

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

ⵍⵓⵎⵓⵔ ⵎⵎⵎⵔ ⵉⵔⵓⵣⵓⵓ



Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie

Option: Biotechnologie Microbienne

Caractérisation de bactéries thermophiles: Criblage d'activités enzymatiques

Présenté par: HASSAD Cylia

IMMOUNE Rezika

Soutenu publiquement le 04/07/2019 devant le jury composé de:

M^{me} BEN AHMED DJILALI A.	MCA	UMMTO	Présidente du jury
M^r BOUACEM K.	MCB	UMMTO	Promoteur
M^{me} ASMANI K. L.	MCB	UMMTO	Co-promotrice
M^{me} GUECHTOULI S.	MAA	UMMTO	Examinatrice

Année universitaire: 2018/2019



Remerciements

C'est avec un très grand plaisir que nous remercions infiniment notre promoteur Mr Bouacem K, qui nous a accordé l'honneur de diriger ce travail. Qu'il trouve en ces mots toute notre gratitude, et nos sentiments de reconnaissance, pour sa confiance en nous, sa générosité et son engagement.

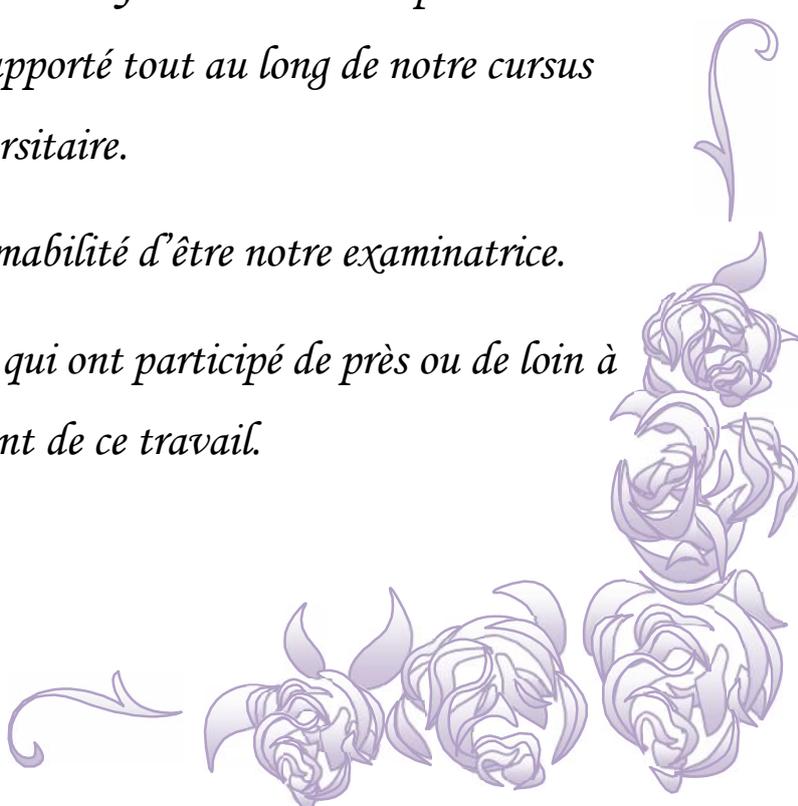
Nos sincères remerciements vont aussi à notre co-promotrice Mme Asmani K, L. pour sa contribution, ses conseils et sa gentillesse.

Nous tenons également à exprimer notre grande considération aux membres du jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail:

Mme Ben Ahmed Djillali A. qui nous a fait l'honneur de présider le jury, pour tout ce qu'elle nous a apporté tout au long de notre cursus universitaire.

Mme Guechtouli S. qui a eu l'amabilité d'être notre examinatrice.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.



Dédicaces

Je dédie ce présent travail:

*À Mes très chers parents **AHMED** et **FATIMA** pour
l'ampleur des sacrifices consentis pour mon instruction et
mon bien être, aucune dédicace ne saurait exprimer
l'amour, le respect et l'estime que je porte pour vous.*

*À mes adorables frères **MOHAMMED** et **MASSIL**, ainsi
qu'à mes sœurs **ROSA** et **MAZGHA**.*

*À mon mari **SAID**.*

*À la mémoire de mon ami **HOCINE** qui nous a quitté tôt,
que Dieu lui accord sa miséricorde.*

*À ma binôme **REZIKA** et tous ceux qui me sont chers.*

CYLIA

Dédicaces

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie
ce modeste travail:*

À ma plus chère du monde, à YEMMA,

*Parce qu'elle est mon école, mon enseignante, ma
conseillère et mon soutien continuel. Jamais je ne saurai la
remercier comme il se doit.*

Au meilleur de tous, à VAVA,

*Parce qu'il est toujours à mon côté, m'encourageant et
m'éclairant le chemin par ses conseils gracieux.*

*À mes chers frères MALIK et LAMINE, à mes
charmantes sœurs NABILA, NAIMA et SABRINA,
Pour leur affection, compréhension, aide et patience.*

*Je dédie aussi ce travail à tous mes amis, en particulier,
CYLIA et THIZIRI.*

À tous les professeurs qui m'ont enseigné.

Et à tous ceux qui me sont chers.

REZIKA

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures et tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Les écosystèmes chauds..... 3

1. Notions sur les écosystèmes chauds 3

1.1. Sources thermales dans le monde..... 3

1.2. Sources thermales en Algérie 4

II. Les organismes thermophiles..... 6

1. Définition..... 6

2. Mécanismes d'adaptation à la thermophilie..... 7

2.1. Thermostabilité des acides nucléiques (ADN, ARN) 7

2.2. Thermostabilité des protéines 8

2.3. Thermostabilité des lipides 8

3. Biodiversité de certaines bactéries thermophiles 9

3.1. *Bacillus* 9

3.2. *Anoxybacillus* 9

3.3. *Tepidimonas* 10

3.4. *Hydrogenophilus* 10

3.5. <i>Albidovolum</i>	11
III. Métabolites produits par les bactéries thermophiles	11
1. Enzymes.....	11
1.1. Définition	11
1.2. Classification	11
1.3. Origines des enzymes.....	12
1.3.1. Amylases	13
1.3.2. Cellulases	13
1.3.3. Protéases	14
1.3.4. Chitinases	15
1.3.5. Kératinases	16
1.3.6. Lipases	17
2. Autres métabolites.....	18
2.1. Exopolysaccharides.....	18
2.2. Polyhydroxyalcanoates	18
IV. Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles.....	19
V. Avantages d'applications des bactéries thermophiles	20
VI. Inconveinants d'applications des bactéries thermophiles.....	20
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 80%;">Matériel et Méthodes</div>	
I. Matériel biologique	22

II. Matériel non biologique.....	22
III. Méthodes.....	22
1. Revivification des souches	22
2. Caractérisation des souches.....	22
2.1. Etude morphologique	22
2.1.1. Examen macroscopique.....	22
2.1.2. Examen microscopique	22
2.2. Etude des caractères biochimiques.....	23
2.2.1. Etude du métabolisme énergétique	23
2.2.2. Etude du métabolisme glucidique	24
2.2.3. Etude du métabolisme des acides organiques	24
2.2.4. Recherche du type respiratoire	24
2.3. Etudes des caractères physiologiques	25
2.3.1. Influence de la température sur la croissance.....	25
2.3.2. Influence du pH sur la croissance	25
2.3.3. Influence de la salinité.....	25
3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	25
3.1. Amylases	25
3.2. Cellulases	25
3.3. Caséinases	26
3.4. Chitinases	26

3.5. Xylanases	26
3.6. Kératinases	26
3.7. Activités lipolytiques.....	26
Résultats et discussion	
1. Résultats de la revivification des souches.....	28
2. Résultats de la caractérisation des souches.....	28
2.1. Etude morphologique	28
2.1.1. Examen macroscopique.....	28
2.2.2. Examen microscopique	30
2.2. Etude des caractères biochimiques.....	31
2.2.1. Métabolisme énergétique	31
2.2.2. Métabolisme glucidique	31
2.2.3. Métabolismes des acides organiques	32
2.2.4. Métabolisme respiratoire.....	32
2.3. Caractérisation physiologique des isolats	34
2.3.1. Température	34
2.3.2. Spectre du pH.....	35
2.3.3. Salinité.....	35
3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires	36
Conclusion et perspectives	41

Références bibliographiques 42

Annexes.

Liste des figures

Figure 1: Exemples de biotopes naturels des thermophiles 4

Figure 2: Arbre phylogénétique universel basé sur les petites sous unités de l'ARNr16s 7

Figure 3: Aspects des colonies formées sur gélose nutritive 28

Figure 4: Exemples de quelques résultats d'activités hydrolytiques obtenues 38

Figure 5: Effectifs des souches ayant pu synthétiser les différentes enzymes 40

Liste des tableaux

Tableau I: Exemples de températures dans quelques sources chaudes mondiales 3

Tableau II: Exemples de températures dans quelques sources thermales algériennes 5

Tableau III: Les principales classes d'enzymes dans le système EC 12

Tableau IV: Caractères cultureux des souches cultivées à 60°C 29

Tableau V: Etude microscopique à l'état frais et à l'état fixé des isolats bactériens 30

Tableau VI: Etude des caractères biochimiques des souches bactériennes 33

Tableau VII: Physiologie de la croissance des souches sur milieu GN en fonction de la température, pH et du NaCl 34

Tableau VIII : Résultats des activités enzymatiques recherchées à la température 37 et 60°C 39

Introduction

La découverte par le microbiologiste américain Thomas Brock, à la fin des années soixante, de populations microbiennes abondantes proliférant dans les sources chaudes du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis, à des températures comprises entre 50°C et 90°C, allait ouvrir la voie à une nouvelle ère passionnante de la microbiologie. Désormais, tous les milieux extrêmes de la planète allaient être l'objet de nombreuses investigations (Guezennec, 2004). Par ailleurs, d'après des études réalisées à ce sujet, en raison de la position de l'Algérie dans un cadre géologique tectoniquement actif, il se trouve qu'il existe sur son territoire plus de 200 sources thermales dont les températures mesurées à l'émergence varient de 19 à 98 °C. À l'exemple de Hammam Righa, situé à 100 Km au sud-ouest d'Alger dans la wilaya de Ain Defla, les eaux jaillissantes sont salines, sulfatées, calciques et hyperthermales (69 °C) (Belhai et *al.*, 2013).

Bien que les environnements extrêmes sont qualifiés d'anthropocentriques, à priori hostiles à la vie, en revanche, ils ne constituent pas des milieux extrêmes pour les populations microbiennes qui s'y développent. Il s'agit souvent de leur milieu de vie exclusif, dans lequel plusieurs facteurs, en plus de la température, la salinité, le pH, la solubilité de l'oxygène et la disponibilité en nutriments, contrôlent leur vitesse de croissance et leur biodiversité. En dépit de l'importance scientifique et potentiellement économique, les connaissances sur ces microorganismes, dits « extrémophiles », présentant des composants cellulaires potentiels, restent limitées (Querellou, 2004).

Comme les thermophiles ont généralement un optimum de croissance supérieur à 45 °C, ils ont pu être isolés depuis diverses régions de la terre comme les sources chaudes, les fonds marins et les zones volcaniques (Stetter et *al.*, 1993). Par conséquent, ils possèdent des métabolites thermostables présentant un réel intérêt biotechnologique, dont il convient de citer en priorité les enzymes qui sont largement exploitées dans le monde industriel (Laubier, 2012). En effet, le succès remarquable que connaissent les industries employant les enzymes d'origine microbienne explique l'augmentation de leur demande mondiale d'une année à une autre. Par ailleurs, sur la base d'un criblage très étendu et orienté de la collection des thermophiles, plusieurs enzymes présentant des propriétés intéressantes ont été mises en évidence. Toutefois, il apparaît pertinent, voire stratégique de les explorer afin d'améliorer certains procédés de fabrication, sûrement travaillant en condition de hautes températures, telles que l'industrie du textile, la papeterie, la dépollution, l'industrie alimentaire et bien d'autres (Gregoire et *al.*, 2009).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de bactéries thermophiles, isolées des eaux de Hammam Righa, ainsi qu'au criblage de leurs activités enzymatiques extracellulaires d'intérêts biotechnologiques. Cette étude est structurée en trois parties:

- La première partie c'est une synthèse bibliographique traitant les microorganismes thermophiles, leur biodiversité, leurs écologies, leurs modes d'adaptations, les métabolites qu'ils produisent ainsi que leurs applications biotechnologiques.
- La deuxième partie présente la partie pratique dans laquelle nous avons abordé deux aspects:
 - La caractérisation macroscopique, microscopique, physiologique et biochimique des souches.
 - La mise en évidence de quelques activités enzymatiques extracellulaires.
- La troisième partie expose les résultats obtenus et leurs discussion, suivis par une conclusion générale et des perspectives.

Synthèse bibliographique

I. Les écosystèmes chauds

1. Notions sur les écosystèmes chauds

Les microorganismes thermophiles ainsi que les hyper-thermophiles habitent des écosystèmes thermiques naturels qui sont généralement associés à des zones tectoniques actives volcaniques ou géothermiques, telles que des sources hydrothermales, océaniques profondes et sources chaudes terrestres. Ils sont également retrouvés dans des biotopes artificiels chauds comme les canalisations domestiques d'eau chaude, le compost, les bioréacteurs...etc. (Ferrera et Reysenbach, 2007).

En fait, certains environnements naturels chauds tels que les volcans sous marins, fumeroles et événements peuvent avoir des températures qui dépassent les 300 °C. Or, il existe aussi d'autres où la température est aux alentours de 65 °C, c'est le cas des réservoirs pétroliers ou encore des sols chauffés par l'énergie solaire (Canganella et Wiegel, 2014).

1.1. Sources thermales dans le monde

Dans les biotopes terrestres, les sources chaudes sont fréquentes, les plus explorées sont situées aux Etats-Unis, en Russie, en Islande, à la Nouvelle Zélande et au Japon (Figure 1). Se sont des geysers qui sont définis comme étant des jets d'eaux chaudes ou de bulles (Ferrera et Reysenbach, 2007).

La température dans ces systèmes écologiques est naturellement variable d'une source à une autre (Tableau I), ce qui est à l'origine d'une biodiversité microbienne très importante (De Castro et *al.*, 2016).

Tableau I: Exemples de températures dans quelques sources chaudes mondiales (Hug et *al.*, 2014; Menzel et *al.*, 2015).

