



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De l'Enseignement Supérieur

Et

De la Recherche Scientifique



Centre Universitaire Abbès Laghrour Khenchela

Institut des Sciences de la Nature Et de la Vie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magistère

Option: Microbiologie des écosystèmes aquatiques

Présenté par

YAKHLEF Wahiba

Thème

**Identification et Caractérisation des Communautés
Microbiennes des Sources Hydrothermales de l'Est
Algérien**

Soutenu le: 03 / 01 / 2012

Devant le jury

Président :	M. BENOUNIS M. (MCA)	C. Univ. Abbès Laghrour - Khenchela
Encadreur :	M. DARBOUCHE A. (Prof)	C. Univ. Abbès Laghrour - Khenchela
Examineurs :	M. HOUHAMDI M. (Prof)	Univ. 08 Mai 1945 - Guelma
	M. BOUDEMAGH A. (MCA)	Univ. Mentouri - Constantine

2011-2012

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je tien tout d'abord à remercier Monsieur **DARBOUCHE A.**, Président du Conseil Scientifique et Professeur au Centre Universitaire de Khenchela, pour avoir accepté de diriger ce mémoire et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet passionnant. Merci pour votre simplicité et vos grandes qualités humaines.

Je remercie également Monsieur **BENOUNIS M.**, Maître de Conférences au Centre Universitaire de Khenchela, qui me fait l'honneur de présider mon jury de soutenance.

Mes plus vifs remerciements vont à Monsieur **HOUHAMDI M.**, Professeur à l'Université de Guelma, d'avoir voulu accepter de participer à ce jury. Je suis particulièrement heureuse de bénéficier de ses critiques et je lui exprime ma profonde considération.

Je suis également très honorée de la présence de ce jury de monsieur **BOUDEMAGH A.**, Maître de Conférences à l'Université de Constantine.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mon respect à tous nos estimables enseignants de la première année de notre formation, Mme **Kellil K.**, Mme **Bouannani S.**, M. **Ghers A.**, M. **Houha B.** et Mme **Deghbouche N.**

Mes remerciements vont également à tous mes camarades de promotion, spécialement **Asma, Leyla, Zineb et Mokhtar**. Je vous remercie pour avoir contribué à l'excellente ambiance qui a fait de cette période, deux années riches en souvenirs forts sympathiques. Sans oublier Mme **Chorfi K.** à qui je suis «extrêmement» reconnaissante pour l'aide qu'elle m'a apporté.

Je dois également une profonde gratitude à mon **Père** et à Monsieur **Ghoumri H.** qui m'ont accompagné et aidé durant toutes les sorties d'échantillonnage que j'ai effectué.

Merci à tous mes amis, **Zahra, Mohsen, Hichem et Charaf-eddine** pour leurs sincères encouragements, leur aide et leur soutien. Merci d'avoir supporté mes conversations tournant presque exclusivement autour de la rédaction de mon mémoire depuis quelques mois.

Je n'oublierai pas de remercier toute l'équipe du laboratoire de bactériologie de l'Etablissement Public Hospitalier de Oued Zenati, en particulier Mme **Djaballah A.** pour leur aimable aide et encouragements.

Et puis, j'aurais dû bien évidemment commencer par eux, pour leur soutien continu tout au long de ma scolarité: un Grand Merci à ma **Famille**, à qui je dois une infinie reconnaissance.

Dédicaces

A mes chers Parents,

A mes deux Sœurs,

A mon unique frère Mustapha,

A la mémoire de mes Grands-parents,

Et à tous ceux que j'aime, je dédie ce mémoire.

Table des matières

Abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des photographies	iii
Liste des tableaux	iv

Introduction	1
---------------------------	---

Revue bibliographique

I. Les eaux thermales	3
1. Définition de la thermalité	3
2. Classification des eaux thermales	3
2.1. Selon la température d'émergence	3
2.1.1. Eaux hypothermales	3
2.1.2. Eaux métriothermales	3
2.1.3. Eaux mésothermales.....	3
2.1.4. Eaux hyperthermales	3
2.2. Selon la minéralisation	4
2.2.1. Eaux bicarbonatées.....	4
2.2.2. Eaux chlorurées sodiques	4
2.2.3. Eaux sulfatées	4
2.2.4. Eaux sulfurées	4
3. Thermalisme en Algérie	5
II. Les extrémophiles	7
1. Définition et terminologie	7
2. Habitats des extrémophiles	8
III. Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles	11
1. Définition	11
2. Classification	12
3. Ecologie	13
4. Phylogénie	14

5. Physiologie	20
6. Adaptation et stabilité	21
6.1. Lipides	22
6.2. Acides nucléiques	22
6.3. Protéines	23
IV. La biotechnologie des microorganismes thermophiles	26
1. Enzymes thermostables	26
2. Substances antibactériennes et microorganismes thermophiles	28

Matériel et méthodes

1. Procédure d'échantillonnage	29
2. Mesure de la température et du pH <i>in situ</i>	29
3. Isolements	31
3.1. Isolement en aérobiose	31
3.2. Isolement en anaérobiose	32
4. Purification des isolats	33
5. Conservation des souches	33
6. Biodiversité physiologique des isolats.....	33
6.1. Croissance à différentes températures.....	33
6.2. Croissance à différents pH.....	33
7. Biodiversité morphologique des isolats	33
7.1. Aspect des colonies sur milieu solide	34
7.2. Colorations	34
7.2.1. Préparation des frottis	34
7.2.2. Coloration de Gram	34
7.2.3. Coloration au vert de malachite.....	35
8. Biodiversité métabolique des isolats.....	35
8.1. Recherche de la catalase.....	35
8.2. Recherche de l'oxydase	35
8.3. Recherche de l'Uréase	36
8.4. Recherche de la production de l'indole.....	36

8.5. Utilisation du citrate comme seule source de carbone.....	36
8.6. Réduction des nitrates.....	36
8.7. Hydrolyse de l'amidon.....	36
8.8. Hydrolyse de la gélatine	37
9. Recherche de l'activité antibactérienne	37
9.1. Inocula des bactéries tests	38
9.2. Technique des cylindres d'agar.....	38

Résultats et discussion

1. Caractéristiques physico-chimiques des sources hydrothermales étudiées.....	39
2. Résultats des isolements	40
2.1. Isolement en aérobiose	42
2.2. Isolement en anaérobiose	44
3. Biodiversité physiologique des souches sélectionnées	45
3.1. Croissance à différentes températures	45
3.2. Croissance à différents pH.....	47
4. Biodiversité morphologique des souches sélectionnées.....	48
4.1. Examen macroscopique et microscopique des isolats.....	48
4.2. Colorations	52
5. Biodiversité métabolique des souches sélectionnées.....	52
5.1. Réduction des nitrates	54
5.2. Hydrolyse de l'amidon	54
5.3. Hydrolyse de la gélatine	57
6. Activité antibactérienne des isolats	57
7. Identification des souches isolées	60

Conclusion et perspectives	63
---	----

Références bibliographiques	66
--	----

Annexes

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

atm : Atmosphère

ATP : Adénosine triphosphate

°C : Degré Celsius

DO : Densité optique

G: Grossissement

G+C : Coefficient de Chargaff

GN : Gélose nutritive

H : Hammam

h : Heure

M : Molaire

min : Minute

mm : Millimètre

Mrad: Megarad

MT: Milieu *Thermus*

NaCl : Chlorure de sodium

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

ng : Nanogramme

nm : Nanomètre

ORL : Oto-rhino-laryngologie

pH : Potentiel d'hydrogène

sp : Espèce

t : Temps

T : Température

TSA : Trypticase soja agar

UFC : Unité Formant une Colonie

µm : Micromètre

Liste des figures

Figure N°1: Répartition des sources thermales dans le Nord algérien (Fekraoui <i>et al.</i> , 1999)	6
Figure N°2: Variation des conditions environnementales normales et extrêmes (zones ombrées) sur la majorité des organismes (Wharton, 2000).....	7
Figure N°3: Division des organismes vivants selon leur température de croissance (Madigan <i>et al.</i> , 2003).....	13
Figure N°4: Répartition mondiale des zones géothermiques où les thermophiles et les hyperthermophiles ont été isolés (Castenholz, 1969).....	13
Figure N°5: Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques (Madigan <i>et al.</i> , 2003; Hobel, 2004).....	16
Figure N°6: Le profil de distribution des procaryotes thermophiles en fonction de leur température et pH optimaux respectifs (Kristjansson et Stetter, 1992).....	20
Figure N°7: Structure membranaire des <i>Archaea</i> (Madigan <i>et al.</i> , 2003).....	22
Figure N°8: Carte de l'Algérie montrant la zone d'étude (nord-est algérien) (Saibi, 2009). 29	
Figure N°9: Schéma global de la procédure d'isolement en aérobiose.....	31
Figure N°10: Schéma global de la procédure d'isolement en anaérobiose.....	32
Figure N°11: Fluctuation du taux d'isolement en fonction de la température et du pH de chaque source.....	41
Figure N°12: Fluctuation du taux des thermophiles aérobies isolés en fonction du milieu de culture utilisé.....	43
Figure N°13: Fluctuation du nombre des isolats en fonction de la température	46

Liste des photographies

Photographie N°1: Sites des prélèvements.....	30
Photographie N°2: Aspect macroscopique des huit souches thermophiles isolées des sources thermales de l'Est algérien.....	51
Photographie N°3: Aspect microscopique des souches thermophiles isolées des sources thermales.....	53
Photographie N°4: Tests de sélection de souches amylolytiques sur milieu nutritif gélosé à 1% d'amidon.....	54
Photographie N°5: Effet de la souche STK sur <i>S. aureus ATCC43300</i>	59
Photographie N°6: Effet de la souche STL sur <i>S. aureus ATCC43300</i>	59
Photographie N°7: Effet de la souche SLK sur <i>S. aureus ATCC 25923</i>	59
Photographie N°8: Effet des souches STP sur <i>E. coli ATCC 25922</i>	59
Photographie N°9: Effet des souches STK et STL sur <i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	59
Photographie N°10: Effet de la souche SBA sur <i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	59

Liste des tableaux

Tableau N°1: Caractéristiques de quelques sources thermales du Nord de l'Algérie (Ouali <i>et al.</i> , 2007).....	6
Tableau N°2: Caractéristiques des environnements extrêmes dans lesquelles les microorganismes peuvent se développer (Prescott <i>et al.</i> , 1999).....	10
Tableau N°3: Températures maximales de croissance des principaux groupes d'organismes (Hobel, 2004).....	12
Tableau N°4: Caractéristiques des <i>Bacteria</i> et des <i>Archaea</i> (Postec, 2005).....	15
Tableau N°5: Liste des Bactéries et <i>Archaea</i> thermophiles possédant une T_{opt} supérieure à 65°C, et leurs caractéristiques physiologiques respectives (modifié par Kristjansson et Stetter, 1992, Marteinson, 1997, Kristjansson <i>et al.</i> , 2000, Boone <i>et al.</i> , 2001, et Hreggvidsson et Kristjansson, 2004).....	17
Tableau N°6: Applications des enzymes et des composés endogènes des organismes thermophiles et hyperthermophiles (modifié par Haki et Rakshit, 2003).....	27
Tableau N°7: Références des souches bactériennes cibles.....	38
Tableau N°8: Les paramètres physico-chimiques des quatre sources thermales étudiées.....	39
Tableau N°9: Les faciès chimiques des eaux thermales des quatre sources étudiées.....	40
Tableau N°10: Résultats des isolements en aérobiose et en anaérobiose à partir des quatre échantillons d'eaux thermales.....	41
Tableau N°11: Résultats de l'isolement en aérobiose sur les trois milieux de culture.....	43
Tableau N°12: Nombre de souches sélectionnées par échantillon.....	44
Tableau N°13: Croissance des seize isolats à différentes valeurs de température.....	45
Tableau N°14: Microorganismes hyperthermophiles, thermophiles et thermotolérants isolés.....	46

Tableau N°15: Croissances des seize isolats à différentes valeurs de pH.....	47
Tableau N°16: Observation culturelle et morphologique des souches isolées.....	49
Tableau N°17: Genres probables des souches microbiennes isolées à partir des eaux thermales du nord-est algérien.....	56
Tableau N°18 : Activité antibactérienne des isolats aérobies contre les bactéries tests.....	58

INTRODUCTION

La naissance de la planète terre est passée par plusieurs temps parfois très extrêmes comme la température, la surcharge en métaux lourds ou la dominance des écosystèmes salins etc. La genèse d'organismes était d'une manière générale très difficile, nécessitant une adaptation spécialisée et continue aux conditions extrêmes. Par ailleurs tout organisme vivant est influencé par de nombreux paramètres physico-chimiques environnementaux (température, salinité, pH, pression hydrostatique, radiations ionisantes, etc.). La détermination des valeurs minimales, optimales et maximales est indispensable. Ceci a pour but d'attribuer à chaque organisme un classement, une généalogie ou une approche scientifique ou étique.

Le terme extrêmophiles est porté à tout organisme ancestral persistant dans des conditions extrêmes (**Madigan et Marris, 1997**). Ce sont en très grande majorité des microorganismes et plus particulièrement des procaryotes (microorganismes unicellulaires ne possèdent pas de noyau) appartenant aux domaines des Bactéries et des *Archaea* (**Woese et al., 1990**).

A la fin des années soixante, Thomas Brock a découvert dans le parc national de Yellowstone aux Etats-Unis une nouvelle forme de bactéries (*Thermus aquaticus*) pouvant vivre d'une façon optimale à proximité des températures d'ébullition. A cette époque, la température limite de la vie a été fixée à 73°C. Huit ans plus tard, Brock a isolé *Sulfolobus acidocaldarius*, le premier organisme hyperthermophile (température optimale de croissance supérieur à 80°C). Depuis ce temps, divers microorganismes extrêmement thermophiles ont été isolés. La majorité de ces organismes appartiennent aux archées (**Brock et Freeze, 1969; Brock et al., 1972; Stetter et al., 1986; Gerday et Glansdorff, 2007**).

Au cours des dernières années, des études microbiologiques fondées sur des approches moléculaires et culturelles ont révélé une grande diversité phylogénétique et physiologique des microorganismes colonisant les sources hydrothermales terrestres. En outre de la capacité de ces microorganismes à tolérer et à résister aux températures et aux conditions extrêmes. Ce groupe de microorganismes dits thermophiles constitue une source d'enzymes thermostables potentiellement utiles pour des applications biotechnologiques et industriels (**Leuschner et Antranikian, 1994**).

Il existe sur le territoire algérien plus de 240 sources hydrothermales terrestres. D'après les études réalisées à ce sujet, ce nombre croit régulièrement quand on se déplace vers l'Est. Les températures mesurées à l'émergence varient de 19°C à Ben Haroune à 98°C à Hammam Dbegh (**Ouali, 2008; Saibi, 2009**).

Ce n'est que récemment que les écosystèmes hydrothermaux terrestres ont été exploités en Algérie à fin de rechercher de nouveaux microorganismes. *Pyrococcus*, *Archaea* hyperthermophile, et *Caldicoprobacter algeriensis*, une bactérie thermophile xylyanolytique, ont été isolé du nord-est de l'Algérie (**Kecha et al., 2007; Bouannane et al., 2011**). À notre connaissance, aucune espèce aérobie thermophile n'a été déjà décrite jusqu'à présent.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la biodiversité des microorganismes thermophiles et hyperthermophiles dans quelques sources hydrothermales terrestres de l'Est algérien. En effet, le travail s'articule sur:

- L'isolement des microorganismes thermophiles et hyperthermophiles ;
- La sélection des milieux de culture adéquats et les techniques culturales favorisant la croissance de ce groupe de microorganismes ;
- L'identification des souches isolées jusqu'au niveau du genre, en étudiant leurs caractères morphologiques, physiologistes et biochimiques ;
- La recherche d'éventuelles souches bactériennes productrices d'enzymes thermostables ;
- La sélection des isolats thermophiles développant une activité antibactérienne.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. Les eaux thermales

1. Définition de la thermalité

Différentes définitions ont été données pour une eau thermale, nous tiendrons la définition de Schoeller qui considère comme thermales les eaux dont la température à l'émergence est supérieure à la température moyenne annuelle de l'air de la région (plus de 4°C) (Schoeller, 1962).

Il est important de signaler que la température mesurée à l'émergence n'est pas forcément représentative de la température réelle de la source, un refroidissement des eaux thermales se produit au cours de leur remontée vers la surface par dégazage, échanges thermiques avec les parois du circuit hydrothermal, ou par mélange avec les eaux froides en surface ou en profondeur (Athemena, 2006).

2. Classification des eaux thermales

2.1. Selon la température d'émergence

On distingue les eaux thermales de basse température et les eaux thermales de haute température. D'après Issaâdi, les eaux thermales sont classées selon leur température d'émergence en quatre classes :

2.1.1. Eaux hypothermales

Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est inférieure à celle de la partie supérieure de la zone d'homothermie ou à la température moyenne interannuelle du lieu d'émergence plus 4°C.

2.1.2. Eaux métriothermales

Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est inférieure à 30°C mais supérieure à celle des eaux hypothermales.

2.1.3. Eaux mésothermales

Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est entre 30°C et 50°C.

2.1.4. Eaux hyperthermales

Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est supérieure à 50 °C et inférieure à 100 °C. Ces températures élevées témoignent une origine profonde de ces eaux (Issaâdi, 1992).

2.2. Selon la minéralisation

La minéralisation des eaux thermales est déterminée surtout par la nature chimique et minéralogique des sédiments qu'elles traversent et, accessoirement, par la vitesse de circulation souterraine. En se basant sur l'importance de tel ou tel sel minéralisateur, on distingue, des sources bicarbonatées, chlorurées sodiques, sulfatées, sulfurées, etc. Chaque type est connu par des vertus curatives particulières (**Guigue, 1940**).

2.2.1. Eaux bicarbonatées

Des eaux qui proviennent des roches calcaires et contiennent les bicarbonates. On distingue : Les eaux bicarbonatées sodiques ou bicarbonatées calciques. Ce type d'eaux facilite le traitement des différentes brûlures (exemple Hammam Abou Hanifa, Mascara) (**Dib, 2008**).

2.2.2. Eaux chlorurées sodiques

Où prédomine le chlorure de sodium. Elles sont indiquées dans le traitement des troubles du développement et de l'énurésie (exemple Hammam Essalhine, Khenchela) (**Houha, 1996**).

2.2.3. Eaux sulfatées

Des eaux riches en soufre. On distingue : les eaux sulfatées calciques et les eaux sulfatées sodique et magnésiennes. Elles sont utilisées pour le traitement des affections rhumatismales chronique (exemple Hammam Belhachani et Hammam Ouled Ali, Guelma) (**Dib, 2008**).

2.2.4. Eaux sulfurées

Elles contiennent du soufre sous différentes formes, Celles qui contiennent de l'hydrogène sulfureux sont caractérisées par une odeur d'œufs pourris. Cependant, on diffère : Les eaux sulfurées sodiques et Les eaux sulfurées calciques qui sont prescrites pour le traitement des voies ORL (exemple Hammam Dbegh, Guelma) (**Guigue, 1940**).

3. Thermalisme en Algérie

Les traces retrouvées dans les stations thermales remontent à l'époque romaine. En effet les romains accordaient une importance très particulière aux sources thermales, très souvent ils construisirent leurs sites autour de ces sources, comme c'est le cas pour les sites suivants : *Aquae Mauretaniae Cesarienne* (Hammam Righa) ; *Aquae Sirenses* (Hammam Bouhanifia) ; *Aquae Chibilita Nae* (Hammam Dbegh).

Accordant de l'importance à l'hygiène corporelle, les Arabes renouèrent avec les sources thermales sans en faire un cadre de vie comme les Romains. Hammam (bain chaud) est la dénomination donnée à l'ensemble des sources fréquentées. Aujourd'hui comme dans le passé les stations thermales sont très sollicitées par les algériens pour divers traitements d'ordre rhumatologique, dermatologique (**Boughlali, 2003; Ouali, 2008**).

Il existe sur le territoire algérien plus de 240 sources thermales. D'après les études réalisées à ce sujet, ce nombre croit régulièrement quand on se déplace vers l'Est. Les températures mesurées à l'émergence varient de 19 à 98°C. La température la plus élevée enregistrée pour la zone ouest est: 68°C (Hammam Abou Hanifia), 80°C pour la zone centrale (Hammam El Biban) et 98°C pour la zone de l'Est (Hammam Dbegh). Dans la zone sud, il existe des sources thermales avec une température moyenne de 50°C. Ceux sont surtout les régions du nord-est et celle du nord-ouest qui comptent le plus grand nombres de sources thermales (figure N°1) (**Ouali, 2008; Saibi, 2009**).

La minéralisation des eaux est généralement supérieure à 1 mg/l. elle est déterminée surtout par la nature chimique et minéralogique des sédiments qu'elles traversent. Les sources thermales les plus minéralisées sont en relation directe avec les sédiments gypso-salins du Trias si répandu en Algérie, ce cas est rencontré à titre d'exemple à Hammam Melouane 29.42 gr/l, Hammam El Biban 15gr/l, Hammam Salhine 9 gr/l. Les faciès dominants de ces eaux sont chloruré-calciques, sulfaté-calciques et bicarbonatés. Le pH des eaux est généralement proche de la neutralité (tableau N°1) (**Guigue, 1940; Fekraoui et al., 1999**).

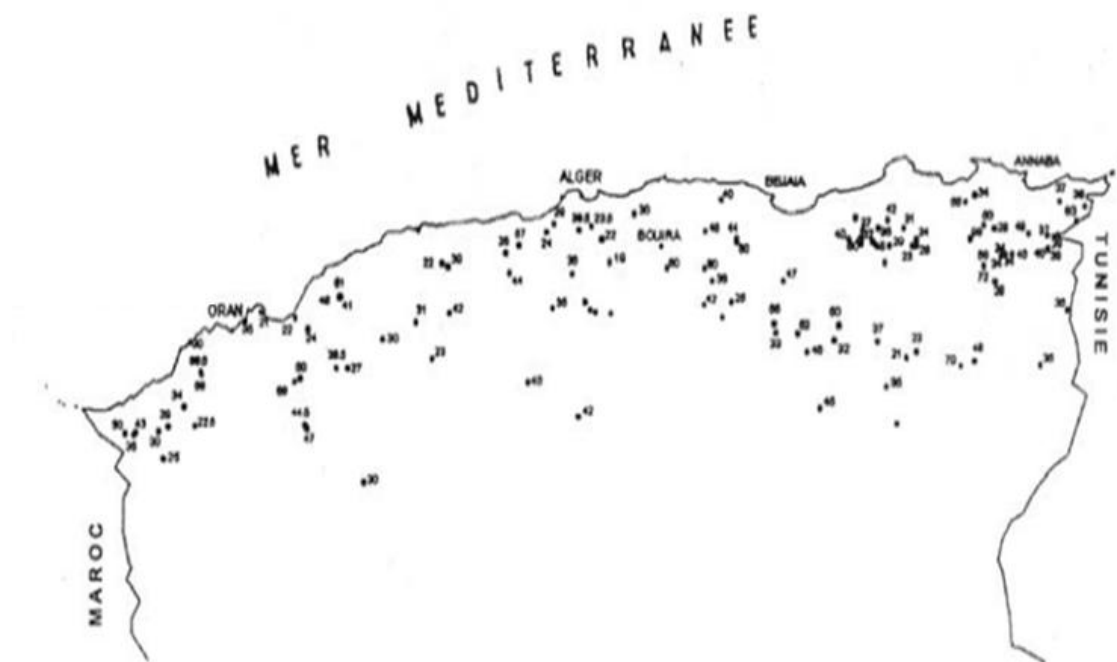


Figure N°1: Répartition des sources thermales dans le Nord algérien (Fekraoui *et al.*, 1999).

Tableau N° 1: Caractéristiques de quelques sources thermales du Nord de l'Algérie (Ouali *et al.*, 2007).

