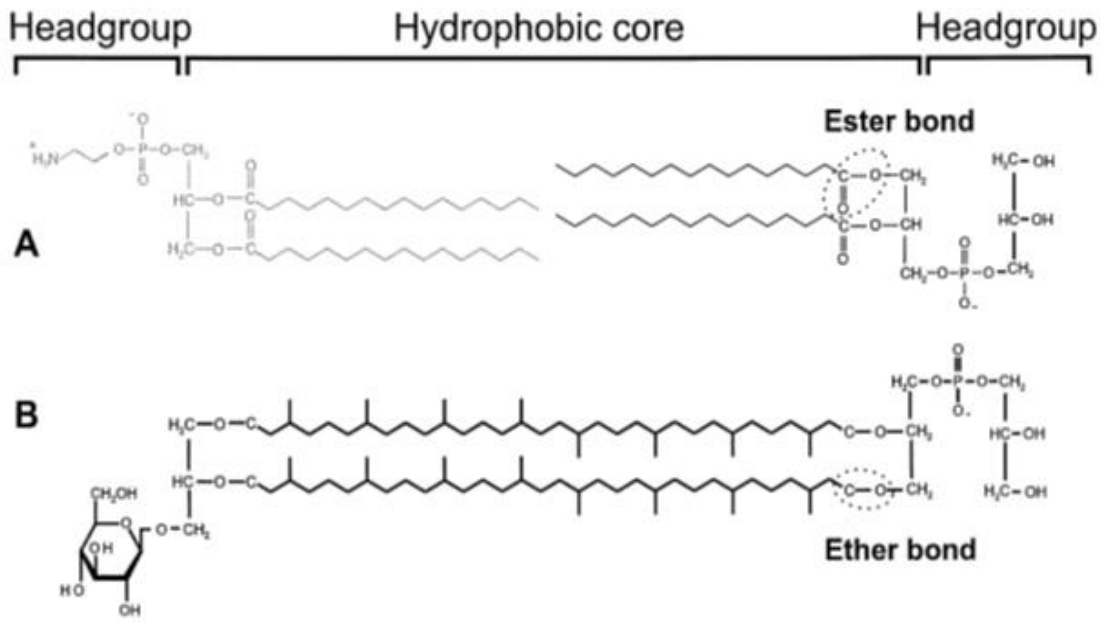


Figure 8 : Lipides des archées et des bactéries. **A :** Un lipide formant une bicouche dans bactéries: Phosphatidylaéthanolamine (PE). La chaîne acyle est droite (pas dans tous les cas: chaîne acyle au glycérol est via une liaison ester. **B :** Lipides formant une monocouche en

thermoacidophiles archaea: principal glycophospholipide (MPL) de Thermoplasma acidophilum. La chaîne phytanyl contient des branches de type isoprénoïde. Le con- La connexion de la chaîne phytanyle avec le groupe de tête se fait par une liaison éther. Les membranes archéennes contiennent également des lipides diéther formant des bicouches. Certains les tétraéthers acidophiles contiennent des cycles cyclopentane. **(Albers et *al.*, 2001).**

II.6-2-les acides nucléiques

La super enroulement positif de l'ADN peut être un facteur important de stabilisation de l'ADN à hautes températures. De plus, les sels monovalents et divalents améliorent la stabilité des acides nucléiques car ces sels criblent les charges négatives du phosphore des groupes de phosphates et parce que KCl et $MgCl_2$ protègent l'ADN de la dépurination et l'hydrolyse **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

Les thermophiles accumulent de larges quantités d'osmolytes variés qui contribuent à la stabilisation de l'ADN en augmentant sa température de fusion. 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-DPGc **(GOMRI, 2012).**

La paire d'acides nucléiques G – C est plus thermostable que les paires A – T ou A – U en raison de la liaison hydrogène supplémentaire**.** Mais des rapports élevés de G et C ne se trouvent pas dans les génomes de procaryotes thermophiles, bien que la thermostabilité ait été corrélée à une augmentation dans les paires G – C de leur ARNr SSU et ARN de transfert **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

Plusieurs facteurs peuvent se combiner pour conférer une stabilité thermique à l'ADN des thermophiles y compris des niveaux élevés de K +, ADN gyrase inverse, et l'histone ou toute autre protéine **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

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 (Tableau 5). Un contenu accru en G+C des ARN de transfert et des ARN ribosomiques pourraient stabiliser les conformations actives **(GOMRI, 2012).**

Tableau 5 : Principaux facteurs responsables de la thermostabilité des acides nucléiques (ADN et ARN) (Charlier et Droogmans, 2005).

ADN	ARN (ARNt, ARNr)
- cyclisation - superenroulement - association protéines-nucléotides - gyrase reverse - concentrations élevées en sel - polyamines linéaires - systèmes uniques de réparation - copies multiples du génome	- contenu accru en G+C - polyamines ramifiés - affinité accrue des protéines ribosomales -méthylation des bases - modifications post-transcriptionnelles accrues

II.6-3-les protéines

Les thermophiles subissent des effets déstabilisateurs constants des températures élevées. Pour conseiller effet néfaste de la température sur les protéines, les thermophiles adoptent des stratégies caractérise différent des mésophiles.

Certaines des stratégies sont le remplacement d'Arg par Tyr, présence d'ions sulfates **(Trivedi et *al*., 2006),** le type d'ions métalliques en tant que cofacteurs, la mines, chaperons, substrat, flexibilité et ou rigidité des protéines **(Vieille et *al*., 2001),** mobilité des protéines **(Panasik et *al*., 2000)** et pression due à l'habitat des grands fonds. A côté de cela, taille de protéine plus petite et un rapport de compacité plus élevé peut également influencer la stabilité des protéines **(Trivedi et *al*., 2006).** Cependant, certains rapports suggèrent que le rapport de compacité des protéines chez les thermophiles et les mésophiles n'est pas très différents **(Kumar et *al*., 2000).** Il apparaît que ces stratégies sont importantes mais pas universellement adopté par les procaryotes thermophiles.

Les études structurales de plusieurs protéines thermostables ont montré que certaines caractéristiques sont fortement corrélées à la thermostabilité **(Mehta et Satyanarayana, 2013**). Un noyau hydrophobe permet d'exclure le solvant de l'intérieure région de la protéine, ce qui la rend plus résistante au déploiement. Une augmentation significative dans la proportion de codons NTN qui code pour les acides aminés hydrophobes non polaires acides (isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine et valine) se sont avérés être en corrélation

avec l'augmentation de la température de croissance optimale pour la plupart des bactéries et archées. Cela indique l'utilisation de l'hydrophobie pour stabiliser les protéines à haute températures **(Lieph et *al*., 2006).**

Une teneur plus élevée en arginine et une réduction du nombre total de matières thermiquement instables résidus chimiques, tels que Cys, Lys, Met, Asn et Gln a été rapporté pour les protéines thermostables. La stabilité des protéines peut également être mulation de potassium intracellulaire et de solutés tels que le 2,3-diphosphoglycérate **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

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 **(GOMRI, 2012).**

En plus de ces facteurs, certaines protéines auxiliaires, comme le chaperon moléculaire, facilitent également la thermostabilité des protéines. Chaperonines (protéines de choc thermique) fonction de repliement des protéines partiellement dénaturées. Les archées hyperthermophiles produisent des classes spéciales de chaperonines qui fonctionnent uniquement aux températures de croissance les plus élevées **(Mehta et Satyanarayana, 2013).**

II.7-Les besoins nutritifs des Bactéries thermophiles

Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles sont différents à ceux des bactéries mésophiles. En effet plusieurs auteurs ont noté un besoin particulier de vitamines tel que la vitamine B1 (thiamine) et B2 (riboflavine), d'acides aminées tels l'histidine et la méthionine et aussi de calcium et de magnésium pour stimuler ou permettre la croissance des bactéries **(Larbi, 2015).**

L'identification de facteurs physiologiques et environnementaux qui peuvent limiter une croissance appropriée des bactéries thermophiles est importante pour le développement d'applications industrielles (par exemple les enzymes, les métabolites) à partir de ces microorganismes. En effet plusieurs réactions secondaires peuvent survenir à des températures élevées. C'est le cas de la formation accélérée des produits de la réaction de brunissement de Maillard à de telles températures. La réaction de Maillard est la réaction entre des sucres réducteurs (par exemple le glucose) est des composés amino (par exemple les acides aminés) **(Hupé, 2008)** et comme résultats la croissance d'*Aeropyrum pernix* est inhibée par les composés formé entre les sucres réducteurs et la tryptone, il est possible que la

croissance cellulaire est inhibée par la perte de nutriments disponibles capacité due à la décomposition thermique des composants labiles **(Kim et Lee, 2003).** Une étude récente a montré qu'une incubation prolongée du L- glutamate dans des conditions de culture avec *S. solfataricus* a entraîné la conversion du L- glutamate en L -pyroglutamate et que le L-pyroglutamate a agi comme un puissant inhibiteur de croissance de S. solfataricus (**Park et *al*., 2001).** Ces données supportent l'idée que la formation chimique des milieux de culture à des températures élevées soit un facteur déterminant pour la croissance efficace des thermophiles **(Larbi, 2015).**

II.8-Application des thermophiles

Les bactéries thermophiles sont des microbes qui habiter des sources chaudes, vivre et survivre à des températures supérieures 70°C. En raison de la croissance à des températures élevées et des propriétés macromoléculaires uniques, les thermophiles peuvent posséder un métabolisme élevé, physiquement et chimiquement des enzymes stables et croissance plus faible mais produit final plus élevé et rendements que les espèces mésophiles similaires (Tableaux 6, 7) **(Haki et Rakshit 2003)**.

Tableau 6 : Enzymes thermophiles et leurs rôles potentiels (Mehta et *al.*, 2016).

Microorganismes	Enzymes	Température d'activité	Applications	Références
Pyrococcus woesei	Alpha amylases	Topt. = 100 °C	Industrie sucrière et amidon En traitement	Alqueres et *al.*, (2007).
Thermococcus profundus DT5432	alpha-amylases	Topt. = 80 °C	Industrie sucrière et amidon En traitement	Eichler (2001), Antranikian et *al.*, (2005).
Staphylothermus marines	Pullulanases	Topt. = 90–105 °C	Industrie sucrière et amidon En traitement	Eichler (2001), Antranikian et *al.*, (2005).
Thermoplasma Acidophilum	Glucoamylases	Topt. = 90 °C	Industrie sucrière et amidon En traitement	Eichler (2001), Antranikian et *al.*, (2005).
Pyrococcus woesei	b-galactosidases	Topt. = 93 °C	Production de lait à faible teneur en lactose	Dabrowski et *al.*, (1998).
Pyrococcus furiosus Sulfolobales sp.	Cellulases	Topt. = 103 °C	Production d'alcool, industrie de fruits	Antranikian et *al.*, (2005).
Pyrodictium abyssi	Xylanases	Topt=100 110 °C	Industrie du papier – blanchiment de la pâte	Egorova et Antranikian (2005), Eichler (2001).
Humicola lanuginosa souche Y-38 *Myceliophthora thermophila*	Lipases Laccases	Topt. = 65 ° C Topt. = 60 ° C	Les détergents à lessive Polymérisation du phénolique composés aux substances humiques	Arima et *al.*, (1972) Chefetz et *al.*, (1998).
Myceliophthora Thermophila *Penicillium duponti*	Phytases glucose-6-phosphate déshydrogénase	Topt. = 42–45 ° C Topt. = 50 °C	L'alimentation animale Génération de NADPH pour réactions biosynthétiques	Wyss et *al.*, (1999) Broad and Shepherd (1970).
Bacillus lichniformis	Alcalase	Topt. = 60 °C	Composant de soft enrichi en protéines boissons et aliments diététiques, aide dans la récupération des protéines de viande, poisson et crustacés déchets de coquille	Synowiecki (2008).

Tableau 7 : Brevets récents sur les thermophiles et leurs applications potentielles (Mehta et *al*., 2016).

	Sujet	Numéro et date du brevet	Application	Application
1	Bioconversion en une seule étape de biomasse lignocellulosique à biocarburants utilisant extrême bactéries thermophiles	US2014 /0363869 A1 décembre 11, 2014	Bioconversion de lignocellulosique de la biomasse aux biocarburants	Curvers et al. (2014)
2	Bactérie thermophile et utilisations des protéines extracellulaires à partir de là	US 8828238 B2 9 septembre 2014	Excellente capacité de liaison aux ions métalliques	Han et al. (2014)
3	Fermentation modérément Bacilles thermophiles sur saccharose	US 8, 663,954 B2 4 mars 2014	Modification génétique de modérément souche thermophile de Bacillus utiliser le saccharose comme source de carbone	Van Kranenburg et al. (2014)
4	Biorestauration de persistant polluants organiques utilisant bactéries thermophiles	US 2014/0042087 A1 février 13, 2014	Dégradation des polluants organiques	O'Driscoll et al. (2014
5	Bactéries productrices de phytase, et méthode de production de phytase	US 6, 180,390 B1 30 janvier 2001	Rôle dans l'alimentation animale, environnement protection, nutrition humaine et applications sanitaires et industrielles	Chu et al. (2001)
6	Procédé de production de modifications Des micro-organismes pour l'huile, traitement à haute température, pressions et salinité	US 5492828A 20 février 1996	Utilisé dans l'huile améliorée récupération microbienne	Eugene et al. (1996)

Les micro-organismes thermophiles sont d'intérêt particulier en tant que source de nouvelles enzymes thermostables et de nombreux de ces micro-organismes thermophiles possèdent des propriétés pour une utilisation biotechnologique et commerciale.