Source chaude	Température en °C
Yellowstone (U.S.A)	92
Champagne pool (Nouvelle Zélande)	45-75
Uzon caldera (Russie)	61-64
Krísuvík (Islande)	90

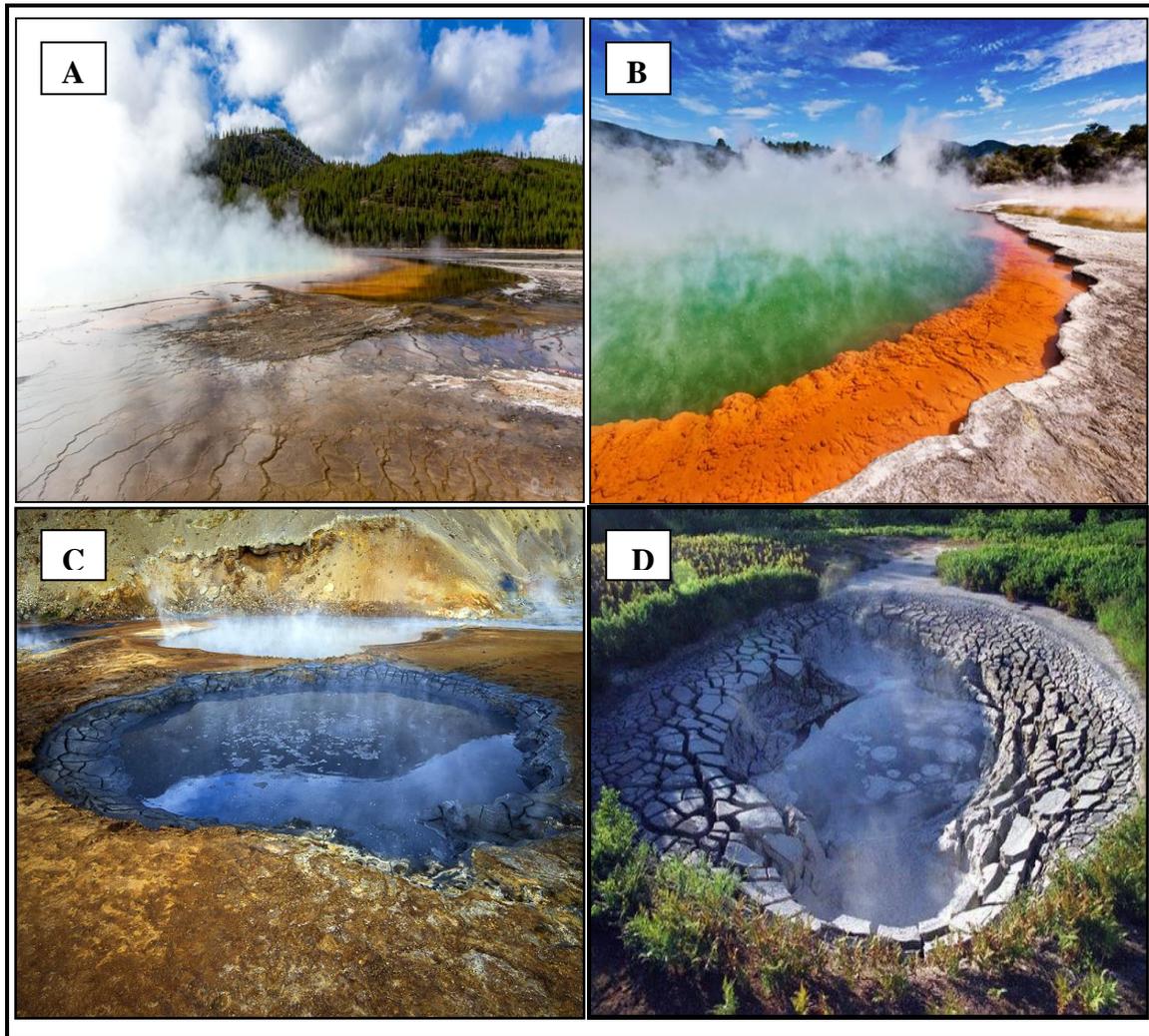


Figure 1: Exemples de biotopes naturels des thermophiles. (A). Parc national de Yellowstone (Etats Unis);¹ (B). Champagne Pool (nouvelle Zélande);² (C). Krísvík (Islande);³ (D). Uzon caldera (Russie)⁴.

1.2. Les sources thermales en Algérie

L'Algérie, le plus grand pays de la région méditerranéenne et du nord africain est doté d'un potentiel géothermique considérable, caractérisé par la présence de nombreuses stations d'eaux thermo-minérales réparties sur l'ensemble de son territoire. Ces sources thermales sont, non seulement, très abondantes mais aussi très riches dans leur composition chimique notamment en minéraux (Saibi, 2015).

¹<https://www.smartrippers.com/fr/site/midway-geyser-basin-les-incroyables-couleurs-de-grand-prismatic-spring>

²https://fr.wikipedia.org/wiki/Champagne_Pool

³<http://www.nielsthye.dk/wp-content/uploads/2012/07/MGL5704.jpg>

⁴http://izverzhenie-vulkana.ru/2015/08/kaldera_vulkana_uzon_367094.html

Synthèse bibliographique

En effet, plus de 240 sources thermales ont été répertoriées. Elles sont distribuées sur les quatre coins du pays et leur nombre augmente au fur et à mesure que l'on se rapproche de la région Nord (Saibi, 2015). Parmi ces stations, les majeures et les plus populaires sont: Hammam Meskhoutine (H. Debagh) et Hammam Guergour à l'est; Hammam Bouhanifia, Hammam Bouhadjar, Hammam Bougharara et hammam Righa à l'ouest; ainsi que Hammam Salihine au sud (Fekraoui et Kedaid, 2005). Ces sources sont reconnues comme étant des niches écologiques qui abritent une large communauté de bactéries anaérobiques thermophiles, présentant des propriétés intéressantes d'un point de vue biotechnologique (Bouacem et al., 2014; Bouanane et al., 2016). L'importance accordée à la température et/ou à la composition des eaux jaillissantes de ces sources explique leur large exploitation en balnéothérapie et médecine thermique (Boughlali, 2003).

Tableau II: Exemples de températures dans quelques sources thermales algériennes (Fekraoui et Kedaid, 2005).

Source thermale	Température (°C)
Hammam Maskhoutine	95-98
Hammam Guergour	44
Hammam Bouhanifia	68
Hammam Bouhadjar	65
Hammam Boughrara	37-43
Hammam Righa	68
Hammam Salihine	70

La composition en minéraux et nutriments, la concentration en gaz et le pH qui varie de 1 à 10 expliquent relativement, la variété des communautés microbiennes habitant ces régions thermiques selon leurs conditions physiques et géochimiques (Ferrerai et Reysenbach, 2007).

II. Les organismes thermophiles

1. Définition

Les microorganismes croissent plus rapidement à une température donnée, il s'agit de la température optimale de croissance sur laquelle Karl Stetter s'est basé pour classer les bactéries en trois groupes: les psychrophiles, les mésophiles et les thermophiles.

Plusieurs définitions ont été proposées, la plus connue est celle de Thomas Brock. Ce dernier qualifie un organisme thermophile par un être vivant dont la température optimale de croissance est au dessus de 60 °C. Par contre, la définition la plus large a été proposée par Stetter, définissant un thermophile par un organisme qui se développe à une température optimale de 45 °C. Elle a mis l'accent sur trois sous groupes au sein des thermophiles qui sont (Laubier, 2012):

- Les thermophiles modérés (optimum entre 55 et 65 °C);
- Les thermophiles extrêmes (optimum entre 65 et 80 °C);
- Les hyper thermophiles (optimum supérieur à 80 °C).

Un arbre du vivant est proposé (Figure 2), inféré sur la base des séquences de l'ARNr 16s et raciné entre les bactéries d'une part et les archées et les eucaryotes d'autre part. (Iwabe et *al.* 1989). Le positionnement des hyper-thermophiles près de la racine de l'arbre phylogénétique qui est basé sur l'ARNr16s a favorisé l'hypothèse que le milieu pré-biotique était chaud, suggérant que les thermophiles aient précédé les mésophiles dans l'histoire des premières formes de vie (Woese et *al.*, 1990).

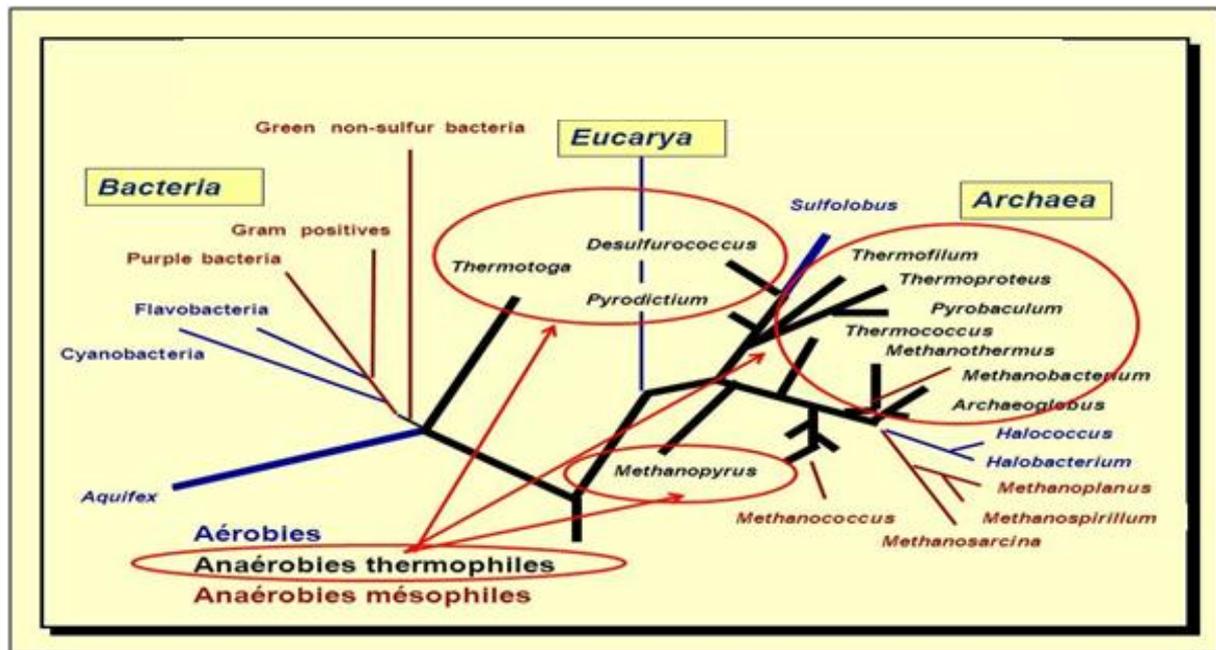


Figure 2: Arbre phylogénétique universel basé sur les petites sous-unités de l'ARNr16s.¹

2. Mécanismes d'adaptation à la thermophilie

Parmi les caractéristiques des thermophiles, la capacité de vivre à des températures supérieures à celles tolérées par les autres organismes vivants (Bertrand et *al.*, 2011). Pour se développer dans de telles conditions, les thermophiles ont subi de nombreuses adaptations, ce qui a permis le maintien de leur intégrité ainsi que leurs fonctions (Niehaus et *al.*, 1999). De ce fait, leurs macromolécules (ADN, protéines et lipides) possèdent des propriétés particulières (Bertrand et *al.*, 2011).

2.1. Thermostabilité des acides nucléiques (ADN, ARN)

L'une des premières questions posée est celle de la stabilité du matériel génétique. Sachant que la composition des acides nucléiques des microorganismes thermophiles est identique à celle des mésophiles, et qu'à des températures élevées, l'ARN est dégradé et l'ADN est dénaturé *in vitro* (séparation des deux brins de la double hélice), puis dégradé (Quérellou et Guézennec, 2010); plusieurs mécanismes contribuant à la stabilité et la réparation des acides nucléiques chez les thermophiles ont été identifiés (Bertrand et *al.*, 2011):

✓ **L'ADN gyrase reverse:** cette enzyme introduit des super-enroulements positifs au niveau de l'ADN, et enroule une protéine manteau à l'emplacement des dommages, réduisant

¹<https://slideplayer.fr/slide/10395675/33/images/11/Arbre+phylog%C3%A9n%C3%A9tique+universe1.jpg>

ainsi le taux de rupture de la double hélice et donc assurer une meilleure stabilité vis-à-vis de la température.

✓ **Les protéines similaires aux histones des eucaryotes:** ces protéines sont liées à l'ADN et contribuent à sa compaction donc à sa stabilité.

✓ **Accumulation d'une grande quantité d'osmolytes:** la présence de solutés compatibles, par exemple de fortes concentrations intracellulaires en 2,3-diphosphoglycérate de potassium cyclique chez *Methanopyrus* sp. protège l'ADN contre des lésions chimiques telles que les dépurinations, ce qui contribue à la stabilisation de l'ADN en augmentant sa température de fusion (Charlier et Droogmans, 2005).

✓ **Contenu (Guanine + Cytosine):** un contenu accru en (G+C) des ARN de transfert et des ARN ribosomiques pourrait stabiliser leurs conformations dans les conditions extrêmes (Charlier et Droogmans, 2005).

2.2. Thermostabilité des protéines

Les protéines des thermophiles présentent des caractéristiques spécifiques qui sont à l'origine de leur thermostabilité. Bertrand et ses collaborateurs ont mis en évidence :

✓ **La présence des centres hydrophobes:** ils diminuent la tendance de la protéine à se déplier. En effet, il a été démontré que c'est le repliement de la protéine qui contribue le plus à sa résistance à la chaleur.

✓ **La présence d'interactions ioniques nombreuses à la surface des protéines:** elles contribuent au maintien des protéines entre elles.

✓ **La présence des protéines chaperonnes du choc thermique:** elles interviennent dans le repliement des protéines partiellement dénaturées.

2.3. Thermostabilité des lipides membranaires

Les lipides membranaires des microorganismes thermophiles sont des tétraéthers de dibiphytanyle. Ils sont naturellement résistants aux températures élevées (Bertrand et *al.*, 2011). Leur principal moyen d'adaptation consiste à l'augmentation de la longueur des chaînes acyles et à l'élévation du degré de saturation en acides gras, ramification et cyclisation (Charlier et Droogmans, 2005). De plus, pour limiter les effets néfastes des hautes températures sur la perméabilité cellulaire, certains thermophiles tendent à utiliser des systèmes antiports proton-sodium non stœchiométriques pour générer un deuxième gradient sodium indépendant de la température du milieu (Albers et *al.*, 2001).

3. Biodiversité de certaines bactéries thermophiles

3.1. *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est établi par Cohn en 1872. Il fait partie des microorganismes les plus abondants dans la nature; étant ubiquitaire, il colonise principalement le sol, mais on peut également le trouver dans les eaux, les aliments...etc. (Elshagabee et al., 2017). C'est le genre le plus vaste et le plus important dans le monde bactérien (Fritze, 2004). En 2015, il contenait plus de 299 espèces et 7 sous-espèces (Euzéby, 2015).

Des études ont démontré que la souche *Bacillus licheniformis* (BL010) dégrade efficacement l'aflatoxine B1 qui est un polluant des produits agricoles. Cependant, une solution enzymatique brute de cette souche présentait le niveau de dégradation le plus élevé (97,3 %) et cela après trois périodes d'incubation (Wang et al., 2018).

3.2. *Anoxybacillus*

Ce sont des bactéries ayant un optimum de croissance qui varie de 50 à 60 °C (Paul et al., 2012). *Anoxybacillus flavothermus*, classée initialement parmi les bactéries du genre *Bacillus* a été isolée pour la première fois à partir d'une source thermique chaude en Nouvelle Zélande (Heinemann et Saenger, 1982). Par la suite, aux alentours des années 2000, Pikuta est parvenu à isoler la même espèce depuis le fumier d'animaux (Pikuta et al., 2000).

Ces dernières années, 19 espèces et 2 sous-espèces appartenant au genre *Anoxybacillus* dont on peut citer *A. flavothermus* subsp. *Yunnanensis* et *A. kanchatkinsis* subsp. *Asaccharedens*, ont été dénombrées (Kian et al., 2013).