Sources thermales	Région	Faciès chimique	Résidus sec (mg/l)	T (°C)	Débit (l/s)
H. Dbegh	Guelma	Sulfurées calciques	1600	98	100
H. Bou Hadjar	Ain Timouchent	Chloruré sodique	3210	66.5	nd
H. Bouhanifa	Mascara	Bicarbonaté sodique	1400	66	nd
H. Boutaleb	Sétif	Chloruré sodique	3416	52	nd
H. Essalhine	Khenchela	Chloruré sodique	2082	70	nd
H. Salhine	Skikda	Sulfaté magnésien	2046	55	nd
H. Sidi Bou abdellah	Relizane	Chloruré sodique	1194	51	nd
H. Delaa	M'sila	Sulfaté sodique	1980	42	nd
H. Rabi	Saida	Chloruré sodique	1524	47	nd
H. Sillal	Bejaia	Chloruré sodique	2221	46	nd
H. Ben Haroun	Constantine	Chloruré sodique	3762	42	10

H : hammam

nd : non déterminé

II. Les extrêmophiles

1. Définition et terminologie

La survie et la croissance des organismes vivants sont régies par de nombreux facteurs physico-chimiques de l'environnement, chaque organisme étant défini et caractérisé d'après des paramètres spécifiques qui sont nécessaires à son développement. Les écosystèmes incompatibles avec la vie humaine sont le plus souvent considérés comme extrêmes. C'est le cas lorsque les températures, généralement tempérées à la surface de la terre (4-40°C), s'écartent de cette gamme. Ainsi, les microorganismes extrêmophiles se développent de façon optimale dans des conditions extrêmes de température, de pH (< 5 et >8), de salinité, de pression hydrostatique ou de radiations ionisantes. Il est donc naturel de considérer que tout système écologique qui n'est pas compatible avec la croissance et la survie des êtres humains comme étant «extrême» (Brock, 1978; Madigan, 1997). En opposition de nombreux organismes qui ne peuvent pas survivre en dehors des conditions «normales», les microorganismes extrêmophiles prospèrent de manière optimale lorsque l'un ou plusieurs de ces paramètres sont dans la gamme extrême (figure N°2).

Les facteurs les plus importants pour la croissance des microorganismes extrêmophiles sont la température élevée ou basse, le pH élevé ou bas et la salinité élevée. Les microorganismes sont alors qualifiés respectivement de thermophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles et halophiles.

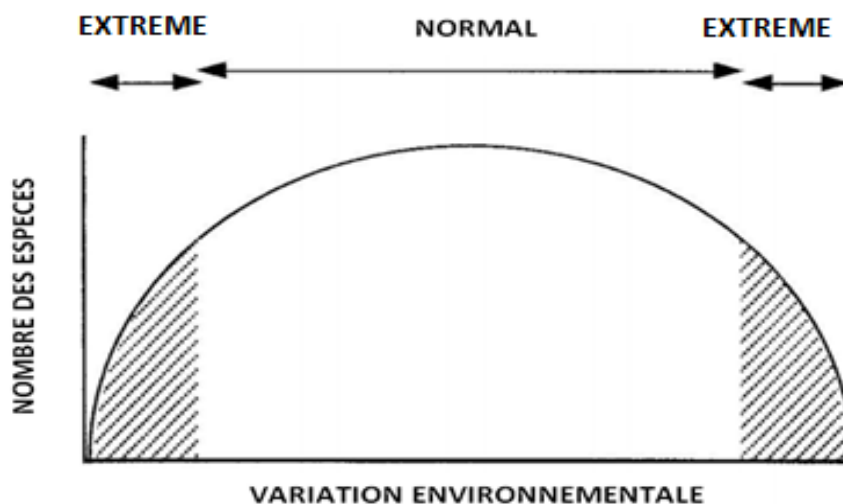


Figure N°2 : Variation des conditions environnementales normales et extrêmes (zones ombrées) sur la majorité des organismes (Wharton, 2004).

Cette classification englobe plusieurs biotopes naturels dans lesquels les conditions environnementales extrêmes sont plus fréquentes que celles habituelles trouvées dans la nature. En considérant la grande variété des biotopes sur terre, les réponses physiologiques aux conditions extrêmes sont observées sur une gamme qui va de la tolérance à l'exigence.

2. Habitats des extrémophiles

Les environnements extrêmes les plus importants trouvés dans la nature et les groupes microbiens typiques ou les espèces qui ont été observés en eux sont énumérés dans le tableau N°2.

Une grande partie de la surface terrestre possède une basse température. Les océans qui couvrent 71% de la surface ont une température moyenne annuelle de 5°C et les profondeurs des océans possèdent une température constante comprise entre 1 et 4 ° C durant toute l'année à cause d'une combinaison de la pression hydrostatique et la densité de l'eau. Les régions polaires, qui représentent 14% de la surface de la Terre, sont gelées en permanence ou au-dessus des températures de congélation seulement pour une courte période de temps. Ces environnements, qui sont dominants sur Terre, sont favorables aux psychrophiles capables de croître à une température froide à laquelle l'eau reste liquide (**Madigan, 1997**).

L'eau de mer contient en moyenne 3% de NaCl (poids/volume), des concentrations en sel supérieures à 3% dans l'eau sont rares dans la nature. La mer Morte, le Grand Lac Salé aux Etats-Unis présentent les écosystèmes naturels les plus hypersalés sur Terre. Le Blue spa de Lagoon en Islande, ou les marais salants solaires en Ouest de la France sont quelques exemples d'écosystèmes salés/hypersalés artificiels.

Les microbes halotolérants et halophiles croissent dans des concentrations de 1 à 20% en NaCl. Certains peuvent se développer en saturation en NaCl (> 30%) (**Grant, 1991**).

Les environnements à pH extrêmes limitent l'apparition de la vie microbienne. Les milieux acides sont largement distribués dans les aliments et les sols au monde entier. Les grandes zones géographiques riches en composés soufrés sont liées à l'activité volcanique. Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est libéré en grandes quantités et oxydé chimiquement et biologiquement en acide sulfurique résultant une forte diminution du pH dans le sol. D'autre part, il ya peu d'exemples de biotopes très alcalins dans la nature (**Grant, 1991**).

Les émissions de radiations extrêmes sont surtout présentes dans les installations nucléaires. Très peu de microbes ont été identifiés en provenance des bassins dans lesquels la matière fissile est stockée. Parmi ces derniers, *Deinococcus radiodurans* peut survivre autant que de 3 à 5 Mrad quand une dose de 0,0001 Mrad est mortelle pour les humains. Des recherches récentes indiquent que sa capacité à résister à la radioactivité peut résulter de la présence de multiples copies du chromosome et la capacité de réparation de l'ADN sévèrement endommagé (**Prescott, 1999**).

Enfin, les environnements à température élevée sont généralement trouvés associés à l'activité volcanique et des complexes artificiels. Les biotopes les plus importants sont les sources thermales terrestres, les milieux marins côtiers et les systèmes hydrothermaux océaniques profonds et peu profonds. Il faut également signaler que les environnements chauds affichent une gamme complète de pH, de l'acide à l'alcalin, selon la température, la disponibilité en eau, des gaz et de la concentration d'ions (**Kristjansson et Hreggvidsson 1995**).

Revue bibliographique

Tableau N°2: Caractéristiques des environnements extrêmes dans lesquelles les microorganismes peuvent se développer (**Prescott et al., 1999**).

Stress	Conditions environnementales	Ecosystèmes	Microorganismes observés	Références
Température	-2.5 – 0 °C	Régions polaires	<i>Flavobacterium</i>	(Shi et al., 1997)
	0 – 4 °C	Tranchées marin profondes	<i>Pseudomonas</i>	(Ravenschlag et al., 2001)
	65 – 95 °C	Sources hydrothermales terrestres	<i>Thermus spp.</i>	(Kristjansson et al., 1995)
	>100 – 121 °C	Events sous-marins	<i>Thermococcus barophilus</i>	(Marteinsson et al., 1999)
Salinité	> 6 %	Saumures, marais salants	<i>Halobacterium sp.</i>	(Sleator et al., 2002)
pH	pH 3 ou moins pH 10 ou plus	Zones géothermiques riches en sulfure Lacs alcalins	<i>Thiobacillus</i> <i>Bacillus sp.</i>	(Kristjansson et al., 1995) (Rees et al., 2004)
Pression	500 – 1034 atm	Tranchées marin profondes	<i>Moritella yayanosii</i>	(Nogi et al., 1999)
Radiation	3 -5 Mrad	Centrales nucléaires	<i>Deinococcus radiodurans</i>	(Rainey et al., 1997)

III. Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles

1. Définition

Les thermophiles (du grec *thermê*, chaleur et *philein*, aimer) sont des microorganismes de type extrêmophiles unicellulaires (bactérie, protiste) ou, plus rarement, pluricellulaires (algue, champignon) ayant besoin d'une température élevée pour se développer (Alain *et al.*, 2002). Ils sont capables de vivre d'une façon optimale à des températures comprises entre 45 et 70 °C, mortelles pour la plupart des êtres vivants.

Les hyperthermophiles sont une classe des thermophiles qui ne peuvent vivre qu'au-dessus de 60°C (Madigan *et al.*, 2003). À ce jour ils ne sont représentés que par des procaryotes, des bactéries et surtout des *Archaea*.

Parmi les bactéries, *Aquifex pyrophilus* et *Thermotoga maritima* présentent par exemple un optimum de croissance à 90°C et 95°C respectivement. Les *Archaea* appartenant par exemple aux genres *Pyrococcus*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thermococcus*, *Pyrodictium*, *Hyperthermus* ou *Pyrolobus*. Sont des exemples de microorganismes hyperthermophiles (Achenbach-Richter *et al.*, 1987). Le micro-organisme le plus hyperthermophile connu à ce jour est l'archée *Pyrolobus fumarii* capable de se diviser à une température maximale de 113°C et incapable de se développer en dessous de 90°C (Blöchl *et al.*, 1997; Kashefi *et Lovley*, 2003). La croissance d'archées à des températures maximales de 121 voire 122°C a également été rapportée, mais ces résultats sont controversés. Néanmoins, il existe probablement des microorganismes capables de se développer à ces températures voire même à des températures sensiblement plus élevées (Alain *et al.*, 2002; Postec, 2005).

Chez les eucaryotes, les températures maximales de croissance recensées à ce jour se situent aux alentours de 50°C chez les plantes et les animaux, de 60°C chez les algues unicellulaires, de 60-62°C chez les champignons microscopiques et de 70°C chez les protozoaires (tableau N°3).

Tableau N°3: Températures maximales de croissance des principaux groupes d'organismes (Hobel, 2004).

Organismes	T _{max} (°C)
Animaux	
Poissons	38
Insectes	45-50
Crustacées	48-50
Plantes	
Plantes vascularisées	45
Bryophytes	50
Microorganismes eucaryotes	
Protozoaires	56
Algues	55-60
Champignons	60-62
Procaryotes	
Cyanobacteria	70-72
Bactéries vertes	70-72
Bacteria	95
Archaea	121

2. Classification

La relation des organismes vivants à la température a longtemps été considérée en biologie comme un élément de base de classification. Trois groupes majeurs sont définis selon les températures optimales de croissance (T_{opt}): les psychrophiles qui ont des T_{opt} inférieures à 20°C, les mésophiles qui poussent de façon optimale entre 20 et 45°C et les thermophiles qui se développent à des températures supérieures à 45°C (figure N°3) (Alain *et al.*, 2002).

Selon Karl Stetter, le groupe des thermophiles se divise en trois sous catégories:

- **Les thermophiles modérés**, dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C;
- **Les thermophiles extrêmes**, dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C;
- **Les hyperthermophiles**, dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C (Stetter, 1999).

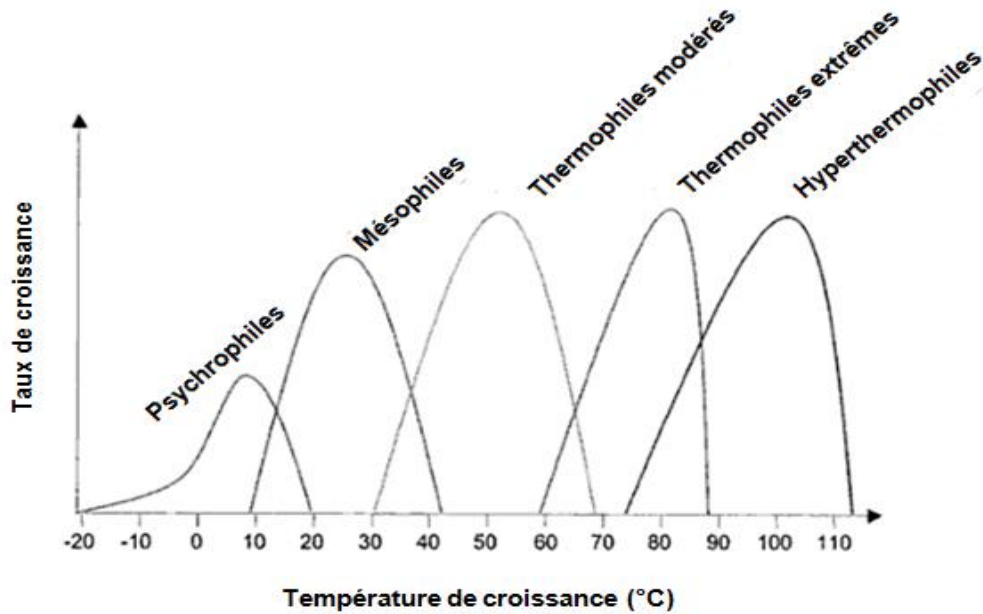


Figure N°3 : Division des organismes vivants selon leur température de croissance (**Madigan et al., 2003**).

3. Ecologie

Les plus importants biotopes thermophiles naturels, le plus souvent associés à une activité volcanique, sont les sources thermales terrestres ainsi que et les environnements hydrothermaux marins côtiers et abyssaux (figure N°4).

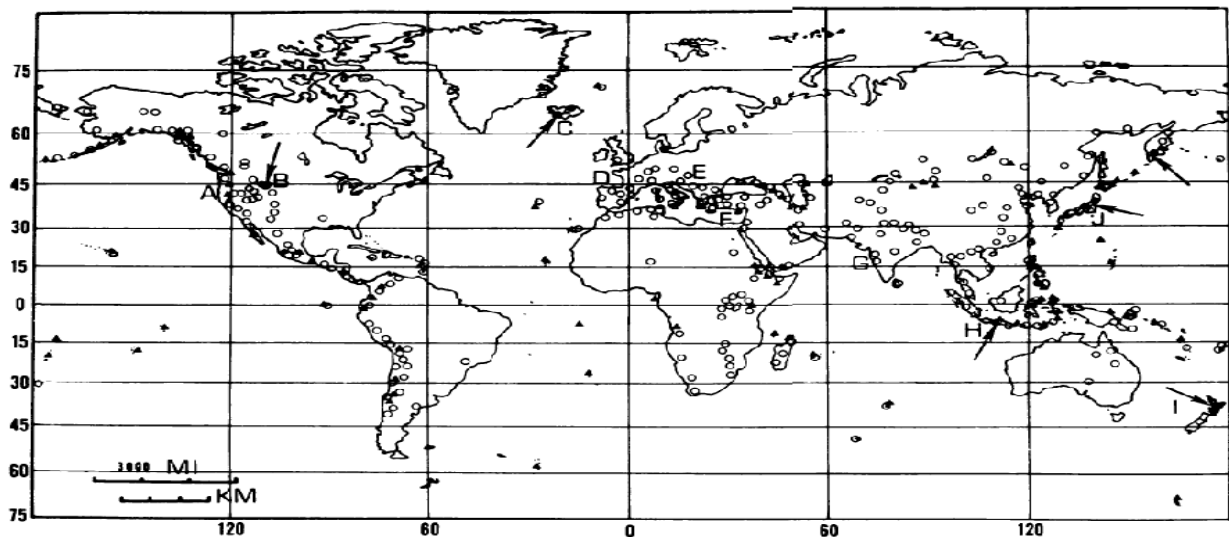


Figure N°4 : Répartition mondiale des zones géothermiques où les microorganismes thermophiles ont été isolés (**Castenholz, 1969**).

(A, l'Oregon; B, le parc de Yellowstone; C, l'Islande; D, la France; E, la Hongrie, la Tchécoslovaquie et la Yougoslavie; F, la Grèce et Palestine; G, l'Inde; H, l'Indonésie; I, la Nouvelle-Zélande et J, le Japon).

D'autres habitats chauds non géothermiques sont très rares dans la nature. Par exemple, les étangs chauffés par l'énergie solaire et les composts chauffés biologiquement peuvent provoquer des températures élevées, mais ces derniers présentent des écosystèmes très transitoires qui seront principalement colonisés par une croissance rapide des spores (**Hobel, 2004**).

Des écosystèmes chauds artificiels ont été également créés. Il s'agit notamment des canalisations d'eaux chaudes, les déchets des usines de traitement ou des procédés des industries alimentaires ou chimiques. La biodiversité microbienne des écosystèmes artificiels chauds a révélé la présence de plusieurs thermophiles connus, comme le genre *Thermus* (**Rad, 1992**). *Thermus scotoductus*, bacille productrice de pigments, a été d'abord isolé à partir de l'eau chaude du robinet en Islande (**Kristjansson et al., 1994**), ce dernier a été montré par la suite endémiques d'une large majorité de sources hydrothermales neutres à alcalins (**Hjorleifsdottir et al., 2001; Skirnisdottir et al., 2000**). Cependant, ces écosystèmes constituent des sites spécifique et unique d'isolement de l'espèce *Thermoplasma acidophilum* (**Darland et al., 1970; Kristjansson et Stetter, 1992**).

4. Phylogénie

Les microorganismes ont été traditionnellement classés selon leurs caractères morphologiques et physiologiques, ce qui ne permettait pas d'établir des relations d'évolution entre les différents groupes microbiens. L'introduction de la phylogénie basée sur l'analyse de séquences d'acides nucléiques en systématique microbienne a permis une classification des microorganismes en terme d'évolution et une clarification des lignées phylogénétiques entre elles et des niveaux taxonomiques (espèces, genres, familles etc.) (**Pace, 1997**). De plus, les travaux de phylogénie moléculaire sont à l'origine d'une avancée scientifique majeure datant de la fin des années 1970 : la découverte par Carl Woese des *Archaea*, troisième domaine du vivant avec les *Eukarya* et les *Bacteria* (**Woese et Fox, 1977; Woese et al., 1990**).

Les domaines des procaryotes *Archaea* et *Bacteria* présentent des caractères phénotypiques communs mais aussi des différences très spécifiques (tableau N°4).

Tableau N°4: Caractéristiques des *Bacteria* et des *Archaea* (Postec, 2005).

Caractéristiques	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>
Présence du peptidoglycane	+	-
Présence d'acide muramique dans la paroi (si présente)	+	-
Lipides membranaires	Acides gras aliphatiques liés au glycérol par des liaisons ester ou ether	Chaînes hydrocarbonées liées au glycérol par des liaisons ether
Premier acide aminé initiant la synthèse d'une chaîne polypeptidique	N-formylméthionine	Méthionine
Endospore	+	-
Présence d'introns dans les gènes	-	+
ARN polymérase eucaryotique	-	+
Coenzymes spéciaux	-	+
Température maximale de croissance	95°C	121°C
Photosynthèse complète	+	-
Méthanogénèse	-	+
Cycle de Calvin (fixation du CO ₂)	+	-

+ : présence

- : absence

La phylogénie des extrémophiles a été très étroitement liée à des questions sur l'origine et l'évolution précoce de la vie sur Terre. Plusieurs thermophiles et hyperthermophiles semblent avoir une lignée très "ancienne" (ou profonde) dans l'arbre de la vie (figure N°5). Cela est particulièrement évident chez les archées thermophiles. Il est également très important de constater que 11 des 23 principaux phylums bactériens cultivables comprennent des représentants des thermophiles. Quatre d'entre eux, à savoir, les *Aquificae*, les *Thermotogae*, les bactéries vertes non-sulfureuses dont le groupe des *Thermales* et *Thermodesulfobacter* constituent l'ensemble des branches les plus profond dans l'arbre phylogénétique des bactéries. Cela confirme l'hypothèse que les thermophiles et les hyperthermophiles représentent les formes les plus anciennes de la vie sur terre (Madigan *et al.*, 1997).

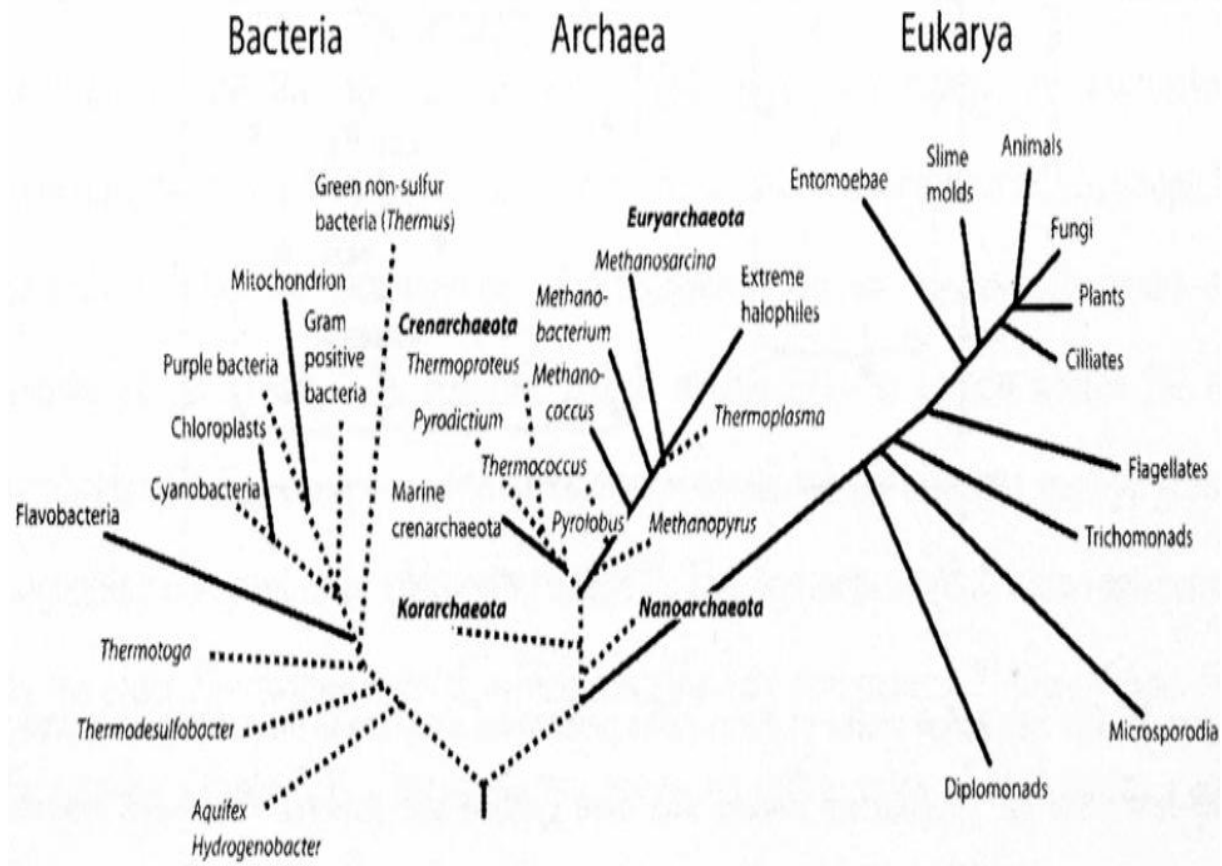


Figure N°5 : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques (Madigan *et al.*, 2003; Hobel, 2004).

La figure N°5 indique une discrimination entre les trois domaines, deux d'entre eux contenant des représentants procaryotes (*Bacteria* et *Archaea*). L'enracinement représente la position supposée du dernier ancêtre commun universel. Les groupes phylogénétiques contenant des membres thermophiles ou exclusivement thermophiles sont indiqués en lignes pointillées (Madigan *et al.*, 2003; Hobel, 2004).

Les espèces bactériennes thermophiles, valablement acceptées, qui se développent à des températures $\geq 65^{\circ}\text{C}$ sont répartis sur 52 genres tandis que les *Archaea* thermophiles couvrent 33 genres (tableau N°5).