Les thermophiles ont montré une énorme promesse en termes de leurs applications en biotechnologie moderne. Certains des applications haut de gamme de ces thermophiles ont été élucidée ci - dessous (Figure 9) **(Mehta et al., 2016).**

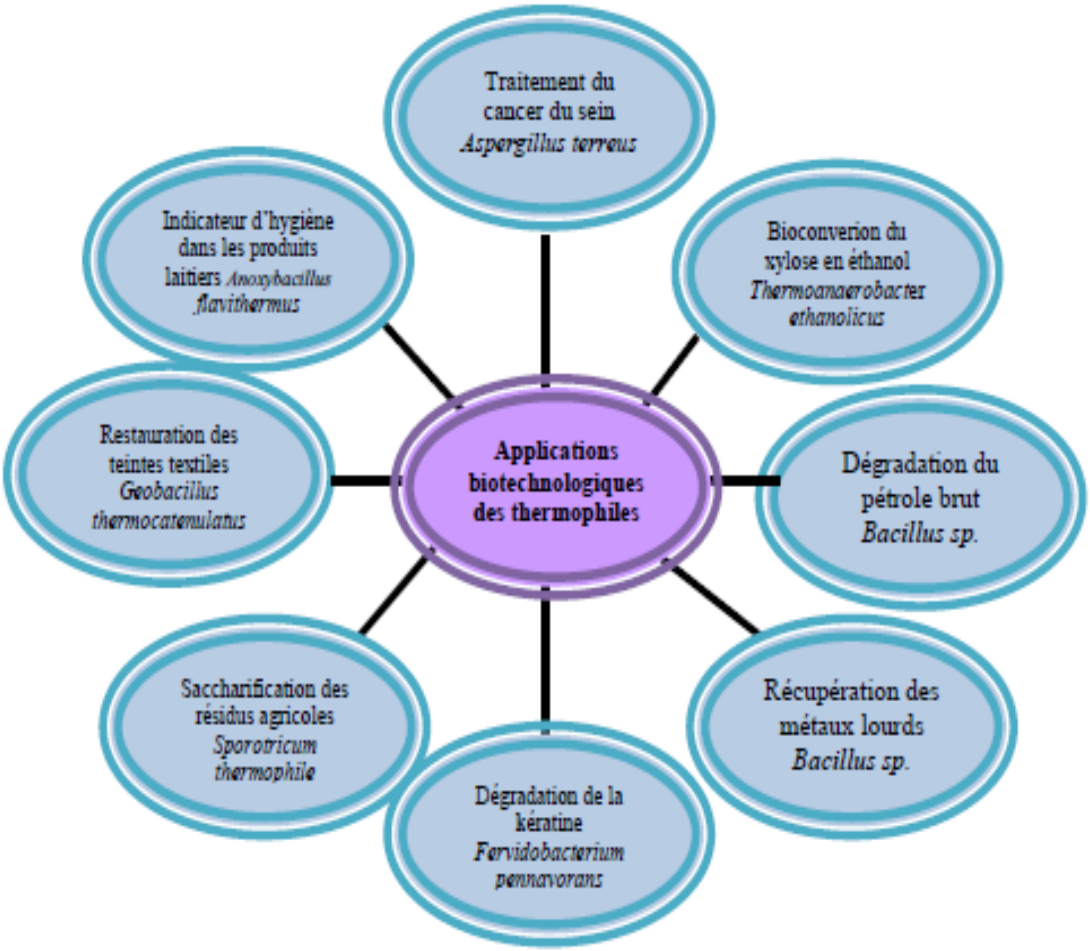


Figure 9 : Différentes applications de micro-organismes thermophiles (Mehta et *al.*, 2016).

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 **(GOMRI, 2012).** Les avantages d'utilisation des micro-organismes thermophiles dans ces applications biotechnologiques sont répertoriés dans le tableau 8 **(Urbietaet al., 2014).**

Tableau 8 : Avantages de l'utilisation des thermophiles dans les applications biotechnologiques (Urbietaet al., 2014).

Avantages de l'utilisation des thermophiles dans les applications biotechnologiques.
- Une activité métabolique élevée entraîne une augmentation des taux de formation de produits - Inactivation ou élimination de microorganismes mésophiles contaminants / pathogènes - Production de macromolécules et métabolites thermostables - Les réactions métaboliques se produisent à la même température élevée que les substrats solubilisent - Aucune étape de refroidissement requise après les étapes de chauffage - Augmentation des taux de diffusion, ionisation et solubilité des produits chimiques - Une densité, une tension de surface et une viscosité plus faibles des solutions améliorent les vitesses de réaction - Récupération directe des produits volatils - Une faible formation de masse bactérienne donne des rapports plus élevés de produit - souhaité sur substrat assimilé et diminution de la production de déchets - Enzymes thermostables express

II.9-Quelques travaux d'isolement des bactéries thermophiles

II.9.1-En Algérie

Les environnements chauds terrestres sont des ressources importantes pour l'isolement des micro-organismes thermophiles. Peu d'études ont été faites sur la diversité microbienne des sites géothermiques algériens. L'Algérie contient de nombreux environnements extrêmes non étudiés. Par exemple, plus de 240 sources géothermiques ont été enregistrées dans le nord de l'Algérie mais les données sur leur biodiversité sont très limitées. Ces sources pourraient être considérées comme naturellement bien protégées, renouvelables et des ressources quasi-infinies **(Fekraoui et Kedaid, 2005 ; Amarouche-Yala et *al.*, 2014),** mais peuvent, en revanche, être particulièrement vulnérables aux contaminations microbienne due aux activités humaines et à leur biodiversité pourrait être considérablement affectée **(Gomri et *al.*, 2018).** Ces sources chaudes sont utilisées pour des fins thérapeutiques depuis l'Antiquité. Ils ont été bien caractérisé en termes de leurs caractéristiques géologiques et géochimiques **(Kedaid, 2007; Saibi, 2009),** propriétés sur l'hydrogéologie, et composition physico-chimique **(Arab et**

***al*., 2018).** Cependant, peu d'études ont abordé l'analyse microbienne de ces sources chaudes **(Amarouche-Yala et *al*., 2015; Bouanane-Darenfed et *al*., 2011; Kecha et *al*., 2007).**

Ces sources géothermiques d'Algérie ont été connues depuis l'Empire romain. Ils se situent principalement dans **L'Algérie orientale** et sont habitées par des organismes thermophiles. Une étude a été réalisés dans ces sources comprennent les cyanobactéries formant des tapis et des concrétions, les isolats ont été collectés à partir d'eau, de concrétions et de nattes dans neuf sources chaudes avec des températures de l'eau allant de 39 à 93°C. Dix-neuf morphotypes cyanobactériens différents ont été identifiés, dont les plus abondantes étaient trois espèces de *Leptolyngbya*, accompagné de membres des *genres Gloeocapsa, Gloeocapsopsis, Stigonema, Fischerella, Synechocystis, Microcoleus, Cyanobacterium, Chroococcus et Geitlerinema.* Les analyses de diversité moléculaire étaient en bon accord général avec l'identification classique et a permis la détection d'espèces supplémentaires dans trois sources avec des températures supérieures à 50°C. Ils correspondaient à un clade de *Synechococcus* et à des parents de l'intracellulaire calcifiant *Candidatus Gloeomargarita lithophora***.** Les sources les plus chaudes étaient dominées par des membres *de Leptolyngbya, cyanobactéries* de type *Synechococcus et Gloeomargarita*, tandis que les *Oscillatoriales* autres que *Leptolyngbya, Les Chroococcales* et l*es Stigonematales* dominaient les températures inférieures **(Amarouche-Yala et *al*., 2014).**

Une autre étude visait à la production et la caractérisation partielle d'un xylanase thermostable d'une nouvelle bactérie anaérobie thermophile *Caldicoprobacter algeriensis* souche TH7C1 T isolée d'une source chaude de Hammam D'bagh (Guelma) (70°C) située au nord-est de l'Algérie **(Bouacem et *al*., 2014).** Une autre bactérie anaérobie thermophile a été isolée de cette source hydrothermale qui la source le plus chaud de pays, avec des températures pouvant atteindre 98°C. Cette bactéries appartient aux *Firmicutes*, commande les *Clostridiales* et présente traits phénotypiques, génétiques et phylogénétiques importants avec son plus proche parent *Caldicoprobacter oshimai* famille des *Caldicoprobacteraceae* à proposer comme roman espèces de ce genre, les échantillons de cette étude ont été prélevés à une altitude de 320 m dans la zone aquifère était proche de la surface **(Bouanane-Darenfed et *al*., 2011).** Dans la même source chaude de Debagh, une étude rapporte la première tentative de décrire les communautés de bacilles aérobies. Parmi lesquels 41 bacilles aérobies, thermophiles et halotolérants ont été isolés et sélectionnés sur la base de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques. L'analyse de la séquence d'ADNr 16S a révélé que le les isolats récupérés appartenaient à quatre genres bactériens dominés par le

genre Bacillus représenté avec les espèces *B. mojavensis*, B. *licheniformis*, *B. subtilis*, B. *atrophaeus*, *B.amyloliquifaciens* et *B.pimulus*. Le genre *Aeribacillus* représenté par l'espèce *A. pallidus***,** le genre *Geobacillus* représenté par l'espèce *G. toebii*, et le genre *Hydrogenophilus* représenté par l'espèce *H. hirschii*. Bien que l'analyse MALDI-TOF ait déterminé que les isolats appartenaient au genre Bacillus qui contenait *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus* et *B. pumilus* **(Arab et *al.*, 2018).**

Des échantillons d'eau et de sédiments prélevés à Hammam Ouled Ali et Hammam Debagh, deux sources chaudes, plage de températures et une composition minérale très riche, situées dans la région de Guelma, au nord-est de l'Algérie**,** les isolats de l'eau et des sédiments ont été caractérisés par des méthodes phénotypiques et moléculaires ont indiqué que trois familles dominaient les deux sources chaudes: *Planococcaceae*, *Bacillaceae* et *Paenibacillaceae*, une analyse basée sur les séquences d'ARNr 16S a révélé que ces souches étaient affiliées aux genres *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* et *Geobacillus* répartis entre les deux zones chaudes ressorts **(Gomri et *al.*, 2018).**

II.9.2-Dans d'autre pays

Des souches bactériennes thermophiles ont été isolées avec succès de différentes sources chaudes en Arabie Saoudite, ont été obtenues à partir de trois sources chaudes: Al-Majardah, Al-Khubah et Al-Ardah. Ces sources chaudes ont une plage de température de 50 à 70°C, et ont donc une grande chance de soutenir la survie des bactéries thermophiles **(Rehman et Shash, 2011).**

L'identification moléculaire et l'analyse phylogénique des isolats prometteurs sélectionnés a confirmé l'identité des isolats comme *Bacillus aerius*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus sonorensis*, qui ont le potentiel de produire les enzymes cibles α-amylase, protéase et lipase, respectivement **(Alrumman et *al.*, 2018).**

Des sources chaudes jordaniennes étaient situées dans différentes villes et représentent un thermophile modéré à thermophile (39,9–6°C), y compris Hammamat Ma'in, Zara Dead Sea, Hammamat Afra, Al-Burbita et Al-Hemma**,** ont été choisie pour collecter l'échantillon pour l'isolement des bactéries thermophiles. Le séquençage du L'ADNr 16S des isolats suivi d'une recherche BLAST a révélé que neuf souches pouvaient être identifiées comme *Bacillus licheniformis* et une isoler sous le nom de *Thermomonas hydrothermalis*. Il s'agit du premier rapport sur l'isolement des espèces de *Thermomonas* des sources chaudes jordaniennes **(Mohammad et *al.*, 2017).**

Prenant un autre exemple au Maroc dont la diversité des bactéries thermophiles a été étudié dans quatre sources chaudes : Ain Allah (45°C), Abaynou (39°C), Moulay Yaacoub (57°C) et Ain Jerri (39°C). Deux cent quarante (240) bactéries thermophiles ont été récupérées, identifiées et caractérisé. Tous les isolats étaient Gram positifs, en forme de bâtonnet, formant des spores et halotolérants. En se basant sur BOXA1R-PCR et le séquençage du gène de l'ARNr 16S, les isolats récupérés étaient dominés par le genre Bacillus (97,5%) représenté par *B. licheniformis*, *B. aerius*, *B. sonorensis*, *B. subtilis (subsp. Spizizenii et subsp. Inaquosurum*), *B. amyloliquefaciens* (*subsp. Amyloliquefaciens* et *subsp. plantarum*), *B. tequilensis*, *B. pumilus* et *Bacillus sp*. Seuls six isolats appartenaient au genre *Aeribacillus* représenté par *A. pallidus* et *Aeribacillus sp*. Dans cette étude, *B. aerius* et *B. tequilensis* sont décrits pour la première fois comme bactéries thermophiles **(Aanniz et *al*., 2015).**

Des souches bactériennes thermophiles distinctes ont été isolées de la source chaude de Soldhar dans la région de Garhwal, en Inde Himalaya, des échantillons d'eau et de sol ont été prélevés, les isolats ont grandi au cours d'une large gamme de températures (20–100°C) et de pH (5–10). Deux isolats ont été sélectionnés pour le gène d'ARNr 16S analyse de séquence, et a montré une similitude maximale et homologie la plus proche avec *Geobacillus thermocatenulatus* et *Geobacillus thermoleovorans*, respectivement, ce qui indiquant que les isolats de deux différents des échantillons (sol et eau) sont membres du genre *Geobacillus*. Auparavant, une bactérie hautement thermostable *Geobacillus stearothermophilus* a été isolée du même site de source chaude **(Arya et *al*., 2015).**

Dans la montagne des Andes, la plus longue chaîne de montagnes continentale du monde, situé en Amérique du Sud, plusieurs sources thermales sont associées à des activités géothermiques et volcaniques, Sept sources thermales situées au centre et à l'est des chaînes de ces montagnes ont été étudiées pour l'isolement des bactéries thermophiles anaérobies produisant de l'hydrolyse enzymes.