D'après les recherches, il a été démontré que le genre *Anoxybacillus* sécrète une variété d'enzymes lignocellulolytiques thermostables telles que les cellulases et les xylanases qui jouent un rôle important dans la dégradation de la biomasse (Ellis et Magnuson, 2012). Certaines des xylanases et xylosidases ont déjà été caractérisées à partir du genre *Anoxybacillus* (Goh et al., 2013), alors qu'il existe encore de nombreuses enzymes xylanolytiques prédites codées par les bactéries du même genre qui doivent encore être isolées et caractérisées. *Anoxybacillus kamchatkinsis*, décrite pour la première fois par Kevbrin et ses collaborateurs, a été isolée de la vallée de Geysir, située dans la péninsule du Kamtchatka (région extrême-orientale de la Russie) (Kevbrin et al., 2005). Cependant, à notre connaissance, aucune caractérisation enzymatique supplémentaire de cette souche n'a été rapportée à ce jour (Yadav et al., 2018).

3.3. *Tepidimonas*

Le genre *Tepidimonas* comporte des espèces isolées de sources chaudes à températures modérément élevées comprises entre 50 et 60 °C (Dhakan et al., 2016). Il est caractérisé par un taux de croissance faible et un mécanisme de métabolisation de protéines lent (Han et al., 2017).

L'espèce *Tepidimonas taiwanensis* a été isolée à partir des sources chaudes du sud de Taïwan (Chen et al., 2006), de la Roumanie et de l'Inde centrale (Coman et al., 2013 ; Dhakan et al., 2016). En outre, *Tepidimonas* spp. a été découverte en Italie dans des circuits d'eau industriels à des températures égales ou supérieures à 40 °C (Chiellini et al., 2014). La souche MB2 de *Tepidimonas taiwanensis* a été isolée d'une source thermale située dans le centre de l'Inde. Son génome présente les propriétés du métabolisme du soufre, de la fixation de l'azote, du métabolisme de l'ammoniac, de l'assimilation des acides organiques et d'une grande variété de protéases (Dhakan et al., 2016).

3.4. *Hydrogenophilus*

Ce genre a été créé pour la première fois aux alentours de 1999 (Hayashi et al., 1999) et isolé d'un sol à la périphérie d'une source thermale. Les isolats étaient initialement affiliés au genre *Pseudimonas* et *Flavobacterium* (Goto et al., 1977; Goto et al., 1978). Il comprend deux espèces modérément thermophiles qui sont: *Hydrogenophilus thermoluteolus* (souche type NBRC 14978T), isolée d'un site géothermique au Japon (Hayashi et al., 1999) et *Hydrogenophilus hirschii* (souche type DSM 11420T), isolée depuis le Parc National de Yellowstone, USA (Stöhr et al., 2001).

La souche TH-1 *Hydrogenophilus thermoluteolus* (anciennement appelée *Pseudomonas oxygenothermophila*) est une betaprotéobactérie, aérobie, modérément thermophile, isolée du sol autour d'une source thermale située dans la péninsule d'Izu, au Japon (Goto et al., 1977; Hayashi et al., 1999). Cette bactérie, étant chimiolithoautotrophe facultative, peut se développer non seulement de manière autotrophe sur des composés de l'hydrogène ou du soufre en tant que donneur d'électrons et du dioxyde de carbone en tant que source de carbone, mais également de manière hétérotrophe en milieu organique (Goto et al., 1977; Miyake et al., 2007). Elle fixe le dioxyde de carbone via le cycle Calvin-Benson-Bassham (CBB). La température optimale de croissance de la souche TH-1 est de 52 °C et son taux de croissance spécifique maximum dans des conditions autotrophes optimales a été déterminé à 0,68 h⁻¹, ce dernier est qualifié comme le plus élevé parmi les taux de croissance des autotrophes (Goto et al., 1977).

Des bactéries du genre *Hydrogenophilus* sont localisées dans des régions géothermales du monde entier et l'ADN de *H. thermoluteolus* a également été identifié au niveau des zones d'accumulations des glaciers de l'Antarctique (Arai et al., 2018).

3.5. *Albidovulum*

Le genre *Albidovulum* a été proposé comme nouveau genre bactérien, très proche phylogénétiquement du genre *Rhodovulum*, il y a près de quinze ans. Son premier membre nommé est *Albidovulum inexpectatum*, légèrement thermophile et non photosynthétique (Albuquerque et al., 2002). Depuis lors, une seule espèce supplémentaire a été isolée et caractérisée, c'est *Albidovulum xiamenense* (Yin et al., 2012). Or, les deux organismes sont modérément thermophiles et halophiles, isolés à partir de sources thermales (Màrquez et Blamey, 2019).

En 2019, la souche SLM16 a été isolée d'un échantillon d'eau de mer et de sédiment de sable prélevés dans une fumerole côtière située à Whalers Bay, dans l'île de Déception située en Antarctique qui est la caldera d'un volcan actuellement en activité. Il s'est avéré qu'elle a la capacité de croître à une température modérée allant de 60 à 66 °C. Appartenant au genre bactérien marin *Albidovulum*, cette souche est étroitement apparentée à l'espèce *Albidovulum inexpectatum* d'après une analyse phylogénétique. Le premier microorganisme de ce genre isolé de l'Antarctique a présenté une activité amine-transaminase (Màrquez et Blamey, 2019).

III. Les métabolites produits par les bactéries thermophiles

1. Les enzymes

1.1. Définition

Les enzymes sont des macromolécules biologiques, synthétisées par les organismes vivants dans le but d'effectuer des réactions biochimiques nécessaires à leurs activités métaboliques intra et/ou extracellulaires. Celles-ci sont généralement appelées « Biocatalyseurs » (Anbu et al., 2013).

1.2. Classification

La première classification des enzymes a été proposée en 1956 par la Commission des enzymes (EC), puis suite à plusieurs révisions, une nomenclature finale a été mise en œuvre en se basant sur le type de réaction catalysée, le substrat utilisé ainsi que la présence d'éventuels cofacteurs (Combes et Monsan, 2009).

Les classes d'enzymes ainsi constituées sont au nombre de six comme le démontre le Tableau III (Robinson, 2015).

Tableau III: Les principales classes d'enzymes dans le système EC.

Premier chiffre E.C	Classe d'enzymes	Type de réaction
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydoréduction
E.C.2	Transférases	Transfère de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse des différentes liaisons chimiques
E.C.4	Lyases	Elimination des groupements
E.C.5	Isomérasés	Réactions d'isomérisations
E.C.6	Ligases	Formation des liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

1.3. Origines des enzymes

Les enzymes sont retrouvées chez tous les organismes vivants incluant les bactéries, les champignons, les animaux, les végétaux et l'Homme. Par conséquent, les microorganismes restent la source alternative la plus exploitée (Nigam, 2013).

Les premières enzymes microbiennes ont été découvertes au cours du 20^{ème} siècle et depuis, leurs techniques d'isolement, leurs caractérisations, leurs productions dans les différents types de bioréacteurs ainsi que leurs applications en bioindustrie ont évoluées. Les caractéristiques spécifiques de ces enzymes représentent leurs activités dans des conditions défavorables de culture, particulièrement, celles relatives à la température et au pH (Nigam, 2013).

Les enzymes des thermophiles présentent une stabilité remarquable les laissant actives dans des réactions à hautes températures, d'où leur grand intérêt dans le domaine industriel. Elles connaissent une large utilisation en bioindustrie et restent les molécules les plus exploitées dans ce secteur. Cela revient à leur faisabilité économique, leur rendement élevé, leur stabilité, leur activité catalytique accrue et la croissance des microorganismes sur des milieux peu coûteux ou extrêmes (Gurung et *al.*, 2013).

1.3.1. Amylases

Ce sont des enzymes hydrolysant l'amidon en différents produits: dextrine, maltose et glucose (Simair et *al.*, 2017). Elles sont classées en trois catégories selon leurs produits finaux:

1.3.1.1. α -amylase ou dextrinogène amylase (1,4- α -D-glucan-glucanohydrolase): son rôle est l'hydrolyse de l'amidon de manière aléatoire pour donner suite à des molécules de glucose linéaires et d'autres oligosaccharides ramifiés, de différentes longueurs, tel que le maltose par réaction lente (Ram et *al.*, 2019). Elle a une activité endo-cellulaire (Haki et Rakshit, 2003).

1.3.1.2. β -amylase (1,4- α -D-glucanomaltohydrolase): connue comme enzyme de saccharification. Elle permet de produire le maltose de manière rapide (Bois et Savary, 2018).

1.3.1.3. La glucoamylase (1,4- α -D-glucanohydrolase): est responsable du clivage des extrémités non réduites de l'amidon pour produire des sucres à chaînes courtes (Nakai et *al.*, 2005).

Parmi toutes les enzymes amylolytiques existantes, les amylases microbiennes sont les plus utilisées dans les processus industriels et ont carrément remplacées l'hydrolyse chimique de l'amidon. Cela revient à leur taux de rendement élevé, leur stabilité, leur spécificité, le contrôle de la réaction amylolyse et l'élimination des étapes de neutralisation du substrat dans l'industrie de sa transformation (Ram et *al.*, 2019). Parmi les bactéries productrices des amylases, *Bacillus* sp. reste la plus employée, en plus de *B. licheniformis*. Ces deux espèces possèdent un taux de production élevé d'amylases (Vihiner et *al.*, 1989). Aujourd'hui, de nouvelles espèces sont déterminées comme productrices d'amylases, par exemple *Anoxybacillus thermarum* isolée à partir d'une source chaude à Minahasa, en Indonésie, s'est révélée être une source incontournable d'enzymes α -amylases (Mantri et *al.*, 2019).

Les amylases représentent 25% des enzymes employées industriellement. Elles sont utilisées en industrie alimentaire, pharmaceutique, de textile, de papier et produits détergents (Ram et *al.*, 2019).

1.3.2. Cellulases

La cellulase est un complexe enzymatique qui présente une multiplicité de composants montrant une synergie marquée contre la cellulose cristalline (Béguin et Aubert, 1994). Son rôle est d'hydrolyser la liaison glucosidique β (1-4) (Gilbert et *al.*, 1993) par un mécanisme d'hydrolyse acide utilisant un donneur de proton et un nucléophile ou une base (Lee et *al.*, 2002).

En fait, pour avoir une dégradation totale de la cellulose, trois enzymes interviennent par complémentarité dans la réaction (Nigam, 2013):

1.3.2.1. L'endoglucanase (1,4-D-glucan-4-glucanohydrolase): c'est la première enzyme qui intervient dans la réaction par lésion aléatoire des polymères du glucose. Cette réaction donne suite à de petites portions fibrillaires de différentes longueurs, avec ou sans extrémités réductrices.

1.3.2.2. L'exocellobiohydrolase (1,4-D-glucan glucohydrolase): elle attaque les extrémités cristallines à réduction libre (produit précédent) pour avoir la cellobiose (diholoside).

1.3.2.3. La β -glucosidase (D-glucoside glucohydrolase): elle permet de libérer le glucose comme produit final en séparant les disaccharides.

Les cellulases ont été extraites à partir de diverses souches de microorganismes, y compris champignons, levures et bactéries. Concernant les cellulases des thermophiles, elles sont très intéressantes en applications industrielles en raison de leur résistance aux hautes températures puisqu'elles restent actives dans un intervalle de 50 à 90 °C (Ram et al., 2019). Plusieurs souches thermophiles appartenant au genre *Bacillus*, *Geobacillus*, *Caldibacillus* et *Clostridium* sont qualifiées comme productrices principales de la cellulase (Rastogi et al., 2010; Zambare et al., 2011).

Les cellulases sont exploitées dans diverses applications industrielles telles que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, alimentation animale, textile, détergents, production du vin et boissons, fabrication du papier, agriculture, extraction des huiles et des caroténoïdes ainsi que la production du bioéthanol et des composés organiques à haute valeur ajoutée à partir des résidus agricoles renouvelables (Bahobil et al., 2014; Hardiman et al., 2010; Kuhad et al., 2011; Singh et al., 2004).

1.3.3. Protéases

Les protéases, appelées aussi protéinases ou enzymes protéolytiques, font partie de la famille des hydrolases. Ce sont des enzymes dont la fonction est l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des protéines, générant de petits peptides et acides aminés (Ram et al., 2019). Les enzymes protéolytiques sont subdivisées en deux groupes (Gupta et al., 2002; Ram et al., 2019):

1.3.3.1. Les exopeptidases: ce sont des aminopeptidases et des carboxypeptidases qui interviennent dans le clivage des liaisons peptidiques qui forment les groupements amines et carboxyles des protéines présentes dans le milieu extracellulaire. Elles permettent ainsi aux cellules d'exploiter les produits hydrolytiques résultants.

1.3.3.2. Les endopeptidases: interviennent dans divers processus métaboliques et cellulaires telles que la sporulation et la maturation des enzymes et/ou des hormones en coupant les liaisons peptidiques internes du substrat.

Les protéases sont retrouvées chez tous les organismes vivants du fait de leur importance dans la croissance, le métabolisme, la signalisation et aussi la différenciation cellulaire. Cependant, les microorganismes (champignons et bactéries) peuvent être une source importante de ces enzymes (Ram et al., 2019). En effet, il y a trois types de protéases d'origine microbienne classées selon l'intervalle du potentiel d'hydrogène dont elles sont actives : acidiqes, neutres et alcalines (Nigam, 2013). Leur majeure partie est sécrétée par *Bacillus* sp. (Ram et al., 2019). Or, de nouvelles découvertes dévoilent leur large source de production, comme par exemple, la purification d'une protéase alcaline thermostable à partir de l'espèce *Aeribacillus pallidus* C10, caractérisée par son activité à un optimum de pH = 9 et une température de 60 °C (Yildirim et al., 2017).

Les protéases représentent les enzymes les plus exploitées dans le secteur industriel. Elles sont utilisées dans divers processus tels que l'agro-alimentaire, l'industrie pharmaceutique et thérapeutique, le cuir, le textile, les détergents et l'alimentation animale (Singh et al., 2016).

1.3.4. Chitinases

La chitinase est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de la liaison β (1-4) reliant les unités N-acetyl-D-glucosamines composantes de la chitine. Elle est retrouvée chez de nombreuses espèces de bactéries, champignons, levures, plantes, protozoaires, nématodes, arthropodes, mollusques et également chez l'Homme (Perrakis et al., 1994). Elle représente un complexe de deux enzymes travaillant ensemble:

1.3.4.1. L'endochitinase: mène à la production des N-acetyl-D-glucosamine (NAG) (Ulhoa et al., 1992).

1.3.4.2. L'exochitinase: formée de deux protéines différentes (Ram et al., 2019): la chitobiosidase qui élimine les extrémités non réduites de la chitine pour avoir du diacetylchitobiose; la β -1,4-N-acetyl glucosamidase qui dégrade les produits de l'endochitinase et ceux de la chitobiosidase résultant l'élément de base de la chitine (NAG).

La chitinase assure d'autres fonctions telle que la morphogénèse, la pathogénèse et la défense de l'organisme (Ulhoa et al., 1992).

En effet, la chitine étant très abondante dans la nature, peut être dégradée à l'échelle industrielle par réactions chimiques impliquant des acides forts. Cependant, faute du rendement qui est faible, plus la toxicité et les déchets liquides qui sont générés et qui représentent des problèmes techniques dans l'exploitation de ce substrat, un emploi précoce des chitinases généreusement disponibles est mis en place (Chen et *al.*, 2010; Gao et *al.*, 2015). D'ailleurs, s'agissant des microorganismes, les bactéries des genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Arthobacter* et *Aeromonas* sont connues comme productrices potentielles de chitinases (Bhattacharya et *al.*, 2007). Exemple d'une nouvelle chitinase thermophile et extracellulaire purifiée et caractérisée chez l'espèce *Bacillus* sp. Hu1, isolée depuis le sol d'une source thermale située à la province Xinjiang en Chine (Dai et *al.*, 2011).