Tableau N° 5: Liste des bactéries et *Archaea* thermophiles possédant une T_{opt} supérieure à 65°C, et leurs caractéristiques physiologiques respectives (modifié par Kristjansson et Stetter, 1992 ; Marteinson, 1997 ; Kristjansson *et al.*, 2000 ; Boone *et al.*, 2001 et Hreggvidsson et Kristjansson, 2004).

Organismes	T_{max}	Physiologie	pH_{opt}	Aérobic / Anaérobic
<i>Archaea</i>				
<i>Crenarchaeota</i>				
<i>Archaeoglobales</i>				
<i>Archaeoglobus</i>	80-82	H/A	6-7	An
<i>Ferroglobus</i>	85	A	7	An
<i>Desulfurococcales</i>				
<i>Aeropyrum</i>	90-95	H	7	An
<i>Desulfurococcus</i>	85-92	H	6	An
<i>Hyperthermus</i>	95-106	H	7	An
<i>Ignicoccus</i>	90	A	5.8-6	An
<i>Pyrodictium</i>	97-105	A	5.5-6	An
<i>Pyrolobus</i>	106	A	5.5	Aer/An
<i>Staphylothermus</i>	92-95	H	6-6.5	An
<i>Stetteria</i>	95	H	6	An
<i>Sulfophobococcus</i>	85	H	7	An
<i>Thermodiscus</i>	90	H	5.5	An
<i>Thermosphaera</i>	85	H	6.5-7.2	An
<i>Euryarchaeota</i>				
<i>Methanobacteriales</i>				
<i>Methanothermus</i>	80-88	A	6.5	An
<i>Methanococcales</i>				
<i>Methanocaldococcus</i>	80-85	A	5.2-7.6	An
<i>Methanothermococcus</i>	60-65	A	5.1-7.5	An
<i>Methanotrris</i>	88	A	5.7	An
<i>Methanopyrales</i>				
<i>Methanopyrusn</i>	98	A	6.5	An
<i>Sulfolobales</i>				
<i>Acidianus</i>	70-90	H/A	1.5-2.5	Aer/An

<i>Metallosphaera</i>	75	H/A	1-4.5	Aer
<i>Sulfurococcus</i>	60-75	H/A	2-2.6	Aer
<i>Stygiolobus</i>	80	A	2.5-3	An
<i>Sulfolobus</i>	65-85	H/A	2-4.5	Aer
<i>Sulfurisphaera</i>	84	H	2	Aer/An
<i>Thermococcales</i>				
<i>Thermococcus</i>	75-88	H	6-8	An
<i>Pyrococcus</i>	100	H	7	An
<i>Thermoproteales</i>				
<i>Caldivirga</i>	85	H	3.7-4.2	An
<i>Pyrobaculum</i>	100-102	H/A	6-7	Aer/An
<i>Thermocladium</i>	75	H	4.2	Aer/An
<i>Thermophilum</i>	85-90	H	5	An
<i>Thermoproteus</i>	90	H/A	5-6.5	Aer/An
<i>Thermoplasmatales</i>				
<i>Thermoplasma</i>	60	H	2	Aer/An
<i>Picrophilus</i>	60	H/A	0-3.5	Aer
<i>Bacteria</i>				
<i>Aquificae</i>				
<i>Aquifex</i>	95	A	6.8	Aer
<i>Hydrogenobacter</i>	77-85	A/H	6-7.5	Aer
<i>Hydrogenobaculum</i>	70	A	3-4	Aer
<i>Hydrogenothermus</i>	80	A	5-7	Aer
<i>Persephonella</i>	75-80	A	6	An/Aer
<i>Thermocrinis</i>	89	A	7-8.5	Aer
<i>Gram positives</i>				
<i>Alicyclobacillus</i>	70	H	2	Aer
<i>Ammonifex</i>	77	A	7.5	An
<i>Bacillus</i>	65-80	H	4.5-9	Aer
<i>Caldicellulosiruptor</i>	80	H	7-7.5	An
<i>Caloramator</i>	68-80	H	7-7.5	An
<i>Caloranaerobacter</i>	65	H	7	An
<i>Carboxydobrachium</i>	80	H	6.8-7.1	An
<i>Carboxythermus</i>	78	A	6.8-7	An
<i>Clostridium</i>	66-91	H	5-7	An
<i>Desulfotomaculum</i>	65-85	H/A	7-7.4	An
<i>Dictyoglomus</i>	80-86	H	7	An

<i>Geobacillus</i>	68-78	H	6.2-7	Aer
<i>Moorella</i>	65-70	H/A	5.7-6.8	An
<i>Saccharococcus</i>	65	H	7-7.5	Aer
<i>Thermaerobacter</i>	80	H	7-7.5	Aer
<i>Thermanaerobacter</i>	75-85	H/A	5.8-7.5	An
<i>Thermanaerovibrio</i>	65	H/A	7.3	An
<i>Thermoanaerobacterium</i>	74	H/A	6-6.2	An
<i>Thermobrachium</i>	75	H	8.2	An
<i>Thermohalobacter</i>	70	H	7	An
<i>Thermosyntropha</i>	70	H	8.1-8.9	An
<i>Thermoterrabacterium</i>	66-75	H	5.2-7	An
Cyanobacteria				
<i>Synechococcus</i>	73	Photo	8	An
Cytophaga / Flexibacter / Bacteroides				
<i>Rhodothermus</i>	72	H	6.5	Aer
<i>Thermonema</i>	65-70	H	6.5-7.5	Aer
Chloroflexi				
<i>Chloroflexus</i>	70	H/photo	8	Aer
Themomicrobia				
<i>Thermomicrobium</i>	80	H	8.3	Aer
<i>Thermooleophilum</i>	70	H	6.8-7.3	Aer
Deinococcus-Thermus				
<i>Marinithermus</i>	67	H	7	Aer
<i>Meiothermus</i>	65-70	H	7-8.5	Aer
<i>Oceanithermus</i>	60	H/A	7.5	Aer/An
<i>Thermus</i>	80-85	H	7.3-7.5	Aer
<i>Vulcanithermus</i>	70	H/A	6.7	Aer/An
Nitrospira				
<i>Thermodesulfobivrio</i>	70	H	6.8-7	An
β-Proteobacteria				
<i>Hydrogenophilus</i>	80-86	H/A	6.8-7.5	Aer
<i>Thermothrix</i>	65	A	6.5	Aer
δ-Proteobacteria				
<i>Desulfurella</i>	70-77	H/A	6.4-7.2	An

<i>Thermodesulforhabdus</i>	74	H	6.9	An
<i>ε-Proteobacteria</i>				
<i>Caminiibacter</i>	55-70	H/A	5-5.7	An
<i>Thermodesulfocateria</i>				
<i>Thermodesulfobacterium</i>	74-85	H/A	6.5-7.5	An
<i>Thermotogae</i>				
<i>Fervidobacterium</i>	80	H	6.5-7.2	An
<i>Marinitoga</i>	65-70	H/A	6-7	An
<i>Thermotoga</i>	72-90	H	6.5-7.4	An
<i>Thermosipho</i>	70-80	H	6.5-7.5	An
Non classés				
<i>Coprothermobacter</i>	70	H	7.5	An
<i>Desulfurobacterium</i>	75	A	6-6.5	An

H, hétérotrophe; A, autotrophe; **Photo**, photosynthétique; **Aer**, aérobie; **An**, anaérobie.

5. Physiologie

D'un point de vue physiologique, les microorganismes thermophiles/hyperthermophiles couvrent un large spectre, allant par exemple à partir des chimio-litho-autotrophes obligatoires aux strictes organotrophes, d'aérobies aux stricts anaérobies, d'acidophiles extrêmes aux alcalophiles (figure N°6) (**Huber et al., 2000**).

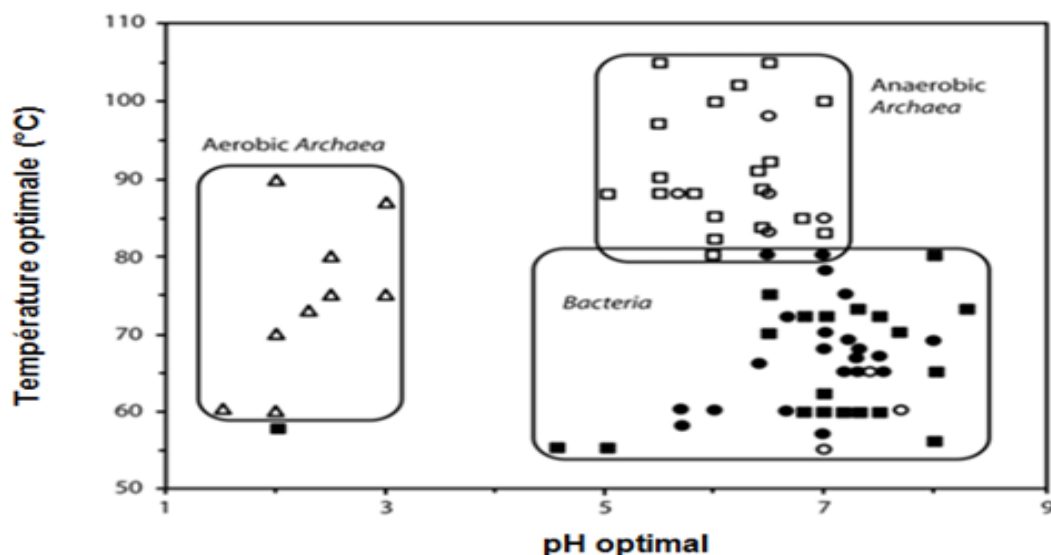


Figure N°6 : Le profil de distribution des procaryotes thermophiles en fonction de leur température et pH optimaux respectifs (**Kristjansson et Stetter, 1992**). (○, méthanogènes; Δ, *Archaea* aérobies; □, *Archaea* anaérobies; ■, Bactéries aérobies; ●, Bactéries anaérobies).

6. Adaptation et stabilité

L'étude de la vie à haute température est relativement récente, et malgré l'ensemble des connaissances acquises depuis une vingtaine d'années, les mécanismes moléculaires d'adaptation à la thermophilie reste à ce jour peu connus. Tous les composants cellulaires des microorganismes thermophiles doivent être adaptés, ou du moins résistants, aux températures élevées. Ceci implique que non seulement les protéines soient stables à des températures supérieures à 80°C, mais aussi les lipides, les acides nucléiques et les métabolites de faible poids moléculaire.

6.1. Lipides

L'étude de la composition des lipides membranaires indiquent des différences d'adaptation à la thermophilie entre les archées et les bactéries. Les lipides membranaires des archées comportent des liaisons éther alors que ces liaisons sont généralement de type ester chez les bactéries et les eucaryotes. Toutefois, un nouveau type de lipide de glycérol à liaison éther a été identifié chez la bactérie hyperthermophile *Thermotoga maritima* : l'acide 15,16-diméthyl-30-glyceryloxy-triacontanedioïque. Les liaisons éther sont plus résistantes que les liaisons ester aux effets de la température, à l'oxydation et à la dégradation enzymatique. De plus, les archées possèdent des tétraéthers de diphytanyl-glycérol : les deux chaînes d'acides gras (phytanyl) issues de chaque molécule de glycérol sont liées par des liaisons covalentes créant une structure membranaire en monocouche lipidique (figure N°7). Cette structure, largement répandue chez les archées hyperthermophiles, est beaucoup plus rigide que les bicouches lipidiques des bactéries (**Van de Vossenberg et al., 1998**). Les stratégies de conservation de la structure membranaire à température élevée impliquent chez les bactéries une augmentation du degré de saturation et de la longueur des chaînes d'acides gras, et chez les archées une cyclisation des chaînes d'acides gras et une transition de lipides à liaison diéther en lipides à liaison tétraéther, ce qui contribue à une meilleure adaptation aux températures élevées par réduction de la fluidité membranaire.

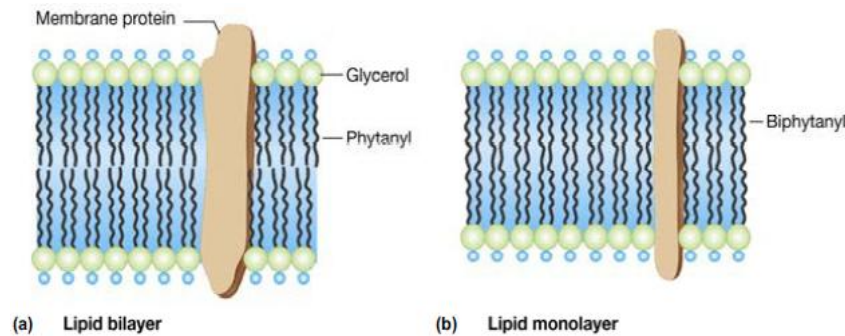


Figure N°7: Structure membranaire des *Archaea* (Madigan *et al.*, 2003).

(a) bicouche lipidique contenant des diéthers de glycérol, (b) monocouche lipidique contenant des tétraéther de glycérol.

6.2. Acides nucléiques

Les archées hyperthermophiles possèdent une gyrase inverse, l'ADN topoisomérase de type I qui introduit des super-tours positifs dans l'ADN ce qui contribue à stabiliser la double hélice d'ADN et à la préserver de la dénaturation thermique (Forterre *et al.*, 1989). Les gyrases inverses ont été détectées uniquement chez les microorganismes qui ont une température optimale de croissance de plus de 65°C, et sont présentes sans exception chez les archées et les bactéries dont les températures optimales de croissance sont supérieures à 80°C. Ce super-enroulement pourrait maintenir les paramètres structuraux et thermodynamiques de l'ADN à des valeurs similaires à celles des mésophiles (Forterre *et al.*, 1996). D'autres protéines sont connues pour participer au maintien à forte température de la structure double-brin de l'ADN. Certaines, pouvant être homologues aux histones des eucaryotes, compactent l'ADN en des structures qui rappellent les nucléosomes. Les mécanismes de thermoadaptation des hyperthermophiles incluent également des modifications nucléotidiques des ARN de transfert qui ont des structures secondaires stabilisées et des températures de fusion plus élevées. Un contenu élevé en bases G+C des ARN de transfert et des ARN ribosomiques pourrait stabiliser les conformations actives (Woese *et al.*, 1991). Concernant l'ARN simple-brin, certaines liaisons induisant sa structure secondaire sont renforcées par des modifications post-transcriptionnelles des bases impliquées. Enfin, des concentrations intracellulaires élevées en solutés variés, sels, polyamines, et protéines à bas poids moléculaire qui se lient à l'ADN ont été observées dans le cytoplasme de certains hyperthermophiles. Le 2-3 diphosphoglycérate de potassium sous forme cyclique est un soluté détecté dans le cytoplasme de méthanogènes hyperthermophiles. Il protège l'ADN des modifications chimiques apparaissant à forte température telles que la dépurination (Madigan

et al., 2003). Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont présumés avoir des mécanismes de réparation de l'ADN particulièrement efficaces. Les détails de ces mécanismes sont pourtant jusqu'à présent inconnus.

6.3. Protéines

Il semble qu'il n'existe pas de mécanisme universel expliquant la thermostabilité des protéines chez les microorganismes thermophiles, mais plutôt plusieurs facteurs intervenant à différents niveaux selon le microorganisme considéré. La composition en acides aminés des protéines thermostables issues d'hyperthermophiles ne présente pas de particularités notables. Les enzymes classiques sont inactivées souvent de façon irréversible à des températures supérieures à 60°C par la désorganisation de leur structure tertiaire, tandis qu'un grand nombre d'enzymes issues de microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles sont stables et actives à des températures largement supérieures à la température maximale de croissance de l'organisme d'origine (**Sterner et Liebl, 2001**). La désamination des chaînes latérales des acides aminés, glutamine et asparagine, et les clivages des ponts disulfures apparaissent au-delà de 80°C. Le repliement des protéines semble être un facteur essentiel de thermostabilité.

Certaines propriétés communes aux protéines thermostables ont été observées :

- Une faible surface d'exposition aux solvants ;
- Une augmentation de l'hydrophobicité du centre de la protéine, ce qui diminue probablement le risque de dépliement ;
- Une augmentation de la densité de l'enzyme repliée, permettant de diminuer les cavités du centre hydrophobe ;
- Une diminution de la longueur des boucles superficielles ;
- La présence de liaisons hydrogènes entre les résidus polaires, et davantage de liaisons ioniques en surface.

C'est finalement le repliement de la protéine qui conditionne la résistance aux températures élevées. Ainsi, des changements mineurs dans la séquence primaire d'acides aminés sont apparemment suffisants pour qu'une protéine thermolabile devienne thermostable. L'adaptation des protéines aux températures extrêmes semble être le résultat d'un compromis entre la rigidité permettant la thermostabilité et la flexibilité nécessaire à la

fonction physiologique. Comme toutes les cellules, les hyperthermophiles produisent des protéines chaperonnes qui participent au repliement des protéines partiellement dénaturées. Une protéine chaperonne appelée *thermosome* a été caractérisée chez *Methanopyrus kandleri* (Andrä *et al.*, 1996) et également détectée chez *Pyrodictium fumarii* et *Pyrodictium occultum*. Cette protéine participe au maintien de la structure et de la fonction des autres protéines intracellulaires, et contribue ainsi à la survie des cellules à des températures supraoptimales. A 108°C, les protéines solubles d'un extrait brut de *Pyrodictium occultum* contiennent près de 80% de thermosome. Il a été montré que des cellules de *P. occultum* et *P. fumarii* peuvent survivre 1 h dans l'autoclave (121°C – 2 bars) (Blöchl *et al.*, 1997 ; Stetter, 1999). Aux températures maximales de croissance, le rôle des protéines de choc thermique (HSP) semble être essentiel. Il a été montré qu'une protéine HSP issue de l'hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* pouvait empêcher l'agrégation des protéines de la bactérie mésophile *E. coli* exposée 40 min à 105°C (Laksanalamai *et al.*, 2001). Enfin, une accumulation très inhabituelle de solutés compatibles tels que le di-myo-inositol-phosphate ou le mannosylglycérate a été mise en évidence chez des archées et bactéries thermophiles et hyperthermophiles *Thermotoga maritima* (Ramakrishnan *et al.*, 1997) et *Pyrococcus woesei* (Scholz *et al.*, 1998) et n'ont jamais été identifiés chez des organismes mésophiles. Il a été montré *in-vitro* que ces deux composés pouvaient jouer un rôle de thermoprotecteurs sur des protéines cytoplasmiques. Certains solutés compatibles sont également impliqués dans l'ajustement osmotique. La nature des solutés compatibles intracellulaires dépend de la phase de croissance et de la composition du milieu de culture (Lamosa *et al.*, 1998). Le mode d'action de ces composés, d'intérêt fondamental et appliqué, reste à élucider (Santos et Da Costa, 2002). Outre la thermostabilité des macromolécules, la thermostabilité de métabolites à faible poids moléculaire et de coenzymes pourrait être un facteur qui régit les limites supérieures de température pour la croissance des hyperthermophiles. A des températures de l'ordre de 100°C, des acides aminés thermolabiles tels que la cystéine et l'acide glutamique sont détruits et l'ATP et le NAD⁺, coenzymes utilisés par les archées hyperthermophiles, sont instables. La durée de demi-vie de l'ATP et du NAD⁺ est inférieure à 30 min à 120°C et diminue fortement pour des températures supérieures (Madigan *et al.*, 2003). Les stratégies microbiennes mises en oeuvre pour surmonter cette instabilité sont inconnues. La survie des organismes se développant à ces températures pourrait être assurée par une re-synthèse rapide des composés thermo-sensibles. Outre la stabilité des biomolécules, la perméabilité membranaire aux protons doit être maintenue à un niveau suffisant pour assurer le gradient

électrochimique de protons et ainsi le gain d'énergie. Le séquençage complet de plusieurs génomes d'archées et de bactéries hyperthermophiles ouvre la voie pour la recherche de déterminants génétiques de l'hyperthermophilie (**Makarova et al., 2003**).

La limite supérieure de la vie n'a probablement pas été atteinte et pourrait se situer aux alentours de 140-150°C, en supposant que les réactions chimiques telles que les réparations moléculaires et la synthèse de biomolécules thermo-sensibles ne peuvent avoir lieu au-delà de ces températures (**Cowan, 2004**). L'ATP étant instable à 150°C, si des "super" hyperthermophiles capables de se croître à ou au-delà de 150°C étaient découverts, ils révéleraient probablement de nouveaux principes fondamentaux en biologie et biochimie. Puisque la vie telle que nous la connaissons est essentiellement dépendante de la présence d'eau sous forme liquide, les habitats microbiens supérieurs à 100°C n'existent que dans des environnements hyperbares. De plus, il est probable que la pression stabilise de nombreuses protéines hyperthermophiles *in vivo*, à des températures supérieures à leur température optimale (**Holden et Baross, 1995**). Les écosystèmes hydrothermaux marins profonds constituent dès lors un milieu idéal pour tenter de découvrir et cultiver de nouveaux microorganismes qui repousseraient la température maximale de croissance compatible avec la vie.

IV. La biotechnologie des microorganismes thermophiles

Depuis que les recherches ont prouvé la capacité des environnements extrêmes à soutenir la vie biologique, un nombre croissant de ces nouveaux microorganismes ont été isolés depuis les années 1970 (**Horikoshi et Grant, 1998**). Nombreuses études ont montré que les microorganismes colonisant les sources hydrothermales présentent une source potentielle de substances biochimiques précieuses, y compris les enzymes thermostables, les antibiotiques, les anti-algues, les substances anticancéreuses, etc. (**Landenstein et Antranikian, 1998**).

1. Enzymes thermostables

Les enzymes thermostables arrivent au premier rang des molécules d'intérêt biotechnologique. Les activités thermostables d'hydrolyse de composés protéiques, lipidiques et glucidiques sont principalement recherchées. Une température élevée augmente la biodisponibilité et la solubilité des composés organiques, et abaisse la viscosité. De nombreux procédés industriels comportent des étapes enzymatiques réalisées à des températures supérieures à 60°C. C'est le cas de la production de glucose et de fructose à partir d'amidon (activités amylases), des procédés de blanchiment de la pâte à papier faisant intervenir des xylanases, ou du blanchiment des jeans (cellulases). Ces enzymes issues de microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles tardent à être exploitées dans les procédés industriels, car elles ne répondent pas exactement aux besoins industriels ou que leur substitution aux enzymes classiques est trop coûteuse. Ces enzymes sont par contre largement employées en biologie moléculaire. Certaines font l'objet de brevets et sont commercialisées : c'est le cas de plusieurs ADN polymérase hyperthermostables utilisées dans la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Tfu Pol issue de *Thermococcus fumicolans*, Pab Pol issue de *Pyrococcus abyssi* : Isis®), d'une phosphatase alcaline utilisée en immuno-marquage, et d'une ADN ligase qui sont issues de souches hydrothermales océaniques. Des souches hyperthermophiles réductrices du soufre telles que *Thermococcus hydrothermalis*, issue d'un écosystème hydrothermal océanique, ont permis la caractérisation de plusieurs enzymes présentant un intérêt industriel potentiel : une alcool deshydrogénase NADPH group III (**Antoine et al., 1999**), une pullulanase (**Gantelet et Duchiron, 1998**), et une α -amylase (**Leveque et al., 2000**) (tableau N°6).

Revue bibliographique

Tableau N°6: Applications des enzymes et des composés endogènes des organismes thermophiles et hyperthermophiles (**Haki et Rakshit, 2003**).