Cette étude démontré que ces sources thermales contenaient diverses populations microbiennes de thermophiles anaérobies comprenant différents groupes métaboliques de bactéries, y compris des souches appartenant aux genres *Thermoanaerobacter*, *Caloramator*, *Anoxybacillus*, *Caloranaerobacter*, *Desulfomicrobium*, *Geotoga*, *Hydrogenophilus*, *Desulfacinum* et *Thermoanaerobacterium* avec des amylases, les protéases, lipases, estérases, xylanases et pectinases ; par conséquent, les souches représentent une source prometteuse d'enzymes à potentiel biotechnologique **(Rubiano-Labrador et *al*., 2019).**

Chapitre III : Les thermozymes

III.1-Généralité sur les thermozymes

Les enzymes sont des biocatalyseurs à haut pouvoir catalytique et spécificité de la strate / réaction. Ce sont des molécules recherchées pour processus industriels car leur application conduit à la génération efficace de stéréoisomères purs, moins de réactions secondaires, séparation plus facile des produits, et une charge environnementale moindre. Leur utilisation est limitée par le fait que la plupart des enzymes fonctionnent dans des conditions physiologiques ambiantes et être inactivé pendant les processus industriels opérationnels dans des conditions difficiles. Cela nécessite la recherche d'enzymes capables de résister à des conditions opérationnelles extrêmes **(kumar et *al.*, 2019)**. Au cours de la dernière décennie, des efforts considérables ont été déployés dans la recherche sur la biochimie et la physiologie des bactéries thermophiles. Les paramètres moléculaires de différents protéines, y compris les enzymes qui fonctionnent sous conditions extrêmes, sont toujours sous enquête active **(Pantazaki et *al.*, 2002).** Les enzymes de micro-organismes croissant à des températures élevées sont appelés thermozymes et considérés comme des candidats idéaux pour les processus catalytiques fonctionnant à haute températures. Les opérations de traitement à des températures élevées ont plusieurs avantages à savoir : vitesse de réaction plus rapide, solubilité accrue des substrats, augmentation de la viscosité et élimination de la contamination microbienne **(Gomes et Steiner, 2004).**

Depuis la découverte des thermophiles dans les années 1970 par Brock **(Brock, 1985)**, l'étude des micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles est devenue un domaine de recherche majeur. Une attention croissante est accordée à ces micro-organismes en raison de leurs propriétés inhabituelles **(Bruins et *al.*, 2001).** Les enzymes produites par les thermophiles et les hyperthermophiles sont généralement thermostables (résistants aux irréversibles inactivations à haute température) et thermophile (c'est-à-dire actif de façon optimale à haute températures, entre 60 et 125°C) et sont connus sous le nom de thermozymes (ou thermo-enzymes) **(Li et *al.*, 2005).**

Les micro-organismes thermophiles représentent sans équivoque une source précieuse d'enzymes hydrolytiques hautement thermostables, avec de nombreux avantages pour les applications biotechnologiques en raison de leur stabilité intrinsèque globale et de leurs taux de réaction élevés à des températures élevées **(Vieille et Zeikus, 2001; Turner et *al.*, 2007).**

Les thermozymes peuvent être purifiés facilement par traitement thermique lorsqu'il est exprimé dans des hôtes mésophiles. Cette façon de purification des enzymes thermostables recombinantes est tout à fait satisfaisante pour de nombreuses applications industrielles.

Additionnel l'avantage de certaines enzymes thermostables est diminué l'activité à basse température et cette fonctionnalité permet l'arrêt de la réaction par simple refroidissement **(Vieille et Zeikus, 2001).** Les thermozymes ne sont pas seulement plus thermostable, mais aussi plus résistant aux produits chimiques que leurs homologues mésophiles, propriétés qui les rendent extrêmement intéressants pour un processus industriel **(Pantazaki et *al*., 2002).** La résistance thermique des enzymes est déterminée par consommation d'énergie nécessaire à la transformation des molécules de l'état plié à l'état déplié **(Shiraki et *al*., 2001).** Bien que l'adaptation des thermozymes pour agir des températures élevées sont principalement obtenues par échange de peu de résidus d'acides aminés et / ou leur localisation différente en molécule, l'homologue thermostable et thermolabiles les enzymes sont similaires et ont le même mécanisme catalyseur **(Vieille et Zeikus, 2001).** Il est intéressant de noter que la plupart des enzymes résistantes à la chaleur indiquent une activité maximale au-dessus la température de croissance optimale des micro-organismes dont ils sont isolés **(Synowiecki, 2010).**

La principale raison de la sélection d'enzymes parmi les thermophiles est leur stabilité, ce qui les rend attractifs pour plusieurs procédés industriels. Il est non seulement leur thermostabilité mais aussi leur plus grande stabilité sous d'autres conditions extrêmes telles qu'un pH élevé ou de faibles concentrations en eau utile dans de nombreuses applications. Ces enzymes, en particulier celles qui sont actifs et stables à des températures allant jusqu'à 100°C, sont utilisés pour étudier l'adaptation des protéines à des températures élevées et pour mieux comprendre de la stabilité des protéines en général. Les enzymes des thermophiles et des hyperthermophiles sont thermostables et n'affiche une dénaturation irréversible des protéines qu'à haute température **(Bruins et *al*., 2001).** De plus, les thermozymes peuvent être utilisés comme modèles pour comprendre la thermostabilité. Donc, l'identification des caractéristiques structurelles impliquées dans la stabilité des thermozymes est essentielle pour description théorique des principes physico-chimiques contribuant à la stabilité des protéines et pliage **(Li et *al*., 2005).**

Certains des thermozymes ont également montré une stabilité et une activité dans d'autres conditions difficiles telles qu'un pH bas, une pression élevée et présence de sels et peut être jugée appropriée pour une conditions polyextrêmes **(kumar et *al*., 2019).**

III.2-Les principales thermozymes

III.2.1-Enzymes de dégradation des hydrolases

III.2.1.1-Les amylases

L'amidon est l'une des sources de produits et d'énergie les plus abondantes sur Terre **(Berlemont et Gerday, 2011).** Il est composé de deux composés de haut poids moléculaire components, amylose (15–25%) et amylopectine (75–85%) **(Pantazaki et *al*., 2002).** L'amylose se compose uniquement de polymères de glucose liés par α-1,4, alors que l'amylopectine a également Liens α-1,6 **(Bruins et *al*., 2001).** La capacité d'utiliser l'amidon comme énergie et source de carbone est largement répartie parmi la plupart sinon la totalité des organismes. Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles croissent sur l'amidon indique qu'ils possèdent des enzymes dégradant l'amidon. Le thermozymes impliqués dans la conversion de l'amidon en glucose, du maltose et des oligosaccharides a été décrits **(Pantazaki et *al*., 2002).** Plusieurs enzymes sont impliquées dans la conversion de l'amidon : les amylases endoactives et exoactives qui agissent principalement sur les liaisons α-1,4 **(Bruins et *al*., 2001).** Les amylases sont l'une des enzymes industrielles les plus importantes. **(Aygan et *al*., 2008).**

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules des grains d'amidon pour donner divers produits, y compris les dextrines et des polymères progressivement plus petits composés de glucose unités **(Gupta et *al*., 2003).** Bien que les amylases puissent provenir de plusieurs sources, y compris les plantes, les animaux et les micro-organismes, les enzymes microbiales répondent généralement aux demandes industrielles. Aujourd'hui un grand nombre d'amylases microbiennes sont disponibles commercialement et ils ont presque complètement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon dans la transformation industrielle **(Pandey et *al*., 2000).**

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes et sont d'une grande importance dans la biotechnologie actuelle. Le spectre d'application de l'amylase s'est élargi de nombreux autres domaines, tels que les domaines clinique, médical et analytique, chimiques, ainsi que leur application répandue dans la saccharification de l'amidon et dans le textile, l'alimentation, industries de la brasserie et de la distillation **(Pandey et *al*., 2000).** L'α-amylase détient aussi la part de marché maximale des ventes d'enzymes avec des applications majeures dans l'industrie de l'amidon, boulangerie, analytique chimie, détergents à vaisselle automatiques, désencollage textile, industrie des médicaments, des pâtes et papiers **(Aygan et**

***al*., 2008).**Il est souhaitable que les α-amylases soient actives aux températures élevées de gélatinisation (100 à 110°C) et liquéfaction (80 à 90°C) pour économiser les processus par conséquent, il y a eu un besoin et une recherche continue de α-amylases plus thermopiles et thermostables **(Burhan et *al*., 2003).**

III.2.1.2-Les protéases

Les protéases microbiennes sont parmi les plus importantes enzymes hydrolytiques et ont fait l'objet d'études approfondies depuis l'avènement de l'enzymologie **(Gupta et *al*., 2002).**

Les protéases (EC 3.4.21-24) sont des hydrolases et sont les plus répandues utilisé parmi les enzymes industrielles. Ils sont principalement produits à partir de micro-organismes qui représentent une excellente source d'enzymes en raison de leur grande diversité biochimique et de leur sensibilité à la manipulation génétique. En effet, les protéases microbiennes représentent environ 40% du total des ventes mondiales d'enzymes **(Belmessikh et *al*., 2013).** Ils sont divisés en exopeptidases et endopeptidases selon leur spécificité vis-à-vis des liaisons peptidiques terminales ou non terminales. Ils sont classés comme sérine protéases, protéases aspartiques, cystéine protéases et métalloprotéases en fonction de la nature de la groupe fonctionnel sur le site actif **(Pantazaki et *al*., 2002).**

Les protéases sont des molécules physiologiquement importantes et leur synthèse est répandue chez les plantes, les animaux et différentes souches de bactéries, champignons et levures. Une excellente source de protéases sont les micro-organismes, et parmi eux la grande attention a reçu des bactéries thermophiles et les archées classées en catégories modérées ou thermophiles et hyperthermophiles extrêmes, en croissance de manière optimale à 50 - 60°C, 60 - 80°C ou 80 - 113°C respectivement **(Synowiecki, 2010).**

Les protéases thermostables comme les autres enzymes des micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles (souvent appelés thermozymes) présentent un intérêt particulier des applications car ils sont stables et actifs au niveau températures supérieures à 60-70°C. De plus, ils sont plus résistant que leurs homologues mésophiles à solvants organiques, détergents, pH bas et élevé et autres agents dénaturants. L'utilisation de protéases à un niveau supérieur températures est bénéfique, car la forme dépliée de substrat protéique est mieux sensible à l'alambic protéase thermostable active. Il en résulte des activités spécifiques plus élevé pour les protéases provenant de thermophiles et optimisation de certains processus industriels, notamment avec les enzymes qui sont actives à des

températures proches 100°C. La résistance aux solvants organiques fait les protéases thermostables utiles pour la synthèse de peptides de poids moléculaire, réalisés en milieu réactionnel à faible teneur en eau **(Synowiecki, 2010).**

Les protéases sont généralement produites à l'aide de souches thermophiles appartenant au genre Bacillus **(Haaki et Rakshit, 2003).** Un exemple d'une telle enzyme est la thermolysine, un métalloprotéase neutre isolée de *Bacillus stearothermophilus* avec une demi-vie de 1 h à 80°C. La pyrolysine, sérine protéase qui atteint une activité maximale à 100°C a été isolé d'*archéon hyperthermophile Pyrococcus furiosus130292* **(Synowiecki, 2010).** Autres exemples de puits les protéases résistantes à la chaleur caractérisées sont des subtilisines d'Origine Bacillus. Certaines souches *Thermus*, par exemple, *Thermus aquaticus* et *Thermus thermophilus* peuvent être utilisé comme source d'aqualysine de type subtilisine sérine protéase thermostable. Cette enzyme est sécrétée comme zymogène activé dans le milieu de croissance par autolyse **(Pantazaki et *al*., 2002).** Autre enzyme protéolytique provenant de souches *Thermus* est du zinc dépendant de l'ATP protéase qui catalyse la libération de petits peptides **(Pantazaki et *al*., 2002).**

Les protéases thermostables sont avantageuses dans certains applications car des températures de traitement plus élevées peuvent être employés, entraînant des vitesses de réaction plus rapides, une augmentation solubilité des réactifs et produits non gazeux, et réduit incidence de contamination microbienne par des organismes mésophiles. Les protéases sécrétées par les bactéries thermophiles sont donc un intérêt particulier et sont devenus de plus en plus utiles dans une gamme d'applications commerciales **(Nascimento et Martins, 2004).**

