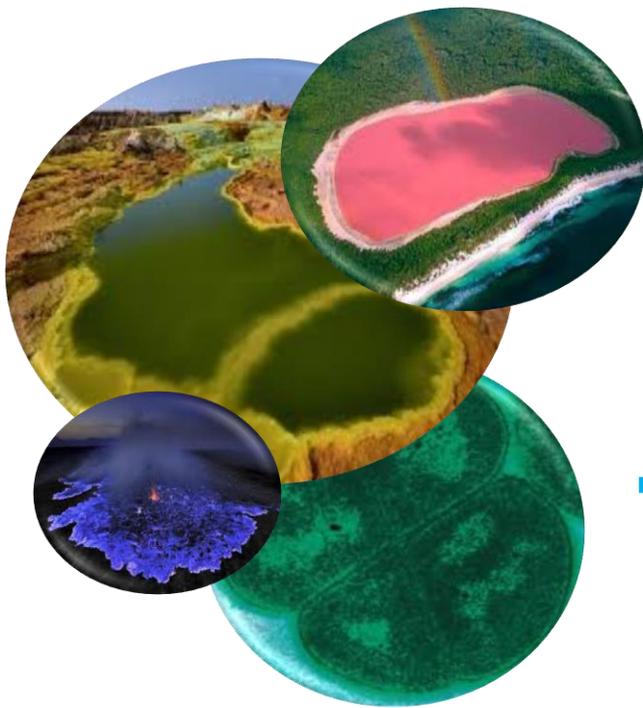


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abderahmane MIRA-Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



Cours de Microorganismes des milieux extrêmes

M^{elle} DJINNI Ibtissem
Maitre de Conférences

Année Universitaire 2016/2017

*« Les micro-organismes peuvent
faire ce que vous voulez.
Il suffit d'imaginer comment. »*

Koki HORIKOSHI

*« La nature a plus d'imagination que nos
rêves. »*

Protéus, société de biotechnologie
France.

SOMMAIRE

Listes des figures et tableaux

Préface

Introduction

| | |
|---|---|
| I. La diversité microbienne..... | 1 |
| 1. Les trois domaines du vivant | 1 |
| 1.1. Le domaine <i>Bacteria</i> | 3 |
| 1.2. Le domaine <i>Archeae</i> | 6 |
| 1.3. Le domaine <i>Eucarya</i> | 8 |
| II. Last Universal Common Ancestor (LUCA) | 8 |

Chapitre I : L'extrémophilie

| | |
|--|----|
| I. Notion d'extrémophiles | 10 |
| 1. La diversité écologique | 10 |
| 2. Biodiversité des extrémophiles | 14 |
| II. Propriétés des extrémophiles | 17 |
| III. Importance et applications biotechnologique des extrémophiles | 18 |
| 1. Exploitation de l'adaptation extrémophile | 18 |
| 1.1. Utilisation des cellules entières | 18 |
| 1.1.1. Réduction des métaux toxiques | 19 |
| 1.1.2. Oxydation et biolixiviation | 19 |
| 1.1.3. Biominéralisation et bioimmobilisation | 20 |
| 1.1.4. La chélation à la surface des bactéries | 21 |
| 1.2. Utilisation des biomolécules | 22 |
| 1.2.1. Protéines et enzymes | 22 |
| Carboxylestérases : lipases et estérases..... | 23 |
| Protéases et peptidases | 24 |
| Glycosidases | 24 |

Chapitre II : Les Thermophiles

| | |
|---|----|
| I. Définition et classification | 28 |
| II. Ecologie des thermophiles | 29 |
| 1. Les biotopes naturels | 30 |
| 2. Les biotopes artificiels | 32 |
| III. Echantillonnage et culture | 32 |
| IV. Diversité taxonomique et métabolique | 33 |
| 1. Voies métaboliques des thermophiles | 35 |
| V. Adaptations physiologiques à la thermophilie | 36 |
| 1. Aspects physiologiques et morphologique | 36 |
| 1.1. La perméabilité membranaire | 37 |
| 1.2. Teneur en G+C | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Les protéines | 37 |
| 3. Accumulation de solutés compatibles | 38 |
| VI. Applications biotechnologiques des thermophiles | 39 |
| 1. Conversion de la lignocellulose en hydrogène | 39 |
| 2. Le biofuel | 43 |

Chapitre III : Les Halophiles

| | |
|--|-----------|
| I. Définition et classification | 45 |
| II. Ecologie des halophiles | 46 |
| III. Diversité taxonomique et métabolique des microorganismes halophiles et halotolérants | 48 |
| 1. Les archaea halophiles | 48 |
| 2. Caractéristiques générales des archaea halophiles extrêmes | 52 |
| 2.1. Caractères cultureux et morphologiques | 52 |
| 2.2. Caractères physiologiques et biochimiques... .. | 53 |
| 3. Les bactéries halophiles | 54 |
| 3.1. Taxonomie et physiologie | 54 |
| IV. Mécanismes d'adaptation à la vie en milieu hypersalin | 57 |
| 1. Régulation de la pression osmotique | 58 |
| 2. Adaptation des protéines à l'hypersalinité | 59 |
| 3. Adaptation des acides nucléiques à l'hypersalinité | 61 |
| V. Potentiel biotechnologique des organismes halophiles | 62 |
| 1. Production d'enzymes | 63 |
| 1.1. Les enzymes lipolytiques | 65 |
| 1.2. Les enzymes protéolytiques | 66 |
| 1.3. Les enzymes amylolytiques | 66 |

Chapitre IV : Autre extrémophiles

| | |
|--|-----------|
| I. Introduction | 67 |
| II. Les psychrophiles | 67 |
| 1. Définition | 67 |
| 2. Biodiversité des microorganismes psychrophiles | 68 |
| 2.1. Les écosystèmes aquatiques froids | 70 |
| 2.1.1. Atmosphère et nuages | 70 |
| 2.1.2. Neige | 70 |
| 2.1.3. Glaciers | 71 |
| 3. Stratégies d'adaptation des microorganismes psychrophiles et leur études métaboliques | 71 |
| 3.1. Adaptation environnementale | 72 |
| 3.2. Adaptation moléculaire | 72 |
| 3.3. Adaptations physiologiques | 74 |
| 4. Applications biotechnologiques des microorganismes psychrophiles | 76 |
| III. Les alcaliphiles et acidophiles | 77 |
| 1. Les alcaliphiles | 77 |
| 1.1. Définition et écologie | 77 |

| | |
|--|----|
| 1.2. Distribution et isolement des alcaliphiles | 78 |
| 1.3. Adaptations physiologiques des microorganismes alcaliphiles | 78 |
| 1.4. Applications biotechnologiques des microorganismes alcaliphiles | 80 |
| 2. Les acidophiles | 81 |
| 2.1. Définition et écologie | 81 |
| 2.2. Diversité microbienne | 82 |
| 2.3. Adaptations physiologiques des microorganismes acidophiles | 83 |
| 2.4. Applications biotechnologiques des microorganismes acidophiles | 85 |
| IV. Les piezophiles | 86 |