Dans le secteur industriel, les chitinases sont principalement employées en biochimie, industrie alimentaire, agriculture et production de biocarburants (Dahiya et *al.*, 2006; Hartl et *al.*, 2012).

1.3.5. Kératinases

Les kératinases sont des enzymes, principalement des sérines protéases ou des métallo-protéases, impliquées dans l'hydrolyse de la kératine. Cette dernière peut être soit soluble (molle) comme dans les matériaux des cytosquelettes et des tissus épithéliaux contenant jusqu'à 1 % du soufre. Ou bien insoluble (dure), présente dans les tissus protecteurs des cheveux, des ongles, des plumes, contenant jusqu'à 5 % du soufre. Ces enzymes agissent principalement sur la liaison disulfure (-SS-) du substrat résultant des polypeptides simples et des acides aminés (Hu et *al.*, 2013).

Dans la classification enzymatique, les kératinases sont de la superfamille des protéases analogues à la subtilisine, appartenant à la sérine protéase. Cependant, toutes les protéases de subtilisine ne peuvent pas dégrader la kératine. De plus, les caractéristiques requises pour sa dégradation restent inconnues. Par conséquent, la plupart des kératinases connues sont identifiées par homologie de séquence avec la kératinase (KerA) de *Bacillus licheniformis* (Hu et *al.*, 2013).

En effet, les kératinases sont à sécrétion exo-cellulaire, produites par divers groupes microbiens tels que les bactéries, les champignons, les actinomycètes et les levures, mais les bactéries se révèlent être la source la plus dominante en terme de productivité telle que l'espèce *Caldicoprobacter algeriensis* (Ram et *al.*, 2019).

En raison de leur multitude applications industrielles et de leur intérêt biotechnologique croissant, les kératinases et les microorganismes kératinolytiques ont suscité un grand intérêt. Par exemple, la kératinase produite par *Bacillus licheniformis* a été largement étudiée pour ses capacités de dégradation de la kératine des plumes. En fait, le domaine de la kératinase a prospéré grâce aux études sur l'enzyme kératinolytique de cette espèce. En 2017, il y a eu une découverte et une identification, par des chercheurs, d'une kératinase thermostable (MtaKer) issue de la souche thermophile *Meiothermus taiwanensis* WR-220 qui pousse entre 55 et 65 °C (Wu et al., 2017).

Outre leur emploi dans l'industrie alimentaire, les détergents, les cosmétiques, la médecine et l'alimentation animale (Farag et Hassan, 2004), les kératinases sont également appliquées dans le traitement de la maladie des vaches folles par dégradation des prions (Langeveld et al., 2003) et biodégradation du plastique (Gregg, 2002).

1.3.6. Lipases

Les lipases, sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et en acides gras libres et cela dans des conditions aqueuses. Inversement, lorsqu'il s'agit de conditions non aqueuses, il se produit des réactions inverses (estérification, inter-estérification et trans-estérification) en produisant des glycérides à partir du glycérol et d'acides gras. Ces enzymes, possèdent une grande spécificité du substrat avec une activité optimale sur une large gamme de température, cela fait des lipases des biocatalyseurs polyvalents (Ram et al., 2019).

Les lipases peuvent être d'origine animale, végétale ou microbienne. Parmi ces origines, les microorganismes sont les producteurs majeurs de ces enzymes, et principalement les bactéries du genre *Bacillus* sp. (Ram et al., 2019). Il a été récemment démontré que les sources géothermales arméniennes abritaient des microorganismes thermophiles de différents groupes taxonomiques. Un nombre d'espèces de bacilles thermophiles appartenant aux genres *Bacillus*, *Geobacillus* et *Anoxybacillus* ont été isolées, analysées et signalées comme productrices de lipase thermostables (Shahinyan et al., 2017).

Le genre *Geobacillus*, particulièrement la souche *Geobacillus thermoleovorans*, isolée à partir d'une source chaude en Nouvelle-Zélande, sont des productrices des lipases thermostables comme *Geobacillus thermocatenulatus* lipase (GTL). Ces dernières ont montré une activité optimale à température élevée (60-70 °C) et à un pH alcalin (9-10) et sont hautement thermostables. Elles sont également connues pour l'hydrolyse des lipides riches en acides gras saturés tels que le suif de bœuf et liaison des cations divalents.

La GTL est capable de discriminer les acides gras polyinsaturés (AGPI) et pourrait être un catalyseur prometteur pour l'enrichissement des AGPI en huiles naturelles telles que l'huile de poisson, l'huile d'algue...etc. (Moharana et *al.*, 2019).

Les lipases d'origine bactérienne sont très employées industriellement. Elles sont appliquées en industrie alimentaire, laitière, pharmaceutique, cosmétique, les détergents, le textile et aussi dans la production du biodiesel (Jaeger et Eggert, 2002; Saxena et *al.*, 1999).

2. Autres métabolites

Outre que les enzymes, les bactéries thermophiles produisent des polymères à haute valeur biotechnologique qui sont les polysaccharides, en particulier, les exo-polysaccharides (EPS) et les polyhydroxyalcanoates (PHA) connues sous le nom de polyesters biodégradables (Guezennec, 2004).

2.1. Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides sont des polymères d'unités de monosaccharides reliées entre elles par des liaisons glycosidiques. Ils peuvent être secrétés par les bactéries et relargués dans le milieu de culture (Krausz et *al.*, 2014), par exemple les cyclodextrines produites par *Bacillus* spp. (Guezennec, 2004).

Ils sont largement exploités dans différents secteurs industriels, aussi bien en agroalimentaire comme agents texturants, gélifiants et épaississants (Jeddou et *al.*, 2016; Roger, 2002) et dans le domaine médicale comme antioxydant, anti-inflammatoire, anticoagulant (Jeddou et *al.*, 2016), anti-tumorale (Yu et *al.*, 2017), antidiabétique (Zhang et Li, 2015) et antibactérien (Zhu et *al.*, 2017).

2.2. Polyhydroxyalcanoates

Les polyhydroxyalcanoates sont des macromolécules produites par les microorganismes, particulièrement, les bactéries de l'extrême, accumulées sous formes de granules dans le cytoplasme (Jendrossek, 2009) et aident la cellule à survivre dans des conditions extrêmes à haute température (Obruca et *al.*, 2017; Slaninova et *al.*, 2018). Elles sont caractérisées par la thermoplasticité, la biodégradabilité et la biocompatibilité ainsi que leur production à partir de ressources renouvelables abondantes et disponibles (microorganismes). Par conséquent, elles sont exploitées dans divers secteurs.

En effet, le domaine prioritaire d'application des PHA est le domaine alimentaire (exploitées dans la production des matériaux d'emballage biodégradables), ainsi que le domaine médical (la production de dispositifs médicaux à base de PHA tels que le filage en fusion) (Koller, 2018).

IV. Applications biotechnologiques des bactéries thermophiles

Les microorganismes thermophiles possèdent des propriétés intéressantes d'un point de vue scientifique mais aussi industriel. Leur potentiel enzymatique représente la propriété la plus exploitée; dès lors, leur thermostabilité explique leurs larges applications dans les différents secteurs industriels. Ils sont principalement exploités en (Charnoch et McCleary, 2005):

➤ **Industrie alimentaire:** la glucoamylase est la première enzyme à être utilisée dans la fabrication des aliments. Elle sert à l'augmentation du rendement du glucose produit à partir de l'amidon et à sa pureté, ainsi qu'à faciliter sa cristallisation lors du processus de production. Par la suite, d'autres enzymes ont pu être employées comme les protéases pour l'attendrissement des viandes.

➤ **Industrie de boissons:** la première enzyme utilisée fut les pectinases afin de clarifier le jus de pomme trouble. Par la suite, il y a eu évolution des techniques enzymatiques. Cette enzyme devient alors essentielle pour l'augmentation des rendements en jus, par décomposition des pectines contenues dans les parois des cellules végétales.

➤ **Industrie des détergents:** c'est le domaine qui emploie le plus les enzymes thermostables. Il fait introduire les protéases, les lipases, les amylases et les cellulases pour libérer les souillures et éliminer les taches indésirables.

➤ **Industrie papetière:** blanchiment du papier par les xylanases.

➤ **Industrie laitière:** exemple des lipases qui sont largement appliquées dans les processus de transformation du lait. Elles interviennent dans l'hydrolyse de la matière grasse du lait par clivage des longues chaînes d'acides gras, menant à l'affinage et à l'amélioration de la saveur des fromages, lipolyse du beurre, graisses et crèmes (Ghosh et *al.*, 1996; Sharma et *al.*, 2001) .

➤ **Industrie du cuir:** s'agissant de l'épilation des peaux et leur raffinage par des protéases qui servent à dissoudre les graisses et les protéines non fibreuses et lier chimiquement les fibres de collagènes (Baker et *al.*, 1987).

➤ **Industrie du textile:** emploi des enzymes pour le désencollage des tissus de coton, le bio polishing, le blanchiment biologique du coton...etc. (Nigam et Singh, 1995).

V. Avantages d'applications de bactéries thermophiles

L'extraction d'enzymes d'intérêts biotechnologiques à partir des bactéries thermophiles présente plusieurs avantages (Robinson et *al.*, 2015):

- La haute stabilité et la résistance aux traitements thermiques, chimiques (pH) et physiques (pression);
- La facilité d'extraction en raison de leurs localisations extracellulaires;
- L'extraction enzymatique à partir des bactéries thermophiles se fait en peu de temps, avec un simple dispositif de production et à des quantités considérables. Par exemple, pour la production de rennine (enzymes coagulant le lait) à partir d'une source animale (extrait de l'estomac d'un veau), pour collecter 1kg de présure, il faut plusieurs mois d'élevage intensif pour obtenir un veau. En comparaison, un fermenteur de 1000 L de *Bacillus subtilis* recombinant donne 20 kg d'enzyme en 12 heures;
- La production en pérennité contrairement aux enzymes animales et végétales qui sont saisonnières;
- La facilité des modifications génétiques chez les bactéries par une simple insertion de plasmide qui a pour but l'obtention d'enzymes ou métabolites d'intérêt modifiées (améliorées) génétiquement, par apport aux animaux et végétaux;
- Leur thermostabilité permet de réduire les risques de contamination, de favoriser les transferts de masse en augmentant la solubilité des substrats et donc la diminution de la viscosité et la tension de surface dans le milieu (Turner et *al.*, 2007).

VI. Inconvenients d'applications de bactéries thermophiles

- La non-stabilité des aliments en conserve est due à l'augmentation de la population de spores avant traitement thermophile et à l'augmentation de leur thermorésistance. Les bactéries thermophiles que sont *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et *Geobacillus stearothermophilus* causent plus de 70 % des cas de non-stabilité des conserves à 55 °C (Durand, 2014).
- Des études ont montré la formation de biofilm sur les équipements des laiteries par des souches mésophiles du groupe *Bacillus cereus* et des souches thermophiles du genre *Geobacillus*. Ces biofilms résistent aux opérations de nettoyage et sont une source de contamination chronique du lait pasteurisé (Malek, 2019).

Matériel et Méthodes

J Cadre de l'étude

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou, durant une période de deux mois s'étalant du mois d'Avril jusqu'à la fin du mois de Juin. Il a pour objectif la caractérisation morphologique, biochimique et physiologique de bactéries thermophiles, et aussi le criblage de leurs activités hydrolytiques extracellulaires.

I. Matériel biologique

Les souches utilisées dans cette étude sont des bactéries thermophiles isolées des eaux d'une source thermale algérienne (Hammam Righa). Au total, dix-sept souches ont fait l'objet d'un criblage pour production d'enzymes.

II. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel utilisé dans les différentes manipulations est cité en Annexe 1.

III. Méthodes

1. Revivification des souches

À partir de cultures bactériennes pures conservées à 4 °C, un repiquage a été effectué pour l'ensemble des souches sur une gélose nutritive par la méthode des stries. Les boîtes ont été par la suite, incubées à 60 °C pendant 24 heures afin d'obtenir des cultures jeunes.

2. Caractérisation des souches

2.1. Etude morphologique

2.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet la description des colonies, à savoir: la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect de surface, le contour...etc. Il est effectué par moyen d'une loupe binoculaire pour des souches cultivées dans un milieu solide sur boîtes de Petri.

2.1.2. Examen microscopique

- Observation à l'état frais: permet la détermination de la forme des cellules, de leur mode d'arrangement ainsi que leur mobilité au grossissement ($\times 40$).
- Observation à l'état fixé (coloration de Gram): c'est une coloration différentielle ou double coloration dont le protocole est cité en Annexe 2.

Elle permet de diviser les bactéries en deux grands groupes (Gram positif et Gram négatif), selon leur affinité pour les colorants liés à la structure générale de leur paroi (Gram, 1884).

2.2. Etude des caractères biochimiques

Pour la détermination des caractères biochimiques des souches isolées, différents tests classiques ont été appliqués:

2.2.1. Etude du métabolisme énergétique

➤ Test de catalase

La production de la catalase est mise en évidence par une production d'oxygène (test positif) lorsque la bactérie est mise en contact avec du peroxyde d'hydrogène. Sa présence est révélée en déposant à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame en verre contenant une goutte d'eau oxygénée. La présence de l'enzyme se traduit, en quelques secondes, par l'apparition de bulles d'air et dégagement gazeux (Gerhardt et *al.*, 1994).

➤ Test de l'oxydase

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne respiratoire en catalysant une réaction d'oxydo-réduction. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif N diméthyle paraphénylene diamine en dérivé violet. Sa production est mise en évidence par des disques « Ox » imprégnés d'oxalate N-N-diméthylparaphénylène. Une quantité suffisante de culture est déposée sur le disque imbibé d'eau distillée. Sa présence est traduite par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Delarras, 2014; Joffin et Leyral, 2006).

➤ Test de nitrate-réductase

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme nitrate réductase. Il est réalisé selon le protocole mentionné dans le Bergey's Manuel of Systematics (De Vos et *al.*, 2009). Les souches sont cultivées sur bouillon nitraté, après incubation à 50 °C pendant 24 heures, trois gouttes de chacun des réactifs de Griess NR I (acide sulfanilique) et NR II (naphtylamine) sont ajoutés à la culture. Un résultat positif est mis en évidence par le virage immédiat de la couleur du jaune en rouge. En absence de cette coloration, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés. Si le milieu devient rouge, cela indique que les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc le test est négatif.

Si le milieu reste inchangé cela veut dire que les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la Nitrate réductase.

2.2.2. Etude du métabolisme glucidique

➤ Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)

La gélose Triple Sugar Iron permet la mise en évidence de la fermentation du glucose (avec ou sans production de CO₂), l'oxydation du lactose et/ou du saccharose et la production de sulfure d'hydrogène. L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification, jaunissement du culot dans le cas du glucose et de la pente dans le cas du lactose et/ou du saccharose. Quant à la production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate, elle est mise en évidence par le noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente. Concernant le dégagement du CO₂, il est révélé par l'apparition de bulles d'air dans le culot ou par le décollement de la gélose (Guiraud, 1998).

➤ Test Mannitol-Mobilité

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont testées en ensemençant le milieu Mannitol-Mobilité par pique centrale. La mobilité est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la pique d'inoculation. Tandis que la fermentation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du milieu au jaune (Harley et Prescott, 2002).

2.2.3. Etude du métabolisme des acides organiques

➤ Utilisation du citrate

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est testée sur un milieu synthétique au citrate de Simmons. Seules les bactéries possédant la citrate perméase sont capables de se développer sur ce milieu. Après incubation, la croissance sur ce milieu s'accompagne généralement du virage de l'indicateur au bleu indiquant une alcalinisation du milieu donc la présence de l'enzyme (Harley et Prescott, 2002).