Les protéases, également appelées hydrolases peptidyl-peptidiques, sont d'importantes enzymes industrielles, responsables pour environ 60% de toutes les ventes d'enzymes, et sont utilisés largement dans une variété d'industries, y compris les détergents, attendrissement de la viande, fabrication du fromage, épilation, cuisson, brasserie, la production d'aides digestives et la récupération d'argent à partir de pellicules photographiques **(Reddy et *al*., 2008).** Ces enzymes ont de nombreuses applications dans la production industrielle de différents articles, y compris les aliments, produits pharmaceutiques, cuirs et réactifs de diagnostic. Ces enzymes ont également été utilisées pour les déchets gestion et récupération de l'argent **(Amoozegar et *al*., 2007).**

III.2.1.3- Les cellulases

La cellulases est une famille d'enzymes qui hydrolysent β-1,4-liaisons glucosidiques dans la cellulose native et dérivée substrats **(Bajpai, 2009).** La cellulose, est la source d'énergie renouvelable la plus abondante dans l'environnement **(Azadian et *al.*, 2017**). Qui un glucide complexe $(C_6H_{10}O_5)n$, c'est-à-dire composé d'unités de glucose, forme les principaux constituants de la paroi cellulaire dans la plupart des plantes, et est important pour la fabrication de nombreux produits, tels que le papier, textiles, produits pharmaceutiques et explosifs **(Bajpai, 2009).**

Les cellulases jouent un rôle important dans la production de biocarburant de deuxième génération à partir de la biomasse lignocellulosique. Outre leur utilisation pour la production de biocarburants, les cellulases sont utilisées dans l'industrie textile pour le ramollissement du coton et la finition du denim et sur les marchés des détergents pour le soin des couleurs, le nettoyage et l'anti-redéposition dans les poudres à laver. Les cellulases peuvent être utilisées dans l'industrie des pâtes et papiers avec des hémicellulases pour améliorer le drainage et le fonctionnement des machines à papier et pour améliorer le désencrage des fibres recyclées **(Vyas et Lachke, 2003; Pandey et *al.*, 2013; Yadav et *al.*, 2015c).**

Une nouvelle application des cellulases dans l'industrie textile est l'utilisation de Denimax ® (Novo Nordisk) pour la " biostoning " des jeans au lieu de la pierre classique en jean délavé. Autre aussi significatif les applications des cellulases comprennent le prétraitement des biomasses cellulosiques et cultures fourragères pour améliorer la nutrition qualité et digestibilité, saccharification enzymatique des déchets agricoles et industriels et production de fines produits chimiques. En raison des limites des ressources fossiles, des enzymes de dégradation de la lignocellulose robustes joueront un rôle dans le développement de technologies biosourcées pour production durable de carburants et de produits chimiques (bioraffinerie) **(Antranikian, 2009).**

III.2.1.4-Les xynlases

Les xylanases font partie de la classe des enzymes glycosidases, qui est divisé en plusieurs familles différentes sur la base de la séquence de leurs domaines catalytiques, ce qui se traduit par une structure tertiaire partagée et fonction. Selon cette classification, la plupart des xylanases peuvent être trouvée dans la famille des glycosides hydrolases 10 (GH10) et la famille 11 (GH11), bien que certains appartiennent à d'autres familles **(Nguyen et *al.*, 2018).**

Le substrat naturel des xylanases est le xylane, un complexe, hautement polymère

ramifié formé de sous-unités de xylose à substituants multiples. C'est le principal composant de l'hémicellulose, qui à son tour est une fraction importante de la paroi cellulaire végétale. Compte tenu de sa nature complexe, plusieurs activités enzymatiques sont nécessaires à sa dégradation complète, ce qui pourrait expliquer pourquoi de nombreuses familles diverses de xylane dégradant les enzymes se trouvent dans la nature, toutes avec des spécificités différentes **(Basit et *al.*, 2018).**

L'hydrolyse du xylane utilisant des enzymes telles que les xylanases offre une alternative viable à l'hydrolyse chimique car elle est de nature très spécifique en plus d'être un processus respectueux de l'environnement **(Verma et *al.*, 2015).**

Toutes les xylanases actuellement disponibles dans le commerce des fournisseurs ne peuvent que partiellement remplir les critères. Les xylanases de micro-organismes thermophiles modérés sont rapidement dénaturé à des températures supérieures à 70°C **(Antranikian, 2009).**

Ces dernières années, les xylanases ont fait l'objet d'intérêts de recherche mondiaux en raison de leur potentielle application en biotechnologique dans divers processus industriels. Les utilisations commerciales suggérées des xylanases impliquent la conversion du xylane, qui est présent dans les déchets de l'agriculture et l'industrie alimentaire, en xylose. La xylanase peut également être utilisée pour la clarification des jus, l'amélioration de la consistance de la bière et l'amélioration de la digestibilité des matières premières chimiques **(Bin et *al.*, 2012).**

La xylanase a également été largement utilisée dans les secteurs de l'énergie, de l'alimentation, de l'alimentation animale, de la médecine, de la fabrication du papier et du textile **(Demain et *al.*, 2005; Yadav et *al.*, 2015c).**

III.2.1.5-Lipases et estérases

Les enzymes lipolytiques sont membres de l'hydrolase α / β famille et comprennent deux groupes d'enzymes, de vraies lipases (EC 3.1.1.3 triacylglycérol lipases) et estérases (EC 3.1.1.1 carboxylestérases), qui diffèrent par leurs propriétés biochimiques. Les deux types catalysent le clivage hydrolytique d'une liaison ester entre un acide carboxylique et un groupe alcool dans l'eau. Il existe plusieurs critères pour distinguer les vrais lipases et estérases. Ils diffèrent par la préférence du substrat. Les estérases hydrolysent uniquement les chaînes courtes (<12 atomes de carbone), les esters d'acides gras solubles dans l'eau et les lipases montrent une préférence pour les esters d'acide gras à longue chaîne (≥ 12 atomes de

carbone **(López-López et *al*., 2014).** Les lipases peuvent être aussi distinguées des estérases par le phénomène d'activation inter faciale, qui n'était servi pour les lipases. Alors que les estérases obéissent aux Michaelis Cinétique mentale, les lipases ont besoin d'une minimum concentration du substrat avant d'observer une activité élevée **(Bornscheuer, 2002).** De plus, les lipases préfèrent substrats insolubles dans l'eau, généralement des triglycérides composé d'acides gras à longue chaîne, tandis que les estérases hydrolyser totalement les esters «simples» (par exemple l'acétate d'éthyle) et habituellement, seuls les triglycérides contenant des acides gras plus courts que C6. Les deux enzymes se sont montrées stables et actif dans les solvants organiques, mais cette caractéristique est plus prononcée avec des lipases **(Bornscheuer, 2002).**

Lipases sont des Enzymes thermostables isolé principalement de micro-organismes thermophiles ont retenu l'attention en raison de leur potentiel applications commerciales en raison de leur stabilité inhérente et vitesses de réaction élevées à haute températures **(Demirijan et *al*., 2001).** En plus les lipases thermostables jouent un rôle important dans l'industrie utilisés à des températures dépassant 50°C **(Sharma et *al*., 2002).** Beaucoup de lipases thermostables ont été purifiées et caractérisées pour utilisations industrielles dans les détergents et traitement des eaux usées domestiques **(Abdel-Fattah et *al*., 2008).**

Dans le domaine de la biotechnologie industrielle, les lipases et estérases gagnent également une attention croissante en raison de leur application en biosynthèse organique. En solution aqueuse Ils catalysent le clivage hydrolytique des esters pour former l'acide et l'alcool constitutifs, alors que dans les solutions organiques la réaction de transestérification est favorisée **(Antranikian, 2009).**

III.2.2-Enzymes de manipulation des acides nucléiques

III.2.2.1- ADN polymérases

Depuis l'isolement par T. Brock au milieu des années 1960, de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* d'une source chaude dans le Parc national de Yellowstone, quelques années plus tard, la Taq polymérase rendue célèbre par son utilisation intensive dans la PCR, développée au milieu des années 1980 par K. Mullis, R. Saiki, et ses collègues, de nombreux autres ADN polymérases thermostables ont été caractérisées et sont couramment utilisées, non seulement dans la réaction de PCR, mais aussi depuis Séquençage d'ADN par la méthode des didésoxynucléotides de Sanger. Les ADN polymérases thermostables présentent une

diversité considérable au niveau de leur séquence des acides aminé **(Berlemont et Gerday, 2011).**

Les ADN polymérases comprennent une famille des enzymes responsables des informations cellulaires. Elles sont présentes dans tous les organismes vivants. Toutes les ADN polymérases catalyser, en présence d'ions Mg^{+2}, l'incorporation de désoxyribonucléoside-5 ′ -monophosphates en 3′ -hydroxyle terminaison d'un brin d'ADN en croissance, l'opposé brin complémentaire servant de modèle. **(Pantazaki et *al*., 2002).**

La première PCR décrite la procédure a utilisé le fragment de Klenow de l'ADN d'*E. coli* polymérase I, qui était thermolabile et a dû être ajoutée au cours de chaque cycle suivant la dénaturation et l'amorce, étapes d'hybridation. L'introduction d'ADN thermostable polymérases dans la PCR a facilité l'automatisation du traitement une mauvaise partie cyclique de la procédure **(Antranikian, 2009).**

III.2.2.2-ADN ligases

En raison de leur importance physiologique et de leur potentiel biochimique, les ADN ligases provenant de nombreux organismes vivants ont été étudiés depuis que l'enzyme a été disséminée couvert en 1968. L'identification de ces enzymes est également un sujet de recherche fondamentalement intéressant, et ces ADN ligases thermostables, qui maintiennent l'activité catalytique pour la réaction de coupure pendant la température cycliques, y compris l'étape de dénaturation thermique des ADN duplex (90-100°C) **(Ishino et Ishino, 2013).**

Les ADN ligases diffèrent en deux propriétés importantes: Le premier est la source d'énergie (ATP ou NAD) **(Pantazaki et *al*., 2002).** Ils sont classés en deux familles, selon le cofacteur requis pour la formation d'adénylate de ligase, dépendant de l'ATP ADN ligases (EC 6.5.1.1) et ligase des dépendantes de NAD þ (CE 6.5.1.2) **(Rolland et *al*., 2004)** et la seconde est leur capacité à ligaturer les extrémités franches. La ligature des extrémités cohésives est généralement effectuée à basse température (12–15°C) pour maintenir un bon équilibre entre recuit des extrémités et activité de l'enzyme.

Des études récentes ont révélé la présence d'ADN ligases thermostables dans 23 *Thermus* souches. L'avantage de ce enzymes est que effectuant la réaction près du point de fusion des amorces, la spécificité de la réaction de ligature augmente considérablement **(Pantazaki et *al*., 2002).**

Les ADN ligases jouent un rôle essentiel dans l'ADN cellulaire réplication, recombinaison et réparation. Elles sont présente universellement dans les eucaryes, les bactéries et les archées **(Rolland et *al.*, 2004).**

III.3-Application des thermozymes

Les propriétés exceptionnelles des thermozymes sont adaptées aux industries qui utilisent des températures élevées, comme la pâte et industries du papier, de l'alimentation, du brassage et de la transformation des aliments pour animaux.

Les enzymes thermophiles ont joué un rôle des rôles importants non seulement au niveau industriel (Tableau 9), mais aussi en applications pharmaceutiques nécessitant l'utilisation d'aldolases spécifiques pour la synthèse composés énantiopurs **(Falcicchio et *al.*, 2014).**

Tableau 9 : Rapports récents sur les macromolécules produites par des thermophiles ayant des applications biotechnologiques connues ou potentielles (Urbietaet *al.*, 2014).