Conclusion

Références bibliographiques

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I. 1 : Microorganismes extrémophiles et leurs environnements | 12 |
| Tableau I. 2 : Quelques exemples d'extrémophiles appartenant au domaine <i>Archaea</i> | 12 |
| Tableau I. 3 : Applications des extrémophiles en biotechnologie, médecine et industrie | 23 |
| Tableau I. 4 : Classification des amylases | 25 |
| Tableau II. 1 : Les biotopes des hyperthermophiles | 31 |
| Tableau II. 2 : Taxonomie et températures maximales de croissance des hyperthermophiles | 34 |
| Tableau II. 3 : Exemple de la diversité métabolique des thermophiles | 36 |
| Tableau II. 4 : Brevets des principales études réalisées sur les thermophiles et leurs Applications | 39 |
| Tableau III.1 : Distribution des espèces d'Archaea halophiles et leur site d'isolement | 50 |
| Tableau III.2 : Distribution des bactéries halophiles de par le monde | 55 |
| Tableau III. 3 : Microorganismes producteurs d'enzymes hydrolytiques isolées de différents environnements hypersalins | 64 |
| Tableau III. 4 : Applications biotechnologiques de quelques enzymes obtenues de bactéries halophiles modérées et extrêmes | 65 |
| Tableau IV. 1 : Exemples de microorganismes psychrophiles isolés des habitats marins | 70 |
| Tableau IV. 2 : Quelques utilisations potentielles des microorganismes psychrophiles et de leurs produits | 78 |
| Tableau IV. 3 : Composition de milieux de base pour l'isolement de microorganismes alcaliphiles | 79 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation de la diversité des trois domaines du vivant | 3 |
| Figure 2 : Morphologie de la cellule bactérienne..... | 5 |
| Figure 3 : Représentation des principales morphologies décrites chez les procaryotes | 5 |
| Figure 4 : Structure et morphologie d'une <i>Archaea</i> | 7 |
| Figure 5 : Représentation d'une partie des eucaryotes unicellulaires, illustrant leur diversité morphologique | 8 |
| Figure I. 1 : Exemples de biotopes extrêmes | 11 |
| Figure I.2 : Arbre phylogénétique montrant les extrémophiles et les caractéristiques de résistance | 14 |
| Figure I. 3 : La vie à proximité d'une cheminée hydrothermale profonde | 15 |
| Figure I. 4. Bioprécipitation | 21 |
| Figure I. 5 : Les trois principales enzymes amylolytiques | 26 |
| Figure II. 1 : La thermophilie dans les trois domaines du vivant | 29 |
| Figure II. 2: Biotopes des thermophiles et hyperthermophiles | 32 |
| Figure II. 3 : Photographies au microscope électronique à balayage de cellules bactériennes et d'archeae hyperthermophiles | 33 |
| Figure II. 4: Structures simplifiées et sites d'hydrolyse enzymatique sur les polymères de lignocellulose | 43 |
| Figure II. 5: Différentes applications des microorganismes thermophiles | 44 |
| Figure III. 1 : Variation du taux de croissance en fonction de la concentration en NaCl | 46 |
| Figure III. 2 : Exemples de milieux extrêmes propices à l'isolement d'espèces halophiles | 48 |
| Figure III. 3 : Saumure de sel cristallisé | 49 |
| Figure III. 4 : Distribution des <i>Archaea</i> halophiles de par le monde | 50 |
| Figure III. 5 : Distribution des bactéries halophiles de par le monde | 55 |
| Figure III. 6 : Quelques exemples de structures de solutés compatibles | 59 |
| Figure III. 7 : Interactions des solutés compatibles avec l'ADN | 61 |
| Figure IV. 1 : Habitats naturels des microorganismes psychrophiles | 68 |
| Figure IV. 2 : Modifications structurelles communes des enzymes psychrophiles | 74 |
| Figure IV. 3 : Adaptations physiologiques chez les procaryotes psychrophiles | 76 |
| Figure IV. 4 : Représentation schématique de la bioénergétique et des propriétés de surface | |

| | |
|--|----|
| cellulaire de la bactérie alcaliphile <i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4 | 79 |
| Figure IV. 5 : Quelques mécanismes d'adaptation des microorganismes alcaliphiles et leurs applications biotechnologiques potentielles | 81 |
| Figure IV. 6 : (A) Habitat des microorganismes acidophiles (Geysers acides), (B) <i>Thermoplasma</i> | 83 |
| Figure IV.7 : Adaptation des microorganismes acidophiles aux environnements acides | 84 |
| Figure IV. 8 : Applications potentielles des acidophiles et de leurs enzymes | 85 |

Préface

Au cours des dernières décennies, l'étude des extrémophiles a permis des découvertes novatrices qui ont remis en question notre compréhension de la biochimie et de la biologie moléculaire.

Les organismes extrémophiles peuvent être isolés de sources chaudes sulfureuses, de cheminées hydrothermales sous-marines, de sédiments, dans les glaces de l'Antarctique ou de l'Arctique, dans des eaux saturées en sel (lac ou Mer Morte), dans des gisements pétroliers...etc. Parfaitement adaptés à ces conditions très spéciales, les extrémophiles sont rares dans les conditions ordinaires. En effet, même lorsqu'ils sont capables de supporter ces conditions, ils supportent mal la concurrence d'organismes ordinaires.

Du côté appliqué, les extrémophiles et leurs enzymes ont engendré une industrie biotechnologique à plusieurs milliards de dollars, avec des applications couvrant les secteurs biomédical, pharmaceutique, industriel, environnemental et agricole.

La Taq polymérase, isolée de *Thermus aquaticus*, est l'exemple le plus connu de l'application biotechnologique potentielle des extrémophiles et de leurs biomolécules. En effet, l'application des extrémophiles et de leurs composés actifs a ouvert une nouvelle ère en biotechnologie. Cependant, malgré les dernières avancées, l'exploration du potentiel biotechnologique des extrémophiles n'est encore qu'à ces débuts.

Le choix de ce sujet est motivé par la mise en avant de l'importance de l'étude de tels organismes mais également la compréhension des mécanismes impliqués et utilisés dans l'adaptation aux conditions extrêmes.