2.2.4. Recherche du type respiratoire

La détermination du type respiratoire s'effectue sur la gélose viande-foie après sa régénération au bain-marie suivie d'un abaissement de la température à 50 °C. Puis, le milieu est coulé dans des tubes à essai stériles. Ces derniers sont ensuite inoculés à l'aide d'une pipette boutonnée et incubés à une température de 50 °C pendant 24 heures (Harley et Prescott, 2002).

2.3. Etude des caractères physiologiques

L'influence sur la croissance de la température, de la concentration en NaCl et du pH est déterminée en variant l'un des paramètres et en maintenant les deux autres constants.

Le bouillon nutritif additionné d'Agar a été utilisé comme milieu de culture pour l'étude des caractères physiologiques.

2.3.1. Influence de la température sur la croissance

L'influence de la température sur la croissance a été testée en incubant les cultures des souches en milieux solides ou liquides à différentes températures de 37 à 80 °C (37, 44, 50, 60, 80 °C).

2.3.2. Influence du pH sur la croissance

L'influence du pH du milieu sur la croissance des souches est déterminée en l'ajustant à différentes valeurs, à savoir: 5, 7 et 9.

2.3.3. Influence de la salinité

La tolérance au NaCl est étudiée en faisant varier la concentration finale de ce paramètre à 5 et 7 %.

3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Différentes activités enzymatiques ont été recherchées pour les souches isolées en aéro et anaérobie à partir des eaux de Hammam Righa. La recherche d'hydrolases extracellulaires a été effectuée sur milieu solide. Les boîtes de Petriensemencées ont été incubées à 37 ou 60 °C pendant 24 à 48 heures.

3.1. Amylases

L'activité amylolytique a été recherchée sur boîte de Petri contenant de la gélose nutritive additionnée de 1 % (p/v) d'amidon soluble. La lecture se fait par inondation des boîtes avec une solution de lugol. La présence de zones claires autour des colonies témoigne l'hydrolyse de l'amidon. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (Bragger et *al.*, 1989).

3.2. Cellulases

La production de la cellulase a été évaluée par ajout de 0,5 % (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) dans la gélose nutritive. Après incubation, les boîtes de Petri ont été inondées par une solution de rouge congo à 0,1 % (p/v) et incubées pendant 15 à 30 minutes.

La solution de rouge congo a été remplacée par une solution de NaCl à 1 M et les boîtes ont été laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production de cellulase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (Bragger *et al.*, 1989).

3.3. Caséinases

Ce test permet la mise en évidence de l'hydrolyse de la caséine sur Agar doublement concentrée additionnée de lait écrémé. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies (Pruest *et al.*, 1988).

3.4. Chitinases

Pour mettre en évidence l'activité chitinolytique, 0.2 % (p/v) de chitine ont été incorporées dans la gélose nutritive. Après incubation, la production de l'enzyme se manifeste par des zones d'hydrolyses claires autour des colonies (Roberts et Selitrennikoff, 1988).

3.5. Xylanases

L'activité xylanolytique est recherchée sur boîte de Petri contenant la gélose nutritive additionnée de 1 % (p/v) de xylane. Après incubation, les boîtes de Petri ont été inondées par une solution de rouge congo à 0,1 % (p/v) et incubées pendant 15 à 30 minutes. La solution de rouge congo a été remplacée par une solution de NaCl à 1 M et les boîtes ont été laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production de xylanase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (Bragger *et al.*, 1989).

3.6. Kératinases

Pour mettre en évidence l'activité kératinolytique, 1 % (p/v) de farine de plumes a été incorporé dans la gélose nutritive. Après incubation, la production de l'enzyme se manifeste par des zones d'hydrolyses claires autour des colonies (Zaraï Jaouadi *et al.*, 2013).

3.7. Activités lipolytiques

Le test de l'activité lipolytique permet la recherche de la lipase. L'estérase a été recherchée par le test d'hydrolyse des Tween 20 et 80.

➤ **Hydrolyse de l'huile d'olive:** l'activité lipasique est détectée sur un milieu de culture solide (gélose nutritive) additionné d'huile d'olive stérile (par filtration sous vide) et d'une solution fluorescente de Rhodamine . Un halo orange clair fluorescent apparaît autour des colonies produisant des lipases, placées sous UV à 350 nm (Kouker *et al.*, 1987).

➤ **Hydrolyse des Tween 20 et 80:** les Tween 20 et 80 stériles ont été ajoutés à une concentration de 1 % (v/v) au milieu gélose nutritive en surfusion contenant 0,01 % de CaCl₂. Une lecture positive est traduite par l'apparition des cristaux autour des colonies productrices d'estérase (Sierra, 1957).

Résultats et discussion

1. Résultats de la revivification des souches

Le réensemencement des souches conservées à 4 °C sur un milieu solide a permis leur revivification. En effet, il y a eu apparition de colonies sur l'ensemble des boîtes au bout de 24 heures d'incubation.

2. Résultats de la caractérisation des souches

2.1. Etude morphologique

2.1.1. Examen macroscopique

L'observation des caractères cultureux des colonies est le premier examen qui a été effectué après l'incubation des souches à 60 °C sur gélose nutritive. Cependant, il y avait peu de diversité dans leur aspect macroscopique. Les résultats obtenus sont illustrés dans le Tableau IV.

Après l'incubation, la plupart des souches forment des colonies rondes, plates, translucides, de grande taille, de surfaces lisses et à bords réguliers. Mais d'autres aspects macroscopiques ont aussi été observés chez une minorité des souches, tels que la forme et le contour irrégulier, le diamètre petit à relief bombé et une surface rugueuse et opaque. Ceci nous laisse conclure que la température n'est pas l'unique facteur qui joue sur la diversité des organismes présents dans les sources thermales. D'autres facteurs comme les conditions physicochimiques et la composition minérale et organique des eaux peuvent également entrer en jeu. La Figure ci-dessous illustre quelques exemples d'aspects cultureux observés.

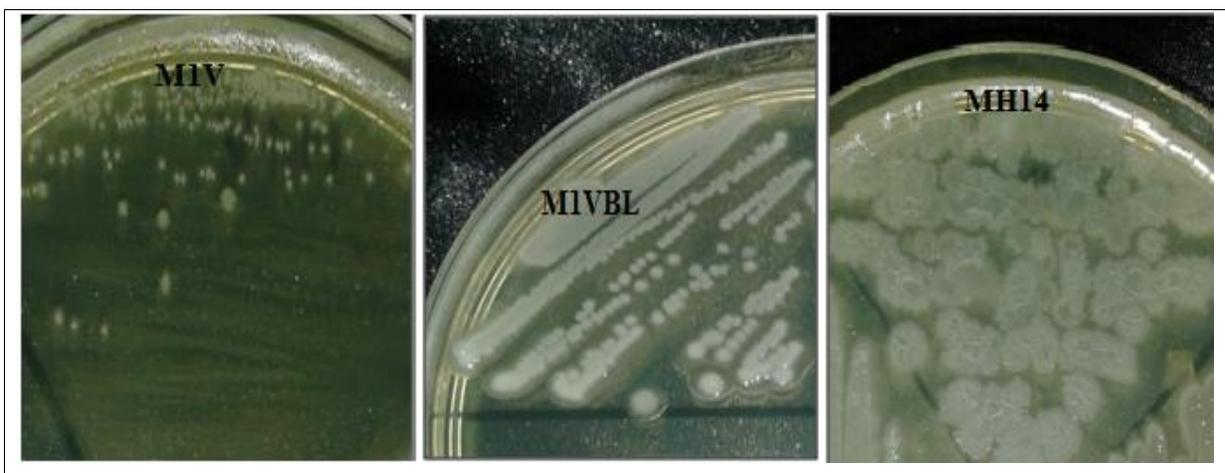


Figure 3: Aspects des colonies formées sur gélose nutritive des souches M1V, M1VBL et MH14 (Photos personnelles).

Tableau IV: Caractères cultureux des souches cultivées à 60 °C.

Aspect Souches	Forme	Taille	Contour	Elévation	Surface	Opacité
HR3	Ronde	Grande	Irrégulier	Plate	Lisse	Translucide
M1V	Ronde	Petite	Régulier à bord dentelé	Plate	Lisse	Translucide
M1VBL	Ronde	Moyenne	Régulier à bord dentelé	Bombée	Lisse	Translucide
KBM7	Ronde	Moyenne	Régulier	Plate	Lisse	Translucide
Ac blan	Ronde	Grande	Régulier	Plate	Lisse	Translucide
BA1	Ronde	Grande	Régulier à bord dentelé	Plate	Lisse	Opaque
RN1	Ronde	Moyenne	Régulier	Plate	Lisse	Translucide
MH14	Irrégulière	Grande	Irrégulier	Plate	Rugueuse	Translucide
HB2'	Ronde	Petite	Régulier	Plate	Lisse	Translucide
D1	Ronde	Moyenne	Régulier	Plate	Lisse	Translucide
BHIA1	Ronde	Moyenne	Irrégulier	Plate	Lisse	Translucide
KBN2	Ronde	Grande	Irrégulier	Plate	Rugueuse	Translucide
B5GN	Ronde	Grande	Régulier	Bombée	Lisse	Opaque
KB1	Ronde	Grande	Régulier	Bombée	Lisse	Translucide
KB2	Ronde	Petite	Régulier	Plate	Lisse	Translucide
HB12	Ronde	Moyenne	Régulier	Plate	Lisse	Translucide
ADfc	Irrégulière	Grande	Irrégulier	Plate	Rugueuse	Translucide

2.2.2. Examen microscopique

Suite à une observation au microscope photonique, au grossissement ($\times 40$) à l'état frais, on a pu constater que les cellules de toutes les souches sont mobiles, isolées et sporulées. De plus, sur les dix-sept souches étudiées, cinq sont sous forme de longs bâtonnets (HR3, M1V, HB2, HB12, ADfc), et le reste sont des bâtonnets de taille moyenne.

Tandis que leur observation à l'état fixé (coloration de Gram), au grossissement ($\times 100$) avec l'ajout de l'huile à immersion, a révélé qu'elles sont toutes des Gram positives. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant:

Tableau V: Etude microscopique à l'état frais et à l'état fixé des isolats bactériens.

Caractère Souches	Etat frais				Etat fixé
	La forme de la cellule	Le mode d'arrangement	La mobilité	La sporulation	Coloration de Gram
HR3	Long bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
M1V	Long bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
M1VBL	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
KBM7	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
Ac blan	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
BA1	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
RN1	Bâtonnet	Isolée	Mobile	Sporulée	+
MH14	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
HB2'	Long bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
D1	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
BHIA1	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
KBN2	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
B5GN	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
KB1	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
KB2	Bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
HB12	Long bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+
ADfc	Long bâtonnet	Isolé	Mobile	Sporulée	+

2.2. Etude des caractères biochimiques

Les résultats de la caractérisation biochimique sont représentés dans le Tableau VI. Plusieurs caractères ont été révélés chez les souches en utilisant des milieux de culture spécifiques de la galerie biochimique.

2.2.1. Métabolisme énergétique

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches bactériennes étudiées possèdent au moins l'une des enzymes respiratoires recherchées (catalase, oxydase, nitrate réductase); de ce fait, toutes les souches sont catalase positive. En effet, cette enzyme contient du fer qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), c'est le cas de la plus part des bactéries aérobie et anaérobie facultatives thermophiles. (Dinsdale *et al.*, 2001; Nazina *et al.*, 2001). Tandis que sept souches uniquement sont oxydase positive (HR3, M1V, M1VBL, KBM7, HB2', KBN2 et KB1). Par ailleurs, la réduction du nitrate en nitrite est observée chez toutes les souches étudiées.

2.2.2. Métabolisme glucidique

➤ Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)

Les résultats obtenus nous ont démontré la capacité des souches à fermenter le glucose, le saccharose et le lactose. L'observation de la pente et du culot virés au jaune est notée chez toutes les souches, ce qui indique la présence de l'enzyme oxydase. Cependant, aucun décollement de la gélose n'est observé et aucun noircissement n'est apparu dans la zone joignant le culot. On conclue alors que cette fermentions n'est pas accompagnée de la production du CO_2 et d' H_2S .

➤ Mannitol-Mobilité

La fermentation du mannitol a été observée chez toutes les souches, indiquée par un virage faible de l'indicateur au jaune. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries aéro-anaérobie facultatives est en générale insuffisante face à l'importance du pouvoir tampon du milieu (Joffin et Leyral, 2006). En ce qui concerne la mobilité, les souches ont poussés sur tout le long de la pique centrale, elles sont alors toutes mobiles. En fait, ce résultat est une confirmation de l'observation de la mobilité des bactéries à l'état microscopique.

2.2.3. Métabolismes des acides organiques

➤ Citrate perméase

Sur les 17 souches testées, cinq seulement (HR3, HB2', D1, KBN2 et B5GN) ont présenté une citrate perméase.

2.2.4. Métabolisme respiratoire

Les résultats de la culture sur le milieu VF ont montré que tous les isolats ont poussé tout le long du milieu ainsi qu'à la surface. Il s'agit de bactéries aéro-anaérobie facultatives. Par ailleurs, les thermophiles facultatifs font partie du genre *Bacillus* et ont l'aptitude de croître à des températures mésophiles et thermophiles (30-55 °C), en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sporothermodurans* et *B. subtilis* (Barbarus et Gulsun, 2014).

Résultats et discussion

Tableau VI: Etude des caractères biochimiques des souches bactériennes.

Caractères Souches	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase	TSI					Mannitol- Mobilité		Citrate perméase	Viande- foie
				Glu	Sac	Lac	Gaz	H ₂ S	Man	Mob		
HR3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	AAF
M1V	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
M1VBL	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
KBM7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
Ac blan	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
BA1	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
RN1	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
MH14	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
HB2'	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	AAF
D1	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	AAF
BHIA1	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
KBN2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	AAF
B5GN	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	AAF
KB1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
KB2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
HB12	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF
ADfc	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	AAF

AAF: Aéro-Anaérobie Facultative; **Glu:** Glucose; **Sac:** Saccharose; **Lac:** Lactose; **Man:** Mannitol; **Mob:** Mobilité

2.3. Caractérisation physiologique des isolats

Les cellules bactériennes sont capables de se multiplier dans des milieux de culture liquides ou sur milieux solides artificiels. Hormis les exigences nutritionnelles, la croissance requiert des conditions physicochimiques particulières approchant les conditions de leur écosystème naturel, à savoir: la température, le pH et la salinité. Les résultats de la caractérisation physiologique des différentes souches sont rassemblés dans le Tableau VII.

Tableau VII: Physiologie de la croissance des souches sur milieu gélosé en fonction de la température, pH et du NaCl.

Paramètres Souches	T °C					pH			[NaCl] %	
	37	44	50	60	80	5	7	9	5	7
HR3	++	+++	++	+	+	++	+++	++	+++	++
M1V	++	+	+	+++	++	-	+	+	++	+
M1VBL	+++	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++
KBM7	++	++	++	+	+	+	+++	+++	++	+++
Ac blan	++	++	+++	++	+	++	+++	+++	+++	++
BA1	++	++	+	+	+	-	++	++	+	+
RN1	+++	++	+	++	+	-	+++	+	+++	+++
MH14	+++	+++	++	++	++	++	+++	++	++	+++
HB2'	++	++	+	++	+	-	++	++	++	+
D1	++	++	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++
BHIA1	++	++	+	++	++	++	+	+++	+	+++
KBN2	++	+++	++	+++	++	+	++	+++	++	++
B5GN	++	+++	++	++	+	++	+++	++	+++	+
KB1	++	++	+++	+	+	+	++	++	++	+++
KB2	++	++	++	+	+	-	++	++	++	+++
HB12	++	+++	++	++	+	+	++	++	+	++
ADfc	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++	+++	++

- : Pas de croissance, + : Croissance faible, ++ : Bonne croissance, +++ : Très bonne croissance

2.3.1. Température

L'aptitude des souches à pousser à différentes températures a été testée. La gamme explorée varie de 37 à 80 °C.