Enzymes	Gamme de température	Bioconversion	Applications
α-Amylase (bactérienne)	90 - 100	Amidon \rightarrow sirops de dextrose	Hydrolyse de l'amidon, brassage, boulangerie, détergents
α-Amylase (fongique)	50 - 60	Amidon \rightarrow sirops de dextrose	Production du maltose
Pullulanase	50 - 60	Amidon \rightarrow sirops de dextrose	Production du sirop de glucose
Xylanase	45 - 105	Pâtes artisanales \rightarrow xylène + lignine	Pâtes et l'industrie du papier
Chitinase	65 - 75	Chitine \rightarrow chitobiose Chitine \rightarrow N-acetylglucosamine N-acetylglucosamine \rightarrow glucosamine Chinine \rightarrow chitosan	Alimentation, cosmétiques, pharmaceutiques, agrochimiques
Cellulase	45 - 95	Cellulose \rightarrow glucose	Hydrolyse de la cellulose, dégradation du polymère dans les détergents
Protéase	65 - 85	Protéine \rightarrow acides aminés et peptides	Boulangerie, brassage, tannerie
Lipase	30 - 70	Dégraissage, l'hydrolyse, l'inter-estérification, alcholyse, aminolyse	Produits laitiers, oléo-chimiques, détergents, pâtes, produits pharmaceutiques, les cosmétiques et la tannerie
Alcool déshydrogénase	80 - 95	Alcools \rightarrow cétones	Chimie fine
Enzymes d'ADN	90 - 95	Amplification de l'ADN (polymérase) Ligature ADN / ARN (ADN / ARN ligase) Restriction de l'ADN	Biologie moléculaire, génie génétique

2. Substances antibactériennes et microorganismes thermophiles

En dépit de la grande attention qui a été donnée aux microorganismes thermophiles et les nombreuses études effectuées sur leur physiologie et leur génétique, le métabolisme secondaire de ces microorganismes reste peu étudié (**Ghauri et al., 1991**). La découverte et la caractérisation des substances antimicrobiennes produites par ces microorganismes est l'un des facteurs les plus importants pour l'industrie. L'un des avantages de ces bactériocines et la possibilité de leur utilisation pour l'élimination des organismes responsables de l'altération des aliments (**Novotny et al., 1992**).

Quarante huit souches bactériennes thermophiles isolées d'échantillons de sol et d'eaux collectés à partir de la source hydrothermale de Sankhamphang (Chine) ont été capables d'inhiber la croissance de plusieurs bactéries tests incluant : *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Naphrae et al., 1999**). Une bactériocine thermostable (Lactacine F) produite par la souche *Lactobacillus acidophilus* 11088 (NCK88) a été également purifiée et caractérisée (**Muriana et al., 1991**).

La thermoleovorine-S2 et la thermoleovorine-N-9, deux bactériocines thermostables produites par les souches *Bacillus thermoleovorans* S-II et *B. thermoleovorans* NR-9, respectivement, ont inhibé la croissance de *Salmonella typhimurum*. La thermophiline T produite par *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 a été active contre d'autres germes responsable de l'altération des aliments, comme, *Clostridium sporogenes* C22/10 et *C. tyrobutyricum* NCDO-1754. Cette propriété peut donner à ces substances une utilité au niveau de l'industriel alimentaire (**Novotny et al., 1992; Aktypis et al., 1998**).

Allouche et ses collègues ont isolé, en Algérie, dix lactobacilles thermophiles capables d'inhiber la croissance de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* (**Allouche et al., 2010**). Et enfin, Deux souches thermophiles Gram négatives, *Yersinia sp.1* et *Aeromonas hydrophila*, isolées à partir d'une source hydrothermale au Jourdain ont également présentées une activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* (**Khalil et al., 2006**).

MATERIEL
ET
METHODES

1. Procédure d'échantillonnage

Des échantillons d'eau ont été prélevés à partir de quatre sources hydrothermales, de températures différentes, situées dans l'Est algérien (figure N°8). Il s'agit de Hammam Belhachani, Hammam Dbegh et Hammam Ouled Ali, situés dans la région de Guelma et enfin, Hammam Essalhine situé dans la région de Khenchela (photographies N°1).

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de flacons en verre de 250 ml préalablement stérilisés au four Pasteur, 3 h à 150°C (Rodier, 1984). Le transport des échantillons au laboratoire est assuré à une température ambiante (Bouannane *et al.*, 2011). Les flacons destinés à la recherche de microorganismes strictement anaérobies ont été complètement remplis et bouchés hermétiquement avec des bouchon en caoutchouc puis stocké à 4°C à l'obscurité jusqu'à l'analyse (Andrews *et al.*, 1996).

2. Mesure de la température et du pH *in situ*

La température et le pH sont les deux facteurs environnementaux majeurs qui affectent la diversité des communautés microbiennes des sources chaudes terrestres (Huang *et al.*, 2011). À chaque site d'échantillonnage, le pH et la température ont été mesurés en utilisant un multi-paramètre (HANNA HI8424) préalablement étalonné.

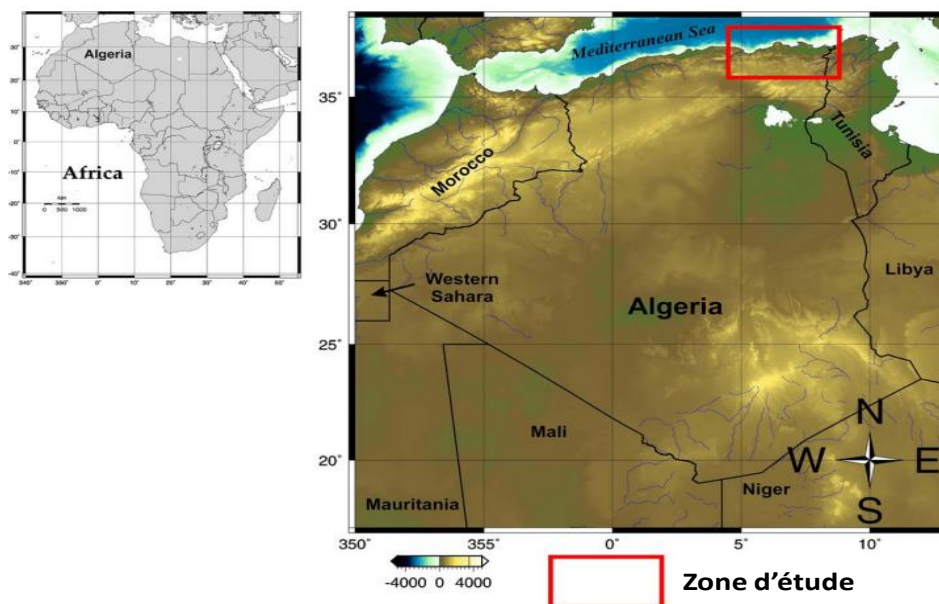


Figure N°8 : Carte de l'Algérie montrant la zone d'étude (nor-est algérien) (Saibi, 2009).



Photographie N°1: Sites des prélèvements.

[(a, b), Hammem Ouled Ali; (c, d), Hammem Essalhine; (e, f), Hammem Belhachani; (g, h), Hammem Dbegh].

3. Isolements

3.1. Isolement en aérobiose

Une quantité de 100 ml de chaque échantillon d'eau est filtrée à travers des membranes (type Gelman GN-6, la taille des pores de $0,45\mu\text{m}$, diamètre 47 mm). Les filtres sont ensuite placés sur la surface des milieux de culture solides suivants, le milieu *Thermus* (MT), la gélose trypticase soja (TSA) et la Gélose nutritive ordinaire (GN), solidifiés avec 2% d'agar (Annexe I) (figure N°9).

A fin d'éviter la déshydratation des milieux, les boîtes de Pétri sont emballées par des sacs en plastique et ensuite incubées à 50°C en aérobiose pendant 4 jours (Moreira *et al.*, 2000 ; Rainey *et al.*, 2003).

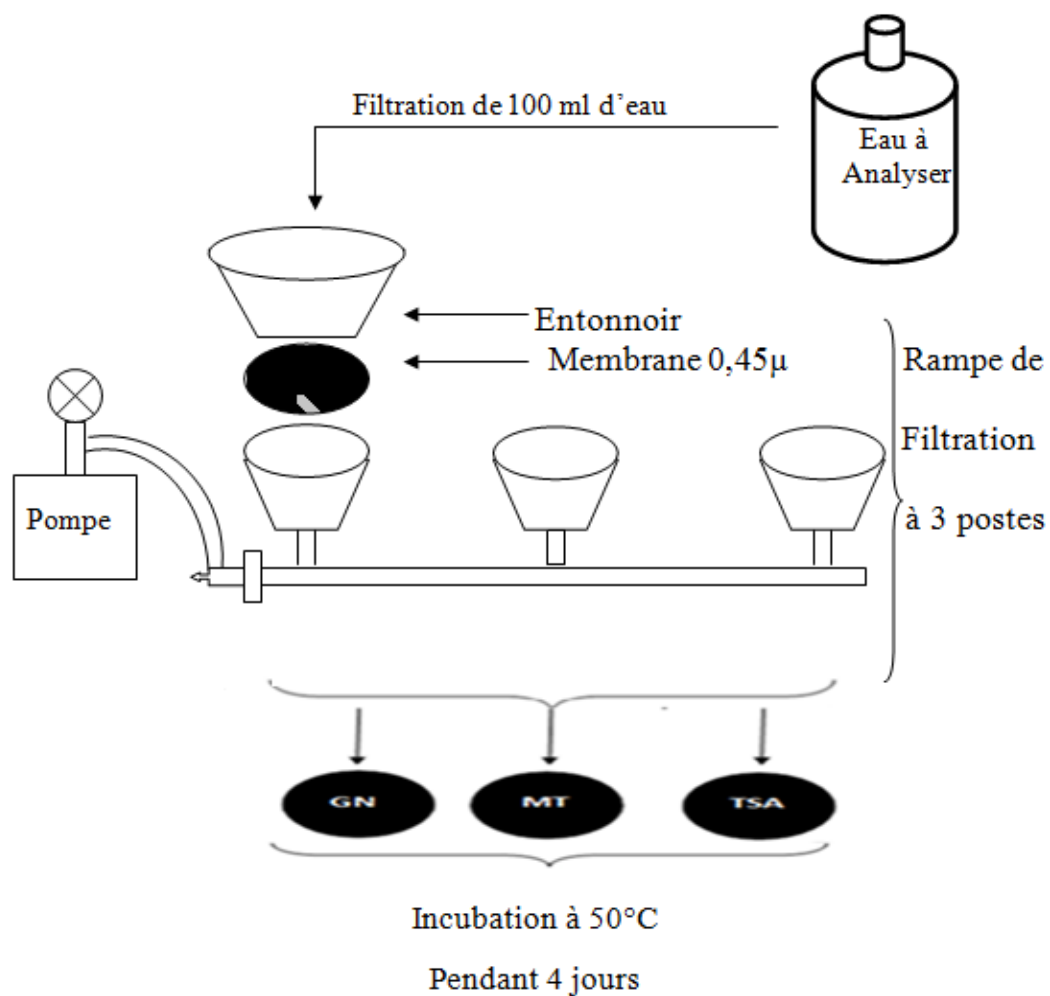


Figure N°9 : Schéma global de la procédure d'isolement en aérobiose.

3.2. Isolement en anaérobiose

L'isolement des microorganismes thermophiles anaérobies est réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie, université de Ratisbonne (Allemagne) en utilisant les techniques développées par Balch et Wolfe (**Balch et Wolfe, 1976**). 1ml d'eau de chaque échantillon est inoculé dans des tubes de Hungate (15ml) contenant 10 ml d'un milieu d'enrichissement minéral supplémenté avec 0.1 % d'extrait de levure (annexe). L'atmosphère vide des tubes est remplie par un mélange de gaz N_2/CO_2 (80:20) à l'aide d'une seringue (**Hungate, 1950; Allen, 1959**).

Les tubes inoculés sont ensuite incubés pendant 2 ou 3 jours à différentes températures allant de 50 à 80°C en anaérobiose. Les cultures d'enrichissement positives ont fait l'objet de dilutions successives. Ensuite, 200 µl de culture est étalée en stries sur la surface des milieux Ravot et Widdel solidifiés avec 2% de Gelrite (Kelco, USA) (Annexe I) (figure N°10) (**Zeikus et al., 1979; Völkel et al., 1993; Sayeh et al., 2010**).

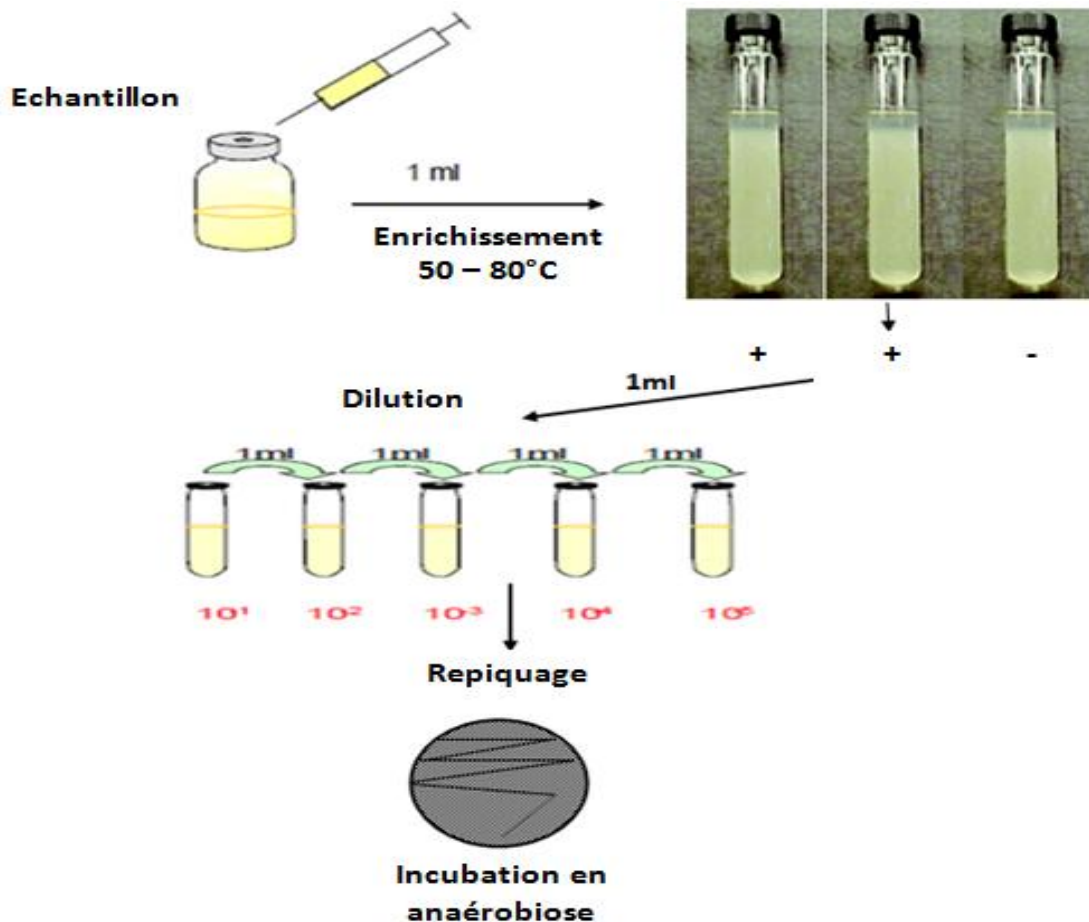


Figure N°10 : Schéma global de la procédure d'isolement en anaérobiose.

Il est important de noter que la préparation des milieux de cultures ainsi que toutes les autres manipulations sont effectuées à l'intérieur d'une hotte anaérobie sous une atmosphère contrôlée.

4. Purification des isolats sélectionnés

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode des stries plusieurs fois sur le même milieu d'isolement.

5. Conservation des isolats sélectionnés

Les isolats pures ont été conservés à -20°C dans le MT additionné de 15% de glycérol, un agent cryoprotecteur qui améliore la survie des cellules à basse température (**Rainey *et al.*, 2003**).

6. Biodiversité physiologique des isolats

6.1. Croissance à différentes températures

Les souches isolées des eaux thermales de l'est algérien sont ensemencées sur le milieu *Thermus* additionné de 2% de NaCl, $\text{pH} = 7$, à raison de trois boîtes de Pétri par souche pour chaque température d'incubation. La croissance est estimée après 48 heures d'incubation à 35, 45, 55, 65, 75 et 85°C par comptage du nombre des colonies.

6.2. Croissance à différents pH

Les souches bactériennes isolées sont ensemencées sur le milieu *Thermus* additionné de 2% de NaCl à différents pH (5 à 9), à raison de trois boîtes par souche pour chaque pH. La croissance a été estimée après 48 heures d'incubation à 50°C .

7. Biodiversité morphologique des isolats

7.1. Aspect des colonies sur milieu solide

La première étape de l'identification d'une souche bactérienne est la description macroscopique de l'aspect de ses colonies. À l'œil nu, on peut distinguer plusieurs caractéristiques, la forme, le relief, la taille, la couleur, l'odeur, l'allure du contour, etc.

En général, on distingue trois types de colonies:

- Colonies de type S (Smooth = lisse), se caractérisent par des contours lisse et réguliers, semi-bombée, surface brillantes et crémeuses;
- Colonies de type M (Muqueux), avec des contours lisse et réguliers, très bombées, surface très brillantes et filantes;
- Colonies de type R (Rough = rugueux), caractérisées par des contours irréguliers, plates rugueuses, mates et sèches.

7.2. Colorations

7.2.1. Préparation des frottis

Sur des lames en verre propres, des frottis des souches isolées ont été réalisés puis fixés par la chaleur en les passant, par mouvements rapides, trois à quatre fois sur la flamme du bec Bunsen.

7.2.2. Coloration de Gram

C'est un procédé qui permet de diviser les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative. Cette coloration permet en plus de préciser la morphologie et le mode de regroupement des cellules.

Les frottis préparés sont colorés avec une solution de violet de Gentiane, qui est un colorant basique, pendant une minute. Ensuite les lames sont rincées par une solution iodo-iodurée (de lugol) qui agit comme un mordant en augmentant les interactions entre le colorant et les cellules afin que ses dernières soient contrastées. Sans rincer et en inclinant les lames à 45 degré, les frottis sont décolorés par lavage avec un mélange d'éthanol et d'acétone. Cette dernière étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram.

Les bactéries de coloration positive gardent le violet de Gentiane tandis que les autres le perdent et se décolorent. Juste après la coloration est arrêtée par lavage à l'eau du robinet. Finalement les frottis seront recolorés au moyen d'un colorant basique de couleur rose (la fuchsine de ziehl) diluée pendant 15 secondes puis rincer abondamment à l'eau du robinet.

Une fois séchés, les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x100).

7.2.3. Coloration au vert de malachite

Certaines espèces bactériennes, et plus particulièrement le genre *Bacillus* (aérobie strict ou aéro-anaérobie) et *Clostridium* (anaérobie strict), ont la propriété de former des endospores, forme de résistance de ces bactéries en particulier vis-à-vis aux conditions extrêmes, capables de redonner des bacilles. Afin de colorer la spore, on utilise en combinaison l'action de la chaleur et une forte concentration de colorant. Les frottis préparés sont recouverts d'une solution de vert malachite à 5%, Chauffés jusqu'à émission de vapeurs puis laisser refroidir et chauffer à nouveau. L'opération doit durer dix minutes. Ensuite les lames sont lavées soigneusement à l'eau du robinet puis contre colorées avec une solution de safranine ou de mercurochrome à 5 % pendant une minute. Une fois séchés, les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x100). Les endospores apparaissent en vert foncés et les corps bactériens en rose.

8. Biodiversité métabolique des isolats

8.1. Recherche de la catalase

Pendant leur respiration aérobie, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce à des enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase.

Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H_2O_2 , puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur boutonnée.

Si formation de bulles, la bactérie possède la catalase. Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

8.2. Recherche de l'oxydase

Sur une lame, on place un disque imprégné du chlorhydrate (disques oxydases) et on dépose après une colonie avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, on conclut que la bactérie est oxydase positive et qu'elle possède la cytochrome oxydase. Et s'il n'y a rien qui apparaît ça veut dire que la bactérie est oxydase négative et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (Pires *et al.*, 2005).

8.3. Recherche de l'uréase

5 ml du milieu urée-indole est ensemencé par 0.5ml de la suspension de la souche. La lecture est effectuée après 24 heures d'incubation à 45°C. Si la couleur du milieu vire vers le rouge donc uréase positive. Si la couleur reste jaune donc uréase négative.

8.4. Recherche de la production de l'indole

5 ml du milieu urée-indole est ensemencé par 0.5ml de la suspension de la souche. La lecture est effectuée après incubation 24 heures à 45°C. Deux à trois gouttes du réactif du Kovacs sont ajoutées à 1 ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface.

8.5. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

La pente du milieu de citrate de *simmons* est ensemencée par en strie longitudinale au moyen d'une anse de platine avec la suspension de la souche. L'incubation s'effectue à 45°C pendant 24 heures.

8.6. Réduction des nitrates

10 ml de bouillon nitraté contenant 0.1% de nitrate de potassium sont ensemencés par 1ml de la suspension de la souche puis incubés pendant 24 heures à 45°C.

La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge après l'ajout de quelques gouttes des deux réactifs de Griess I et II. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés, s'il y a apparition d'une coloration rouge, cela signifie que les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche. L'absence de cette coloration indique la réduction des nitrates jusqu'à le stade d'azote (**Gordon et Smith, 1953**).

8.7. Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé en cultivant les souches sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de Gordon et Smith. Après 24 heures d'incubation à 55°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies, méthode de la zone claire. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Gorden et Smith, 1953**).

8.8. Hydrolyse de la gélatine

Les souches sont ensemencées dans des tubes contenant de la gélatine nutritive, puis incubées à 45°C pendant 24 heures. Ensuite les tubes sont placés pendant environ une heure dans le réfrigérateur. Si la gélatine devient solide, cela implique qu'elle n'a pas été attaquée, si elle reste liquide, une enzyme extracellulaire, la gélatinase, l'a hydrolysé (**Larpent et al., 1985**).

Les autres tests biochimiques ont été élaborés en utilisant les systèmes d'identification API (bioMérieux) suivant les instructions du fabricant. Il s'agit de :

- la recherche de la production d'enzymes suivantes: la β -galactosidase, la tryptophane-désaminase, L'arginine-dihydrolase, lysine-décarboxylase et l'ornithine-décarboxylase ;

- La production d'acide à partir d'hydrates de carbone et de polyols suivants: le D-glucose, le D-mannitol, le melibiose, le D-sorbitol, le L-rhamnose, le L-arabinose, le Inositol, le D-saccharose, le lactose et l'amygdaline ;

- La réaction de Voges-Proskauer, le test de rouge de méthyle et la production du sulfure d'hydrogène.

L'incubation a été faite à 45°C à fin de réduire la dénaturation thermique des substances utilisées.

9. Recherche de l'activité antibactérienne des isolats

9.1. Inocula des bactéries tests

Les souches cibles utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne proviennent de la collection (ATCC) fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) (tableau N°7).

Elles sont constituées de bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et de bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) (Annexe II).

Tableau N° 7: Références des souches bactériennes cibles.

Germes cibles	Milieu d'incubation	Temps d'incubation	Origine
Bactéries à Gram positive			
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300	Gélose nutritive	30 °C ,18-24 heures	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	Gélose nutritive	30 °C ,18-24 heures	ATCC
Bactéries à Gram négative			
<i>Escherichia coli</i> 25922	Gélose nutritive	30 °C ,18-24 heures	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	Gélose nutritive	30 °C ,18-24 heures	ATCC

ATCC: American Type Culture Collection

A partir d'une culture de 18 heures, une suspension de chaque bactéries-tests est préparée dans 10ml d'eau physiologique (0.9% NaCl). La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0.5 McFarland (DO = 0.2 à 650 nm) de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/ml après incorporation dans le milieu Muller Hinton (Merck) (Cavalla et Eberlin, 1994).

9.2. Technique des cylindres d'agar

Les souches thermophiles isolées sont ensemencées en stries serrés sur le milieu solide d'isolement et puis incubé à 50°C pendant 48 heures.

Des cylindres d'agar de 3 mm de diamètre sont ensuite prélevés et déposés à la surface des milieux Muller Hinton préalablement ensemencé par les bactéries-tests. Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 4 heures pour assurer une bonne diffusion puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures (Prescot, 1995; Madigan *et al.*, 1997). L'activité antibactérienne est estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition. Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 2 mm est considérée comme un résultat positif (Aktypis *et al.*, 1998).