Destiné aux étudiants Master 1 en Ecologie Microbienne et toute personne s'intéressant à ce volet de la Microbiologie, ce polycopié est une lecture essentielle pour une compréhension des extrémophiles et leur application biotechnologique potentielle. Il est axé autour de quatre chapitres. Après une introduction sur la diversité microbienne et une présentation des trois domaines du vivant et du Dernier Ancêtre Universel Commun (Last Universal Common Ancestor), le premier chapitre est consacré aux notions d'environnements extrêmes et d'extrémophilie qui tendra à expliquer la notion d'extrémophilie, les propriétés des extrémophiles ainsi que leurs importances et leurs applications biotechnologiques. Le second chapitre se veut plus spécifique et concerne les thermophiles s'intéressant à leur définition et classification, leur écologie, leur isolement et

culture, leur adaptation à la thermophile et enfin leurs application biotechnologiques potentielles. Le chapitre trois est consacré aux halophiles, leur classification et écologie, leur diversité taxonomique et métabolique suivi des mécanismes d'adaptation à l'halophilie ainsi que leur potentiel biotechnologique. Le dernier chapitre regroupe les autres extrêmophiles, notamment les psychrophiles, les alcalophiles et acidophiles et enfin les piezophiles pour ne citer que ceux la.

INTRODUCTION

I. La diversité microbienne

1. Les trois domaines du vivant

Les microorganismes sont largement distribués à travers le globe et font preuve d'une extraordinaire diversité. Pourtant, ces organismes microscopiques furent longtemps ignorés par la plupart des biologistes et sont encore méconnus du grand public.

L'histoire des micro-organismes en biologie commence avec la mise au point du microscope au milieu du 17^{ième} siècle. Malgré le perfectionnement des techniques de microscopie et la multiplication des observations, pendant deux siècles, le statut des micro-organismes resta flou. Jusqu'au 19^{ième} siècle, la vision traditionnelle du vivant était centrée sur les macroorganismes, avec le monde animal d'une part et le monde végétal d'autre part. Leur rôle en tant qu'agents infectieux, est mis en évidence et leur implication au niveau de processus biochimiques est démontrée. Cependant, leur place au sein des êtres vivants reste peu débattue. Louis Pasteur en 1864 réfuta la théorie de la génération spontanée en mettant en évidence l'implication de microorganismes qu'il fut le premier à nommer «bactéries». Haeckel, en 1866, intégra à la classification des organismes, n'appartenant ni au règne animal, ni au règne végétal, ce qui le conduisit à subdiviser le vivant en trois: les plantes, les animaux et les protistes. Ces derniers sont constitués de bactéries, de myxomycètes ainsi que de protozoaires. Puis, dans les années 1930, les bactéries constituèrent à elles seules une quatrième subdivision du vivant selon la proposition de Copeland. Outre le fait qu'un cinquième règne du vivant, les champignons, fut proposé sous la représentation du vivant de Whittaker, les bactéries n'y représentèrent plus un règne mais une subdivision du règne des monères.

Durant la période 1920-1970, le monde vivant a également été scindé en deux: les eucaryotes d'un côté et les procaryotes de l'autre. Cette dichotomie de base, énoncée par Edouard Chatton en 1938, publie « *Le caractère distinctif des bactéries et des algues bleues vient de la nature Procaryote de leur cellule.* ». Pour lui, il existe une dichotomie fondamentale du monde vivant entre organismes possédant des cellules nucléées (animaux, plantes et protistes), et organismes à cellules anucléées (algues bleues-vertes et bactéries), qu'il nomme respectivement Eucaryotes et Procaryotes. La connotation des termes Procaryotes (*pro* = avant ; *caryon* = noyau) et Eucaryotes (*eu* = vrai ; *caryon* = noyau) illustre

l'idée d'une évolution dirigée dans le sens d'une complexification croissante, d'une cellule procaryote, plus simple, vers une cellule eucaryote.

Stanier et Van Niel (1962) reprennent cette définition des procaryotes pour la description du concept «bacterium» sans, toutefois, apporter une dimension évolutive.

D'une part, les critères phénotypiques utilisés jusqu'alors empêchaient toute classification des microorganismes et d'autre part le désir d'avoir une systématique plus compréhensible intégrant les liens évolutifs entre les espèces plaidèrent en faveur du remplacement des critères morphologiques par des critères moléculaires.

Ainsi, Zukerkandl et Pauling comprirent que les informations pouvant retracer l'histoire évolutive des organismes sont contenues au sein des séquences de macromolécules ou «semantides» telles que les polypeptides ou les acides nucléiques. Avec le temps, ils définirent les bases de la phylogénie moléculaire en comparant les séquences de protéines homologues dans le but d'établir des liens phylogénétiques.

Pour sa part, Carl R. Woese s'intéressa tout d'abord au code génétique et à son origine universelle. Il consacra son travail à l'analyse des séquences d'ARN ribosomiques (noté par la suite ARNr). Carl R. Woese opta pour les séquences d'ARNr 16S et 18S qui permettaient une évaluation évolutive plus précise du fait qu'elles soient hautement conservées, mais également pour leur grande taille et donc de leur plus grande contenance en informations.

Ainsi, la comparaison de ces séquences issues de différents organismes vivants montre des positions identiques ou variables. C'est sur cette base que Carl R. Woese et George E. Fox ont alors proposé une nouvelle organisation phylogénétique du monde vivant. Celui-ci doit être divisé en trois règnes primaires : *Eubacteria* (les bactéries), *Archaeobacteria* (les «bactéries méthanogènes») et *Urkarya* (les cellules eucaryotes) (Figure 1). Le choix du terme «Archaeobacteria» laissait sous-entendre une relation directe avec leurs niches écologiques, des environnements supposés avoir existé il y a 3,5 à 4 milliards d'années mais également une ancienneté des représentants de ce règne par rapport à ceux du règne *Eubacteria*.

Finalement, cette dénomination poussait à assimiler les archaebactéries aux ancêtres des bactéries classiques. Pour remédier à ce problème, Woese et ses collaborateurs proposèrent d'une part de modifier l'appellation «règne» en «domaine du vivant» et de renommer les trois règnes primaires *Eubacteria*, *Archaeobacteria* et *Urkarya* en *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* respectivement. En 1990, le domaine des *Archaea* est alors composé des *Euryarchaeota*, comprenant entre autres les méthanogènes et les halophiles, et des *Crenarchaeota* regroupant les thermoacidophiles soufre dépendants.

Les concepts développés par Carl R. Woese ont contribué à l'essor de la microbiologie environnementale.