Macromolécule	**Thermophile / Source**	**Activité**	**Industrie / bioprocédés**	**Référence**
Thermozymes				
Aldolase	*Sulfolobus solfataricus, S. acidocaldarius, Thermoproteus texas, Hypertermus butilicus*	Formation de liaisons CC stéréosélectibes	Industrie pharmaceutique	Falcicchio et *al.*, (2014)
G6PD, 6PGD, R5PI,	*Geobacillus stearothermophilus* ,	Oxydation du glucose	Pile à combustible enzymatique	Zhu et *al.*, (2014)
autres*	Moorella thermoacetica , Thermotoga maritima			
Hydrogénase	*Pyrococcus furiosus*	Étape finale de l'oxydation du glucose par oxydant cycle du pentose phosphate	Production accrue de biohydrogène	Woodward et *al.*, (2000)
Pullulanase	*Thermotoga neapolitana*	Hydrolyse des liaisons α-1, 6-glucosidiques	Production de biocarburants	Kang et *al.*, (2011)
α-amylase	Clone non cultivé (nettoyage métagénomique)	Hydrolyse de l'amidon à haute température et une concentration élevée en NaCl	Production de biogaz	Jabbour et al.,(2013)
Endoxylanase	*Acidothermus cellulolyticus*	Clivage β-1, 4-xylane	Production de biocarburants à partir de lignocellulose	Barabote et *al.*, (2010)
Chitinase	*Sulfolobus tokodaii*	Hydrolyse de la liaison β-1, 4-glycosidique dans Chitine	Biomédical, pharmaceutique, alimentaire et	Staufenberger et *a*l., (2012)

			Environnement	
Protéase kératinolytique Complexe	*Meiothermus ruber*	Hydrolyse de la kératine	Dégradation des plumes (déchets industriels)	Kataoka et *al*., (2014)
Protéase	Communauté microbienne de l'état solide réacteur de fermentation	Dégradation des déchets de cheveux provenant de la tannerie	L'industrie du cuir	Abraham et *al*., (2014)
Lipase	*Geobacillus sp.*	Hydrolyse de divers substrats lipidiques Biocarburants, cosmétiques ou parfums	industries de la production, du cuir et de la pâte à papier	Gudiukaitė et *al*., (2014)
Thermostable acide lipase	*Bacillus pumilus*	Dégradation de l'huile de palme	Traitement de l'huile de palme contenant les eaux usées	Saranya et *al*., (2014)
Carboxylestérase	*Geobacillus thermoleovorans*	Hydrolyse de l'ester carboxylique	Agriculture, alimentaire et les industries pharmaceutiques	Soliman et *al*., (2014)
Biosurfactants Thermostable de type lipopeptide Biosurfactant	*Aneurinibacillus thermoaerophilus*	Réduction de la tension superficielle de l'eau	Agriculture, alimentaire et pharmaceutique, industries du pétrole et du papier / pâte à papier	
Type glicolipide biosurfactant	*Alcaligenes faecalis*	Diminution de la tension superficielle à l'air-eau interface, améliorer l'émulsification	Industrie pétrolière	Bharali et *al*., (2011)
Lipopeptides cycliques	*Bacillus licheniformis, B. subtilis, B. subtilis*	Mobilisation du pétrole, amélioration de la récupération du pétrole	Industrie pétrolière	Joshi et *al.*, (2008

III.4-Stabilité des thermozymes

La stabilité des thermozymes et des mésozymes a révélé certains facteurs importants contribuent à la stabilité remarquable des thermozymes, mais il n'y a pas de mécanisme universel unique qui favorise la stabilité. Les mécanismes moléculaires de la thermostabilité sont variés et dépendent de l'enzyme spécifique. Les facteurs contribuant à la stabilité comprennent les interactions des intermolécules supplémentaires (par exemple liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes, liaisons disulfure, liaison métallique) et une bonne structure conformationnelle générale (c'est-à-dire plus rigide, emballage compact; libération de contrainte conformationnelle; stabilité de l'hélice a; entropie réduite de déploiement) **(Li et *al*., 2005).**

Les principaux facteurs qui contribuent à la stabilité des enzymes thermophiles sont : L'augmentation du pairage ionique, l'augmentation des interactions hydrophobes (par exemple à l'interface des sous unités), une diminution du ratio surface/ volume, l'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes, une diminution des contraintes conformationelles et une stabilisation des boucles. Tous ces éléments sont intimement reliés par un dernier facteur très important : la composition et le changement au niveau d'acides aminés spécifiques **(Hupé, 2008).**

Partie Expérimentale

I.Matériel et Méthodes

Toute la partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de département de faculté des sciences à l'université de Dr Yahia Fares Médéa.

I.1-Sources thermales étudiées

Les échantillons (eau et sédiment) utilisés au cours de notre étude ont été prélevés pendant le mois de Mars 2020 aux différents sites hydrothermaux dans les Wilayas de MEDEA et BOUIRA.

I.1.2-Source thermale de MEDEA (Hammam Essalihine)

Ce hammam est l'un des plus importants Hammmams thermaux de la wilaya de Médéa. Se trouvant à 6 km de Berrouaghia et à 30 km du chef-lieu de wilaya (Médéa), il s'alimente en eaux thermales à partir de cinq sources, à raison d'un débit de 3 litres à la seconde. La chaleur de ses eaux naturelles atteint la température de 41°C, à la sortie de la source. La composition chimique des eaux de Hammam Essalihine est d'un intérêt thérapeutique certain, notamment pour les maladies de la peau, les maladies respiratoires.



Figure 10: localisation de site d'étude: Hammam Essalihine- MEDEA sur la carte géographique.

I.1.3-Source thermale de BOUIRA (Hammam K'sana)

La station thermale de Hammam K'sana, sise à l'est de la commune d'El Hachimia, à 20 km au sud de la wilaya de Bouira et dans le prolongement ouest de la chaîne marno-calcaire des Bibans. Sa minéralisation est essentiellement sulfurée sodique à faible teneur en gaz sulfureux. Son débit est de 8 litres/seconde et sa température de 64° C.

La source thermale de Hammam Ksana fait l'objet de nombreux témoignages sur ses vertus thérapeutiques et sa fréquentation depuis les temps les plus reculés.



Figure 11: localisation de site d'étude: Hammam Ksana -BOUIRA sur la carte géographique.

La richesse et la haute température de ces sources permanente sont des conditions physico-chimiques seraient favorables à la prolifération de types variés de microorganismes thermophiles.

I.2. Echantillonnage

I.2.1- Prélèvement des échantillons

A partie des déférents sites hydrothermales de notre étude, les deux types d'échantillons sont prélevées dans des conditions aseptiques pour garder la qualité et la viabilité des germes étudiés.

I.2.1.1-Eau

La méthode de prélèvement des échantillons d'eau sont réalisées manuellement dont il s'agit de prolonger directement les flacons en verre stérile de 250 ml à une profondeur de 15-20 cm de surface des sources.

Les deux flacons sont remplis jusqu'au bord et sont ouverts et bouches sous l'eau afin d'éviter la formation des bulles d'air, et sont aussi remplis en prenant soin de ne pas toucher l'intérieur du flacon, du bouchon et le filetage.

La mesure in situ de la température est réalisée, à l'aide d'un thermomètre.

Tableau 10 : Les températures des sources thermales étudie

	Hammam Essalihine de Médéa	**Hammam K'sana de Bouira.**
Température	48 C°	58 C°

I.2.1.2-Sédiment

La récupération des échantillons des sédiments sont récoltées depuis le fond des sources hydrothermales à l'aide d'une spatule stérile, les prélèvements ainsi recueillir dans des boites en plastiques stériles et boucher à des conditions aseptiques.

I.2.2-Transport et conservation des échantillonnes

Pour faciliter le travail tout en évitant les erreurs Les échantillons prélevés sont clairement identifiés. Chaque flacon a porté une étiquette indiquant : le numéro du point de prélèvement, date et heure. Puis tous les prélèvements sont transportés dans une glacière dont la température est comprise entre 4 °C et 6 °C.

I.3- Enrichissement des isolats

1ml d'eau et 10g de sédiment sont placées séparément dans 90ml de BN, ensuite incubé à 60 °C pendant 3j dans un incubateur à agitation. Les cultures positives sont traduites par l'apparition des troubles.

Cette étape permet la répartition des bactéries thermophiles rechercher et rétablir la capacité à former des colonies.

I.4-Isolement des bactéries thermophiles

Pour préparer la suspension mère :

- Du sédiment : 1g de l'échantillon est dissout dans 9 ml d'eau physiologie stérile **(Annexe1)**.une homogénéisation de la suspension est effectuée pendant quelques minutes à l'aide d'un agitateur vortex.
- D'eau : 1 ml de l'échantillon est mise dans 9 ml d'eau physiologie stérile **(Annexe1)**. Une légère homogénéisation de la solution est effectuée pendant quelques minutes à l'aide d'un agitateur vortex.

A partir des solutions mères des deux types d'échantillon (eau et sédiment), une série des dilutions 10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3} sont préparés dans de l'eau physiologique stérile.

Pour l'isolement des bactéries thermophiles 100 µl de chaque solution mère et de chaque dilution de deux échantillons (eau et sédiment) sont ensemencés par strie à la surface des boites de pétri contentent les 3 milieux gélosé qui sont le milieu TTM, le milieu T162M et le milieu MT162M à l'aide des pipettes pasteur stériles. Les boites incuber à 60 °C avec des observations quotidiennes jusqu'au l'apparition total des colonies.

I.5- Purification des isolats

Après incubation et développement des différents isolats de chaque milieu, environ une dizaine de colonies d'aspect différent est prélevée et purifiée par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de clonies pures dans chaque boite de Pétri sur le même milieu d'isolement.

I.6- Conservation des isolats

Les souches pures présentant des aspects différents ont été conservées :

I.6.1- A long terme : sur des tubes Eppendorff contentent un volume 800 µl de BN additionné de 200 µl de glycérol à -20°C.

I.6.2- A court terme : par piqeure centrale sur des micro-tubes contentent la gélose nutritive TTM à 4 °C pendant une durée de 3-6 mois.

I.7-Identification des isolats

I.7.1-Caractérisation morphologique et culturale

I.7.1.1-Examen macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est déterminé après croissance sur milieu solide. C'est une description directe faite sur boites d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres afin de les purifier. Elle permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc.) **(Badis et al, 2005).** L'identification macroscopique des bactéries se fait après leur croissance.

I.7.1.2- Examen microscopique

L'observation microscopique s'effectue à l'aide d'un microscope optique.

I.7.1.2.1-Coloration de Gram

La tâche de gramme est l'une des tâches les plus importantes pour les bactéries. Nommé après Hans Christian Gram qui a développé la méthode en 1884, la coloration de Gram permet de distinguer les bactéries Gram-positives et Gram-négatives sur la base de différences coloration avec un complexe cristal violet-iode et une contre-coloration de safranine. Les parois cellulaires des organismes Gram-positifs conservent ce complexe après traitement à l'alcool et apparaissent pourpre, tandis que les organismes gram-négatifs se décolorent après un tel traitement et apparaissent rose **(Coico, 2005).** Ces deux comportements résultent d'une différence fondamentale de composition et de structure de la paroi. Contrairement à la paroi des bactéries à Gram négatif, celle des bactéries à Gram positif interpose une barrière empêchant la décoloration par l'alcool du cytoplasme qui est le siège de la réaction **(HAYETTE et al., 2010). (Voir Annexe 3)**

I.7.2-Caractérisation biochimique

I.7.2.1-Test de Catalase

Certaines bactéries produisent l'enzyme catalase qui facilite la détoxication cellulaire. La catalase neutralise les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène **(Wheelis, 2008)** et de sa concentration dans les bactéries été corrélée avec la pathogénicité **(Mahon et al., 2011).**

Dans 1893, une publication de Gottstein a attiré l'attention sur la catalase bactérienne, ce qui en fait l'une des premières enzymes bactériennes à décrire **(Reiner, 2010).**

L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides de peroxyde d'hydrogène **(Wheelis, 2008**). La catalase accélère la dégradation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène ($2H_2O_2$ + Catalase → $2H_2O + O_2$). Cette réaction se manifeste par la formation rapide de bulles **(Reiner, 2010).**

Le principe de ce test consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée. **(Joffin et Leyral, 2006 ; Tankeshwar, 2013). (Voir Annexe 4)**

I.7.2.2-Test d'oxydase

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaine respiratoire. Elle permet 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. **(Joffin et Leyral, 2006 ; Delarras, 2014). (Voir Annexe 5)**

I.7.2.3-Identification des espèces par Galeries API

La galerie API 20E est un système standardisé se basant sur des tests biochimiques qui mettent en évidence les métabolismes bactériens. Elles sont utilisées en diagnostic in vitro pour la classification, la détermination et l'identification bactérienne des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif.

La galerie API 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites cependant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification **(Voir Annexe 6).**

I.8-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

I.8.1-Amylase

La recherche de l'activité enzymatique de l'amylase est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à amidon **(Annexe 2)** après les boites sont incubées à 45°C pendant 48h. Après culture bactérienne les colonies sont recouvrent par une solution de lugol. Un résultat positives se traduits par la formation d'une zone claire autour des colonies qui signifié la présence de l'activité amylatique et le résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture.

I.8.2-Protéases

L'activité protéolytique est examinée par l'ensemencement des souches sur gélose au lait **(Annexe 2)**. L'incubation est effectuée pendant 1 à 2 j à 40 ^{o}C-45^{o}C. Un résultat positive st traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies qui signifie la présence de la Protéases alors que l'absence de ce halo signifie un résultat négative et donc l'absence de protéase.

I.8.3-Cellulase ou xylanase

La recherche de cellulase ou xylanase est effectuée par l'ensemencement des souches sur un milieu de base supplémenté par 0,5% (p/v) de CMC **(Annexe 2)**. Puis incuber à 45°C pendant 48h, après incubation les cultures sont recouvrent par la solution de rouge congo à 0,1% (p/v) **(Annexe 1)** et placées pendant 15 à 30 min à 55°C. Après l'incubation la première solution est remplacée par une solution à 1M de NaCl et les boite sont laissées

pendant 5 à 10 min à température ambiante. La présence de cellulase ou de xylanase se traduits par la formation de zones claires autour des colonies.

I.8.4-Lipase et estérase

La recherche d'estérase est effectuée par le test d'hydrolyse des Tweens 20 et 80 alors que celle de Lipase est effectuée par l'hydrolyse de l'huile d'olive.

I.8.4.1-Hydrolyse des Tween 20 et 80

La présence d'estérase est confirmée par l'ensemencement par puits des souches sur un milieu de base contenant 1% (v/v) de Tween 20 ou de Tween 80 **(Annexe 2)**. Après incubation pendant 1 à 3 j à 40°C, l'apparition de zones claires autour des colonies signifie un résultat positives et par la suite la présence d'estérase.