RESULTATS
ET
DISCUSSION

1. Caractéristiques physico-chimiques des sources thermales étudiées

Des études antérieures ont montré que la diversité des communautés microbiennes est influencée par les facteurs physiques et chimiques tels que le pH, la température, la charge en sels minéraux et la disponibilité en nutriments (Sayeh *et al.*, 2010). Les propriétés physico-chimiques des eaux thermales des quatre sources étudiées sont résumées dans le tableau suivant:

Tableau N°8 : Les paramètres physico-chimiques des quatre sources thermales étudiées.

Paramètres physico-chimiques	Source 1 H. Ouled Ali ^a	Source 2 H. Essalhine ^b	Source 3 H. Belhachani ^b	Source 4 H. Dbegh ^b
Localisation	36°30'N / 07°27'E	35°26'N / 07°05'E	36°30'N / 07°23'E	36°27'N / 07°16'E
T(°C)*	57	70	72	98
pH*	7.80	7.29	7.70	7.30
Débit (L/s)	20	50	11	1650
Ca ²⁺	224	146	70.2	130
Mg ²⁺	19	47	33.5	37.4
K ⁺	05	19	1.3	46
Na ⁺	40	507	22.3	240
Cl ⁻	ND	820	31.2	370
SO ₄ ²⁻	300	274	171.6	385
HCO ₃ ⁻	397	293	nd	183
H ₂ S	-	-	-	6.80

- : absence

nd : non déterminé

* : mesuré *in-situ*

^a : données fournies par la direction du tourisme de la wilaya de Guelma.

^b : données prises à partir de (Houha, 1996; Lahlou *et al.*, 1998; Bouannane *et al.*, 2011).

Il est intéressant de noter que les quatre sources étudiées représentent des écosystèmes extrêmes par les températures très élevées des eaux (Huang *et al.*, 2011). Elles sont caractérisées par une gamme de température et de pH allant de 57 à 98°C et de 7.2 à 7.8. Selon Richard, une eau est considérée comme **hypothermale** si elle possède une température comprise entre 21 et 35°C ; **mésothermale** dans le cas où sa température varie de 35 à 45°C et **hyperthermale** si elle possède une température supérieure à 50°C. Les données présentées dans le tableau N°8 nous permettent de conclure que les quatre sources étudiées se caractérisent par des eaux hyperthermales (Richard, 1996).

Les sources 2 et 4 dont les pH respectifs sont 7 et 7.30, sont des eaux neutres, alors que les sources 1 et 3 dont les pH respectifs sont 7.80 et 7.70, sont des eaux qui tendent vers l'alcalinité.

La quatrième source (Hammam Dbegh, 98°C), la source la plus chaude en Algérie et la deuxième source chaude dans le monde, est caractérisée par la présence d'hydrogène sulfuré (H₂S), qui est peut être lié à une activité volcanique (**Hubber *et al.*, 2000**).

En se basant sur la composition en éléments majeurs de chaque eau thermale, nous avons déterminé le faciès hydro-chimique de chaque source. Les sources 1, 3 et 4 possèdent des eaux sulfatées ou bien sulfurées calciques riches en soufre, ce dernier résulte de l'oxydation chimique de l'H₂S par l'oxygène moléculaire pénétrant de la surface, alors que la deuxième source se caractérise par un faciès chloruré sodique où prédomine le chlorure de sodium.

Tableau N°9 : Les faciès chimiques des eaux thermales des quatre sources étudiées.

	Source 1	Source 2	Source 3	Source 4
Faciès chimiques	Sulfatées calcique	Chlorurées sodiques	Sulfatées calcique	Sulfurées calciques

Une des caractéristiques écologiques les plus intéressantes de la plupart des sources d'eau chaude est la grande stabilité de la température et la chimie de ses eaux, généralement variables pour les autres systèmes aquatiques où des grandes fluctuations saisonnières de la température et en teneur en éléments nutritifs peuvent se produire (**Castenholz, 1969**).

En pratique, cela signifie que les microorganismes thermophiles/hyperthermophiles colonisant ces écosystèmes possèdent des rangs de températures optimales de croissance constants durant toute l'année.

2. Résultats des isolements

Après quatre jours d'incubation, nombreux aspects de colonies microbiennes sont apparus. D'après les résultats des isolements en aérobiose et en anaérobiose à partir des échantillons présentés dans le tableau N°10, nous pouvons conclure, que les isolats obtenus sont soit des thermophiles ou bien des thermotolérants. Ceci est dû au fait qu'ils ont pu croître à 50°C. Ils sont dénombrés puis purifiés à des fins de conservation. Le nombre total des

microorganismes isolés des quatre échantillons des eaux thermales est de 66 colonies microbiennes, ce qui correspond à 6.58×10^2 UFC/ml d'eau.

Tableau N°10: Résultats des isolements en aérobiose et en anaérobiose à partir des quatre échantillons d'eaux thermales.

Echantillons	T (°C)	pH	Microorganismes en	
			UFC x 10 ² / ml	
			Aérobiose	Anaérobiose
E 1	57	7.8	18.00	01.00
E 2	70	7.29	15.70	02.00
E 3	72	7.7	12.80	03.20
E 4	97	7.3	07.20	05.90
Total			53.70	12.10

La figure N°11 montre une fluctuation du taux d'isolement en fonction de la température et du pH de chaque source. Nous avons noté que le nombre des isolats aérobies régresse avec l'augmentation du degré de la température. Il était de 18.00 UFC x10²/ ml d'eau pour le premier échantillon (H. Ouled Ali, 57°C) suivie par 15.70 UFC x10²/ ml d'eau pour l'échantillon 2 (H. Essalhine, 70°C), 12.80 UFC x10²/ ml d'eau pour l'échantillon 3 (H. Belhachani, 72°C) et seulement 7.20 UFC x10²/ ml d'eau pour le dernier échantillon (H. Dbegh, 97°C).

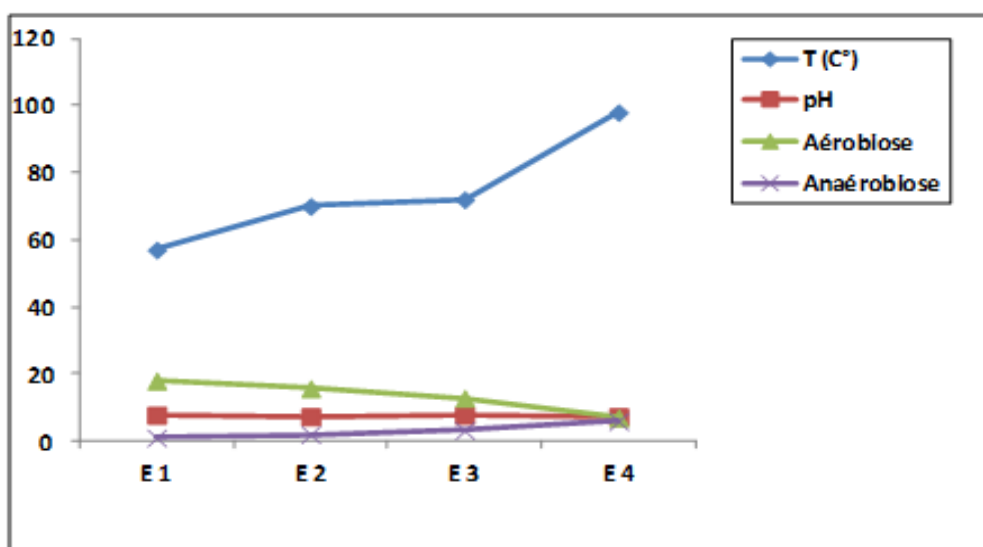


Figure N°11: Fluctuation du taux d'isolement en fonction de la température et du pH de chaque source.

Cette régression peut s'expliquer par une large présence des gaz réduits (H_2S , H_2 , CO_2 , etc.) ainsi qu'une faible solubilité de l'oxygène dans l'eau à des températures élevées. En fait, la possibilité d'utiliser l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons est très limitée à une température qui dépasse $90^\circ C$ (Stetter *et al.* 1990). C'est le cas de la quatrième source (H. Dbegh, $98^\circ C$) qui a présenté un taux d'isolement très faible ($7.20 \text{ UFC} \times 10^2 / \text{ml}$ d'eau).

La faible solubilité de l'oxygène et les températures élevées favorisent cependant une prédominance de la flore anaérobie (Stetter, 1996; Adams et Kelly, 1998; Huber et Stetter, 1998). Le nombre des isolats anaérobie pour l'échantillon 4 (H. Dbegh, $98^\circ C$) était nettement supérieur à ceux obtenu à partir des autres échantillons. Il est de $5.90 \text{ UFC} \times 10^2 / \text{ml}$ d'eau, suivi par 3.20, 2.00 et 1.00 $\text{UFC} \times 10^2 / \text{ml}$ d'eau pour les échantillons 3, 2 et 1, respectivement.

Les pH de toutes les échantillons étaient proches de la neutralité, cela n'a pas avéré avoir une influence importante sur le taux d'isolement à partir de chaque source thermique.

Le taux d'isolement de la flore aérobie à partir des quatre sources ($53.70 \text{ UFC} \times 10^2 / \text{ml}$) est nettement supérieur à celui de la flore anaérobie ($12.10 \text{ UFC} \times 10^2 / \text{ml}$), cela peut s'expliquer par la complexité des technique d'enrichissement et de culture de ce groupe de microorganisme anaérobies obligatoires très intolérants à la présence de l'oxygène.

2.1. Isolement en aérobiose

Des méthodes de prétraitement ont été nécessaires dans de nombreux cas des isolements à partir des eaux thermales pauvres en populations microbiennes (Chen *et al.*, 2004). Pour notre cas, nous avons eu recours à une filtration des échantillons d'eaux, destinés à la recherche des bactéries thermophiles, sur des membranes de type Gelman GN-6, de $0.45 \mu m$ de taille des pores. Cela a pour but de favoriser une bonne croissance de ces dernières.

Afin d'éviter la déshydratation des milieux gélosés, les boîtes de Pétri ont été emballées dans des sacs en plastique avant d'être incubé. Sous ces conditions les géloses peuvent restés intacts jusqu'à sept jours (Degryse *et al.*, 1978).

Pour la recherche des thermophiles aérobies, nous avons sélectionné trois milieux de cultures MT, TSA et la GN. Ces derniers ont donné de bons résultats pour l'isolement des

thermophiles pour de nombreuses études (Rainey *et al.*, 2003; Eun Mi *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2005). Les résultats d'isolement obtenus sont présentés dans le tableau N°11.

Tableau N°11: Résultats de l'isolement en aérobiose sur les trois milieux de culture.

Milieux de culture	Bactéries (UFC x 10 ² / ml)				Pourcentage
	E 1	E 2	E 3	E 4	
MT	9.50	5.70	7.10	4.20	49.34%
TSA	6.50	6.30	3.70	3.00	36.31 %
GN	2.00	3.70	2.00	0.00	14.33 %

Le milieu MT (0.8% polypeptides, 0.4% extrait de levure) a montré un meilleur isolement pour la majorité des échantillons avec une moyenne de **26.50 UFC x 10² /ml** d'eau soit avec un pourcentage de **49.34%** du total de la flore aérobie isolée, suivi par le TSA et la GN avec un pourcentage de 36.31 et 14.33% respectivement (figure N°12).

C'est un milieu universel recommandé par l'ATCC pour l'enrichissement et la culture des thermophiles aérobies à partir des sources chaudes avec une gamme de pH entre 5 et 9. En effet, plusieurs études ont montré que l'utilisation de ce milieu supplémenté avec les peptones et l'extrait de levure avec une incubation à des températures élevées (46 – 79°C) a donné de bons résultats pour l'isolement des thermophiles (Allen, 1953).

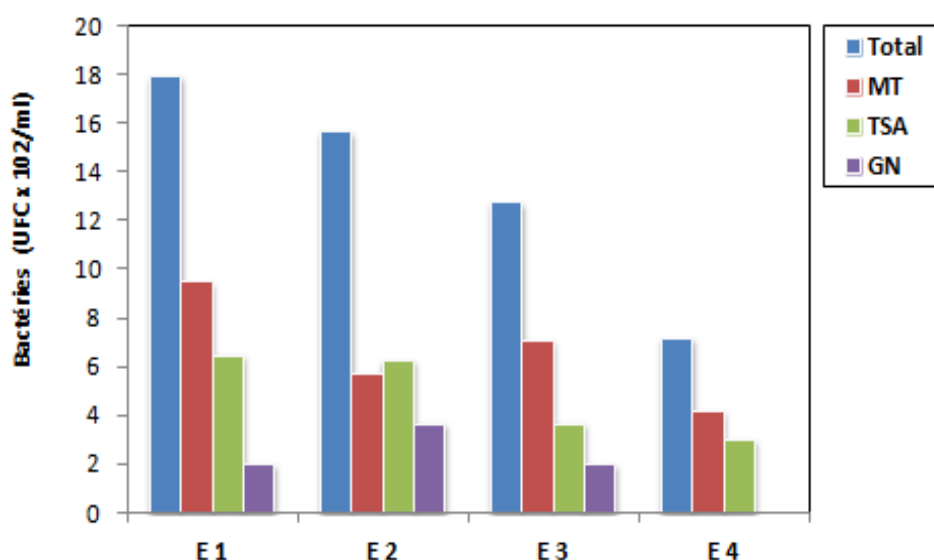


Figure N°12: Fluctuation du taux des thermophiles aérobies isolés en fonction du milieu de culture utilisé.

Il est également important de signaler que la majorité des thermophiles hétérotrophes exigent la présence de l'extrait de levure pour leur croissance. Ce dernier présente une source de carbone, d'azote, de vitamines, de sels minéraux et surtout de nombreux facteurs de croissance très essentiels (Castenholz, 1969).

2.2. Isolement en anaérobiose

Pour l'isolement en anaérobiose, une étape d'enrichissement à des températures élevées (50-80°C) était nécessaire. C'est une étape primordiale pour la culture des thermophiles anaérobies. Pour cela, des tubes spécifiques, avec des bouchons hermétiques en caoutchouc, contenant un milieu minéral liquide supplémenté avec 0.1% d'extrait de levure ont été utilisés. L'atmosphère vide des tubes est remplie par un mélange de gaz N₂/CO₂ (80:20, v/v) pour créer une anaérobiose totale.

Après 48 à 72h d'incubation, les enrichissements positifs (tubes troubles) ont fait l'objet de plusieurs séries de dilutions, au moins trois fois, afin de diminuer la charge microbienne et avoir un bon isolement (Allen, 1959; Zeikus *et al.*, 1979).

Les isolements sont effectués sur les milieux de Ravot et Widdel, deux milieux très favorables pour la croissance des procaryotes fermentatifs (notamment le groupe des *Thermotogae*) ainsi que les hyperthermophiles sulfato-réducteurs (Sayeh *et al.*, 2010).

En raison des températures d'incubation très élevées, les milieux de culture utilisés sont solidifiés avec 2% de Gelrite, un agent gélifiant plus thermostables que l'agar (Völkel *et al.*, 1993). Il faut noter que les résultats des isolements sur les deux milieux étaient très similaires.

A partir des 59 souches microbiennes isolées et purifiées, nous avons sélectionné 16 souches sur la base de caractères morphologiques, pour la poursuite de notre travail. Les souches sélectionnées sont regroupées dans le tableau N°12:

Tableau N° 12 : Nombre de souches sélectionnées par échantillon.

Echantillons	Isolats	Total des isolats
E 1	STX, STG, STK, STL, SGA, SS	6
E 2	STE, STP, STB, STF	4
E 3	SB1, SBA, SXO, SY	4
E 4	SDJ, SDA	2

3. Biodiversité physiologique des souches sélectionnées

3.1. Croissance à différentes températures

Selon les résultats exprimés dans le tableau suivant, nous avons discerné une fluctuation du nombre des isolats en fonction de la température de croissance (figure N°13).

Tableau N° 13: Croissance des seize isolats à différentes valeurs de température.

Echantillons	Souches isolées	35°C	45°C	55°C	65°C	75°C	85°C
E 1	STX	+++	+++	+	-	-	-
	STG	++	+++	+	-	-	-
	STK	++	++	+++	+++	+	-
	STL	++	++	+++	+++	+	-
	SGA	++	+++	++	++	-	-
	SS	+++	+++	+	-	-	-
E 2	STE	++	+++	+	-	-	-
	STP	++	+++	-	-	-	-
	STB	+	+++	++	-	-	-
	STF	-	-	+	+++	+++	++
E 3	SB1	-	++	+++	+++	++	-
	SBA	-	++	+++	+++	+	-
	SXO	+	++	+++	+++	-	-
	SY	-	++	+++	+++	-	-
E 4	SDJ	-	+	+++	+++	+	-
	SDA	-	-	+	+	+++	+++

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modérée, (+++) croissance abondante.

Treize souches ont pu croître dans un intervalle de température allant de 45°C à 55°C, ce qui équivaut **81.25%** de l'ensemble des isolats. Dix souches croissent dans un intervalle de température allant de 35 à 45°C, ce qui équivaut à seulement **62.50%** de l'ensemble des isolats. La même proportion est marquée pour un intervalle allant de 55 à 65°C. Cela affirme que l'incubation à une température de **50°C** était un excellent choix afin de cibler l'isolement d'une flore thermophile. Il faut également noter qu'à cette température, le risque de contamination par les microorganismes mésophiles est négligeable (**Turner et al., 2007**).

Sept souches ont montré une aptitude à croître à 75°C, ce qui représente 43.75% de l'ensemble des souches isolées. Il s'agit des souches STK, STL, SB1, SBA, SDJ, STF et SDA.

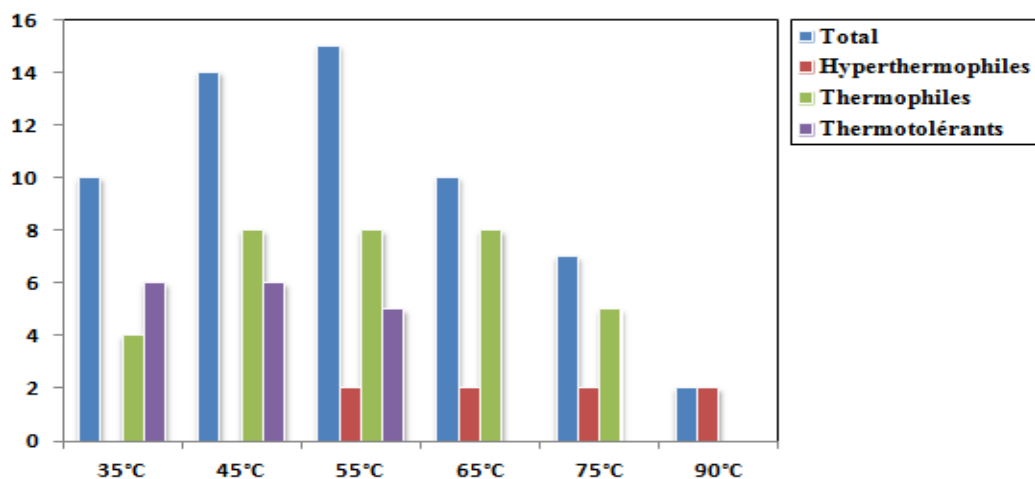


Figure N°13 : Fluctuation du nombre des isolats en fonction de la température.

Sur la base de la définition des organismes thermophiles apportée dans la partie bibliographique (**Alain et al., 2002**) nous avons pu répartir les souches microbiennes isolées des eaux thermales de la région du nord-est algérien en trois grand groupes.

Le premier groupe est composé de deux souches qui exigent une température très élevée pour leur croissance (80°C). Ce qui correspond à 12.5% de l'ensemble des isolas. Ce sont des microorganismes hyperthermophiles. Il s'agit des souches STF et SDA. Elles sont incapables de croître à des températures inférieures à 60°C (**Stetter, 1999**).

Le second groupe est composé de huit souches qui se développent d'une façon optimale à des températures comprises entre 45 et 70°C (**Madigan et al., 2006**). Ce qui correspond à 50% de l'ensemble des isolats. Ce sont des microorganismes thermophiles. Il s'agit des souches STK, STL, SGA, SB1, SBA, SXO, SY et SDJ.

Six souches (**37.5%**) sont révélées incapables de croître à 65°C. On ne peut donc pas les considérer comme thermophiles au sens strict. Ce sont des thermotolérantes. Il s'agit des souches STX, STG, SS, STE, STP et STB. Ces résultats sont résumés dans le tableau N°14.

Tableau N° 14 : Microorganismes hyperthermophiles, thermophiles et thermotolérants isolés.

	Hyperthermophiles	Thermophiles	Thermotolérants
Nombre	02	08	06
Pourcentage	12.5%	50%	37.5%
Souches	STF, SDA	STK, STL, SGA, SB1, SBA, SXO, SY, SDJ	STX, STG, SS, STE, STP, STB

3.2. Croissance à différents pH

Les résultats de ce test sont représentés par le tableau N°15.

Tableau N° 15: Croissances des seize isolats à différentes valeurs de pH.

Echantillons	Souches isolées	pH 5	pH 7.3-7.5	pH 9
E 1	STX	-	+++	-
	STG	-	+++	+
	STK	-	+++	-
	STL	-	+++	-
	SGA	-	+++	+
	SS	+	+++	-
E 2	STE	-	+++	+
	STP	-	+++	+
	STB	-	+++	-
	STF	+	+++	+
E 3	SB1	-	+++	+
	SBA	+	+++	+
	SXO	+	+++	-
E 4	SY	-	+++	+
	SDJ	-	+++	-
	SDA	++	+++	+

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modérée, (+++) croissance abondante.

Selon les résultats de la croissance des souches sélectionnées à trois valeurs de pH (un pH acide, un pH neutre et un autre alcalin), nous divisons les souches en quatre groupes :

Le premier groupe est celui des souches neutrophiles, qui n'ont pu pousser que sur le pH du milieu d'isolement (7.3-7.5). Ce groupe présente **31.25 %** des souches isolées et contient les souches thermophiles STK, STL et STJ, ainsi que les souches thermotolérants : STX et STB.

Le deuxième groupe est formé de trois souches croissant dans un intervalle de pH allant de 5 à 9, ce qui équivaut également à **18.75 %** des souches isolées. Ce groupe comprend une souche thermophile SBA et deux hyperthermophiles STF et SDA.

Le troisième groupe est formé de cinq souches manifestant une croissance à pH acide. Il s'agit des souches SS, STF, SBA, SXO et SDA.

Un quatrième groupe formé de neuf souches capables de croître à pH alcalin. Il s'agit des souches STG, SGA, STE, STP, STF, SB1, SBA, SY et SDA.

Il est bien évident que le pH de croissance des souches thermophiles isolées des sources thermales de l'Est algérien varie de 5 à 9, ce qui est en parfaite concordance avec la bibliographie des thermophiles (Huber *et al.*, 2000).

4. Biodiversité morphologique des souches sélectionnées

4.1. Examen macroscopique et microscopique des isolats

Les résultats des différents caractères macroscopiques et microscopiques des souches étudiées sont représentés dans le tableau N°16. En se basant sur la taille des colonies, nous avons pu diviser les isolats en trois groupes (photographie N°2):

- Le premier groupe est formé des isolats formant des colonies de petite taille (1 à 2 mm de diamètre), rondes, de contour régulier, une surface lisse, un relief bombé ou semi-bombé comme est le cas des isolats : STX, STG, SS et STE ou bien plat comme les souches SXO et SDJ, ou encore d'une surface crémeuse comme la souche STF;
- Le deuxième groupe donne des colonies de taille moyenne (2 à 3 mm de diamètre), rondes plates avec un contour irrégulier et de surface crémeuse comme le cas des trois souches STG, SB1 et SY;
- Le troisième groupe est composé des souches STK, STL, STB, et SBA qui forment des colonies de grande taille avec un aspect filamenteux.

Les isolats STE et SB1 produisent des pigments jaunes orangés. Le reste des colonies se caractérisent par une couleur beige à blanche ou bien maronne.

Les souches STX, STG et SS se caractérisent par des colonies de petites tailles, rondes et bombées, de contour régulier avec une surface lisse. Elles sont de couleur beige foncé ou claire à maronne. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre des courts bâtonnets mobiles ou immobiles.

Pour la souche STK et STL, les colonies sont de grande taille, plates, blanches et crémeuses avec la présence de rides radiales. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre de très longs bâtonnets en chaînes.