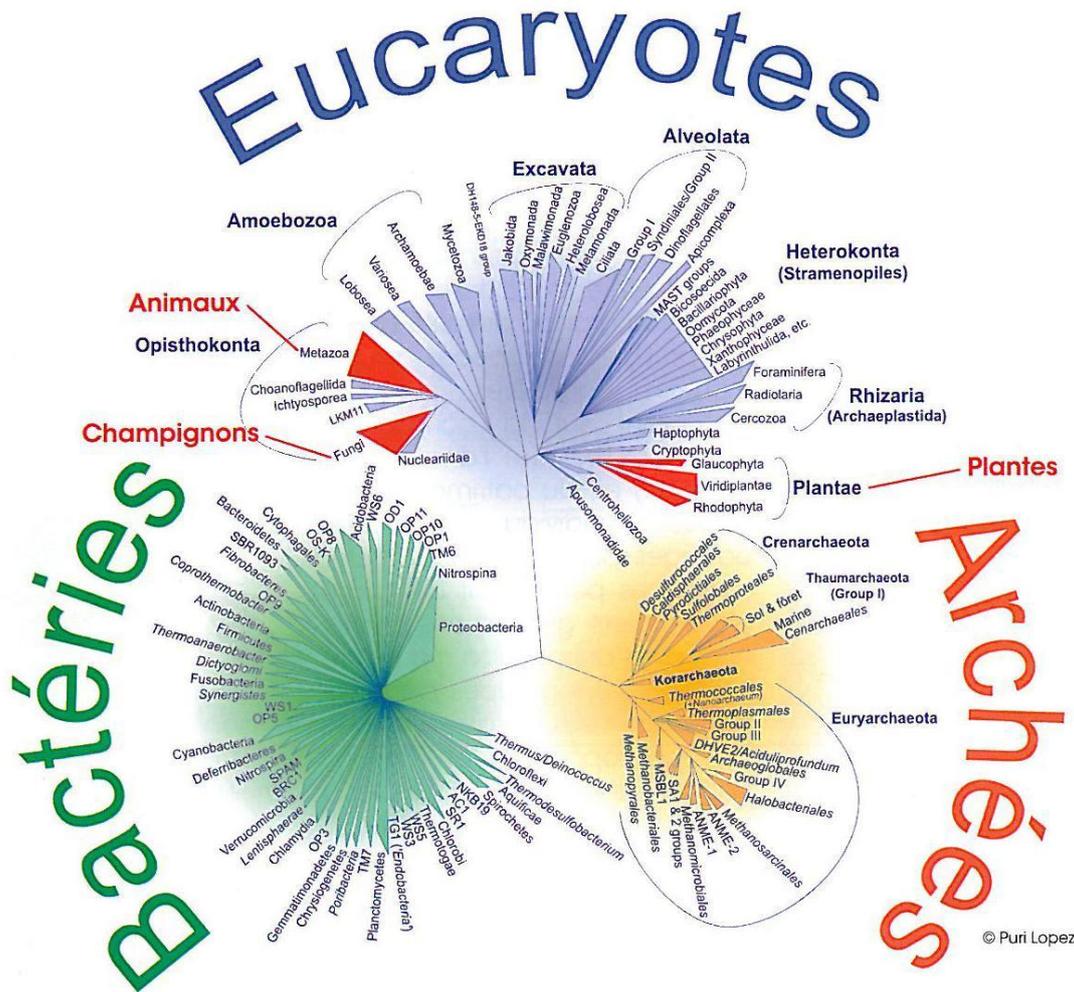


Figure 1 : Représentation de la diversité des trois domaines du vivant.

Modifié d'après López-García et Moreira 2008. Les triangles en vert représentent les phylums, division ou groupes où au moins un des membres est cultivé et décrit ; les triangles en rouge représentent les divisions candidates où aucune espèces n'est cultivée.

1. 1. Le domaine Bacteria

Les bactéries sont des organismes généralement unicellulaires dont la taille est de l'ordre du micromètre (0,5 à 10 µm). Ce sont des organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais un ADN chromosomique circulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra-chromosomique, appelée plasmide. Elles sont entourées d'une paroi complexe et possèdent parfois des flagelles (Figure 2). Elles peuvent vivre en solitaire, en petits groupes ou en grands agrégats (dans ce dernier

cas, il arrive même d'observer une spécialisation des cellules). Les cellules bactériennes prennent différentes formes (Figure 3), les plus courantes étant la sphère (cocci), le bâtonnet (bacille) ou la spirale (spirille). La paroi externe de la membrane plasmique est spécifique des bactéries.

Toutefois, deux sous-catégories de membranes ont été observées: les bactéries Gram-positif, et les bactéries Gram négatif. Parmi les nombreuses sous-catégories phylogénétiques communément admises, les Aquifex, les Thermotoga, les bactéries vertes non sulfureuses, les flavobactéries, les cyanobactéries et les protéobactéries sont citées.

Procaryotes et eucaryotes ont besoin d'énergie et d'une source de carbone, mais la diversité des métabolismes énergétiques et du carbone est globalement bien plus importante chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Pour les chimiotrophes, l'énergie est d'origine chimique, alors que pour les phototrophes, elle est d'origine lumineuse. Les autotrophes utilisent le CO₂ comme source de carbone, alors que les hétérotrophes ont besoin d'une source organique de carbone. Quatre grands groupes nutritionnels de bactéries sont alors distinguables : les photoautotrophes, les photohétérotrophes, les chimioautotrophes et les chimiohétérotrophes. Parmi les chimiotrophes, on peut aussi distinguer ceux oxydant les minéraux, les lithotrophes, et ceux oxydant la matière organique, les organotrophes. Les réactions d'oxydo-réduction des chimiotrophes, c'est à dire la respiration, peut se faire avec l'oxygène, respiration aérobie (facultative ou stricte), mais aussi sans et avec d'autres molécules inorganiques ou organiques. Cette respiration dite anaérobie peut être également facultative ou stricte. Même si la diversité de formes des procaryotes est limitée, leur grande diversité métabolique leur permet d'être présents et de coloniser quasiment tous les écosystèmes de notre planète.