En effet, au-delà de 70 °C, l'Agar devient instable et l'évaporation de l'eau est très importante, ce qui rend la culture impossible (Vokl *et al.*, 1993), d'où le choix d'utilisation d'un bouillon nutritif pour la culture réalisée à 80 °C. La croissance de l'ensemble des souches est optimale à 60 °C (Tableau VII). Elles sont qualifiées de thermophiles modérés. Ceci peut s'expliquer par la correspondance relative à la température initiale de l'isolement des souches à partir des eaux thermales de Hammam Righa (68 °C) (Bouacem, 2016).

2.3.2. Spectre du pH

L'intervalle de pH de croissance a été testé par ensemencement d'un milieu gélosé sur une gamme s'étalant de 5 à 9. La plupart des souches étudiées devraient présenter une gamme de pH de croissance relativement réduite puisque le potentiel d'hydrogène des eaux thermales de Hammam Righa est au alentour de 6 à 7,6 (Belhai *et al.*, 2016). Or, les résultats qui ont été obtenus ont révélé la capacité des bactéries thermophiles en question à croître sur une large gamme de pH indiquant leur adaptation aux conditions du milieu. Il est noté que l'optimum de croissance est atteint sur la gélose nutritive à pH = 7. Contrairement au milieu gélosé acide (pH = 5), il n'y a que certaines souches qui ont légèrement poussé en formant quelques colonies (HR3, M1VBL, Acblan, MH14, BHIA1, B5GN et ADfc), et d'autres n'ont carrément pas pu résister. Par ailleurs, s'agissant du milieu basique, une très bonne croissance a été observée chez la majorité des souches, ce qui suggère que leur milieu d'origine était plus au moins basique et que les bactéries ont développé des mécanismes d'adaptation à ces conditions. Le genre *Anoxybacillus* est formé d'espèces acidophiles (*Anoxybacillus amylolyticus*; pH optimum de 5), alcaliphiles (*Anoxybacillus ayderensis*; pH de 11) et alcalitolérentes (Pikuta, 2009).

2.3.3. Salinité

La croissance sur milieu de culture de concentration faible en sel (0.5 %) est observée initialement chez les 17 souches lors de leur revivification. Par conséquent, l'augmentation du taux de salinité à 5 et 7 % n'a pas affecté la division cellulaire des bactéries. En effet, toutes les souches étudiées ont pu se développer en présence du NaCl et elles ont marqué une croissance considérable dans les deux concentrations.

De ce fait, en plus du caractère thermophile que possèdent les souches d'intérêt, elles peuvent aussi être qualifiées d'alcalitolérantes et d'halotolérantes. Ces deux caractères sont souvent conjugués et il a été prouvé que l'alcali-résistance voir même l'alcaliphilie exigeait la présence intracellulaire d'ions sodium pour le métabolisme et la régulation. C'est la raison

pour laquelle la plupart des organismes alcaliphiles sont au moins halotolérants. Cette tolérance peut s'étendre sur de larges intervalles de pH, ce qui signifie qu'elles peuvent se développer également à des pH acides grâce à d'autres mécanismes d'acidotolérance cette fois-ci (accumulation de solutions compatibles et de protons H⁺) (Lewinson et al., 2004).

3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Un screening de plusieurs activités hydrolytiques extracellulaires a été effectué chez les 17 souches d'intérêt. Les résultats illustrés dans le Tableau VIII montrent clairement la capacité de chaque souche isolée et testée à hydrolyser ou à dégrader des différents substrats inducteurs utilisés, à savoir: l'amidon, le CMC, la caséine du lait écrémé, la chitine, le xylane, la kératine, l'huile d'olive, les Tween 20 et Tween 80, après incubation à 37, 50 et 60 °C pendant 24 heures en condition d'aéro-anaérobiose.

L'hydrolyse de l'amidon est réalisée par toutes les souches à part deux: HR3 et ADfc. Cela signifie que la majorité des souches possède une amylase dont l'activité s'exprime par l'apparition d'un halo d'éclaircissement autour des colonies, observé après addition d'une solution de lugol. En fait, les bactéries à Gram positif représente une bonne source d'amylase (Vieille et al., 2000). Selon Satyanarayana et ses collaborateurs (2005), plusieurs espèces appartenant à ce genre telles que *B. coagulans* et *B. stearothermophilus* sont connues par leur capacité à produire des -amylases thermostables. Récemment, une nouvelle -amylase a été purifiée et caractérisée à partir de la souche *Tepidimonas fonticaldi* HB23 (Allala et al., 2019)

L'activité cellulolytique est présente chez un grand nombre de souches testées (13). De nombreux microorganismes cellulolytiques aérobies secrètent 6 à 10 cellulases extracellulaires (Kim et al., 2009; Moser et al., 2008; Saloheimo et al., 2002). En revanche, de nombreux organismes hydrolysant la cellulose en anaérobiose sont dotés d'un grand complexe enzymatique cellulotique (Bayer et al., 2008).

L'activité protéolytique que se soit l'hydrolyse de la caséine du lait ou bien la dégradation de la kératine est observée chez la plupart des souches. S'agissant de la caséine, des (17) souches en question, (14) sont marquées par l'apparition des halos autour des spots et seulement (3) souches ont démontré un résultat négatif. Quant à la kératine, un résultat positif est noté chez (13) souches. En fait, sa dégradation est plus abondante chez les bactéries Gram (+) que chez les Gram (-) (Gupta et al., 2006). Les bactéries *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B.*

cereus et *B. subtilis* (Lin et al., 1997 ; Kim et al., 2001) sont connues comme productrices majeures de kératinases.

Parmi les (17) souches testées, (15) d'entre elles ont formé des halos indiquant la présence de l'enzyme chitinase. Des études faites à ce propos sur des bactéries du genre *Hydrogenophilus* ont permis la caractérisation d'une nouvelle chitinase thermostable à partir de la souche *Hydrogenophilus hirshii* KB-DZ44 (Bouacem et al., 2018).

La recherche de la xylanase chez les souches d'intérêt a révélé sa présence chez la majorité (15) des souches et son absence uniquement chez deux souches: MH14 et D1. Il est rapporté que plusieurs genres de bactéries thermophiles sont des producteurs majeurs de xylanases thermostables, à savoir les *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* et *Enterobacter* (Bhalla et al., 2014).

Les lipases sont secrétées par la majorité des souches mis à part deux d'entre elles: HB2' et KB2 qui ont démontré des résultats négatifs que ce soit pour l'hydrolyse de l'huile d'olive ou bien des Tween 20 et 80. D'après des études précédentes, les bacilles représentent une source très importante d'enzymes thermostables; un grand nombre de bactéries du genre *Bacillus* et *Anoxybacillus* (Rahman et al., 2005; Olusesan et al., 2009) sont connus majoritairement pour la production de lipases, caractérisées par une grande stabilité dans des conditions restreintes telles que les températures élevées et la présence des solvants organiques (Jaeger et al., 1994).

La Figure 4 présente des zones d'hydrolyses de quelques souches bactériennes testées sur différents milieux après 24 heures d'incubation. L'estimation de la surface des zones produites n'a pas pour but l'appréciation quantitative de l'activité enzymatique en question, mais uniquement sa mise en évidence.

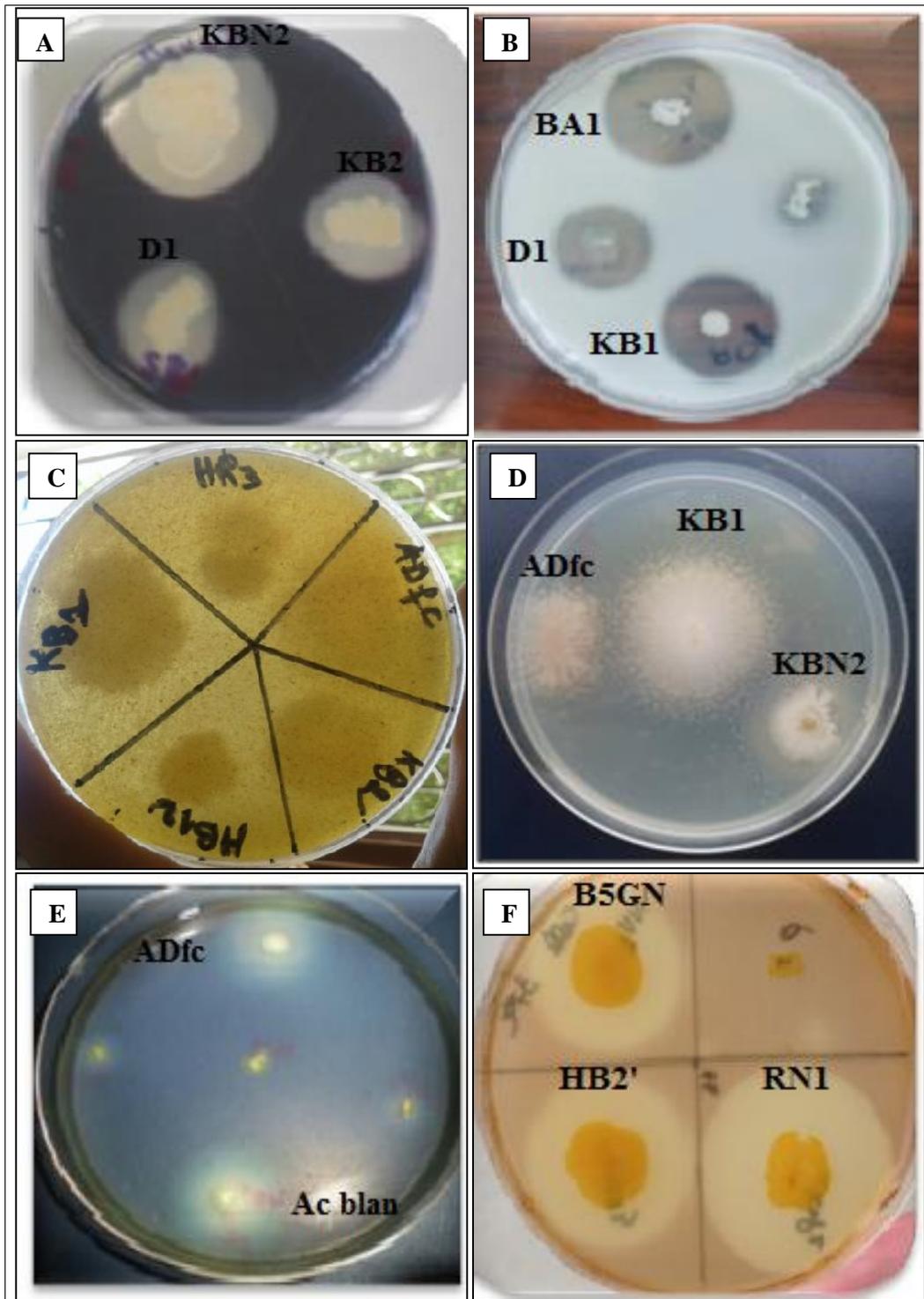


Figure 4: Exemples de quelques résultats d'activités hydrolytiques (Photos personnelles).

(A). Amylases; (B). Caseinases; (C). Chitinases; (D). Hydrolyse de Tween 20;

(E). Xylanases; (F). Cellulases

Résultats et discussion

Tableau VIII: Résultats des activités enzymatiques recherchées à la température 37 et 60°C.

Enzymes Souches	Amylases	Cellulases	Caséinases	Chitinases	Xylanases	Kératinases	Lipases	Estérases	
								T20	T80
HR3	-	+	+	+	+	+	-	+	+
M1V	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M1VBL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ac blan	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BA1	+	-	+	-	+	+	+	+	+
RN1	+	+	-	-	+	+	+	+	+
MH14	+	+	-	+	-	+	+	+	+
HB2'	+	+	-	+	+	+	-	-	-
D1	+	+	+	+	-	+	+	+	+
BHIA1	+	-	+	-	+	-	+	+	+
KBN2	+	+	-	+	+	-	+	+	+
B5GN	+	+	-	+	+	-	+	+	+
KB1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KB2	+	+	+	+	+	+	-	-	-
HB12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADfc	-	+	-	+	+	+	+	+	+

D'après les résultats du criblage enzymatique obtenus, il est clair que les souches étudiées produisent toutes des enzymes thermostables extracellulaires (Figure 5). La comparaison des profils de production enzymatique entre les (17) souches démontre que toutes les enzymes sont synthétisées au moins par 11 d'entre elles. Il paraît que certaines enzymes sont prédominantes: les amylases, xylanases, Tween 20 et 80. Ceci suggère que les microorganismes thermophiles présentent un arsenal enzymatique important, d'où leur intérêt en applications industrielles.

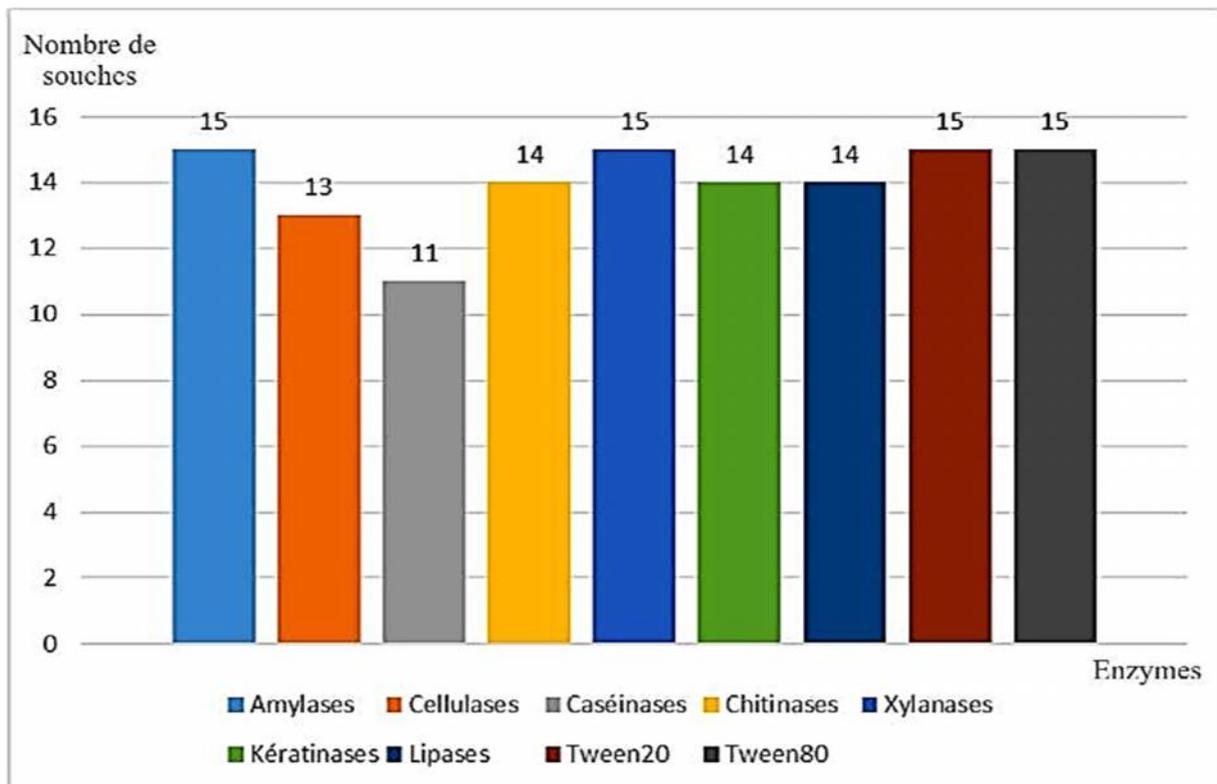


Figure 5: Effectifs des souches ayant pu synthétiser les différentes enzymes.