Résultats et discussion

Tableau N° 16: Observation culturale et morphologique des souches isolées.

Souches	Examen Macroscopique						Examen Microscopique			
	Diamètre	Forme	Contour	Relief	couleur	Surface	Forme	Mobilité	Gram	Sporulation
STX	1mm	Ronde	Régulier	Bombé	Beige	Lisse	Courts Bâtonnets	Mobiles	-	-
STG	1 mm	Ronde	Régulier	Bombé	Marron	Lisse	Coccobacilles	Immobilés	-	-
STK	4 mm	Filamenteuse	Irrégulier	Plat	Blanche	Crémeuse	Bâtonnets	Immobilés	+	+
STL	3 mm	Filamenteuse	Irrégulier	Plat	Blanche	Crémeuse	Bâtonnets	Immobilés	+	+
SGA	2-3 mm	Ronde	Irrégulier	Plat	Blanche	Crémeuse	Courts bâtonnets	Mobiles	-	-
SS	1mm	Ronde	Régulier	Bombé	Transparente	Lisse	Coccobacilles	Immobilés	-	-
STE	2 mm	Ronde	Régulier	Semi-bombé	Jaune orangée	Crémeuse	Coccobacilles	Mobiles	+	-
STP	2 mm	Ronde	Irrégulier	Plat	Transparente	Rugueuse	Courts bâtonnets	Mobiles	-	-
STB	4 mm	Ronde	Irrégulier	Plat	Blanche	Sèche	Bâtonnets	Mobiles	+	-
STF	1 mm	Ronde	Régulier	nd	Blanche	Crémeuse	Courts bâtonnet entourés par un sphéroïde	Mobiles	-	-
SB1	3 mm	Ronde	Irrégulier	Plat	Jaune	Crémeuse	Longs bâtonnets	Immobilés	-	-
SBA	3-4 mm	Filamenteuse	Irrégulier	Plat	Blanche	Rugueuse	Bâtonnets	Mobiles	+	Spore centrale
SXO	2mm	Ronde	Régulier	Plat	Beige	Lisse	Très longs bâtonnets	Immobilés	+	Spore terminale
SY	2-3 mm	Ronde	Irrégulier	Plat	Blanche	Crémeuse	Longs bâtonnets	Mobiles	+	Spore terminale
SDJ	1-2 mm	Ronde	Régulier	Plat	Beige	Lisse	Bâtonnets	Mobiles	+	Spore terminale
SDA	1mm	Ronde	nd	nd	nd	nd	Bâtonnets	nd	nd	nd

(+), résultat positif; (-), résultat négatif; (nd), non déterminé.

Les colonies de la souche STG sont de taille moyenne, rondes, plates avec un contour irrégulier, de couleur blanche. Elles se caractérisent par une surface crémeuse. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre des courts bâtonnets mobiles.

L'isolat STE se caractérise par des colonies rondes et semi-bombées de taille moyenne avec un contour régulier et surface crémeuse. Elles ont une couleur jaune orangée. L'état frais montre des coccobacilles mobiles.

Les colonies de la souche STP sont transparentes, rondes et plates avec une taille moyenne. Elles ont des contours irréguliers et une surface rugueuse. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre des courts bâtonnets très mobiles.

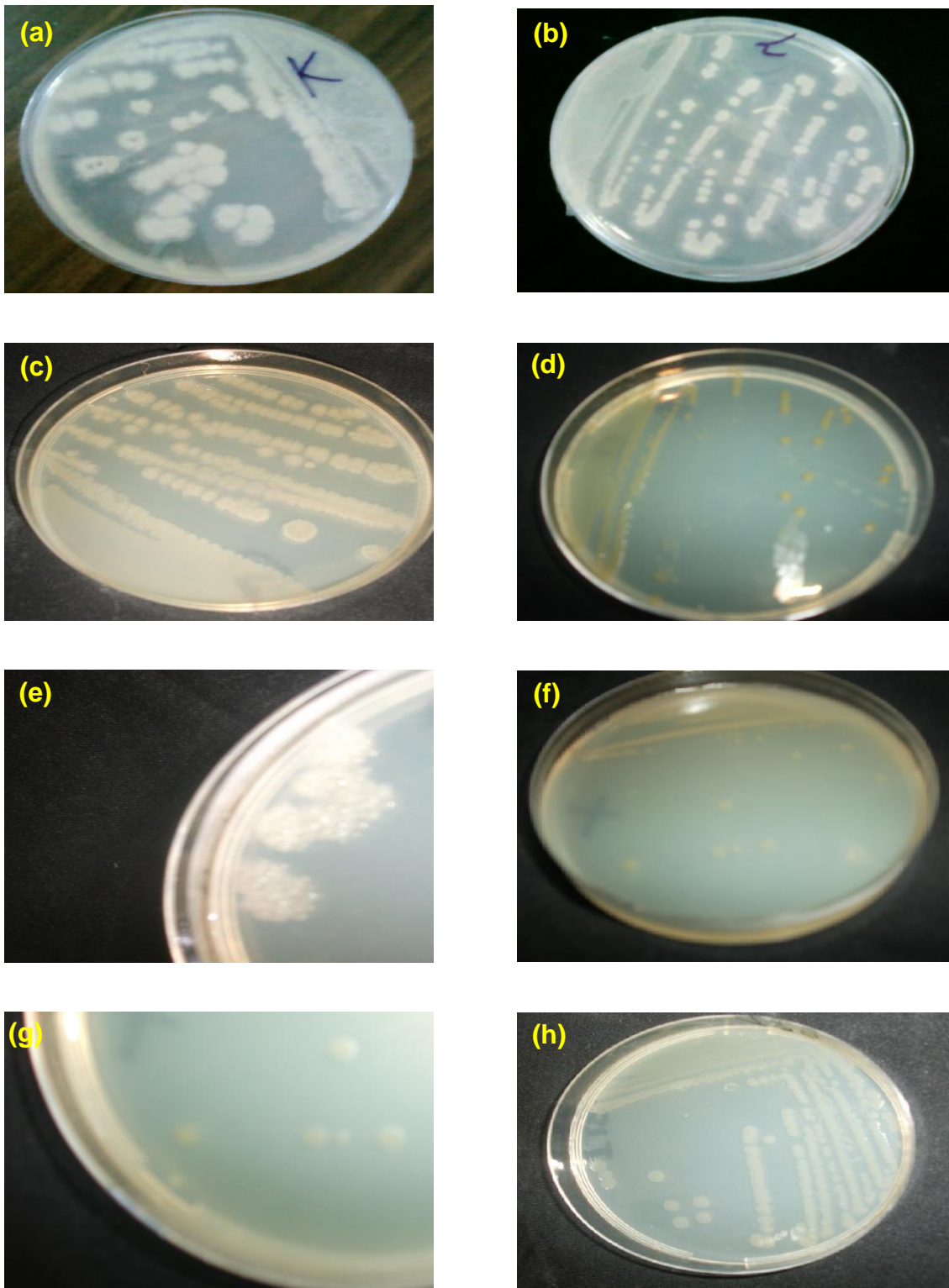
Pour la souche STB, les colonies sont de grande taille, plates avec un aspect filamenteux, contour irrégulier avec une surface rugueuse et de couleur blanche. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre des bâtonnets mobiles et non sporulés.

La souche STF se caractérise par des petites colonies rondes, crémeuses de couleur blanche et de contours réguliers. L'état frais montre des courts bâtonnets non sporulés entourés d'un sphéroïde.

Les colonies de la souche SB1 sont grandes, plates, rondes, de contour irrégulier. Elles se caractérisent par une couleur jaune. L'état frais révèle des longs bâtonnets non sporulés et immobiles.

Pour la souche SBA, les colonies sont grandes, plates, sèches, de couleur blanche avec un pourtour irrégulier. Elles sont caractérisées par un aspect filamenteux et une croissance rapide. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre des bâtonnets mobiles avec la présence de spores centrales.

Les colonies de la souche SXO ont une taille moyenne, plates avec un contour régulier. Elles sont de couleur beige et d'une surface lisse. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre de très longs bâtonnets immobiles avec la présence de spores terminales déformantes.



Photographie N°2: Aspect macroscopique des huit souches thermophiles isolées des sources thermales de l'Est algérien.

[(a), souche STK; (b), souche STL; (c), souche STG; (d), souche SB1; (e), souche SBA; (f), souche SXO; (g), souche SY; (h), souche SDJ].

La souche SY se caractérise par des colonies grandes, plates avec un contour irrégulier. Elles sont de couleur blanche et une surface crémeuse. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre de très longs bâtonnets mobiles avec la présence de spores terminales déformantes.

Les colonies de la souche SDJ sont de taille moyenne, plates avec un contour régulier. Elles sont de couleur beige avec une surface lisse. L'observation de l'état frais au microscope optique au grossissement (G x 40) montre des bâtonnets mobiles avec la présence d'une spore terminale déformante.

Les colonies de la souche SDA sont de taille petite d'une forme ronde. L'état frais montre des longs bâtonnets droits.

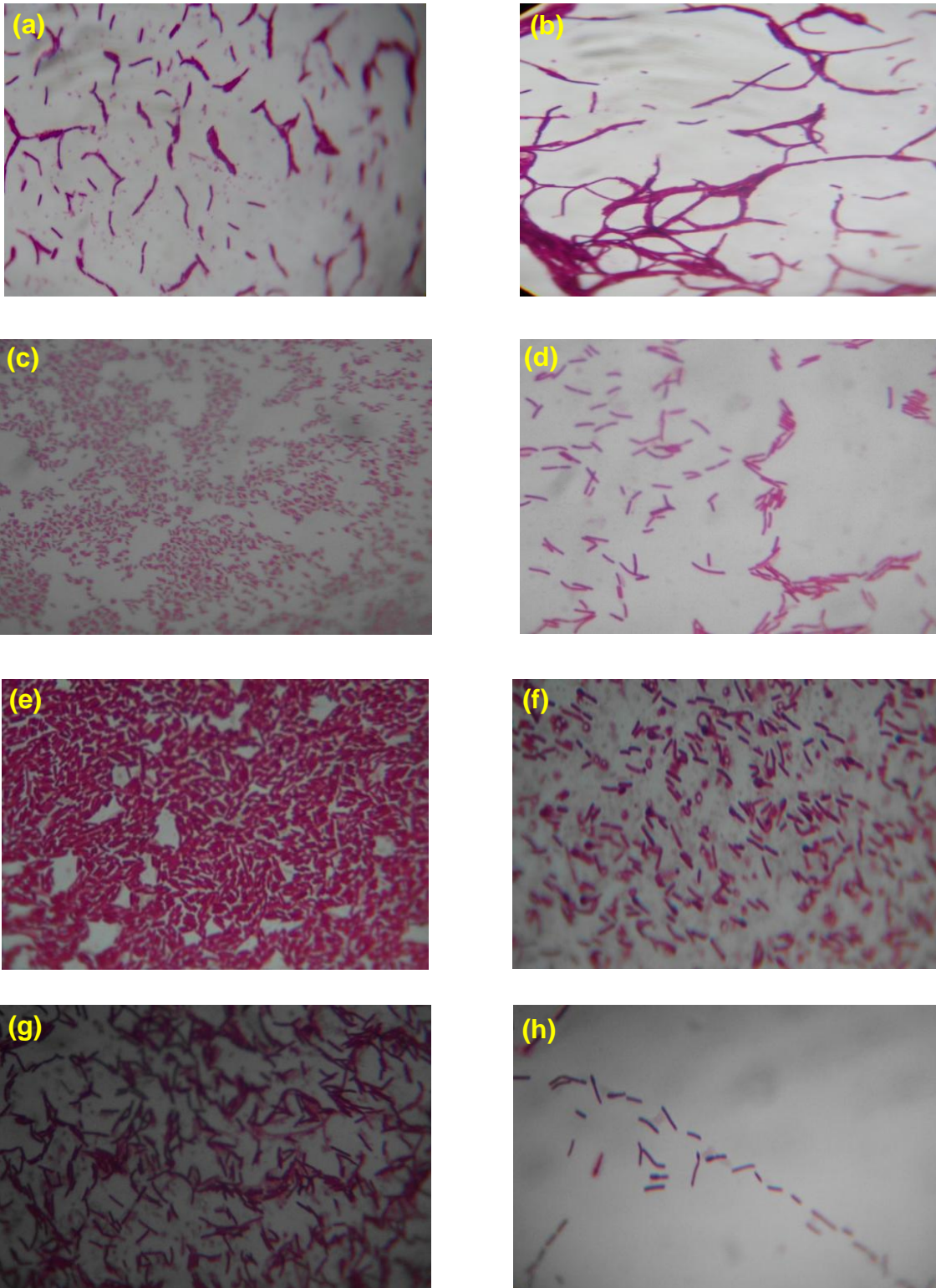
4.2. Colorations

Après l'observation des frottis colorés au microscope optique à l'objectif à l'immersion (G x 100). Il s'est révélé que toutes les souches isolées sont des bâtonnets de longueur et de Gram variables (photographie N°3). Sept souches sont à coloration de Gram négative, il s'agit des souches STX, STG, SGA, SS, STP, STF et SB1 et huit souches sont à coloration de Gram positive. Il s'agit des souches STK, STL, STE, STB, SBA, SXO, SY et SDJ. La coloration au vert de malachite indique la présence de spores chez les quatre souches suivantes: STK, STL, SBA, SXO, SY et SDJ (tableau N° 16).

5. Biodiversité métabolique des souches sélectionnées

Les résultats des différents tests biochimiques réalisés sont réunis dans le tableau N°17. Ces résultats nous fournissent des éléments essentiels pour l'identification de nos souches en se basant sur le manuel de systématique bactériologique de Bergey.

Aucune souche n'a utilisé le citrate de *simmons* comme seule source de carbone. Seule la souche SDA a produit de l' H_2S à partir du thiosulfate. Trois souches produisent de l'indole par l'hydrolyse du tryptophane. Elles n'hydrolysent pas l'urée à l'exception de la souche SB1. Les souches STX, STG, SGA, SS et SB1 étaient incapables de fermenter la plupart des glucides et des polyols examinés. Le caractère aérobic strict des souches STK, STL, STP et SB1 est confirmé par la présence d'une activité de catalase et d'oxydase chez ces souches (Khalil *et al.*, 2006).



Photographie N°3 : Aspect microscopique des souches thermophiles isolées des sources thermales de l'Est algérien avec la coloration de Gram grossissement (G x100).

[(a), souche STK; (b), souche STL; (c), souche STG; (d), souche SB1; (e), souche SBA; (f), souche SXO; (g), souche SY; (h), souche SDJ].

5.1. Réduction des nitrates

La réaction de dénitrification survient habituellement chez de nombreux taxons bactériens mésophiles. Cependant, ce processus est relativement peu étudié chez les microorganismes thermophiles (**Knowles, 1982; Payne, 1973**). Ambroz, le premier, a isolé en 1913 un bacille sporulé qu'il nomma *Denitrobacterium thermophilum* (**Ambroz, 1913**).

Microaerobacter geothermalis, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* et *Calditerrivibrio nitroreducens*, présent également des exemples de bactéries thermophiles dénitrifiantes isolées à partir des sources thermales dans le monde (**Chen et al., 2002; Iino et al., 2008; Khelifi et al., 2010**).

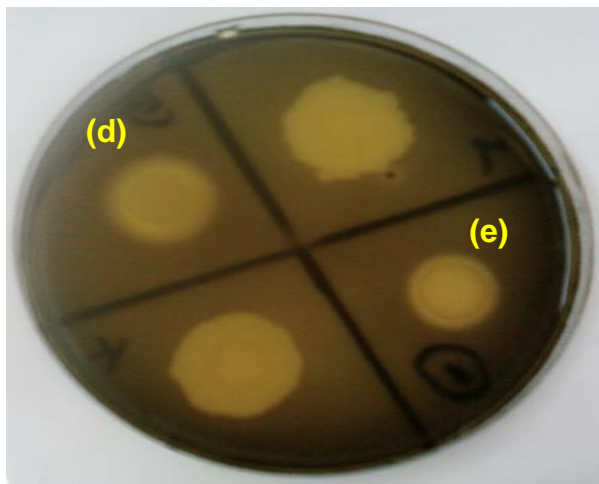
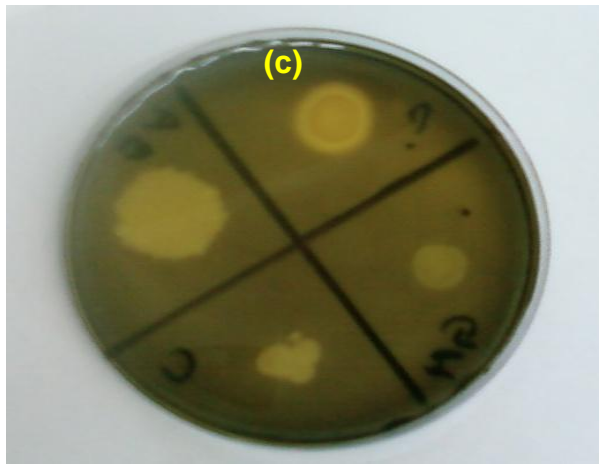
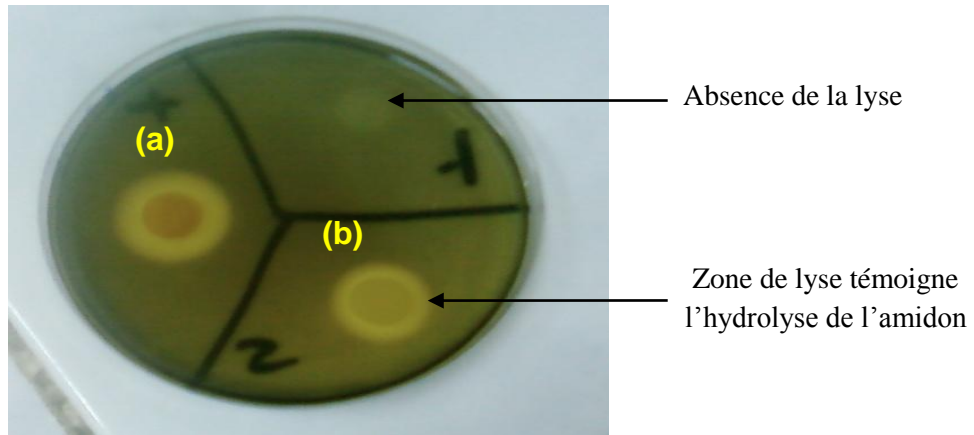
Au sein des seize souches isolées, sept ont montré une capacité de réduire les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-), dont quatre sont thermophiles et trois sont thermotolérantes. Il s'agit des souches STG, STK, STL, SS, STP, SBA, SDJ. La réduction complète des nitrates jusqu'au stade azote N_2 n'a été observée que chez la souche STL.

Cette habilité d'utiliser les NO_3^- comme accepteur final d'électrons peut s'expliquer par la solubilité réduite de l'oxygène *in vivo* en raison des températures très élevées dans ces biotopes très chauds, à partir desquels ces souches ont été isolées. Cette capacité à dénitrifier présente une propriété métabolique particulière qui peut être pertinente, sur le plan écologique, à l'adaptation de ces microbes aux écosystèmes chauds terrestres (**Khelifi et al., 2010**).

Par ailleurs, ces souches thermophiles dénitrifiantes peuvent être, probablement, utiles au niveau des procédés des traitements des eaux usées rejetées, afin de réduire les concentrations très élevées des nitrates dans ces eaux par un procédé biologique non couteux.

5.2. Hydrolyse de l'amidon

Divers amylases naturelles thermostables ont été caractérisées chez les microorganismes thermophiles. Ces enzymes sont largement utilisées dans les industries de la transformation de l'amidon (**Leveque et al., 2000**). Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les isolats, nous avons utilisé un milieu nutritif gélosé à 1 % d'amidon. Après une incubation à 55°C et l'ajout du lugol, nous observons des zones de lyse de différents diamètres au tour des colonies (photographies N°4).



Photographie N°4: Test de sélection de souches amylolytiques sur milieu nutritif gélosé à 1% d amidon (après 24h d'incubation à 55°C et à pH 7).

[(a), souche SXO; (b), souche SS; (c), souche SDJ; (d), souche SGA; (e), souche SB1].

Résultats et discussion

Tableau N° 17: Genres probables des souches microbiennes isolées à partir des eaux thermales du nord-est algérien.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	RM	GEL	GLU	GAZ	LAC	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	CAT	AMI	Genres probables
STX	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>Aeromonas sp.</i>
ST G	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>
ST K	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Thermoactinomyces sp.</i>
ST L	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>Thermoactinomyces sp.</i>
SGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>
SS	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Aeromonas sp.</i>
STE	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	<i>Exigubacterium sp.</i>
STP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	<i>Pseudomonas sp.</i>
STB	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	<i>Bacillus sp.</i>
STF	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	nd	nd	+	nd	<i>Fervidobarcterium sp.</i>
SB1	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	<i>Thermus sp.</i>
SBA	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	<i>Geobacillus sp.</i>
SXO	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	<i>Geobacillus sp.</i>
SY	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Geobacillus sp.</i>
SDJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>Geobacillus sp.</i>
SDA	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	<i>Thermoproteus sp.</i>

(+): résultat positif, (-): résultat négatif, (nd): non déterminé ; (ONPG), β-galactosidase ; (ADH), arginine-dihydrolase ; (LDC), lysine-décarboxylase ; (ODC), ornithine-décarboxylase ; (H₂S), production du sulfure d'hydrogène ; (URE), uréase ; (TDA), tryptophane-désaminase ; (VP), réaction de Voges-Proskauer ; (RM), rouge de méthyle ; (GAZ), gaz en glucose ; (CIT), citrate ; (URE), uréase ; (IND), indole ; (GEL), gélatine ; (GLU), D-glucose ; (MAN), D-mannitol ; (MEL), D-melibiose ; (SOR), D-sorbitol ; (RHA), L-rhamnose ; (ARA), L-arabinose ; (INO), Inositol ; (SAC), D-saccharose ; (LAC), lactose ; (AMY), amygdaline ; (NO²⁻), réduction des nitrates en nitrites ; (N₂), réduction des nitrites en N₂ ; (CAT), catalase ; (OX), Oxidase ; (AMI), hydrolyse de l'amidon.

Ces zones indiquent que l'amidon a été décomposé en dextrines, en maltose et en glucose. Parmi les souches sélectionnées, cinq sont amylolytiques, dont trois souches thermophiles et deux souches thermotolérantes. Il s'agit des souches SXO, SS, SDJ, SGA, SB1.

Les deux souches SXO et SGA possèdent des zones de lyse plus développées que celles des souches SS, SDJ et SB1. Ces deux souches, les plus performantes, méritent d'autres études plus détaillées.

Cette capacité à hydrolyser l'amidon à une température élevée permet probablement de qualifier les α -amylases produites par ces souches comme des enzymes thermostables pouvant éventuellement être utilisées pour des applications industrielles.

5.3. Hydrolyse de la gélatine

Les résultats montrent un métabolisme protéique important. Au moins neuf souches produisent une gélatinase, une enzyme protéolytique qui hydrolyse la gélatine en acides aminés, dont la moitié est thermophiles.

6. Activité antibactérienne des isolats aérobies

L'activité antibactérienne des souches isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette technique a été employée avec succès dans d'autres travaux (**Kitouni *et al.*, 2005; Kitouni, 2007**). Elle est plus facile à utiliser contrairement à celle des disques en papier, qui nécessite au préalable une fermentation en milieu liquide, cette technique est fastidieuse et dure longtemps. Nous recommandons ainsi, l'emploi des disques d'agar dans ce genre de travaux.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau N° 18. Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 2 mm est considérée comme un résultat positif (**Aktypis *et al.*, 1998**). d'où il en ressort que sur les quatorze isolats aérobies testés, seuls quatre souches (**28.57 %**) sont actives contre au moins une des bactéries tests étudiées (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922). Il s'agit des souches thermophiles STK, STL et SBA provenant des sources thermales de H. Ouled Ali et

H. Belhachani, respectivement, et la souche thermotolérante STP isolée de la source thermale de H. Essalhine.

Une seule souche a présenté une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* ATCC 25922. Il s'agit de la souche STP. Il faut noter que la souche STL a développé une activité antibactérienne considérable contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui atteint plus de 20 mm de diamètre de la plage de lyse (photographie N° 5-10). Cette souche mérite une attention particulière et une étude plus détaillée.