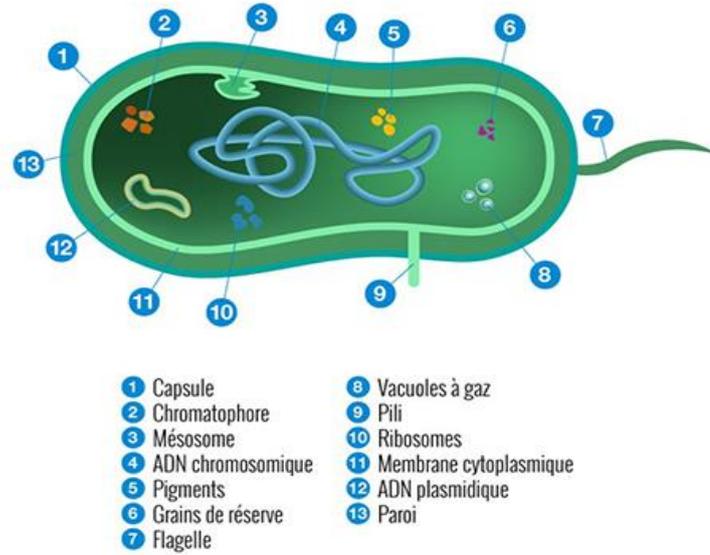


Figure 2 : Morphologie de la cellule bactérienne

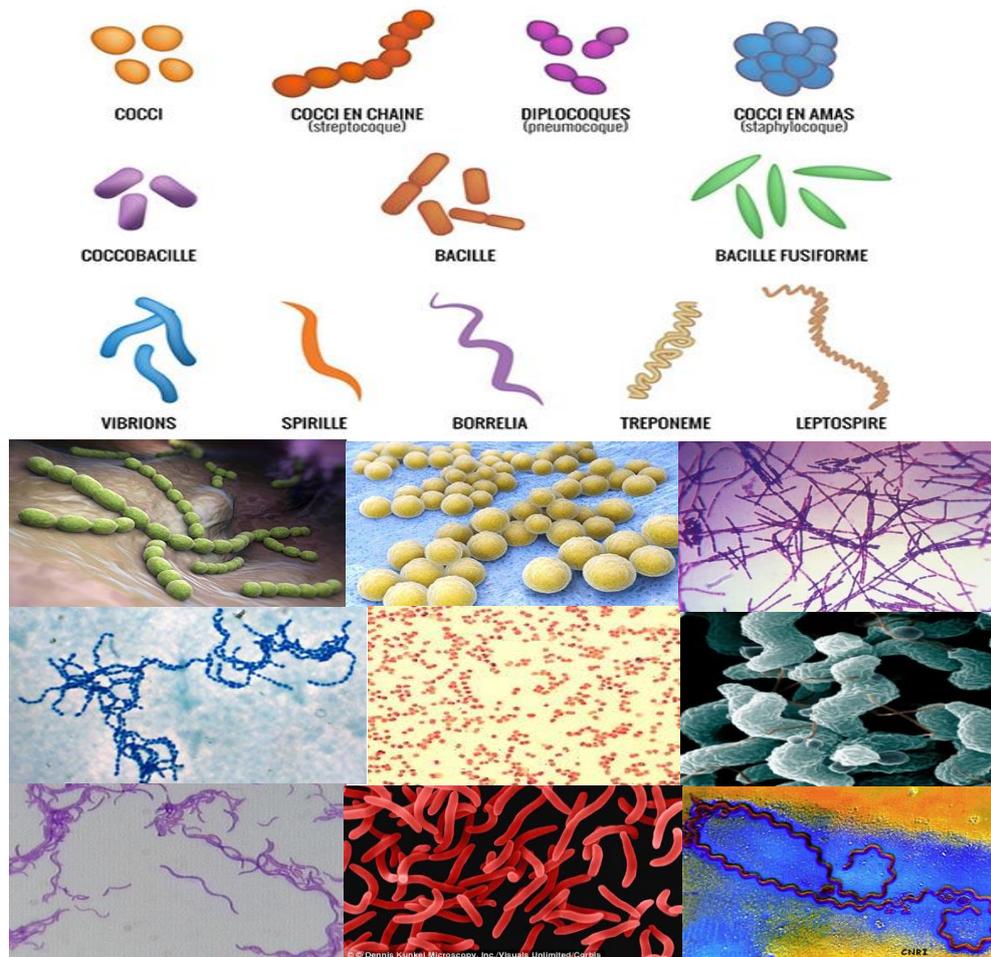


Figure 3 : Représentation des principales morphologies décrites chez les procaryotes

1.2. Le domaine *Archaea*

La séparation des procaryotes en deux groupes est due principalement aux travaux de Woese. Bien que les archéobactéries soient des procaryotes (comme les bactéries), elles ont des points communs avec les eucaryotes au niveau de certaines protéines et de l'ARNr. Malgré cela, leur membrane plasmique présente des différences fondamentales avec les autres domaines du vivant.

Les *Archaea* sont très diverses, tant dans leur morphologie (Figure 3) que dans leur physiologie. Elles peuvent être sphériques, en forme de tige, en spirale, plates ou irrégulièrement formées ; Elles peuvent exister comme des cellules isolées, en agrégats ou former des filaments ; elles se multiplient par fission binaire, bourgeonnement, fragmentation, ou d'autres mécanismes.

Les *Archaea* peuvent être aérobies, facultativement anaérobies, ou strictement anaérobies et nutritionnellement, elles s'étendent de chimiolithoautotrophes à organotrophes. Certaines sont mésophiles tandis que d'autres sont hyperthermophiles et peuvent se développer à des températures dépassant les 100°C.

Les *Archaea* peuvent être à Gram positif ou négatif, mais la structure de leur paroi cellulaire diffère significativement de celle des bactéries. La paroi cellulaire de beaucoup d'*Archaea* à Gram positif est constituée d'une seule couche homogène, alors que chez les bactéries une couche de peptidoglycane est séparée de la membrane plasmique par l'espace périplasmique. Chez les *Archaea* à Gram négatif, la membrane externe et le complexe peptidoglycane, caractéristique des bactéries à Gram négatif ne sont pas présents.

La paroi cellulaire des *Archaea* se distingue aussi par sa chimie. Chez certaines espèces, la paroi est composée de pseudo-peptidoglycane : il manque l'acide muramique, remplacé par de la pseudomuréine et les résidus de D-alanine remplacent les L-alanine. Cette composition particulière leur confère la résistance aux lysozymes et aux antibiotiques Beta-lactamines. Chez d'autres espèces la paroi cellulaire est entièrement composée de protéines et est appelée réseau paracristallin ou S-layer. Les lipides de la membrane cellulaire, sont des hydrates de carbone ramifiés attachés au glycérol par des liaisons éther à la différence de la chaîne droite des acides gras attachés au glycérol par des liaisons ester chez les *Bacteria* et *Eucarya*. Les lipides sont souvent polaires comme les phospholipides, les sulfolipides ou les glucolipides. Chez les thermophiles extrêmes, des structures de type tétra-éther en monocouche confèrent la résistance aux températures élevées.