Conclusion et perspectives

Les potentialités industrielles liées aux molécules issues des microorganismes thermophiles sont multiples et variées, (environnement, santé, agroalimentaire...etc.). Parmi les macromolécules présentant de réels enjeux économiques, les enzymes thermostables et les polymères bactériens (les exopolysaccharides, les hydroxycarboxylates...etc.) occupent une place importante.

L'objectif de cette étude consiste à caractériser 17 souches bactériennes thermophiles, issues d'une source hydrothermale algérienne (Hammam Righa), et à étudier leur potentiel enzymatique par la recherche des amylases, cellulases, caséinases, chitinases, xylanases, kératinases, lipases et estérases. Les résultats obtenus ont montré que les souches sont des bâtonnets Gram positifs, mobiles, aéro-anaérobie facultatives, polyextremophiles et dotées d'un arsenal enzymatique important leur permettant de dégrader différents polymères.

La recherche de nouvelles enzymes bactériennes, notamment chez les thermophiles, suscite donc un réel intérêt, non seulement parce qu'elles pourraient aboutir à une meilleure compréhension des bases moléculaires de la thermophilie et par là, aider à établir des règles pour améliorer les procédés industriels, mais aussi pour leurs applications potentielles en biotechnologie. En perspectives, il serait intéressant de consolider cette étude avec:

-) L'identification moléculaire des isolats;
-) Dosage de ces activités enzymatiques sur milieux liquides;
-) Purification et caractérisation des activités les plus importantes.

Références bibliographiques

A

Albers S V., Van de Vossenberg J L., Driessen A J., Kon-ings W N. (2001). Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*, 5: 285–294.

Albuquerque L., Santos J., Travassos P., Nobre M. (2002). *Albidovulum inexpectatum* gen. nov., sp. nov., a non photosynthetic and slightly thermophilic bacterium from a marine hot spring that is very closely related to members of the photosynthetic genus *Rhodovulum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9): 4266-73.

Allala F., Bouacem K., Boucherba N., Azzouz Z., Mechri S., Sahnoun M., Benallaoua S., Hacene H., Jaouadi B., Bouanane-Darenfed A. (2019). Purification, biochemical, and molecular characterization of a novel extracellular thermostable and alkaline α -amylase from *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. *International Journal of Biological Macromolecules*. 132: 558-574.

Anbu P., Gobinath S C B., Cihan A C., Chaulagain B P. (2013). Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. *BioMed Research international*, 204014.

Arai H., Shomura Y., Higichi Y., Ishii M. (2018). Complete Genome Sequence of a Moderately Thermophilic Facultative Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1. *Microbiology Resource Announcements*, 7.6 (2018): e00857-18.

B

Bahobil A., Bayoumi R A., Atta H M., El-schrawey M M. (2014). Production of thermoalkaliphilic microbial cellulases from some agricultural wastes under solid state fermentation conditions. *International Journal of Current Microbiology and applied Science*, 3: 99-117.

Baker D B. (1987). Encyclopédie de sécurité et de santé au travail: le cuir, la fourrure et la chaussure: le tannage et le finissage du cuir. 3^{ème} Edition.

Barbarous O., Gulsun A E. (2014). Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Development. CRC Press, 9.

- Béguin P., Aubert J P. (1994).** The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13 (1): 25-58.
- Belhai M., Bouchareb-Haouchine F Z., Fujimitsu Y. (2013).** Geochemistry of the Hammam Righa Thermal Manifestation North- Central Part of Algeria. *Symposium on Earth Sciences and Technology*. Kyushu University, Fukuoka, Japan.
- Bertrand R., Lenoir J., Piedallu C., Riofrio-Dillon F., De Ruffrey P., Vidal C., Pierrat J C., Fegout J C. (2011).** Changes in plant community composition lag behind climate warming in low land forests. *Nature*, 517-520.
- Bhalla A., Bischoff K M., Uppugundla N., Balan V., Sani R K. (2014).** Novel thermostable endo-xylanase cloned and expressed from bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1. *Bioresource Technology*, 165: 314–318.
- Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R K. (2007).** Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27 (2007): 21-28.
- Bragger J M., Daniel R M., Coolbear T., Morgan H W. (1989).** Very stable enzymes from extremely thermophilic archae bacteria and eubacteria. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 31: 556-561.
- Bois E., Savary J. (2018).** Les amylases des microorganismes. *Canadian Journal of Research*, 23: 208-213.
- 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. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174: 1969–1981.
- Bouacem K., Bouannane-Darenfed A., Laribi-Habchi H., BenElhoul M., Hmida-Sayari A., Hacene H., Ollivier B., Faedeau M L., Jaouadi B., Bojar S. (2015).** Biochemical characterization of a detergent stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81: 299-307.

Bouacem K. (2016). Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien: Etude des propriétés enzymatiques. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, 189p.

Bouacem K., Laribi Habchi H., Mechri S., Hacene H., Jaouadi B., Bouanane-Darenfed A. (2018). Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB-DZ44. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106 (2018): 338-350.

Bouanane- Darenfed A., Boucherba N., Bouacem K., Gagaoua M., Joseph M., Kebbouche G., Nateche F., Hacene H., Ollivier B., Cyol J L., Fardeau M L. (2016). Characterization of a purified thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. strain TH7C1T. *Carbohydrate Research*, 419: 60-68.

Boughlali M. (2003). Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. *La presse thermale et climatique*, 140: 161-165.

C

Canganella F., Wiegel J. (2014). Anaerobic thermophiles. *Life (Basel)*, 4 (1): 77-104.

Charlier D., Droogmans L. (2005). Microbiol life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2974-84.

Charnock S J., Mccleary B V. (2005). Les enzymes: Applications industrielles et analytiques. *Revue des Oenologues*, 116: 1–5.

Chen T L., Chou Y J., Chen W M., Arun B., Young C C. (2006). *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. *Extremophiles*, 10: 35–40.

Chen J K., Shen C R., Liu C L. (2010). N-acetylglucosamines: production and applications. *Marine Drugs*, 8 (9): 2493-2516.

Chiellini C., Iannelli R., Lena R., Gullo M., Petroni G. (2014). Bacterial community characterization in paper mill white water. *BioResources*, 9: 2541–2559.

Coman C., Drug B., Hegedus A., Sicora C., Drago N. (2013). Archaeal and bacterial diversity in two hot spring microbial mats from a geothermal region in Romania. *Extremophiles*, 17: 523–534.

Combes D., Monsan P. (2009). Biocatalyse ou catalyse enzymatique. *Chimie verte*, 1, Réf: BIO590.

D

Dahiya N., Tewari R., Hoondal G S. (2006). Biotechnological aspects enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 773-782.

Dai D L., Hu W L., Huang G R., Li W. (2011). Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology*, 10 (13): 2476-2485.

De Castro M E., Rodreguez-Belmont E., Gonzalez-Siso M I. (2016). Metagenomics of thermophils with a focus on Discovery of Novel Thermozyemes. *Frontiers in Microbiology*, 1521.

Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de labotoire, recherche de bacteries et de levure-moisissures. International Standard Book Number 978-2-7430-1565-7, 772.

Devillers N., Le Dividich J., Farmer C., Mounie A M., Le fibre M., Prunser A. (2005). Origine et consequences de la variabilité de la production de colostrum par la truie et de la consommation de colostrum par les porcelets. *Porcine Research*, 37: 435-442.

De Vos P., Garrity G M., Jones D., Krieg N R., Ludwig W., Rainey F A., Schleifer K.H., Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed, The Firmicute, Springer, New York, 3: 63-67.

Dhakan D B., Saxena R., Chaudhary N., Sharma V K. (2016). Draft genome sequence of *Tepidimonas taiwanensis* strain MB2, a chemolithotrophic thermophile isolated from a hot spring in Central India. *Genome Announcements*, 4 (1): 1723-15.

Dinsdale A E., Halket G., Coorevits A., Van Landschoot A., Busse H J., De Vos P., Logan N A. (2001). Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenuatus*. *International Journal of Systems Science*, 61: 1802–1810.

E

Ellis J T., Magnuson T S. (2012). Thermostable and alkalistable Xylanases produces by the thermophilic Bacterium *Anoxybacillus flavithermus* TWXYL3. International Scholarly Research Notices: Microbiology, 517524.

Elshagabee F M E., Rokana N., Gulhan R D., Sharma C., Panwar H. (2017). *Bacillus* as Potential Probiotics: Status, Concers and Future perspectives. Frontiers Microbiology, 10 (8): 1490.

Euzeby J. (2015). List of Prokaryotic Names with stinding in Nomenclature: a folder available on the Internet. International Journal of Systematic Bacteriology, 47: 590– 592.

F

Farag A M., Hassan M A. (2004). Purification, characterization and immobilization of keratinase from *Asoergillus orizae*. Enzyme and Microbial Technology, 34: 85-93.

Fekraoui A., Kedaïd F Z. (2005). Geothermal Resources and Uses in Algeria. A country Update Report. Proceedings World Geothermal Congress 2005 Antalya, Turkey, 24-29 April 2005.

Ferrera I., Reysenbach A L. (2007). Thermophiles in: Encyclopedia of life sciences. John Wiley et Sons, 1-9.

Fritze D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera, the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology, 94 (11): 1245-8.

G

Gram C. (1884). On the isolated coloring of the Schizomycetes in cut and dry preparations. Fortschritte der Medicin, 2: 185-189.

Gao C., Zhang A., Chen K., Hao Z., Tong J., Ouyang P. (2015). Characterisation of extracellular chitinase from *Chitinibacter* sp. GC72 and its application in Glc Nac production from crayfish schell enzymatic degradation. Biochemical Engineering Journal, 97: 59-64.

Gerhardt P., Murray R G E., Wood W A., Kring N R. (1994). Methodes for general and Molecular Bacteriology. American society for Microbiology, Washington, D.C: 791.

Ghosh PK., Sexana RK., Gupta R., Yadrav R P., Davidson S. (1996). Microbial lipases: production and application. *Science Progress*, 79: 119-157.

Gilbert H J., Hazlewood G P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139: 187-194.

Goh K M., Kahar U M., Chai Y Y., Chong C S., Chai K P., Ranjani V., Ilias R., Chan K G. (2013). Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (4): 1475-88.

Goto E., Kodama T., Minoda Y. (1977). Isolation and culture conditions of thermophilic hydrogen Bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41 (4): 685-690.

Goto E., Kodama T., Minoda Y. (1978). Growth and taxonomy of thermophilic hydrogen Bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42 (7): 1305-1308.

Gregg R. (2002). From feathers to degradable plastic, BRI: end of mad cows diseases. *Triangle Technology Journal*. (<http://www.triangle-techjournal.com>).

Gregoire P., Fardeau M L., Guaso S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B. (2009). Les microorganismes de l'extrême. *La presse thermique et climatique*. 146: 49-61.

Guezennec J. (2004). Les bactéries des sources hydrothermales profondes à l'origine de nouvelles molécules bioactives ? *Vertigo*, la revue électronique en sciences de l'environnement [En ligne], 5 (3), mis en ligne le 01 décembre 2004, consulté le 13 Mai 2019. URL : <http://journals.openedition.org/vertigo/3214> ; DOI : 10.4000/vertigo.3214.

Guiraud J P. (1998). *Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyses microbiologiques.* Ed. Dunod, p 82, 83, 88.

Gupta R., Beg Q K., Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (1): 15-32.

Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V. (2013). *A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine and Beyond*, 18.

H

Haki G D., Rakshit S K. (2003). Developement in industrially important thermostable enzymes. ELSEVIER, 89: 17-34.

Han Y L., Chang J S., Lou Y C., Cheng L L., Liu C H. (2017). Method for producing extracellular proteins from genus *Tepidomonas*. Industrial Technology Research Institue. U.S. Patent No. 9,580,738. Washington, D.C: U.S. Patent and Trademark Office.

Hardiman E., Gibbs M., Reeves R., Bergquist P. (2010). Directed Evolution of a thermophilie beta-glucosidase for cellulosic Bioethanol Production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 161: 301-312.

Harley J P., Prescott L M., Klein D A. (2002). Microbiologie, 5^{eme} Edition, 449p.

Hartl L., Zach S., Seidl-Seiboth V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. Applied Microbiology, 93: 533-543.

Hayashi N R., Ishida T., Yokta A., Kodama J., Igarashi Y. (1999). *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. cov., a thermophilic, facultatively chemiolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium. International Journal of systematic Bacteriology, 49: 783-786.

Heinemann U., Saenger W. (1982). Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2 -guanylic acid complex: an X-ray study. 2; 299 (5878): 27-31 .

Hu H., Gao J., He J., Yu B., Zheng P. (2013). Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of a Keratinase Gene in Pichiapastoris. Public Library of Science ONE, 8 (3): e58393.

Hug K., Maher W. A., Stott M. B., Krikowa F., Foster S., Moreau J. W. (2014). Microbial contributions to coupled arsenic and sulfur cycling in the acid-sulfide hot spring Champagne Pool, New Zealand. Frontiers in Microbiology, 5: 569. 10.3389/fmicb.2014.00569.

I

Iwabe N., Kuma K., Hasegawa M., S Osawa S., Miyata T. (1989). Evolutionary Relationship of Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes Inferred from Phylogenetic Trees

of Duplicated Genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86 (23): 9355–9.

J

Jaeger K E., Eggert T. (2002). Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 13: 390-397.

Jaouadi N Z., Rek H., Yahiaoui A B., Ben Aicha H., Toumi A., Bejar S., Jaouadi B. (2013). Biochemical and Molecular Characterization of a serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* U5575 with promising Keratin-Biodegradation and Hid-Dehairing Activities. Public Library of Science ONE, 8 (10): e76722.

Jeddou K., Chaari F., Makhtouf S., Nouri-Ellouz O., Helbert C B. et Ghorbel R E. (2016). Structural, functional and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. Food Chemistry, 205: 97–105.

Jendrossek D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). Journal of Bacteriology, 191: 3195–3202.

Joffin J N., Leyral G. (2006). Microbiologie technique. Tome 1, Dictionnaire des techniques 4^{ème} édition, p361.

K

Kevbrin V V., Zengler K., Lysenko A M., Wiegel J. (2005). *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic, facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geysir Valley Kamchatka. Extremophiles, 9 (5): 391-8.

Kian M G., Unnirul M k., Yen Y C., Chun S C., Kian-Gan C. (2013). Découvertes et applications récentes d'*Anoxybacillus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (4): 1475-1488.

Kim J M., Lim W J., Suh H J. (2001). Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. Process Biochemistry, 37 (3): 287–91.

Kim M., Suh H., Cho E J., Buratowski S. (2009). Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serine 2,5 and 7. Journal of Biological Chemistry, 284 (39): 26421-6.

Koller M. (2018). Biodegradable and biocompatible polyhydroxyalkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules*, 23: 362.

Kouker G., Jaeger K E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (1): 211-213.