Ces résultats confirment les résultats obtenus par plusieurs études antérieures qui affirment l'habilité des microorganismes thermophiles isolés des sources thermales terrestres à produire des substances antibactérienne actives contre plusieurs bactéries à Gram positive et négative. (Muriana *et al.*, 1991; Novotny *et al.*, 1992; Khalil *et al.*, 2006). L'un des avantages de ces bactériocines et la possibilité de leur utilisation pour lutter contre les microorganismes responsables de l'altération des aliments (Novotny *et al.*, 1992).

Tableau N° 18: Activité antibactérienne des isolats aérobies contre les bactéries tests.

Echantillons	Souches isolées	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922
E 1	STX	-	-	-	-
	STG	-	-	-	-
	STK	4 mm	4 mm	25 mm	-
	STL	5 mm	3 mm	14 mm	-
	SGA	-	-	-	-
	SS	-	-	-	-
E 2	STE	-	-	-	-
	STP	-	-	-	8 mm
	STB	-	-	-	-
E 3	SB1	-	-	-	-
	SBA	4mm	3 mm	5 mm	-
	SXO	-	-	-	-
	SY	-	-	-	-
E 4	SDJ	-	-	-	-

(-) : Pas d'inhibition (diamètre d'inhibition < 2 mm)



Photographie N°5 : Effet de la souche STK sur *S. aureus* ATCC43300.



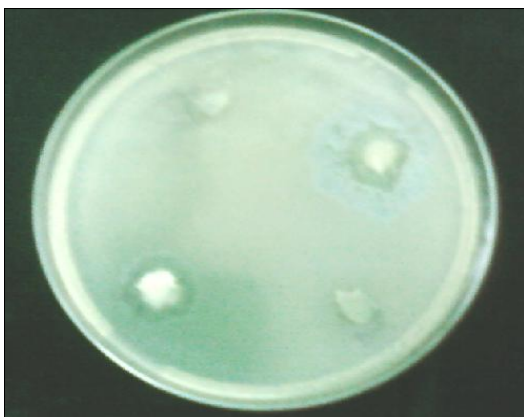
Photographie N°6: Effet de la souche STL sur *S. aureus* ATCC43300.



Photographie N°7: Effet de la souche SLK sur *S. aureus* ATCC 25923.



Photographie N°8: Effet de la souche STP sur *E. coli* ATCC 25922.



Photographie N°9: Effet des souches STK et STL sur *P. aeruginosa* ATCC 27853.



Photographie N°10: Effet de la souche SBA sur *P. aeruginosa* ATCC 27853.

7. Identification des souches isolées

Selon les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats et en se basant sur le Manuel de Systématique Bactériologique de Bergey (9^{ème} édition), nous avons pu diviser les souches isolées à partir des sources thermales de l'Est algérien en six catégories (tableau N°18):

- La première catégorie est formée de souches thermophiles modérées ou bien thermotolérantes possédants des températures optimales de croissance d'environ 50°C et des pH optimum de croissance neutres. Il s'agit des quatre souches STX, STG, SS et STP isolées à partir de la première et la deuxième source (H. Ouled Ali, 57°C; H. Esslahine, 70°C). Ce sont des courts bâtonnets (coccobacilles) à coloration de Gram négative, non sporulés et non-fermentatifs. La plupart de ses souches sont avérées capables de réduire les nitrates. Ces propriétés sont caractéristiques aux membres des *Gamaproteobacteria*. Généralement, les membres du phylum du *Proteobacteria* croissent que rarement à des températures qui dépassent 45°C (Alves *et al.*, 2003). Cependant, récemment certains membres des genres *Pseudoxanthomonas* et *Aeromonas* appartenant à ce phylum et montrant des propriétés légèrement thermophiles, ont été isolés à partir d'environnements chauds tels que les sources thermales terrestres (Chen *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2006). Ainsi, nos quatre souches peuvent être assignées à ces deux genres.

- La deuxième catégorie comprend des souches thermophiles possédantes des températures optimales de croissance d'environ 65°C et des pH optimums de croissance neutres ou légèrement alcalins. Il s'agit des quatre souches SBA, SXO, SY et SDJ isolées à partir de la troisième et la quatrième source (H. Belhachani, 72°C; H. Dbegh, 98°C). Ce sont des longs bâtonnets à coloration de Gram positive, sporulés, possèdent une catalase et capables de liquéfier la gélatine. Ces propriétés sont spécifiques au phylum des *Firmicutes*. Toutefois, des études moléculaires récentes indiquent que les sources thermales avec des températures très élevée (70-90°C) sont largement colonisées par les *Firmicutes* et plus précisément les genre *Geobacillus*, indigène aux écosystèmes géothermales (Sayeh *et al.*, 2010).

- La troisième catégorie est formée de souches extrêmement thermophiles ou hyperthermophiles avec des températures optimales de croissance d'environ 80°C et une gamme de pH neutre ou légèrement alcaline. Il s'agit des deux souches anaérobies STF et

SDA isolées à partir de la deuxième et la quatrième source (H. Essalhine, 72°C ; H. Dbegh, 98°C), respectivement. La souche STF produit des renflements terminaux appelés sphéroïdes. C'est une forme caractéristique aux membres appartenant au genre *Fervidobacterium*. Ce dernier présente avec *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Geotoga*, *Petrotoga* et *Marinitoga* les seuls genres bactériens anaérobies, hyperthermophiles décrits jusqu'à présent (Huber *et al.*, 1986; Huber et Stetter, 2001 ; Huber *et al.*, 1989; Ravot *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1985; Huber *et al.*, 1990 ; Davey *et al.*, 1993; Davey *et al.*, 2001; Wery *et al.*, 2001).

Cependant, la souche hyperthermophile anaérobie SDA est attribuée au domaine des *Archaea* sur la base de sa résistance à tous les antibiotiques (Hilpert *et al.*, 1981). Ses caractères physiologiques et morphologiques indiquent qu'elle appartient aux membres des *Thermoproteales* et probablement au genre *Thermoproteus*. Il faut signaler que, jusqu'à présent, seulement quelques genres et espèces ont été décrits dans l'ordre des *Thermoproteales* (Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 1990; Huber *et al.*, 1987; Völkl *et al.*, 1993; Zillig *et al.*, 1981; Zillig, 1989).

- La quatrième catégorie comprend deux souches thermophiles avec des températures optimales de croissance d'environ 60°C et des pH optimum neutres. Il s'agit des deux souches STK et STL isolées à partir de la première source (H. Ouled Ali, 57°C). la coloration de Gram a indiqué des très longs bacilles sporulés en forme de chaînes ou filaments, à coloration de Gram positive. L'aspect filamenteux de leurs colonies ainsi la capacité de ces souches à produire des substances antibactériennes contre la majorité des bactéries tests étudiées, peuvent les assigner au groupe des *Actinomycetes* thermophiles. L'étude de leurs caractères biochimiques indique qu'elles appartiennent probablement au genre *Thermoactinomyces*. Nombreuses espèces appartenant à ce genre ont été déjà isolées à partir des sources géothermales dans le monde (Yoon *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007).

- Une cinquième catégorie comprend une souche aérobie, thermophile avec une température optimale de croissance d'environ 70°C et un pH neutre ou légèrement alcalin. Il s'agit de la souche SB1 isolée à partir de la troisième source (H. Belhachani, 72°C). Ce sont des longs bacilles à Gram négative non sporulés, distingués par des colonies à pigment jaune. Ces caractères sont similaires à ceux du genre *Thermus*. Ce dernier possède une distribution mondiale dans les sources thermales qui possèdent des températures d'eaux supérieures à

55°C et des pH neutres à alcalins (**Kristjansson et Alfredsson, 1983; Williams et da Costa, 1992**).

- La sixième catégorie est formée de deux souches légèrement thermophiles avec des températures optimales de croissance d'environ 45°C, ce qui suggère une adaptation de ces dernières aux conditions chaudes. Il s'agit des souches STB et STE isolées à partir de la deuxième source (H. Essalhine, 70°C). Ce sont des bacilles à coloration de Gram positive. L'étude de leurs caractères biochimiques a montré qu'elles appartiennent probablement aux deux genres *Bacillus* et *Exiguobacterium*, respectivement. Quelques espèces thermophiles modérées appartenant à ces deux genres ont été également isolées à partir des écosystèmes chauds (**Nicolaus et al., 1996; Crapart et al., 2007; Caccamo et al., 2000**).

En dernier, il faut noter que les deux premières sources avec des températures modérées (57-70°C) ont présenté une diversité microbienne plus abondante en comparaison avec les deux dernières sources qui se caractérisent par des températures très élevées (72-98°C). Cela est en parfaites concordance avec les résultats démontrés par Lau et ses collègues (**Lau et al., 2006**).

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion et perspectives

Afin d'étudier la biodiversité des microorganismes thermophiles isolés de quatre échantillons d'eaux thermales, un protocole d'isolement et d'identification jusqu'au niveau du genre a été adopté.

Les quatre sources thermales étudiées présentent des températures très élevées allant de 57 à 98°C, ce qui les place parmi les écosystèmes extrêmes. Elles se caractérisent par des pH neutres ou légèrement alcalins (7.20 - 7.80).

Les sources 1, 3 et 4 (H. Ouled Ali, H. Belhachani et H. Dbegh) présentent des eaux sulfatées ou bien sulfurées calciques riches en soufre, alors que la deuxième source (H. Essalhine) se caractérise par un faciès chloruré sodique où prédomine le chlorure de sodium.

La quatrième source (H. Dbegh, 98°C), la plus chaude en Algérie et au monde, est caractérisée par la présence d'hydrogène sulfuré et d'arsenic.

Pour favoriser une bonne croissance de la flore aérobie thermophile, nous avons eu recours à une filtration des échantillons d'eaux thermales, généralement très pauvres en populations microbiennes, sur une membrane de 0.45µm de taille de pores puis faire une incubation à une température élevée pendant plusieurs jours.

Afin d'éviter la déshydratation des milieux gélosés, les boîtes de Pétri sont emballées par des sacs en plastique avant d'être incubées. Sous ces conditions les géloses peuvent rester intactes plus de sept jours.

Parmi les milieux de culture utilisés pour l'isolement des thermophiles aérobies, le milieu *Thermus*, enrichi avec 0.8% de polypeptones et 0.4% d'extrait de levure, a donné les meilleurs résultats. C'est un milieu universel recommandé pour l'isolement des thermophiles à partir des sources chaudes avec une gamme de pH entre 5 et 9.

Une étape d'enrichissement à différentes températures élevées était nécessaire pour cibler la flore anaérobie.

En raison des températures d'incubation très élevées, les milieux de culture destinés pour l'isolement des thermophiles anaérobies sont solidifiés avec 2% de Gelrite, un agent gélifiant plus thermostable que l'agar.

Le taux d'isolement de la flore aérobie régresse avec l'augmentation du degré de la température. Cette régression peut s'expliquer par une large présence des gaz réduits dans ce genre d'écosystèmes ainsi qu'une faible solubilité de l'oxygène dans l'eau à des températures élevées. Ces deux facteurs favorisent, cependant, la prédominance de la flore anaérobie stricte.

Les pH de toutes les échantillons étaient proches de la neutralité, cela n'a pas avéré avoir une influence importante sur la population microbienne isolée.

Grâce au protocole suivi pour l'isolement des microorganismes thermophiles, nous avons pu isoler 66 colonies microbiennes à partir des échantillons étudiés, ce qui correspond à 6.58×10^2 UFC/ ml d'eau. A partir de ces isolats nous avons choisi et purifié seize souches qui ont fait l'objet de notre recherche.

Deux souches (12.5% de l'ensemble des isolats) sont des hyperthermophiles aptes à croître à plus de 80°C. Huit souches (50%) sont des thermophiles se développent d'une façon optimale à des températures comprises entre 45 et 70°C. le reste des souches sont révélées incapables de croître à 65°C. Ce sont des thermotolérantes ou bien des thermophiles modérés.

La majorité des souches croissent d'une façon optimale dans un intervalle de pH allant de 7.3 jusqu'à 7.5. Il est important de noter que 18.75% des souches isolées ont été capables de se développer dans un intervalle de pH allant de 5 à 9.

Cinq souches sont amylolytiques dont trois sont thermophiles. Au moins neuf souches, dont la moitié est thermophiles, possèdent une enzyme protéolytique qui hydrolyse la gélatine en acides aminés. Quatre souches thermophiles sont capables de réduire les nitrates.

L'activité antibactérienne des souches isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar, une technique très facile et non fastidieuse. Quatre souches étaient actives contre au moins une des bactéries tests utilisées (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922).

L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et métaboliques a permis de suspecter les genres suivants : ***Geobacillus*** avec un pourcentage de **31.5%** et puis ***Pseudoxanthomonas*** en deuxième position avec 18.75%, suivie de ***Thermoactinomyces*** et

Aeromonas avec un pourcentage de 12.5%. On dernière position viennent les genres *Exigubacterium*, *Thermus*, *Fervidobacterium* et *Thermoproteus*.

Perspectives:

- Confirmer l'identification des genres par des techniques plus précises notamment l'identification moléculaire et pousser l'identification des souches isolées au niveau de l'espèce;
- Tester l'aptitude de ces souches à synthétiser d'autres enzymes thermostables dégradants la cellulose, la pectine, la lignine, la chitine, les hydrocarbures et les pesticides;
- Tester leur aptitude à produire des substances antibactériennes et antifongiques, tout en étudiant leur structure chimique ainsi que leurs cibles, et la possibilité de leur usage dans le domaine pharmaceutique;
- Réétudier ces écosystèmes en utilisant pour l'isolement d'autres milieux de culture et différentes températures d'incubation à fin d'isoler le maximum de microorganismes thermophiles.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Achenbach-Richter L., Gupta R., Stetter K.O., Woese C.R. Were the original *Eubacteria* thermophiles. *Systematic and Applied Microbiology*. 1987; **9**: 34-9.
- Adams M.W.W. et Kelly R.M. Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends in Biotechnology*. 1998; **16**: 329–332.
- Aktypis A., Kalantzopoulos G., Huis in't Veld J. H. J., Brink B. Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*. 1998; **84**: 568–576.
- Alain K., Marteinsson V.T., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Prieur D., Birrien J.L. *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; **52**:1331–1339.
- Allen M. B. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. *Bacteriological Reviews*. 1953; **17**:125-173.
- Allen M.B. Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. *Archives of Microbiology*. 1959; **32**: 270-277.
- Allouche F.N., Hellal A., Laraba A. Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*. 2010; **03**: 13 -20.
- Alves M.P., Rainey F.A., Nobre M.F., Da Cosata M. S. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., a new slightly Thermophilic c-proteobacterium isolated from a hot spring in central Portugal. *Systematic and Applied Microbiology*. 2003; **26**: 70–75.
- Ambroza A. *Denitrobacterium thermophilum* spec. nova ein Beitrag zur Biologie der thermophilen Bakterien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt*. 1913; **37**: 3-16.

- Andrews K., Patel B.K.C. *Fewidobacterium gondwanense* sp. nov., a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from Nonvolcanically Heated Geothermal Waters of the Great Artesian Basin of Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996; **16**: 265-269.
- Andrä S., Frey G., Nitsch M., Baumeister W., Stetter K.O. Purification and structural characterization of the thermosome from the hyperthermophilic archaeum *Methanopyrus kandleri*. *FEBS letters*. 1996; **379**: 127-131.
- Antoine E., Rolland J.L., Raffin J.P., Dietrich J. Cloning and over-expression in *Escherichia coli* of the gene encoding NADPH group III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus hydrothermalis*. *European Journal of Biochemistry*. 1999; **264**: 880-889.
- Athemena M. Etude des ressources thermales de l'ensemble allochtone sud sétifien. Thèse de doctorat. Faculté des sciences de l'ingénieur. Batna. Algérie. 2006. 125p.
- Balch W., Wolfe R.S. New Approach to the Cultivation of Methanogenic Bacteria: 2-Mercaptoethanesulfonic Acid (HS-CoM)-Dependent Growth of *Methanobacterium ruminantium* in a Pressurized Atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 1976; **77**: 781-791.
- Bouanane-Darenfed A., Fardeau L., Grégoire P., Manon J., Kebbouche-Gana S., Benayad T. et al. *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. a New Thermophilic Anaerobic, Xylanolytic Bacterium Isolated from an Algerian Hot Spring, *Current Microbiology*. 2011; **62**: 826-32.
- Boughalali M. Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. *Presse thermal et climaiquet*. 2003; **140**: 161-165.
- Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H.W., Stetter K.O. *Pyrolobus fumarii*, gen. nov., sp. nov., represents a novel group of Archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles*. 1997; **1**: 14-21.

- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Chernych N.A. et Zavarzin G.A. *Thermoproteus uzoniensis* sp. nov., a new extremely thermophilic archaeobacterium from Kamchatka continental hot springs. *Archives of Microbiology*. 1990; **54**: 556-559.
- Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. *Bergey's manual of systematic bacteriology - The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. New-York, USA: Springer-Verlag. 2001.
- Brock T.D. et Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n. a non sporulating extreme thermophile. *The Journal of Bacteriology*. 1969; **98**: 289 -297.
- Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T., Weiss R.L. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archives of Microbiology*. 1972; **84**: 54-68.
- Brock T.D. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. New-York, USA: Springer-Verlag. 1978.
- Caccamo D., Gugliandolo C., Stackebrandt E., Mageri T.L. *Bacillus vulcani* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000; **50**: 2009–2012.
- Castenholz R.W. Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. *Bacteriological Reviews*. 1969; **33**: 476-504.
- Cavalla M., Eberlinberlin T. Isolement des *Streptomycetes* du sol. *L'opéron*. 1994; **19**: 13-17.

- Chen M.Y., Tsay S., Chen K. Y., Shi Y. C., Lin Y.T., Lin G. H. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; **52**: 2155–2161.
- Chen M.Y., Wu S.H., Lin G.H., Lu C. P., Lin Y. T., Chang W. C. et al. *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; **54**: 1849–1855.
- Cowan D.A. The upper temperature for life where do we draw the line. *Trends in Microbiology*. 2004; **12**: 58-60.
- Crapart S., Fardeau M.L., Cayol J.L., Thomas P., Sery C., Ollivier B. et al. *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; **57**: 287–292.
- Darland G., Brock T.D., Samsonoff W., Conti S.F. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science*. 1970; **170**: 1416-1418.
- Davey M.E., Wood W.A., Key R., Nakamura K., Stahl D.A. Isolation of three species of *Geotoga* and *Petrotoga*: two new genera, representing a new lineage in the bacterial line of descent distantly related to the “*Thermotogales*.” *Systematic and Applied Microbiology*. 1993; **16**: 191–200.
- Davey M. E., MacGregor B. J., Stahl D.A. Genus IV: *Petrotoga*. In: D. R. Boone and R. W. Castenholz (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York, NY. 2001; **1**: 372–385.
- Degryse E., Glansdorff N., Piérard A. A Comparative Analysis of Extreme Thermophilic Bacteria Belonging to the Genus *Thermus*. *Archives of Microbiology*. 1978; **117**: 189-196.

- Dib H. Guide pratique des sources thermales de l'Est algérien. Mémoires du Service Géologique National. Alger. 2008. 105p.
- Eun Mi L., Che O.J., Inpyo C., Kyu-Seob C., Chang-Jin K. *Silanimonas lenta* gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic and alkaliphilic *Gammaproteobacterium* isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005; **55**: 385–389.
- Fekraoui A., Abouriche A. Ressources géothermiques du Nord de l'Algérie. Eléments de l'Atlas Géothermique. *Revue des Energies Renouvelables*. 1999; **6**: 159-162.
- Forterre P., Elie C., Siuod M., Hamal A. Studies on DNA polymerase and topoisomerases in *Archaeobacteria*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1989; **35**: 228-233.
- Forterre P., Bergerat A., Lopez-Garcia P. The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic *Archaea*. *FEMS Microbiology Reviews*. 1996; **18**: 237-248.
- Gantelet H., Duchiron F. Purification and properties of a thermoactive and thermostable pullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*, a hyperthermophilic *archaeon* isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998; **49**: 770-777.
- Gerday C. et Glansdorff N. Physiology and Biochemistry of Extremophiles. *American Society for Microbiology*. 2007. 472 p.
- Ghauri M.A., Johnson D.B. Physiological diversity amongst some moderately thermophilic ironoxidising *bacteria*. *FEMS Microbiology Ecology*. 1991; **85**: 327-331.
- Gordon R.E., Smith M.M. Rapidly growing, acid fast bacteria I. species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *Journal of Bacteriology*. 1953; **66**: 41-48.

- Grant W.D. General view of halophiles. In Superbugs - Microorganisms in extreme environments. Horikoshi K. et Grant W.D. (eds). Tokyo, Japan: Springer-Verlag. 1991; 15-37.
- Guigue S. Les sources thermo-minérales de l'Algérie. *Bulletin du service de la Carte géologique de l'Algérie*. 1940. 140 p.
- Haki G.D., Rakshit S.K. Developments in industrial important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 2003; **89**: 17-34.
- Hjorleifsdottir S., Skirnisdottir S., Hreggvidsson G.O., Holst O., Kristjansson J.K. Species composition of cultivated and non-cultivated bacteria from short filaments in an Icelandic hot spring at 88°C. *Microbial Ecology*. 2001; **42**: 117-125.
- Hilpert R., Winter J., Hammes W., Kandler O. The sensitivity of *Archaeobacteria* to antibiotics. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. 1981; **2**: 11-20.
- Hobel C.F.V. Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences. Reykjavik. Iceland. 2004. 83 p.
- Holden J.F., Baross J.A. Enhanced thermotolerance by hydrostatic pressure in the deep-sea hyperthermophilic *Pyrococcus strain ES4*. *FEMS Microbiology Ecology* 1995; **18**: 27-34.
- Horikoshi K. et Grant W.D. *Microbial Life in Extreme Environments*. Wiley-Liss, New York. 1998; 322 p.
- Houha B. Qualité des eaux de Khenchela, étude hydrochimique. Thèse de magistère. Université de Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. 1996.
- Hreggvidsson G.O. et Kristjansson J.K. Thermophily. In 3.9 Extremophiles - Encyclopedia of life support systems. Gerday C (ed). Oxford, UK: EOLSS Publishers. 2004.

- Huang G., Ying T., Huo P., Jiang Y.Z. Purification and characterization of a protease from thermophilic *Bacillus strain HS08*. *African Journal of Biotechnology*. 2006; **5**: 2433-2438.
- Huang Q., Dong C.Z., Dong R.M., Jiang H., Wang S., Wang G. *et al.* Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China. *Extremophiles*. 2011; **15**: 549–563.
- Huber R., Langworthy T.A., KLTnig H., Thomm M., Woese C.R., Sleytr U.B. *et al.* *Thermotoga maritima sp. nov.* represents a new genus of unique extremely Thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Archives of Microbiology*. 1986; **144**: 324-333.
- Huber R., Kristjansson J. K., Stetter K.O. *Pyrobaculum gen. nov.*, a new genus of neutrophilic, rodshaped archaeobacteria from continental solfataras growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology*. 1987; **149**: 95–101.
- Huber R., Woese C. R., Langworthy T. A., Fricke H., Stetter K.O. *Thermosiphon africanus gen. nov.* represents a new genus of thermophilic eubacteria within the "*Thermotogales*". *Systematic and Applied Microbiology*. 1989; **12**: 32-37.
- Huber R., Woese C.R., Langworthy T.A., Kristjansson J.K., Stetter K.O. *Fervidobacterium islandicum sp. nov.*, a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the "*Thermotogales*." *Archives of Microbiology*. 1990; **154**: 105-111.
- Huber H. et Stetter K.O. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 1998; **64**: 39–52.
- Huber R., Sacher M., Vollmann A., Huber H., Rose D. Respiration of arsenate and selenate b hyperthermophilic archaea. *Systematic and Applied Microbiology*. 2000; **23**: 305-314.