L'ADN des *Archaeae* est organisé en un seul chromosome circulaire comme chez les *Bacteria*, mais comporte des gènes en mosaïque similaires à ceux des *Eucarya*. Très peu de

plasmides sont retrouvés chez les *Archaea*. Les ARN polymérase des *Archaea*, par contre, sont beaucoup plus complexes, que les ARN polymérase des bactéries et proches de celles des eucaryotes.

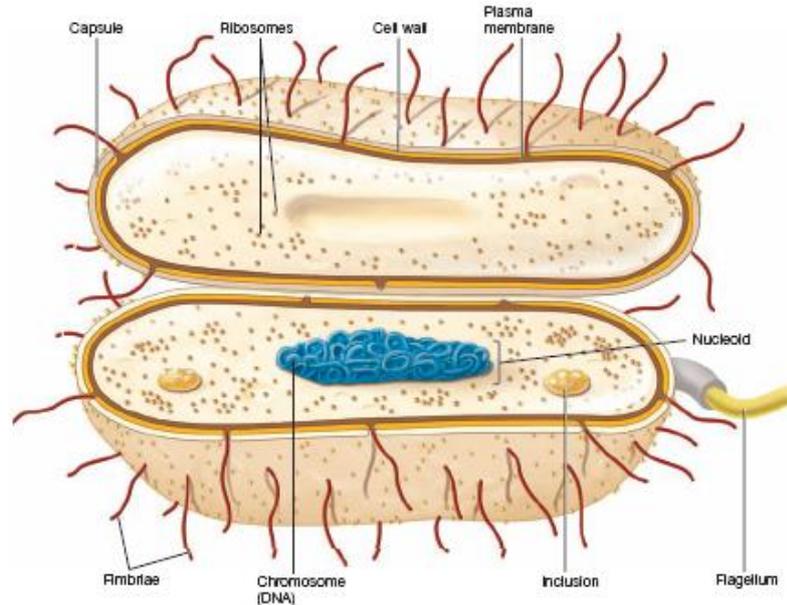


Figure 4 : Structure et morphologie d'une *Archaea*

La première archée de type halophile fut découverte en 1880 et des méthanogènes furent isolées dans les années 30. Aujourd'hui, plus de 300 souches ont été identifiées et plus d'une centaine de génomes sont séquencés, assemblés, annotés et disponibles publiquement dans la banque de données Genbank hébergée sur le site NCBI. La taille des génomes est variable ; le plus petit possède 490 kb pour environ 590 ORF (*Nanoarchaeum equitans*) à l'un des plus grands à 5,75 Mb pour environ 4700 ORF (*Methanosarcina acetivorans*). Les systèmes moléculaires des archées et des eucaryotes partagent diverses caractéristiques ce qui permet d'élucider certains mécanismes moléculaires eucaryotes. En effet les systèmes d'archées sont souvent utilisés et étudiés comme modèles moléculaires simplifiés.

Les archéobactéries vivent en général dans des milieux extrêmes (fonds océaniques, sources volcaniques, fortes ou faibles températures, stations d'épurations, ou encore dans l'intestin grêle). Elles peuvent être séparées en 6 catégories selon leurs biotopes :

- les méthanogènes thermophiles (températures de 60 à 80°)
- les hyperthermophiles (températures extrêmement hautes: plus de 100°, jusqu'à 130°)
- les psychrophiles (températures très basses: proche de 0°)
- les halophiles (environnements fortement salins)

- les thermoacidophiles (milieux chauds et très acides)
- les alcaliphiles (environnements basiques)

Mais dans la taxonomie, les 4 groupes phylogénétiques les plus retenus sont: les euryarchaeotes, les crenarchaeotes, les korarchaeotes et les nanoarchaea.

1.3. Le domaine Eucarya

Contrairement aux procaryotes, les eucaryotes possèdent un noyau. Il s'agit d'une paroi cellulaire qui isole le matériel génétique du cytoplasme. Les organismes eucaryotes peuvent être unicellulaires ou multicellulaires. Les cellules mesurent entre 10 et 100 μm . Ils ont des formes beaucoup plus diverses que les procaryotes (Figure 4).

L'énergie des cellules est produite par photosynthèse (par l'intermédiaire des chloroplastes) ou par respiration (mitochondries).

Les eucaryotes se divisent en quatre groupes phylogénétiques: Les végétaux, les animaux (métazoaires), les mycètes (champignons) et les protistes.

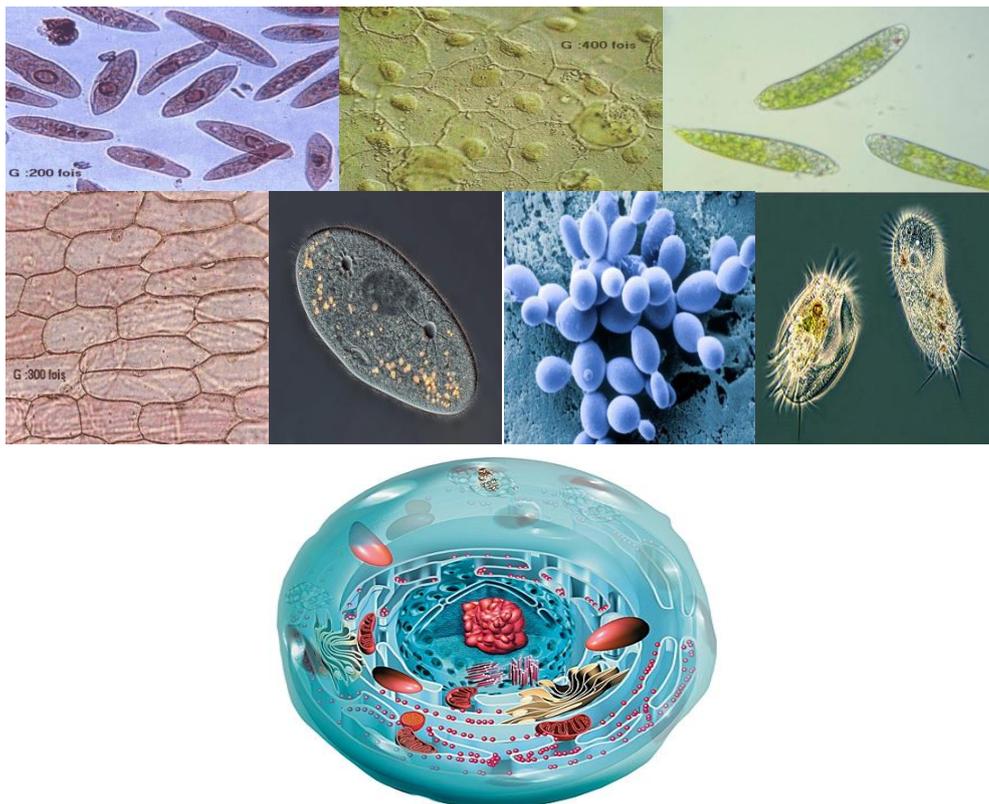


Figure 5 : Représentation d'une partie des eucaryotes unicellulaires, illustrant leur diversité morphologique.