I.8.4.2- l'hydrolyse de l'huile d'olive

La recherche de Lipase est examinée par l'ensemencement par puits des souches sur un milieu de base additionné de 2,5% (v/v) d'huile d'olive stérilisé séparément **(Annexe2)**. Après incubation pendant 1 à 3 j à 40°C, un résultat positif se traduit par apparition de zones claires autour des colonies.

II. Résultats Et Discussion

II.1-Isolement et purification des isolats

Au cours de cette étude, deux prélèvements d'eau thermale sont effectuées l'une de Hammam Essalihine de wilaya de MEDEA et l'autre de Hammam K'sana de wilaya de BOUIRA.

L'enrichissement des prélèvements de deux sources sur le BN incubé à 60°C pendant 3 j montré que ces deux sources sont riches par une population bactérienne qui se traduits par l'apparition d'un trouble sur le BN.

L'isolement qui été effectué par l'ensemencement des isolats sur les 3 milieux gélosés : rsuccessive sur le milieu TTM sont montrés la croissance des différentes souches par l'apparition des premiers colonies après 3j d'incubation.

L'enrichissement et l'isolement sont permis d'isolées et identifiés 25 souches dont 16 souches isolés au niveau de Hammam Essalihine de MEDEA et 9 souches au niveau de Hammam K'sana de BOUIRA, ces souches sont désignés selon un code se forme de lettre (A, B, C, D……).

II.2-Identification des isolats

II.2.1-Observation macroscopique

Après 3 jours d'ensemencement des souches sur les 3 milieux de culture gélosé et incubation à 60°C, toutes les souches sélectionnées sont des bactéries à des aspects différents, L'observation macroscopique de ces souches, a permis de dégager des aspects différents.

Sur le milieu TTM : 7 colonies sont isolées à partir de Hammam Essalihine de MEDEA, ces colonies ont des aspects de plats, blanches certains sont transparents et crue, leur surface est lisse ou rigoureuse dans certains cas, et pour la source de Hammam K'sana de BOUIRA les colonies présentent d'aspect de bouton ou de fleur, blanche ou marron avec une surface plate.

Sur le milieu T162M : pour les 2 sources étudiées, les colonies présentes sont caractérises par des aspects plats, blanches ou transparents, lisse et bombé et des colonies se forme de stries rose dans la source de Hammam K'sana de BOUIRA.

Sur le milieu TM162M : sur cette milieu les colonies sont blanche ou marron ou transparente, bombé.

Un autre aspect de colonie qui creuse la gélose est présent dans tous les milieux pour les prélèvements de la source de Hammam K'sana de BOUIRA.

Les résultats macroscopiques des isolats sont résumés dans le tableau 11 et la figure 12 pour Hammam Essalihine de MEDEA et dans le tableau 12 et la figure13 pour Hammam K'sana de BOUIRA.

Tableau 11 : Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam Essalihine de MEDEA

Milieux de culture	**Observation macroscopique**
TTM	-Colonies plate, blanches. **Photo E (figure12).** -Colonies plate, blanch.**Photo J (figure12.).** -Colonies crue. **Photo L (figure12).** -Colonies blanches, transparents. **Photo M (figure12).** -Colonies rigoureuse. **Photo N (figure12).** -Colonies blanche, plate, centre blanche. **Photo O (figure12).** -Colonies lisse, bouton au centre. **Photo P (figure12).**
T162M	-Colonies blanche clair, contour transparent. **Photo A (figure12).** -Colonies plats, blanche. **Photo B (figure12).** -Colonies petites, blanche, lisse, bombée. **Photo G (figure12).**
TM162M	-Colonies blanche, lisse. **Photo C (figure12).** -Colonies blanche. **Photo D (figure12).** -Colonies petite, transparent, centre boutonné. **Photo F (figure12).** -Colonies blanche. **Photo H (figure12).** -Colonies blanche. **Photo I (figure12).** -Colonies petite, bombé. **Photo K (figure12).**

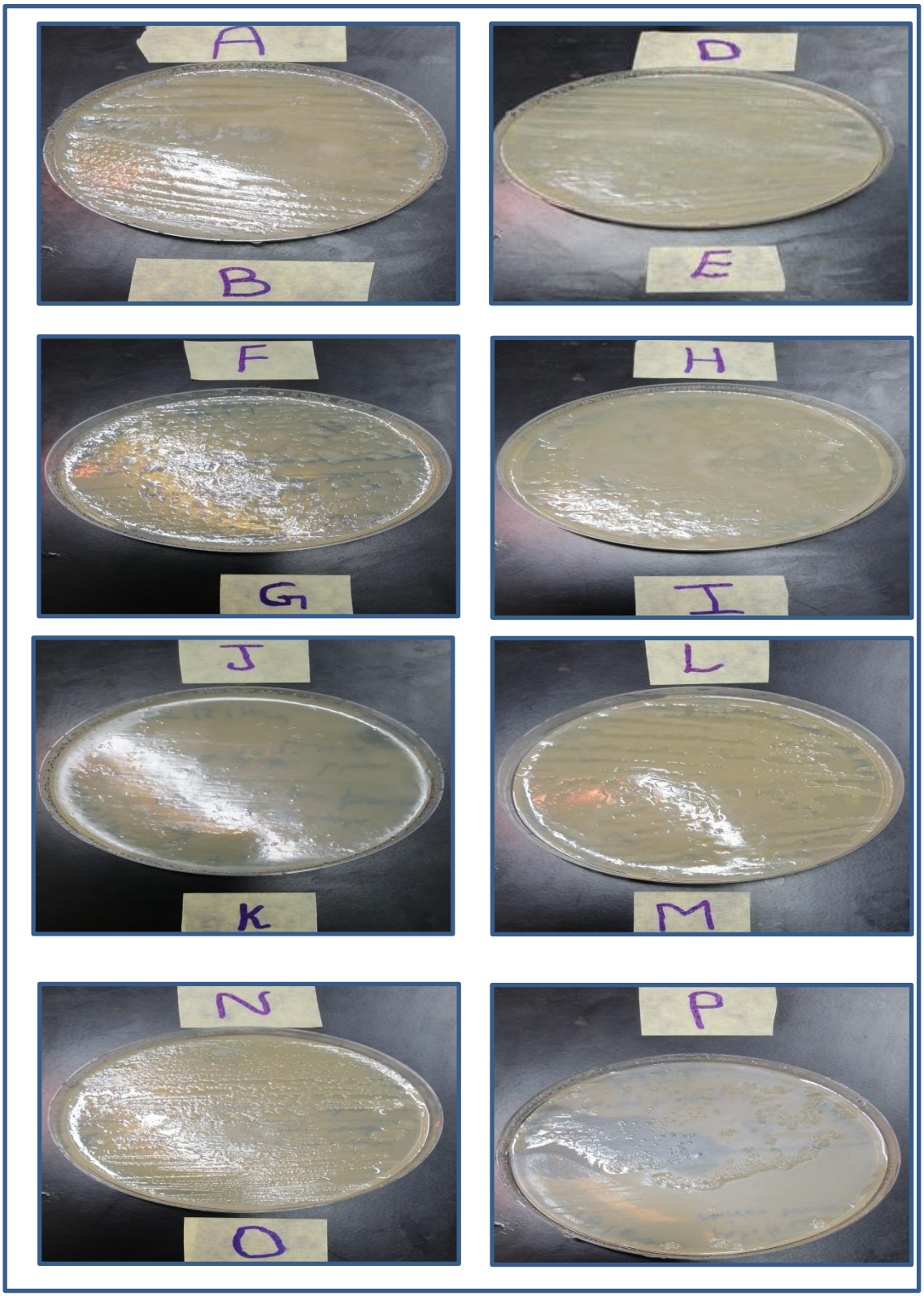


Figure 12 : Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam Essalihine de MEDEA.

Tableau 12 : Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam K'sana de BOUIRA.

Milieux de culture	**Observation macroscopique**
TTM	-Colonies qui creusent la gélose. **Photo T (figure13).** -Colonies d'aspect de bouton, marron. **Photo R** (**figure13).** -Colonies blanche, grande, plate. **Photo W** (**figure13).** -Colonies d'aspect de fleur. **Photo X** (**figure13).**
T162M	-Colonies qui creusent la gélose. **Photo T (figure13).** -Colonies transparent, centre boutonné. **Photo U** (**figure13).** -Colonies se forme de stries rose. **Photo V (figure13).** -Colonies petites, blanche, un peu bombé. **Photo G' (figure13).**
TM162M	-Colonies blanche avec alter de transparente. **Photo Q (figure13).** -Colonies marron, enfoncée dans la gélose. **Photo S (figure13).** -Colonies qui creusent la gélose. **Photo T (figure13).**

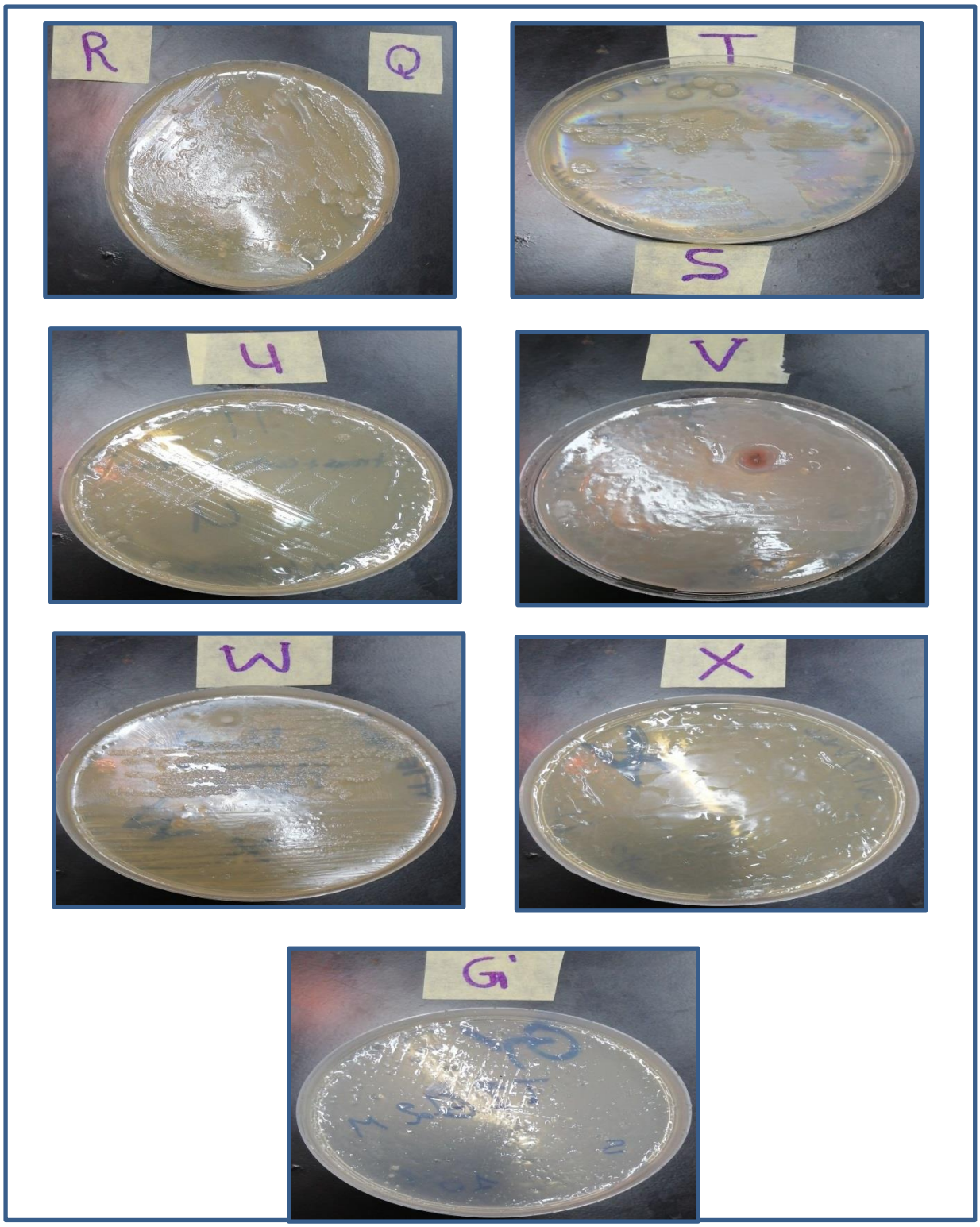


Figure 13 : Aspects macroscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de Hammam K'sana de BOUIRA.

Conclusion Et Perspectives

Les extrêmophile sont des microorganismes très important dans la biotechnologie récente dues à leurs potentialités fonctionnelles. Les bactéries thermophiles sont la classe la plus étudiées parmi les extrêmophile en raison de leur thermostabilités et la haute potentiel à produire des biocatalyseurs extracellulaires qui sont très appliquées dans plusieurs domaines et donne une attention considérable dans les communautés industrielles.

L'isolement et l'identification des bactéries thermophiles productrices des thermozymes constituent l'objectif de cette étude. Ces bactéries ont été isolées à partir des échantillons d'eau et de sédiments prélevés des deux sources hydrothermales à deux régions différentes : Hammam Essalihine dans la région de wilaya de MEDEA et de Hammam K'sana dans la région de wilaya de BOUIRA.