Krausz P., Sol V., Granet R. (2014). Les glucides: structures, réactions, oligo et polysaccharides-cours et exercices corrigés. Ed, Ellipses, Paris-France. 232p.

Kuhad R C., Gupta R., Singh A. (2011). Microbial cellulases and their industrial Applications. *Enzymes Research*, 2011: 1-10.

L

Langeveld J P M., Vandexiel D F M., Shih G C., Gursen G J., Bossers A., Shih J C H. (2003). Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. *The Journal of Infectious Diseases*, 188: 1782-1789.

Laubier L. (2012). Bacteries des abysses. Cherbourg: La Cité de la Mer.

Lewison R L. (2004). Quantifying the effects of fisheries on threatened species: The impact of pelagic long lines on loggerhead and leatherback sea turtles. *Ecology Letters*, 7 (3): 221-231.

Lin X., Miller S E., Shih J C. (1997). Expression of the *Bacillus Licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*. *J IND Microbiol Biotechnol*, 19 (2): 134-8.

Lynd L R., Weimer P J., Van Zyl W H., PProtorius S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 66 (3): 506-77.

M

Mantiri F R., Rumende R R H., Sudewi S. (2019). Identification of α -amylase gene by PCR and activity of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus thermarum* isolated from Remboken hot spring in Minahasa, Indonesia., 2017: 012045.

Marquez S L., Blamey J. (2019). Isolation and partial characterization of a new moderate thermophilic *Albidovolum* sp. SLM16 with transaminase activity from Deception Island. *Antarctica Biology Research*, 52: 5.

Menzel P., Gudbergsdóttir S. R., Rike A G., Lin L., Zhang Q., Contursi P. (2015). Comparative metagenomics of eight geographically remote terrestrial hot springs. *Microbial Ecology*, 70: 411–424.

Miyake D., Ichiki S., Tanabe M., Oda T. (2007). Thiosulfate oxidation by a moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus*. *Archives of Microbiology*, 188 (2): 199-204.

Moharana T R., Pal B., Rao N M. (2019). X-ray structure and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508 (1): 145-151.

Moser F., Irwin D., Chen S L., Wilson D B. (2008). Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. *Biotechnology and Bioengineering*, 100: 1066–1077.

N

Nakai H., Okuyama M., Kim Y M., Saburi W., Wongchawalit J., Mori H., Shiba S., Kimura, A. (2005). Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia*, 60 (Suppl. 16): 131-135.

Nazina T N., Tourova T P., Poltarau A B., Novikova E V., Grigoryan A A., Ivanova A E., Lysenko A M., Petrunyaka V V., Osipov G A., Belyaev S S., Ivanov M V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 433-446.

Nigam P., Singh D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microbiol Technology*, 17: 770-778.

Nigam P S. (2013). Microbial Enzymes with special characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules*, 3: 597-611.

Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. (1999). Applied Microbiology and Biotechnology Extremophiles as a sources of novel enzymes for industriel application, 51, Issue 6: 711-729.

O

Obruca S., Sedlacek P., Koller M., Kucera D., Pernicova I. (2017). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, 36 (3): 856-870.

Olusesan A., Azura L K., Abubakar F., Hamid N S., Radu S., Saari N. (2009). Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus* species: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hot spring. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25 (11): 1981-1988.

P

Paul S C., Jain P., Mirta J., Dutta S., Bhattacharya P., Bal B., Bhattacharya D., Das Gupta S., Pal S. (2012). Induction of Cr (VI) reduction activity in an *Anoxybacillus* strain under heat stress: a biochemical and proteomic study. *FEMS Microbiology Letters*, 331 (1): 70-80.

Perrakis A., Tews I., Dauter Z. (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3.Å resolution. *Structure* 2: 1169–1180.

Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskay N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G., Laurinavichius K. (2000). *Anoxybacillus puschinensis* gen. nov. sp. nov. A novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* combs. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2109-2117.

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

Priest G.F., Fergus G., Goodfellow M., Todd C. (1988). A Numerical Classification of the genus *Bacillus*. Journal of general microbiology, 134: 1847-1882.

Q

Querellou, J. (2004). Les microorganismes des milieux extrêmes: des grands fonds marins aux applications industrielles. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 39 (6): 397-400.

Querellou J., Guezennec J. (2010). Biotechnologie des extremophiles. Vol 580, Edition Techniques de l'Ingénieur, 1-13.

R

Rahman R N., Leow T C., Basri M., Salleh A B. (2005). Secretory expression of thermostable T1 lipase through bacteriocin release protein. Protein Expression and Purification, 40 (2): 411-416.

Ram S S., Taranjeet S., Ashok P. (2019). Microbial Enzymes-An Overview. ELSEVIER, In book: biomas, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzymes Technology, Ed:1: p1-40.

Rastogi G., Bhalla A., Adhikari A., Bischoff K M., Hughes S R., Christopher L P., Sani R K. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. Bioresource Technology, 101 (22): 8798-806.

Ray L., Panda A. N., Mishra S. R., Pattanaik A. K., Adhya T. K., Suar M., Raina V. (2019). Purification and characterization of an extracellular thermo-alkali stable, metal tolerant chitinase from *Streptomyces chilikensis* RC1830 isolated from a brackish water lake sediment. Biotechnology Reports, 21, e00311.

Roberts W K., Selitrennikoff C P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. Journal of General Microbiology, 134 (1): 169-176.

Robinson P K. (2015). Enzymes: Principles and biotechnological applications. Essays in Biochemistry, 59: 75.

Roger O. (2002). Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens: obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse de doctorat, université paris, 19p.

S

Saibi H. (2015). Geothermal resources in Algeria. Proceedings in World Geothermal Congress 2015, Melbourne, Australia, 19–24 April.

Saloheimo M., Paloheimo M., Hakola S., Pere J., Swanson B., Nyysönen E., Bhatia A., Ward M., Penttilä M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins exhibits disruption activity on cellulosic materials. European Journal of Biochemistry, 269: 4202–4211.

Satyanarayana T., Raghukumar Ch., Roswall T., Shivaji S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. Current Science 89: 1.

Sexena R K., Ghoshl K., Gupta R., Sheba D W., Bradro S., Gulati R. (1999). Microbial lipases potential biocatalyst for the future industry. Current Science, 77: 101-115.

Shahinyan G., Margaryan A., Panosyan H., Trchounian A. (2017). Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. BMC Microbiology, 17: 103.

Sharma R., Chisti Y., Banerjee U C. (2001). Production, purification, characterization and applications. Science world Journal, Article ID625258: 15.

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

Simair A A., Qureshi A S., Khushk I., Haider Ali C., Lashari S., Bhutto M A., Mongrio G S., Lu C. (2017). Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. BioMed Research International: 9.

Singh J., Batra N., Sbti R C. (2004). Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate *Bacillus sphaericus* JS1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31: 51-6.

Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta P k. (2016). Microbial Proteases in Commercial Applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4 (3): 365-374.

Slaninova E., Sedlacek P., Mravec F., Mullerova L., Samek O., Koller M., Hesko O., Kucera D., Marova I., Obruca S. (2018). Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 1923–1931.

Stetter K O., Huber R., Blöchl E., Kurr M., Eden R D., Fielder M., Cash H., Vance I. (1993). Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*, 365: 743–745.

Stöhr R., Waberski A., Liesack W., Völker H., Wehmeyer U., Thomm M. (2001). *Hydrogenophilus hirschii* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing beta-proteobacterium isolated from Yellowstone National Park. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 481–488.

T

Turner P., Mamo G., Karlsson E. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factory*, 6: 9.

U

Ulhoa C J., Peberdy J F. (1992). Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 236-240.

V

Vieille C., Savchenko A., Zeikus G. (2000). Microbial amylases. *Encyclopedia of microbiology*, 1: 171-177.

Vihiner M., Mantsala P. (1989). Enzymes amylolytique microbiennes. *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology*, 24: 329-418.

Volkl P., Huber R., Drobner E., Rachel R., Burggraf S., Trincone A., Stetter K O. (1993). *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. Applied and Environmental Microbiology, 59: 2918-2926.

W

Wang Y., Zhang H., Yan C., Liu Y., Xu Q., Liu X., Zhang Z. (2018). Effective biodegradation of Aflatoxin B1 using the *Bacillus licheniformis* (BL010) strain. Toxins, 10 (12): 497.

Woese C R., Kandler O., Wheelis M L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proceeding of the National Academy of Sciences, 87: 4576-4579.

Wu W L., Chen M Y., Tu I F., Lin Y C., Eswarkumar N., Chen M Y., Ho M C., Wu S H. (2017). The discovery of novel heat-stable keratinases from *Meiothermus taiwanensis* WR-220 and other extremophiles. Scientific Reports, 7 (4658).

Y

Yadav P., Mharjan J., Korpole S., Prasad G S., Sahni G., Bhattarai T., Sreerama L. (2018). Production, purification, and Characterization of thermostable alkaline Xylanase from *Anoxybacillus Kamchatkensis* NASTPD13. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6: 65.

Yildirim V., Baltaci M O., Ozgencli I., Sisecioglu M., Adiguzel A., Adiguzel G. (2017). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. Journal Chemistry, 32 (1): 468-477.

Yin D., Xiao J., Ao J., Ai C., Chen X. (2012). *Albidovulum xiamenense* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a terrestrial hot spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62: 1609-1612.

Yu X H., Liu Y., Wu X L., Liu L Z., Fu W., Song D D. (2017). Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from American ginseng. Carbohydrate Polymers, 156: 9–18.

Z

Zambare V P., Zambare A V., Muthukumarappan K., Christopher L P. (2011). Potential of thermostable cellulases in the bioprocessing of switchgrass to ethanol. *BioResources* 6 (2): 2004-2020.

Zaraï Jaouadi N., Rekik H., Badis A., Trabelsi S., Belhoul M., Benkiar Yahiaoui A., Ben Aicha H., Toumi A., Bejar S., Jaouadi B. 2013. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *Public Library of Science One*. 8 (10): e76722

Zhang S., Li X Z. (2015). Inhibition of α -glucosidase by polysaccharides from the fruit hull of *Camellia oleifera* Abel. *Carbohydrate Polymers*, 115: 38-43.

Zhu K., Zhang Y., Nie S., Xu E., He S., Gong D., Wu G., Tan L. (2017). Physicochemical properties and in vitro antioxidant activities of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam Pulp. *Carbohydrate Polymers*, 155: 354-361.

Annexes

Annexe 1

Matériel non biologique

- ❖ Autoclave (WEBECO Allemagne)
- ❖ Etuve (BINDER Allemagne)
- ❖ Bain marie (MEMMERT Allemagne)
- ❖ Agitateur chauffant a barreau magnétique (GARHARDT Allemagne)
- ❖ Balance (KERN 770 Allemagne)
- ❖ Réfrigérateur (ENIEM Algérie)
- ❖ Lampe à UV
- ❖ Microscope photonique
- ❖ Bec bunsen
- ❖ Boites Pétri
- ❖ Pipettes Pasteur
- ❖ Microfiltre
- ❖ Erlenmeyer
- ❖ Eprouvette
- ❖ Flacons en verre
- ❖ Tubes à essai en verre

Annexe 2

Technique de la coloration de Gram:

-) Réalisation d'un frottis, et fixation de ce dernier par la chaleur avec ou sans l'ajout de l'éthanol (95°).
-) Coloration au violet de Gentiane en planant la lame dans la solution pendant 2 à 3 minutes, ensuite le rinçage avec de l'eau distillée.
-) Mordançage au lugol (solution iodo-ioduré) en étalant le lugol sur la lame et laisser agir 20 secondes, puis rincer avec l'eau distillées.
-) Décoloration à l'alcool par le versement de quelques gouttes sur la lame, laisser agir 5 à 10 secondes et le rinçage avec l'eau distillées.
-) Contre coloration avec la fushine pendant 30 secondes à 1 minute, puis le rinçage délicatement avec de l'eau distillée.
-) Séchage de la lame et observation au microscope photonique au grossissement 40.

Résumé

L'intérêt grandissant porté aux microorganismes thermophiles indigènes des biotopes chauds tels que les sources thermales terrestres, revient à leurs capacités d'adaptations moléculaires aux contraintes physico-chimiques auxquelles ils font face ainsi qu'à leur richesse en molécules bioactives peu conventionnelles. D'ailleurs, l'exploitation des enzymes issues de ces microorganismes offre des avantages majeurs et fournit des possibilités d'amélioration et /ou d'innovation dans le domaine de la biotechnologie.

La présente étude a pour objectif: la caractérisation et le criblage d'activités hydrolytiques extracellulaires de bactéries thermophiles isolées à partir d'une source thermale: Hammam Righa. Les résultats obtenus ont permis la révélation de la présence de différentes enzymes, y compris: les amylases, cellulases, caséinases, chitinases, xylanases, lipases, kératinases et estérases chez 17 isolats. Il est noté que l'ensemble des souches présentent un arsenal enzymatique important. En outre, quatre souches (M1VBL, KBM7, HB12 et KB1) s'avèrent les plus performantes puisqu'elles ont dégradé l'ensemble des substrats rajoutés dans les milieux de culture. Or, pour le reste des souches, il a été conclu qu'elles combinaient plus d'une activité catalytique.

D'après ces résultats, il paraît intéressant de développer les recherches sur les bactéries thermophiles et de mieux les étudier afin d'exploiter le maximum de leurs propriétés d'intérêt biotechnologique et industriel.

Mots clés: Sources Thermales, Thermophiles, Enzymes, Criblage, Applications industrielles.

Abstract

The growing interest of thermophilic microorganisms in hot biotopes such as terrestrial hot springs, comes down to their molecular adaptation capacities against the physicochemical constraints they face and their richness of bioactive molecules like thermostable enzymes. Therefore, they are very interesting for industrial applications.

The principal aims of this study was the characterization and screening of some enzymatic activities (amylases, cellulases, proteases, chitinases, xylanases, lipases, keratinase and esterase) of seventeen strains of thermophilic bacteria isolated from a hot spring: Hammam Righa.

The screening led to found that all the strains have an enzymatic arsenal, particularly, four of them (M1VBL, KBM7, H912, and KB1) who represent the most efficient between the others since they have hydrolyzed all the substrates since the others have combined more than one hydrolytic activity.

These results prove that thermophilic bacteria must be exploited for their biotechnological interest and their industrial applications. So that researches about them must be developed.

Key words: Hot springs, Thermophilic microorganisms, Enzymes, Screening, Industrial applications

تتمتع الكائنات المجهرية التي تعيش في الأماكن الحارة كالينابيع المائية الساخنة بأهمية قصوى وذلك لقدرتها على تحمل الظروف البيئية هناك. إنها تعتبر من الكائنات الحيوية الغنية من حيث الجزيئات ذات النشاط الحيوي ميكائزومات بيوكيميائية ضرورية خاصة الإنزيمية منها والتي تملك مقومات هامة تجعلها الأهميتمثل الهدف الرئيسي للدراسة في و ماهية خاصة لسبعة عشرة سلالة بكتيرية محبة من ينبوع مائي ساخن معروف بحمام ريغة في ولاية عين الدفلى. هذه البكتيريا نزيما تالمبحوث عنها (KB1 H912 KBM7 M1VBL) و الباقي يتمتع نزيما ت فقط.

بالرغم من كونها دراسة ولية ن النتائج المتحصل عليها همية هذا النوع من الكائنات الحية كبر كمية من خصائصها المجال الصناعي و البيوتكنولوجي .

الكلمات الهامة : الينابيع المائية الساخنة البكتيريا المحبة الانزيمات.