II. Last Universal Common Ancestor (LUCA)

Les travaux de Woese ont confirmé que tous les êtres vivants actuels descendent d'un organisme unique couramment désigné dans la communauté scientifique par l'acronyme

LUCA (*Last Universal Common Ancestor*). Plusieurs hypothèses existent quant à l'organisation de l'arbre du vivant autour de LUCA, il s'agissait probablement d'un procaryote vivant à proximité des sources volcaniques au fond des océans. Ce surnom fut proposé lors d'un congrès, organisé par Patrick Forterre, qui s'est déroulé en 1996 à la fondation des Treilles (France). LUCA, dont l'existence est largement admise dans la communauté scientifique, occupe une place centrale dans l'évolution car c'est à partir de lui que se sont séparées les lignées menant aux trois domaines (Figure 1).

Chapitre I

Notions d'environnements extrêmes et d'extrémophilie

I. Notion d'extrémophiles

1. La diversité écologique

La Terre possède un grand nombre d'écosystèmes très divers alliant plusieurs paramètres physico-chimiques dont certains sont extrêmes.

Les sources chaudes, dont les exemples les plus connus sont celles du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis ainsi que les solfatares en Italie ou en Islande, combinent hautes températures et milieux très acides. Aussi, les lacs fermés, comme c'est le cas de la mer Morte, en plus d'un fort ensoleillement, sont connus pour leurs fortes concentrations en sels. Sous la surface des océans, il est possible de trouver des sources froides au niveau du plateau continental, ou des cheminées hydrothermales caractérisées par de très hautes chaleurs associées directement aux hautes pressions au niveau des dorsales océaniques (Figure I.1).

L'étude de la biodiversité de ces environnements extrêmes a permis de mettre en évidence la présence d'organismes appartenant aux trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*).

Le terme « extrémophiles » a été proposé pour la première fois, en 1974, par Mac Elroy, dans un article intitulé '*Some comments on the evolution of extremophiles*' paru dans la revue Bioscience, il a été interprété de plusieurs façons pour enfin être associé aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement de la vie.

Un extrémophile est un organisme vivant dans un milieu extrême. Qu'entend-on par milieu extrême ? Les réponses ont varié selon les époques. En effet, il s'agit tout d'abord de milieux hostiles à l'homme et où toute vie humaine paraissait impossible. Cette conception a laissé place à une approche basée sur l'observation des formes de vie macroscopiques. Puis, l'inventaire de ces formes de vie au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle a permis la découverte de micro-organismes vivant dans des milieux auparavant considérés comme stériles : sources thermales, hydrothermales, lacs acides, alcalins, hypersalés, sédiments marins profonds, réservoirs pétroliers, glaciers, etc. Ces découvertes ont progressivement reculé les limites physiques et chimiques connues de la vie sur Terre. Ainsi, le caractère

extrême peut varier: thermophilie (haute température), piezophilie (haute pression), acidophilie (pH acide), halophilie (forte salinité), alcaliphilie (pH alcalin) et les microorganismes extrémophiles sont classés en fonction des environnements extrêmes dans lesquels ils se développent (Tableaux 1 et 2). Parfois, on parle même de polyextrémophiles car certaines espèces peuvent endurer comme l'espèce *Sulfolobus acidocaldarius* une température élevée ($T^{\circ}\text{opt} = 85^{\circ}\text{C}$) et un pH très acide (pH 3).