- Huber H., et Stetter K.O. Order I: *Thermoproteales*. In: G. Garrity (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York, NY. 2001; **1**: 170.
- Hungate R.E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Review*. 1950; **14**: 1-9.
- Iino T., Nakagawa T., Mori K., Harayama S., Suzuki K.I. *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008; **58**: 1675–1679.
- Issadi A. Le thermalisme dans son cadre géo-structural, apports à la connaissance de la structure profonde de l'Algérie et de ses ressources géothermales. Thèse de doctorat d'état. IST. USTBH. Alger. 1992. 274 p.
- Kashefi K. et Lovley D. R. Extending the upper temperature limit for life. *Science*. 2003; **301**: 934-935.
- Kecha M., Benallaoua S., Touzel J.P., Bonaly B., Duchiron F. Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles*. 2007; **11**: 65–73.
- Khalil A.B., Abu zarqa M., Al-Qaryouti M. Production of antimicrobial agents from thermophilic *Yersinia sp.1* and *Aeromonas hydrophila* isolated from hot spring in Jordan Valley, *Biotechnology*. 2006; **5**: 252-256.
- Khelifi N., Ben Romdhane E., Hedi A., Postec A., Fardeau M.L., Hamdi M., et al. Characterization of *Microaerobacter geothermalis* gen. nov., sp. nov., a novel microaerophilic, nitrate- and nitrite-reducing thermophilic bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Tunisia. *Extremophiles*. 2010; **14**: 297–304.

- Kitouni M., Boudmegh A., Oulmi., Reghioia S., Boughachiche F., Zerizer H. *et al.* Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of north-east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*. 2005; **15**: 45-51.
- Kitouni M. Isolement de bactéries Actinomycetales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Constantine. Algérie. 2007. 149 p.
- Knowles R. Denitrification. *Microbiological Reviews*. 1982; **46**: 43-70.
- Kristjánsson J. K. et Alfredsson G. A. Distribution of *Thermus spp.* in Icelandic hot springs and a thermal gradient. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983; **45**: 1785–1798.
- Kristjánsson J.K. et Stetter K.O. Thermophilic bacteria. In Thermophilic bacteria. Kristjánsson JK (ed). Boca Raton, Fl., USA: *CRC Press, Inc.* 1992. 1-18.
- Kristjánsson J.K., Hjorleifsdottir S., Marteinson V.T., Alfredsson G.A. *Thermus scotoductus*, *sp. nov.*, a pigment-producing thermophilic bacterium from hot tap water in Iceland and including *Thermus sp X-1*. *Systematic and Applied Microbiology*. 1994; **17**: 44-50.
- Kristjánsson J.K. et Hreggvidsson G.O. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1995; **11**: 17-25.
- Kristjánsson J.K., Hreggvidsson G.O., Grant W.D. Taxonomy of extremophiles. In Applied microbial systematics. Priest FG et Goodfellow M (eds). Dordrecht. *The Netherlands: Kluwer Academic Press*. 2000. 231-291.
- Lahlou Mimi A., Ben Dhia H., Bouri S., Llahrach A., Ben Abidate L., Bouchareb-Haouchim F.Z. Application of chemical geothermometers springs of the maghreb, north africa. *Geothermics*. 1998; **27**: 211-233.

- Laksanalamai P., Maeder D.L., Robb F.T. Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of Bacteriology*. 2001; **183**: 5198-5202.
- Lamosa P., Martins L. O., Da Costa M.S., Santos H. Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 1998; **64**: 3591-3598.
- Ladenstein R. et Antranikian G. Proteins from hyperthermophiles: Stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; **61**: 37-85.
- Larpent J.P., Larpent-Gourgaud M. Manuel pratique de microbiologie. Herman. Paris. 1985. 230 p.
- Lau M.C.Y., Jing H., Aitchison J.C., Pointing S.B. Highly diverse community structure in a remote central Tibetan geothermal spring does not display monotonic variation to thermal stress. *FEMS Microbiology Ecology*. 2006; **57**: 80–91.
- Leuschner C. et Antranikian G. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1994; **11**: 95–114.
- Leveque E., Haye B., Belarbi A. Cloning and expression of an alpha-amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; **186**: 67-71.
- Liu G.Y., Essex A., Buchanan J.T., Datta V., Hoffman H.M., Bastian J.F., Fierer J., Nizet V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005; **202**: 209-215.

- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. In Brock Biology of Microorganisms. Madigan M.T, Martinko J.M et Parker J. (eds). Upper Saddle River, NJ, USA. *Prentice Hall International Editions*. 1997.
- Madigan M.T. et Marris B.L. Extremophiles. *Scientific American*. 1997; **4**: 66-71.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. Brock Biology of Microorganisms, 10th ed. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 2003.
- Madigan M.T., Martino J.M. Brock Biology of Microorganisms. 11th ed. *Pearson*. 2006. 136 p.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Potential genomic determinants of hyperthermophily. *Trends in Genetics*. 2003; **19**: 172-176.
- Marteinsson V.T. Isolement et caractérisation de microorganismes extrêmophiles originaire de site hydrothermaux océaniques. Influence du couple température-pression sur la physiologie. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale. France. 1997.
- Marteinsson V.T., Birien J.L., Reysenbach A.L., Vernet M., Marie D., Gambacorta A. *et al.* *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999; **49**: 351-359.
- Moreira C., Rainey F.A., Nobre M.F., Silva M.T., Da Costa M. S. *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the β -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000; **50**: 735-742.

- Muriana P.M., Klaenhammer T.R. Purification and Partial Characterization of Lactacin F, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and environmental microbiology*. 1991; **77**: 114-121.
- Naphrae B. Inhibitory effect of antibiotics from thermophilic bacteria on certain bacteria. Thèse de Doctorat. Chiang Mai University. China. 1999. 76-77.
- Nicolaus B., Lama L., Esposito E., Manca M.C., di Prisco G., Gambacorta A. *Bacillus thermoantarcticus* sp. nov., from Mount Melbourne, Antarctica: a novel thermophilic species. *Polar Biology*. 1996; **16**: 101–104.
- Nogi Y., Kato C. Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolate. *Extremophiles*. 1999; **3**: 71-77.
- Novotny J.F. et Perry J. Characterization of Bacteriocins from Two Strains of *Bacillus thermoleovorans*, a Thermophilic Hydrocarbon-Utilizing Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992; **77**: 2393-2396.
- Ouali S., Khellaf A., Baddari K. Etude des ressources géothermiques du sud algérien. *Revue des Energies Renouvelables*. 2007; **10**: 407–414.
- Ouali S. Les sources Thermales en Algérie. *Recherche et Développement*. 2008; **13**: 17-18.
- Pace N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 1997; **276**: 734-740.
- Patel B.K.C., Morgan H.W., Daniel R.M. *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1985; **141**: 63–69.

- Payne W.J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriological Reviews*. 1973; **37**: 409-452.
- Pires A.L., Albuquerque L., Tiago I., Nobre M. F., Empadinhas N., Verissimo A. *et al.* *Meiothermus timidus sp. nov.*, a slightly thermophilic yellow-pigmented species. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; **245**: 39–45.
- Postec A. Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique : cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles. Thèse de doctorat. Université de Provence. Aix-Marseille I. France. 2005. 220 p.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D. *Microbiologie*. 2th ed. Debroeck-wesmael. 1995.
- Rad W. The genus *Thermus*. In *Thermophilic bacteria*. Kristjansson J.K. (ed). CRC Press. USA. 1992. 228 p.
- Rad W. et Da Costa M.S. The genus *Therrnus* and related microorganisms. *The prokaryotes*.1992; 3745-3753.
- Rainey F.A., Nobre M.F., Schumann P., Stackebrandt E., Da Costa M.S. Phylogenetic diversity of the *Deinococci* as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology*.1997; **47**: 510-514.
- Rainey F.A., Silva J., Nobre M.F., Silva M.T., Da Costa M.S. *Porphyrobacter cryptus sp. nov.*, a novel slightly thermophilic, aerobic, bacteriochlorophyll a-containing species. *International. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003; **53**: 35–41.
- Ramakrishnan V., Verhagen M., Adams M. Characterization of Di-myo-inositol-1,1(prm1)-phosphate in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Applied and Environmental Microbiology*.1997; **63**: 347-350.

- Ravenschlag K., Sahn K., Amann R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; **67**: 387-395.
- Ravot G., Ollivier B., Fardeau M.L., Patel B.K.C., Andrews K.T., Magot M. *et al.* L-alanine production from glucose fermentation by hyperthermophilic members of the domains *Bacteria* and *Archaea*: A remnant of an ancestral metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; **62**: 2657–2659.
- Rees H.C., Grant W.D., Jones B.E., Heaphy S. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods. *Extremophiles*. 2004; **8**: 63-71.
- Richard C. Les eaux, les bactéries, les hommes et les animaux. Elsevier Masson. Paris. 1996. 115 p.
- Rodier J. L'analyse de l'eau. *Edit. Dunod. Paris*. 1984. 1365 p.
- Saha P., Krishnamurthi S., Mayilraj S., Prasad G.S., Bora T.C., Chakrabarti T. *Aquimonas voraii* gen. nov., sp. nov., a novel *Gammaproteobacterium* isolated from a warm spring of Assam, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005; **55**: 1491–1495.
- Saibi H. Geothermal resources in Algeria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2009; **13**: 2544–2552.
- Santos H. et Da Costa M.S. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology*. 2002; **4**: 501-509.
- Sayeh R., Birrien J.L., Alain K., Barbier G., Hamdi M., Prieur D. Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles*. 2010; **14**: 501–514.

- Schoeller H. Les eaux souterraines hydrologie dynamique et chimique, recherche, exploitation et évaluation des ressources. Edit. Masson. Paris. 1962. 642 p.
- Scholz S., Wolff S., Hensel R. The biosynthesis pathway of di-myo-inositol-1, 1'-phosphate in *Pyrococcus woesei*. *Federation of European Microbiological Societies Letters*. 1998; **168**: 37-42.
- Shi T., Reeves R.H., Gilichinsky D.A., Friedmann E.I. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16 S rDNA sequencing. *Microbial Ecology*. 1997; **33**: 169-179.
- Sleator R.D., Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Review*. 2002; **26**: 49-71.
- Sterner R., Liebl W. Thermophilic Adaptation of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2001; **36**: 39-106.
- Stetter K.O., Fiala G., Huber G., Huber R., Segerer A. Hyperthermophilic microorganisms. *Federation of European Microbiological Societies Reviews*. 1990; **75**: 117–124.
- Stetter K.O. Hyperthermophilic prokaryotes. *Federation of European Microbiological Societies Reviews*. 1996; **18**: 149-158.
- Stetter K.O. Diversity of extremely thermophilic archaeobacteria. In *Thermophiles. General, Molecular, and Applied Microbiology*, ed Brock, T.D. 1986; 40-74.
- Stetter K.O., Fiala G., Huber R., Huber G., Segerer A. Life above the boiling point of water. *Experientia*. 1986; **42**: 1187–1191.
- Stetter K.O. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*. 1999; **452**: 22-25.

- Stetter K.O. Hyperthermophiles: isolation, classification, and properties. *Extremophiles*. 1999; **3**: 1-24.
- Tortorano A.M., Cabrini E., Viviani M.A. Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux methods. CMI. En gélose et méthode des disques. *Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale*. 1979; **8**: 69-74.
- Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*. 2007; **6**: 9.
- Van de Vossenberg J.L., Driessen A.J., Konings W.N. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles*. 1998; **2**: 163-170.
- Völkl P., Huber R., Drobner E., Rachel R., Burggraf S., Trincone A. *et al.* *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaerum. *Applied and environmental microbiology*. 1993; **59**: 2918-2926.
- Wery N., Lesongeur F., Pignet P., Derennes V., Cambon-Bonavita M.A., Godfroy A. *et al.* *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; **51**: 495–504.
- Wharton D.A. Organisme in extreme environnements: from the origin and early evolution life on earth to astrobiology. 2004. 14 p.
- Woese C.R., Fox G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977; **74**: 5088-5090.
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1990; **87**: 4576-4579.

- Woese C.R., Achenbach L., Rouviere P., Mandelco L. Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. *Systematic and Applied Microbiology*. 1991; **14**: 364-371.
- Yoon J.H., Kim I.G., Shin Y.K., Park Y.H. Proposal of the genus *Thermoactinomyces sensu stricto* and three new genera, *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium* and *Seinonella*, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005; **55**: 395–400.
- Zhang Y.X., Dong C., Biao S. *Planifilum yunnanense sp. nov.*, a thermophilic thermoactinomycete isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; **57**: 1851–1854.
- Zeikus J.G., Hegge P.W., Anderson M.A. *Thermoanaerobium brockii gen. nov. and spec. nov.*, a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1979; **122**: 41- 48.
- Zillig W., Stetter K.O., Schäfer W., Janekovic D., Wunderl S., Holz I. *et al.* *Thermoproteales*: A novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from Icelandic solfataras. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1981; **2**: 205–227.
- Zillig W. Order II: *Thermoproteales*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. William and Wilkins. *Baltimore, MD*. 1989; 2240–2244.

ANNEXES

Annexe I : Milieux de culture utilisés**• Milieu Thermus (ATCC medium 697)**

Extrait de levure	4.0 g
Polypeptones	8.0 g
NaCl	2.0 g
Agar	30 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7.5

• Gélose trypticase soja

Peptone de caséine	15 g
Peptone de soja	5.0 g
NaCl	2.5 g
Agar	12 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7.3

• Gélose nutritive

Extrait de viande	1.0 g
Extrait de levure	2.0 g
Peptone	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7.4

• Gélose nutritive à 1% d'amidon

Extrait de levure	4.0 g
Peptone	8.0 g
Amidon soluble	10 g
NaCl	2.0 g
Agar	30 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7

- **Milieu de Ravot**

NH ₄ Cl	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Mg Cl ₂ . 6 H ₂ O	0.2 g
Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O	0.1 g
NaCl	10 g
KCl	0.3 g
Cystéine-HCl	0.5 g
Acétate de sodium	0.5 g
Extrait de levure	2.0 g
Trypticase	2 .0g
Solution d'oligo-éléments de Blach	10 ml
Resazurin	1.0 mg
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 8

- **Solution d'oligo-éléments de Blach**

Acide nitriloacétique	1.5 g
Mg SO ₄ .7 H ₂ O	3.0g
Mn SO ₄ . 2 H ₂ O	0.5g
NaCl	1.0g
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	0.1g
Co Cl ₂ . 6 H ₂ O	0.1g
Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O	0.1g
Zn Cl ₂	0.1g
Cu SO ₄ . 5 H ₂ O	0.01g
AlK (SO ₄) ₂	0.01g
H ₃ BO ₃	0.01g
Na ₂ . Mo O ₄ . 2 H ₂ O	0.01g
Eau distillée	1000ml

- **Milieu de widdel**

Solution d'acétate de sodium	10 ml
Na ₂ SO ₄	3.0g
KH ₂ PO ₄	0.2g
NH ₄ Cl	0.3g
KCl	0.5g

CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.1g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.4g
NaCl	1.0g
Solution d'oligo-éléments SL7	1ml
Solution de bicarbonate	30 ml
Solution de sulfure	3 ml
Solution de vitamines	6 ml
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7.1 - 7.3	

- **Solution d'oligo-éléments SL7**

HCl 25%	10 ml
Fe Cl ₂ . 4 H ₂ O	1.5 g
Co Cl ₂ . 6 H ₂ O	0.19 g
Mn Cl ₂ . 4 H ₂ O	0.1 g
Zn Cl ₂	0.07 g
H ₃ BO ₃	0.06 g
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.03 g
Ni Cl ₂ . 6 H ₂ O	0.02 g
Cu Cl ₂ . 2 H ₂ O	0.01 g
Eau distillée	1000 ml

- **Solution de vitamines**

Biotine	2 ng
Acide 4-aminobenzoïque	50 ng
Calcium -pantothenate	25 ng
Pyridoxamine	250 ng
Acide nicotinique	100 ng
Thiamine	50 ng
Solution de vitamine B ₁₂	20 ng

N.B

- L'ajustement du pH des milieux de culture est effectué à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou solution d'HCl 1N à 25°C selon le cas.

- Les milieux sont autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

- Les milieux destinés pour l'isolement des anaérobies stricts sont préparés sous une atmosphère remplie par un mélange des gaz suivants : N₂/CO₂ (90:10).

Annexe II : Bactéries test utilisées

- ***Escherechia coli***

E. coli est le microorganisme le mieux connu en microbiologie. C'est une bactérie aérobie facultative, Gram (-), mésophile (20-40 °C), cause parfois des infections des voies urinaires, certaines souches produisent des entérotoxines responsables de la turista (diarrhée des voyageurs) et provoquant occasionnellement de très graves maladies d'origine alimentaire telle que la maladie du *Hamburger* (**Tortora et al., 2003**).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Bactéries à Gram (-), aérobies strictes, de morphologie bacillaire, mobiles grâce à un seul flagelle, isolées à partir des prélèvements cliniques (blessure, plaie, brûlures, infection de l'appareil urinaire) ou du sol et de l'eau. Les infection à *Pseudomonas aeruginosa* sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiales (**Tortora et al., 2003**).

- ***Staphylococcus aureus***

Ou bien staphylocoque doré. C'est une bactérie sphérique, anaérobie facultative, à Gram (+), se développe dans certains aliments, dans lesquels la pression osmotique est élevée ou bien la teneur en eau est faible, tolèrent une concentration en sel de 7.5%. *Staphylococcus aureus* est le plus pathogène de tous les staphylocoques. Presque toutes les souches de *S. aureus* sont à coagulase (+), Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom, responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses (**Liu et al., 2005**).

Résumé

Un intérêt considérable est porté aux microorganismes thermophiles associés aux sources chaudes terrestres. Seize souches microbiennes ont été isolées et purifiées à partir des échantillons d'eaux thermales prélevés de l'Est algérien. Les échantillons en question sont considérés, après mesure de la température, comme étant des écosystèmes extrêmes. Le milieu *Thermus* (0.8% de polypeptones, 0.4% d'extrait de levure) s'est montré en faveur de l'isolement des thermophiles aérobies. Il s'est avéré que 50% de l'ensemble des isolats sont des thermophiles et 12.5% sont des hyperthermophiles. 18.75% des isolats sont aptes à croître dans un intervalle de pH allant de 5 à 9. Quatre souches thermophiles ont été capables de réduire les nitrates, cinq sont amylolytiques, au moins neuf souches possèdent une enzyme protéolytique et quatre souches (28,57%) sont actives contre au moins une des bactéries tests utilisées (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC43300, *P. aeruginosa* ATCC27853 et *E. coli* ATCC25922). L'étude de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques semble suggère que ces souches appartiennent aux genres : *Geobacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Aeromonas*, *Exiguobacterium*, *Thermus*, *Fervidobacterium* et *Thermoproteus*. Nos résultats permettent d'étendre nos connaissances sur les communautés microbiennes indigènes à ces sources hydrothermales ainsi que leur intérêt en biotechnologie.

Mots clés: Sources hydrothermales, thermophiles, hyperthermophiles, biodiversité, biotechnologie.

Abstract

Considerable interest is given to the thermophilic microorganisms associated with terrestrial hot springs. Sixteen microbial strains were isolated and purified from thermal water samples collected from hot springs in eastern Algeria. The samples in question are considered after measuring the temperature, as extreme ecosystems. *Thermus* medium (0.8% polypeptones, 0.4% yeast extract) was in favor of the isolation of aerobic thermophiles. It turned out that 50% of all isolates are thermophilic and 12.5% are hyperthermophilic. 18.75% of the isolates are able to grow in a pH range from 5 to 9. Four thermophilic strains were able to reduce nitrates; five are amylolytic, at least nine strains possess a proteolytic enzyme and four strains (28.57%) were active against at least one of the tests used bacteria (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC43300, *P. aeruginosa* ATCC25922 and *E. coli* ATCC27853). The study of their morphological, physiological and biochemical characters suggests that these strains belong to the genera *Geobacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Aeromonas*, *Exiguobacterium*, *Thermus*, *Thermoproteus* and *Fervidobacterium*. Our results extend our knowledge on the microbial communities indigenous to the hot springs and their interest in biotechnology.

Keywords: Hot springs, thermophiles, hyperthermophiles, biodiversity, biotechnology.

ملخص

تعطى أهمية كبيرة للكائنات الحية الدقيقة التي تعيش في الينابيع الحارة الأرضية. تم عزل ستة عشر سلالة ميكروبية من عينات المياه الساخنة التي تم جمعها من الشرق الجزائري بعد عدة تحاليل أجريت على هذه العينات اتضح بأنها ذات حرارة عالية جدا, مما يجعل منها أوساط غير مواتية للحياة. تبين بأن الوسط *Thermus* (0.8 % بيتون، 0.4 % مستخلص الخميرة) أعطى النتائج الأفضل. 50 % من السلالات المعزولة محبة للحرارة و 12.5 % جد محبة للحرارة. 18.75% قادرة على النمو في درجة حموضة من 5 إلى 9. أربع سلالات محبة للحرارة كانوا قادرين على اختزال النترات، خمسة محللة للنشاء، على الأقل تسعة سلالات تمتلك إنزيم محللة للبروتينات وأربع سلالات (28.57%) كانت نشطة ضد واحد على الأقل من البكتيريا المختبرة (*S. aureus ATCC 25923*, *S. aureus ATCC43300*, *P. aeruginosa ATCC27853*, *E. coli ATCC25922*). والبيوكيميائية لهذه السلالات بينت بأنهم ينتمون على الأرجح الى الأصناف التالية: *Geobacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Aeromonas*, *Exiguobacterium*, *Thermus*, *Fervidobacterium* و *Thermoproteus*. تعمل هذه النتائج على توسيع معرفنا للمجمعات الميكروبية الأصلية للينابيع الساخنة وأهميتها في مجال التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات الرئيسية: الينابيع الحارة ، الكائنات الدقيقة المحبة للحرارة، الكائنات الدقيقة المحبة جدا للحرارة، التنوع البيولوجي ، التكنولوجيا الحيوية.

Nom : **Yakhlef**
Prénom : **Wahiba**

Date de soutenance: **03 / 01 / 2012**

Diplôme: **Magistère**

Thème: Identification et caractérisation des communautés microbiennes des sources hydrothermales de l'Est algérien

Résumé

Un intérêt considérable est porté aux microorganismes thermophiles associés aux sources chaudes terrestres. Seize souches microbiennes ont été isolées et purifiées à partir des échantillons d'eaux thermales prélevés de l'Est algérien. Les échantillons en question sont considérés, après mesure de la température, comme étant des écosystèmes extrêmes. Le milieu *Thermus* (0.8% de polypeptones, 0.4% d'extrait de levure) s'est montré en faveur de l'isolement des thermophiles aérobies. Il s'est avéré que 50% de l'ensemble des isolats sont des thermophiles et 12.5% sont des hyperthermophiles. 18.75% des isolats sont aptes à croître dans un intervalle de pH allant de 5 à 9. Quatre souches thermophiles ont été capables de réduire les nitrates, cinq sont amylolytiques, au moins neuf souches possèdent une enzyme protéolytique et quatre souches sont actives contre au moins une des bactéries tests utilisées (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC43300, *P. aeruginosa* ATCC27853 et *E. coli* ATCC25922). L'étude de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques semble suggère que ces souches appartiennent aux genres : *Geobacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Aeromonas*, *Exiguobacterium*, *Thermus*, *Fervidobacterium* et *Thermoproteus*. Nos résultats permettent d'étendre nos connaissances sur les communautés microbiennes indigènes à ces sources hydrothermales ainsi que leur intérêt en biotechnologie.

Mots clés

Sources hydrothermales, thermophiles, hyperthermophiles, biodiversité, biotechnologie.

Devant le jury

Président :	M. BENOUNIS M. (MCA)	C. Univ. Abbès Laghrour – Khenchela.
Encadreur :	M. DARBOUCHE A. (Prof)	C. Univ. Abbès Laghrour – Khenchela.
Examineurs :	M. HOUHAMDI M. (Prof)	Univ. 08 Mai 1945 – Guelma.
	M. BOUDEMAGH A. (MCA)	Univ. Mentouri – Constantine.