Au cours de notre étude on a peut faire l'isolement des souches qui ont été effectué sur 3 milieux gélosés : TTM, T162M et TM162M spécifique pour l'isolement des bactéries thermophiles. Et en copmte faire l'identification de ces souches par des tests biochimiques et la galerie API 20E et aussi on veut faire la mise en évidence des activités enzymatiques par 7 milieux gélosés additionnés des différents substrats spécifiques pour chaque enzyme : amidon, caséine, carboxymethylcellulose, Tween 80 et l'huile d'olive, pour la détermination des activités amylolytique, protéolytique, cellulolytique et lipolytique respectivement.

En effet cette recherche a permis l'exploitation d'un biotope extrême (Hammam Essalihin et Hammam K'sana). Ces sites thermaux abritent une microflore particulière possèdent un optimum de température. Les thermophiles possèdent des activités intéressantes pour la biotechnologie de différentes industries attendant une étude détaillée des isolats pour renfoncer leur potentiel, une optimisation supplémentaire des paramètres de croissance pour une activité enzymatique extracellulaire optimale peut être réalisée pour une bonne rentabilité.

Références Bibliographique

A

- **Aanniz, T., Ouadghiri, M & Melloul.M. (2015).** "Thermophilic bacteria inMoroccan hot springs, saltmarshes and desert soils,". *Brazilian Journal of Microbiology*, **46**(2) : 443–453.
- **Abdel-Fattah, Y.R & Gaballab, A.A. (2018).** Identification and over-expression of a thermostable lipase from Geobacillus thermoleovorans Toshki in Escherichia coli. *Microbiological Research* **,163** : 13-20.
- **Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M & Sahin, F. (2009).** Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods*, **79**: 321–328.
- **Albers, S., Vossenberg, J., Driessen, A. & Konings, W. (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles***, 5**:285–294.
- **Alrumman, S., Yasser, S., Mostafa, M., Al-Qahtani, S., Tarek, H & Taha, T. (2018).** Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Open Life Sci*, **13**: 470–480.
- **Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., Bentabet, A.E.O & Lopez-Garcıa. P. (2014).** Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles*, 1-13.
- **Amjad, K. (2011).** Screening and characterization of thermophilic bacteria (lipase, cellulase and amylase producers) from hot springs in Saudi Arabia. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **9** (2) : 672 - 675.
- **Amoozegar, M.A., Fatemi, Z.A., Karbalaei-Heidari, H.R. & Razavi, M.R. (2007).** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, Salinivibrio sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, **162** :369—377.
- **Antranikian, G. (2009***).* Extremophiles and Biotechnology. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS*, 1-5.
- **Antranikian, G., Vorgias, C.E & Bertoldo, C. (2005).** Extreme Environments as a Resource forMicroorganisms and Novel Biocatalysts. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, **96:** 219–262.
- **Arya, M., Joshi, G.K., Gupta, A.K., Kumar, A., Raturi, A. (2015).** Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains from Soldhar (Tapovan) hot spring in Central Himalayan Region, India. *Ann Microbiol*, **65**:1457–1464.

- **Aygan, A., Arikan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S & Çolak, Ö. (2008).** highly thermostable and alkaline α-amylase from a halotolerantalkaliphilic bacillus sp. *ab68. Brazilian Journal of Microbiology*, **39** :547-553.
- **Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Karami, Z & Hassanshahian, M. (2017).** Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from Bacillus sonorensis HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology,* 1-10**.**

B

- **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M. & Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chève de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Science and Technologeie*, **23**: 30-37.
- **Bajpai, P. (2009).** Xylanase**s.** *Elsevier Inc***,** 600-612.
- **Basit, A., Liu, J., Rahim, K., Jiang, W & Lou, H. (2018).** Thermophilic xylanases: from bench to bottle. *Crit. Rev. Biotechnol*, **38**, 989–1002.
- **Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z & Amrane, A. (2013*).*** Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by Aspergillus oryzae. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **44** :377–385.
- **Berlemont, R & Gerday, C. (2011).** *Extremophiles. Elsevier B.V*, 229-242.
- **Bin, L., Zhang, N., Zhao, C., Lin, B., Xie, L & Huang, Y. (2012).** Characterization of a Recombinant Thermostable Xylanase from Hot Spring Thermophilic Geobacillus sp. TC-W7. *Jornal Microbiol Biotechnol*, **22**(10) : 1388–1394.
- **Bornscheuer, U.T. (2002).** Microbial carboxyl esterases: classi¢cation, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **26** :73-81.
- **Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Boucherba, N., Joseph, M., Gagaoua, M., Ben Hania, W., Kecha, M., Benallaoua, S., Hacène, H., Ollivier, B & Fardeau, M.L. (2014).** Partial Characterization of Xylanase Produced by Caldicoprobacter algeriensis, a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from an Algerian Hot Spring. *Appl Biochem Biotechnol*, **174**:1969–1981.

- **Bouanane-Darenfed, A., Fardeau,M.L., Gre´goire, 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.
- **Brock, T. D. (1985**). Science, 230 :132–138.
- **Bruins, M. E., Janssen, A. E & Boom, R. M. (2001).** Thermozymes and their applications. *Applied biochemistry and biotechnology* ,90(2) :155-186.
- **Burhan, A., Nisa, U., Go¨khan, C., O¨mer, C., Ashabil, A & Osman, G. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. Isolate ANT-6. *Process Biochemistry,* **38:**1397-1403.

C

- **CALTEAU, A. (2005).** Relations évolutives entre les bactéries et les archées hyperthermophiles. Thèse de doctorat en microbiologie, *université de Bretagne occidentale, France,* 21-23.
- **Canganella, F & Wiegel, J. (2011).** Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften,* **98**:253–279.
- **Casamayor, E.O. (2009).** protists, bacteria and fungi: planktonic and attached. *Elsevier Inc*, 167-181.
- **CHARLIER, D & DROOGMANS, L. (2005).** Microbial Life at high temperature, the challenges, thestrategies. *Cellular and Molecular Life Sciences,* **62**: 2974-2984.
- **Coico, R. (2005).** Gram Staining. *Current Protocols in Microbiology* ,1-2.

D

- **Deepika, M & Satyanarayana, T. (2013).** Diversity of hot environments and thermophilic microbes. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (eds) Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. *Springer*, 3–60.
- **Delarras, C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire, Recherche de bactéries et de levures-moisissures. *Edition Lavoisier,* 113-114.
- **Demain, A.L., Newcomb, M. & Wu, J.D. (2005).** Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev***, 69:**124-154.
- **Demirjian D.C., Morís-Varas, F & Cassidy, S.C. (2001).** Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology,* **5**: 144–151.

F

- **Falcicchio, P, Wolterink-Van Loo, S, Franssen, M.C, van der Oost, J. (2014).** DHAP-dependent aldolases from (hyper) thermophiles: biochemistry and applications. *Extremophiles*, **18**:1–13.
- **Fekraoui, A & Kedaid, F-Z. (2005).** Geothermal resources and uses in Algeria: a country update report. *In: Proceedings.*
- **FERRERA, I & REYSENBACH, A.L. (2007).** Thermophiles in: encyclopedia of life sciences. *John Wiley & Sons*, 1-9.

G

- **Genc, B., Nadaroglu, H., Adiguzel, A & Baltaci, O. (2015).** Purification and characterization of an extracellular Cellulase from Anoxybacillus gonensis O9 isolated from geothermal area in Turkey. *J Environ Biol*, **36**:1319–1324.
- **Gomes, J., Steiner, W. (2004).** The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol*, **42** :223–235.
- **GOMRI, M.A. (2012).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. *Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires, Universié MENTOURI-CONSTANTINE***.**136p**.**
- **Gomri, M.A., Khaldi, T.E.M & Kharroub, K. (2018).** Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods. *Annals of Microbiology***, 68:**915–929.
- **GREGOIRE, P., FARDEAU, M.L., GUASCO, S., BOUANANE, A., MICHOTEY, V., BONIN, P., DUBOUR, K., CAMBAR, J., OLLIVIER, B. (2009).** Les microorganismes de l'extrême. *Press. Therm. Climat*, **146**:49-61.
- **Gupta, G., Srivastava, S., Khare, S. K &Prakash, V. (2014).** "Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment,". *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, **7**(2) : 371–380.
- **Gupta, R., Beg, Q.K & Lorenz, P. (2002***).* Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol,* **59** :15–32.
- **Gupta, R., Gigras, P., Mohapatran, H., Goswami, K.V & Chauhan, B. (2003).** Microbial α - amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry,* **38** :1599-1616.

H

- **Haaki, G.D., Rakshit, S.K. (2003).** Developments in industrially important thermostable enzymes. *Bioresour Technol***, 89**: 17-23**.**
- **HAYETTE, M.P., HUYNEN, P & MEEX, C. (2010).** TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE GENERALE. *Université de liége*, 1-62.
- **HOLDEN, J.F. (2009).** Extremophiles: Hot Environments in Encyclopedia of microbiology. **Elsevier**, **3** :127-146.
- **Hooper**, **A.B & DiSpirito, A.A. (2013).** Chemolithotrophy. *Elsevier Inc*, **1**:419–424.
- **Horikoshi, K & Bull, A.T. (2011)**. Prologue Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emergingfields of extremophiles In Extremophiles Handboo. *Eds. Springer*.
- **Hreggvidsson, G.O., Petursdottir, S.K., Bjornsdottir, S.H & Fridjonsson, O.H. (2012)** Microbial speciation in the geothermal ecosystem. In: Stan H, Fendrihan LS (eds) Adaption of microbial life to environmental extremes: novel research results and application. *Springer, Wien*, 37–68.
- **Hupé, J-F. (2008).**Enrichissement et recherche de certains activités enzymatiques produites des bactéries aérobies thermophiles. Mémoire de pour l'obtention du garde maîtrése Sciences en Microbiologie Appliquée, *Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier*.175p.

I

- **Ishino, S & Ishino, Y. (2013).** Chapter 17 DNA Polymerases and DNA Ligases**.** *Biotechnology of Thermophiles*, 429-475**.**

J

- **Joffin, J.N & Leyral, G. (2006).** Microbiologie Technique Tome 1 " Dictionnaire des techniques". *CRDP AQUITAINE*. *Bordeaux.* 189-250.

K

- **Kecha, M., Benallaoua, S., Touzel, J.P., Bonaly, R & Duchiron. F. (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, K.W & Lee, S.B. (2003).** Inhibitory Effect of Maillard Reaction Products on Growth of the Aerobic Marine Hyperthermophilic Archaeon Aeropyrum pernix. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, **69**(7) : 4325–4328.
- **Kumar, M., Yadav, A. N., Tiwari, R., Prasanna,R & Saxena, A.K. (2014).** "Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs,". *Annals of Microbiology*, **64**(2) : 741–751.
- **Kumar, S., Tsai, C.J & Nussinov, R. (2000**). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng*, **13** : 179–191.
- **Kumar. S., Dangi. A.K., Shukla, P., Baishya. D & Khare .S.k. (2019).** Thermozymes: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology*, **278 :**372-382**.**

L

- **Ladenstein, R & Ren, B. (2006).** Protein disulfides and protein disulfide oxidoreductases in hyperthermophiles. *FEBS J 273*, **(18):**4170–4185.
- **Lang, J.M., Darling, A.E & Eisen, J.A. (2013).** Phylogeny of bacterial and archaeal genomes using conserved genes: Supertrees and supermatrices. *PLoS ONE*, **8** : 62510.
- **Larbi, D.K. (2015).** isolement et caracterisation des souches productrices de lipase. Thèses de Doctorat en Microbiologie Moléculaire Et Protéomics, *universite djillali liabes sidi balabesse.*165p.
- **Li, W.F., Zhou, X.X & Lu, P. (2005).** Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances*, **23** :271–281.
- **Lieph, R., Veloso, F.A & Holmes, D.S. (2006).** Trends Microbiol, **14**(10):423–426.
- **López-López, O., Cerdán, M. E & & González Siso, M. I. *(*2014).** New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. *Current Protein and Peptide Science* **15** :445-455.

M

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

- **Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2011).** Textbook of diagnostic microbiology, 4th ed. *W. B Saunders Co., Philadelphia, PA.*
- **Mazzoli, R., Riedel, K & Pessione, E. (2017).** Bioactive compound from microbes. *Front Microbiol,* **8**:392.
- **Mehta, d & Satyanarayana, T. (2013).** Chapter 1 Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbe. Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial 3 Biotechnology. *Biotechnology of Thermophiles,* 4-60.
- **Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D & Sharma, A.K. (2016).** Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications, Biotech, **6**(81) :1-9.
- **MESBAH, N.M & WIEGEL, J. (2008).** Life at Extreme Limits The Anaerobic Halophilic Alkalithermophiles. *Ann. N.Y. Acad. Sci***, 1125:** 44–57.
- **Minic, Z., Serre, V & Hervé, G. (2006).** Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes rendus biologies,* **329:** 527–540**.**
- **Mohammad, B.T., Al Daghistani, H.I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S. & Kennes, C. (2017).** Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: Bacillus licheniformis and Thermomonas hydrothermalis Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology,* 1-12.
- **Morozkina , E.V., Slutskaya, E.S., Fedorova, T.V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I & Koroleva, O.V.(2010).** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **46** : 1-14.

N

- **Nascimento, W.C.A. do & Martins, M.L.L. (2004).** production and properties of an extracellular protease from thermophilic bacillus sp. *Brazilian Journal of Microbiology***, 35**:91-96.
- **Nguyen, S.T.C., Freund, H.L., Kasanjian, J & Berlemont, R. (2018).** Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy. *Appl. Microbiol. Biotechnol,* **102** :1629–1637.

P

- **Panasik, N., Brenchley, J.E & Farber, G.K (2000).** Distributions of structural features contributing to thermostability in mesophilic and thermophilic alpha/beta barrel glycosyl hydrolases. **Biochim. Biophys, 1543**: 189-201.
- **Panda, M.K., Sahu, M.K & Tayung, K. (2013).** Isolation and characterization of a thermophilic Bacillus sp. With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *IRANIAN J OURNAL OF MICROBIOLOGY*, **5**(2) : 159-165.
- **Pandey, A., Dhakar, K., Sharma, A., Priti, P., Sati, S & Kumar, B. (2015**). Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the Soldhar (95°C) and Ringigad (80°C) hot springs of Uttarakhand, India. *Ann Microbiol*, **65**:809–816.
- **Pandey, A., Nigam, P., Soccol., CR., Soccol, VT., Singh, D & Mohan, R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem***, 31**:52-135.
- **Pandey, S., Singh, S., Yadav, A.N., Nain, L & Saxena, A.K. (2013).** Phylogenetic diversity and characterization of novel and efficient cellulase producing bacterial isolates from various extreme environments. *Biosci. Biotechnol. Biochem***, 77**:1474-1480.
- **Pantazaki, A.A., Pritsa, A.A & Kyriakidis, D.A. (2002).** Biotechnologically relevant enzymes from Thermus thermophilus. *Appl Microbiol Biotechnol***, 58**(1*)* :1-12**.**
- **Park, C.B., Lee**, **S.B & Ryu, D.D. (2001).** L pyroglutamate spontaneously formrd from L- glutamate inhibits growth of the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus. *Applied and Environmenat microbiology***, 67**(8) : 3650-3654.
- **Pillot, G. (2018).** Biodiversités électroactives issues de sources hydrothermales profondes. Thèse de Doctorat en Océanographie*, l'Université d'Aix-Marseille.*230p.
- **Purcell, D., Sompong, U., Lau, C.Y., Barraclough, T.G., Peerapornpisal,Y& Pointing, S.B. (2007).** The effects of temperature, pH and sulphide on community structure of hyperthermophilic streamers in hot springs of northern Thailand. *FEMS Microbiol Ecol*, **60**:456–466.

R

- **Reddy, L. V.A., Wee, Y.-J., Yun, J.-S & Ryu, H.-W. (2008).** Optimization of alkaline protease production by batch culture of Bacillus sp. RKY3 through Plackett–

Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology* **, 99** :2242–2249.

- **Rehman, S., Shash, A. (2011).** Geothermal resources of Saudi Arabia– country update report. Proceedings World Geothermal Congress. *Antalya, Turkey: ACADEMIA.*
- **Reiner, K. (2010).** Catalase Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1-9.
- **Robinson-Rechavi, M., Alibes, A & Godzik, A. (2006**). Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: Lessons from structural genomics of Thermotoga maritima. *J. Mol. Biol,* **356** : 547–557.
- **Rolland, J.I., Gueguen, Y., Persillon, C., Masson, J.M & Dietrich, J. (2014).** Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon Thermococcus fumicolans .*FEMS Microbiology Letters,* **236** : 267-273.
- **Rubiano-Labrador, C., Díaz-Cárdenas, C., López, G., Gómez, J & Baena , S. (2019).** Colombian Andean thermal springs: reservoir of thermophilic anaerobic bacteria producing hydrolytic enzymes. *Extremophiles*, **23**:793–8.

S

- **Saibi, H. (2009).** Geothermal resources in Algeria. *Renew Sustain Energy Rev* **13**:2544–2552.
- **Satoshi, H. (2003).**Phototrophes anoxygéniques filamenteux à Hot Springs. *Microbe and Environments,* **18** :51–61.
- **Satyanarayana, T., Raghukumar, C. & Shivaji, S. (2005).** Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *current science,* **89**(1) :78-90.
- **Saxena, R., Dhakan, D.B., Mittal, P., Waiker, P & Chowdhury, A. (2017**). Metagenomic analysis of hot springs in Central India reveals hydrocarbon degrading thermophiles and pathways essential for survival in extreme environments. *Front Microbiol*, **7**:2123.
- **Selvarajan R, Sibanda T, Tekere M, Nyoni H, Meddows-Taylor S. (2017).** Diversity analysis and bioresource characterization of halophilic bacteria isolated from a south african saltpan. *Molecules*, 22:657–677.
- **Sen, SK., Mohapatra, S.K., Satpathy, S & Rao, G.T. (2010**). Characterization of hot water spring source isolated clones of bacteria and their industrial applicability. *Int J Chem Res,* **2**(1):1-7.

- **Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L & Gupta, J. (2002).** Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic Bacillus sp. RSJ-1. *Proc. Biochem*, **37** :1075–1084.
- **Shiraki, K., Nishikori, S., Fujiwara, S, Hashimoto, H., Kai, Y., Takagi, M & Imanaka, T. (2001).** Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterparts. *Eur. J. Biochem*, **268**: 4144-4150.
- **Singh, B., Poças-Fonseca, M.J., Johri, B.N & Satyanarayana, T. (2016).** Thermophilic molds: biology and applications. *Crit Rev Microbiol*, **42**(6):985–1006.
- **Singh, R.P., Buttar, H. K., Kaur,R & Manchanda,G. (2020).** The Multifaceted Life of Microbes: Survival in Varied Environments. *Microbial Versatility in Varied Environments*, 3-12.
- **Synowiecki, J. (2010).** Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *African Journal of Biotechnology*, **9**(42) :7020-7025.

T

- **Takacs-Vesbach, C., Mitchell, K., Jackson-Weaver, O. & Reysenbach, A.L. (2008).** Volcanic calderas delineate biogeographic provinces among Yellowstone thermophiles. *Environ Microbiol*, **10**:1681–1689.
- **Tango**, **M. S. A. & Islam, M. R. (2002).** *Potential of extremophiles for biotechnological and petroleum applications. Energy Sources*, **24(6):**543–559**.**
- **Tankeshwar, A. (2013).** Catalase test: principle, uses, procedure and results. Biochemical Tests for Gram Negative Bacteria. http://www.microbeonline.com.
- **Trivedi, S., Gehlot, H.S & Rao, S.R. (2006).** Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genetics ana Molecular Research*, **5** (4): 816-827.
- **Turner, P., Mamo, G. & Karlsson, E.N. (2007) .**Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact*, **6**:1-23.

U

- **Urbieta, M.S., Donati, E.R., Chan, K.G., Shahar, S., Sin,L. L & Goh, K.M.(2014).** Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*, 1-15.

V

- **Valverde, A., Tuffin, M & Cowan, D.A. (2012).** Biogeography of bacterial communities in hot springs: a focus on the actinobacteria. *Extremophiles*, **16**:669–679.
- **Van den Burg, B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in microbioligy*, **6** : 213-218.
- **Verma, P., Yadav, A.N., Shukla, L., Saxena, A.S & Suman, A. (2015).** Hydrolytic enzymes production by thermotolerant Bacillus altitudinis IARI-MB-9 and Gulbenkiania mobilis IARI-MB-18 isolated from Manikaran hot springs. *International Journal of Advanced Research*, **3**(9) : 1241- 1250.
- **Vieille, C. and Zeikus, G.J. (2001)** .Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol*, **65** :1-43.
- **Vieille, C., Epting, K.L., Kelly, R.M & Zeikus, J.G. (2001).** Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of Bacillus licheniformis xylose isomerase. *Eur. J. Biochem*, **268**: 6291-6301.

- **Vyas, S & Lachke, A. (2003).** Biodeinking of mixed office waste paper by alkaline active cellulases from alkalotolerant Fusarium sp. *Enzyme Microb. Technol*, **32**:236-245.

W

- **Wheelis, M. (2008).** Principles of modern microbiology. *Jones &Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA.*
- **Whitaker, R.J., Grogan, D.W., Taylor, J.W. (2003).** Geographical barriers isolate endemic population of hyperthermophilic archaea. *Science*, **301**:976–978.

- **Woese, C.R., Kandler, O & Wheelis, M.L. (1990).** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domainsArchaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** : 4576–4579.

Y

- **Yadav, A.N., Sachan, S.G., Verma, P., Kaushik, R & Saxena, A.K. (2015).**Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic Bacilli isolated from three sub-glacial lakes of NW Indian Himalayas. J. *Basic Microbiol,* **55**:1-14.
- **Yoneda, Y., Yoshida, T., Yasuda, H., Imada, C & Sako,Y. (2013).** "Athermophilic, hydrogenogenic and carboxydotrophic bacterium, Calderihabitans maritimus gen. nov, sp from a marine sediment core of an undersea caldera,".International. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63**(10) : 3602–3608.

Annexes

Annexe 1 : Solutions

- **l'eau physiologique**

Chlorure de sodium……9g

Eau distillée …….....1000ml

- **Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo……..0.1g

Eau distillé…….....…...100 ml

Annexe 2 : Milieux pour les tests enzymatiques

- **Gélose à l'amidon**

TTM……...l00 ml

Amidon ……01 g

- **Gélose au lait**

Poudre de lait ……...….05 g

Eau distillée …….....50 ml

Agar……02 g

Stériliser à l'autoclave 15min à 115 °C.

- **Milieu CMC**

CMC ……..……..……..… 20g

Extrait de levure……...…..……...5g

Agar ……..……..15g

Eau distillé…….....1000ml

pH=5

- **Milieu de base contenant 1% (v/v) de ou de Tween 80**

TTM……...100ml

Tween 80…….....1ml

- **Milieu de base additionné de 2,5% (v/v) d'huile d'olive**

Milieu TTM……...100ml

L'huile d'olive…….2,5 ml

Annexe 3 : coloration de Gram

❖ Réactifs

➢ Violet de gentiane

Violet de gentiane…….....1g

Alcool éthylique à 95% …….....10ml

Phénol …….....2g

Eau distillée…….....100ml

➢ Lugol de Gram

Iodure de potassium ……..…….……..... 1g

Iode ……..…….1g

Eau distillée ……..……..……300ml

➢ Fuschine de ziehl

Fuschine ……..……...……...1g

Alcool éthylique à 95%.....10ml

Phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée……..5g

❖ Préparation du Frottis

- Sur une lame de microscope, déposer une goutte d'H_2O.
- A l'aide d'une anse stérilisé (passant sous le bec benzène), toucher une colonie pour prélever des bactéries.
- Déposer ce prélèvement au milieu de lame, puis passer la lame dans la petite flamme du bec bunsen pour fixer à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de violer de gentiane (cristal violer) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 min, puis rincer à l'eau.
- Déposer quelques gouttes de lugol (un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries) sur le frottis, Laisser agir 1 min et rincer brièvement à l'H2O.
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 s). Rincer avec l'eau. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparait. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

- Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 min. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 40x puis grossissement 100x avec une goutte d'huile à immersion).

Annexe 4 : Test de Catalase

❖ **Technique**

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
- Dissocier la colonie dans la goutte.
- Observer immédiatement.

❖ **Lecture**

➢ Catalase positive : dégagement immédiat de bulles de gaz.

➢ Catalase négative : absence de dégagement de bulles de gaz.

Annexe 5 : Test d'oxydase

❖ **Technique**

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné.
- Avec une pipette Pasteur prélever une colonie et la déposer doucement sur le disque.

❖ **Lecture**

➢ Oxydase positive : virage de couleur rose-rouge.

➢ Oxydase négative : absence de couleur.

Annexe 6 : Tableau de Lecture et l'identification

Test	Groupements active	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranos	Béta-galactosidase	Incolore	jaune

	ide			
ADH	**Arginine**	**Arginine déshydrolase**	**Jaune**	**Rouge**
LDC **ODC**	**Lysine** **Ornithine**	**Lysine décarboxylase** **Orthine décarboxylase**	**Jaune** **Jaune**	**Orangé** **Rouge /orange**
CIT	**Sodium citrate**	**Utilisation de citrate**	**Vert**	**Bleu-vert/orange**
H2S	**Thiosulfate de sodium**	**Production de H 2S**	**Incolore**	**Noir**
URE	**Urée**	**Uréase**	**Jaune**	**Rouge/orange**
TDA	**Tryptophane**	**Tryptophane désaminase**	**Jaune**	**Marron**
IND	**Tryptophane**	**Production d'indole**	**Incolore**	**Rose**
VP	**Pyruvate de sodium**	**Production d'acétoine**	**VP1+VP2**	
			Incolore	**Rose /rouge**
GEL	**Gélatine emprisonnant de charbon**	**Gélatinase**	**Pas de diffusion de pigment**	**Diffusion de pigment noir**
GLU	**Glucose**	**Glucose Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
MAN	**Mannitol**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
INO	**Inositol**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
SOR	**Sorbitol**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
RHA	**Rhamnose**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
SAC	**Sucrose**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
MEL	**Mlebiose**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
AMY	**Amygdaline**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
ARA	**Arabinose**	**Fermentation**	**Bleu /bleu**	**Jaune**

		/oxydation	**vert**	
NO 3-NO2	**GLU tube**	**Production de NO2 réduction au stade N2.**	**Jaune**	**Rouge**
			NIT 1+NIT 2, 2-3 min.	