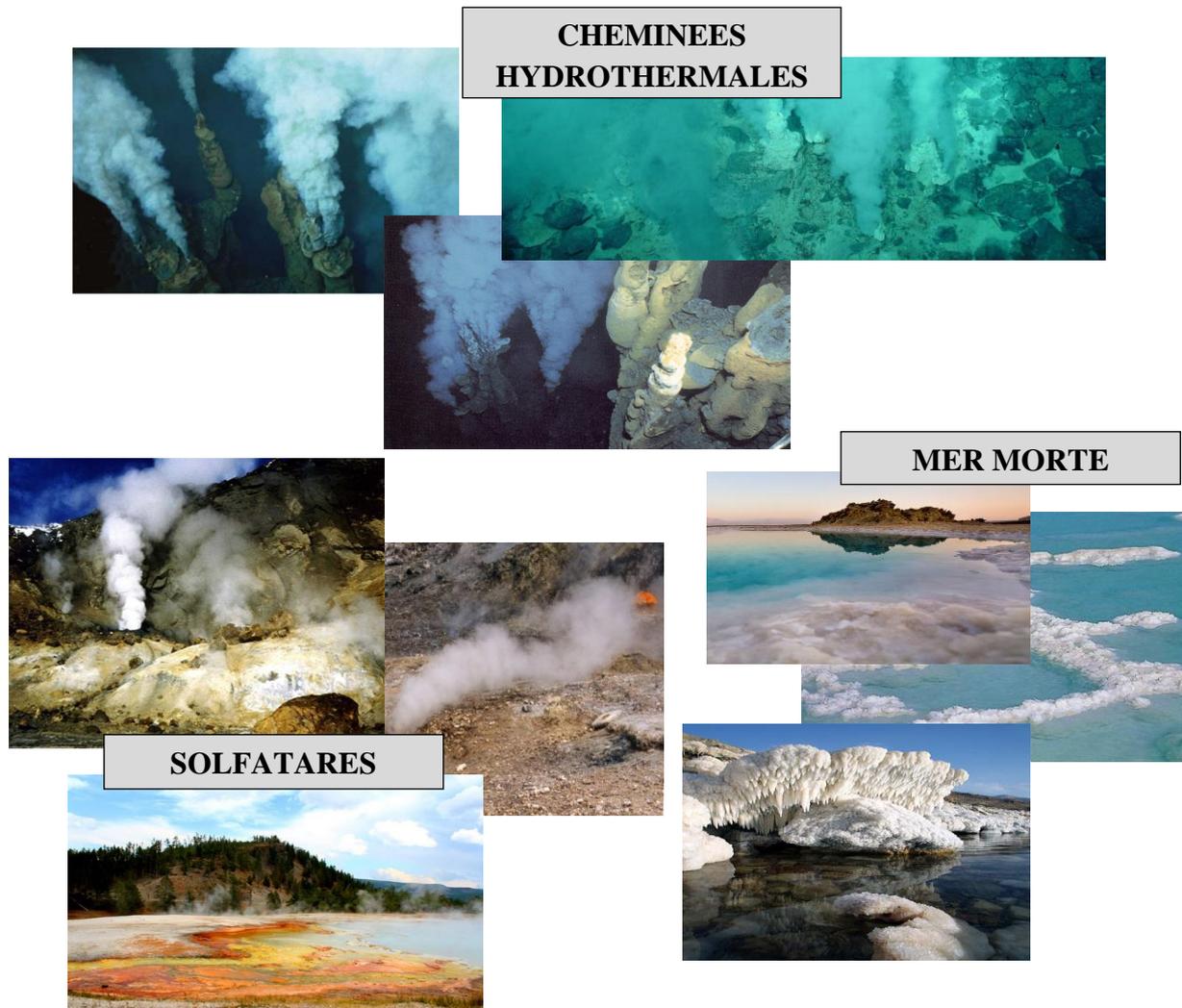


Figure I. 1 : Exemples de biotopes extrêmes

Les solfatares retrouvés en Italie, Russie, Islande ou encore Mexique sont des lieux où le pH y est acide et les températures élevées. La mer Morte est un des biotopes où la concentration en sel est très élevée et le pH est alcalin. Les radiations UV sont très importantes du fait de la faible profondeur de la colonne d'eau. Les cheminées hydrothermales localisées au niveau des dorsales des fonds marins sont caractérisées par des températures très élevées mais aussi par de fortes pressions. Des microorganismes aérobies peuvent se développer aussi bien dans les solfatares que dans la mer morte alors que les microorganismes anaérobies sont isolés au niveau des cheminées hydrothermales par exemple.

Tableau I. 1 : Microorganismes extrémophiles et leurs environnements (Adapté de Horikoshi and Bull (2011)).

| Microorganismes extrémophiles | Environnement favorable à la croissance |
|------------------------------------|---|
| Acidophile | pH optimum de croissance < 3 |
| Alcaliphile | pH optimum de croissance > 10 |
| Halophile | Nécessite au moins 1M de sel pour la croissance |
| Hyperthermophile | Croissance optimale à des températures > 80 °C |
| Thermophile | Croissance à des températures entre 60 °C et 85 °C |
| Eurypsychrophile (psychrotolérant) | Croissance à des températures > 25 °C, mais également < 15 °C |
| Stenopsychrophile (psychrophile) | Croissance à des températures entre 10 °C et 20 °C |
| Piezophile | Croissance sous haute pression → 400 atm (40 MPa) |
| Endolithique | Croissance à l'intérieur des roches |
| Hipolithe | Croissance sur les roches et les déserts froids |
| Oligotrophe | Capable de croître dans des environnements faibles en nutriments |
| Radiorésistant | Tolérance à de fortes doses de radiations |
| Metallotolérant | Tolérance aux fortes concentrations de métaux lourds |
| Toxitolérant | Tolérance aux fortes concentrations d'agents toxiques (solvants organiques) |
| Xerophile | Croissance en présence d'une faible disponibilité d'eau, résistance à la dessiccation |

Tableau I. 2 : Quelques exemples d'extrémophiles appartenant au domaine *Archaea*.

| Caractère extrémophile | Organisme | Paramètre | Référence |
|------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Halophile | <i>Haloarcula marismortui</i> | [NaCl]= 3,9 M | Oren et al. (1990) |
| Psychrophile | <i>Methanococcoides burtonii</i> | T= -2,5 °C | Franzmann et al.(1992) |
| Acidophile | <i>Picrophilus torridus</i> | pH= 0,6 | Shleper et al. (1995) |
| Hyperthermophile | <i>Pyrolobus fumarii</i> | T _{max} = 113°C | Bloch et al. (1997) |
| Alcalophile | <i>Thermococcus acidamonivorans</i> | pH=9 | Dirmeier et al. (1998) |
| Radioactivité | <i>Thermococcus gammatolerans</i> | 500 Gy | Jolivet et al. (2003) |
| Piezophile | <i>Pyrococcus yayanisii</i> | P _{max} = 120M Pa | Zeng et al. (2009) |

La notion d'extrémophilie est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules se développent et fonctionnent de manière optimale dans ces conditions.

Le concept d'extrémophile est apparu suite aux travaux de microbiologistes pionniers en découvrant de nouvelles espèces de microorganismes dans des milieux considérés jusque-là comme stériles. Brock qui, à la fin des années soixante, découvrit les premières espèces se développant à des températures de l'ordre de 70°C dans des sources thermales du parc de Yellowstone aux États-Unis. En 1969, il isola *Thermus aquaticus* qui sera à la base de la découverte des ADN polymérase thermostables. À la même période, Horikoshi, au Japon, mettait en évidence l'existence de microorganismes ne se développant qu'à des pH alcalins. Puis les microbiologistes allemands Zillig et Stetter allaient donner une impulsion déterminante en explorant systématiquement les milieux extrêmes de la planète et la mise en évidence d'espèces ayant un optimum de croissance supérieur à 100°C. *Pyrolobus fumarii* est capable de survivre à 121°C, température à laquelle sont effectuées les opérations de stérilisation courantes en laboratoire et dans l'industrie. De 1980 à 2000, le laboratoire de Stetter isola plus de 50 nouvelles espèces appartenant à de nouveaux genres bactériens : *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Aquifex*, *Thermocrinis*, et de nouveaux genre d'archées *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus*, *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Thermofilum*, *Desulfurococcus*, *Staphylothermus*, *Thermosphaera*, *Ignicoccus*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Archaeoglobus*, *Ferroglobus*, *Methanothermus*, *Methanopyrus*, *Nanoarchaeum* et *Korarchaeum*. De ces travaux et de ceux consacrés à d'autres types d'environnements émergea le concept d'extrémophile.

Chaque espèce vit sous l'influence de paramètres biotiques (proies, prédateurs) et abiotiques (température, pH, concentration en sels, pression...). Pour chaque espèce et chacun de ces paramètres, il est possible de définir une valeur minimale et une valeur maximale entre lesquelles elle accomplit son cycle vital, et également une valeur optimale.

Chaque organisme vivant possède des bornes physico-chimiques bien particulières qu'il lui est impossible de franchir. Certaines de ces bornes atteignent des valeurs extrêmes.

Cependant, l'extrémophilie revêt des caractéristiques très différentes selon le paramètre ou l'organisme considéré. L'arbre phylogénétique montrant les organismes de différents genres et leurs caractéristiques extrémophiles est présenté en Figure I. 2 ci-après.

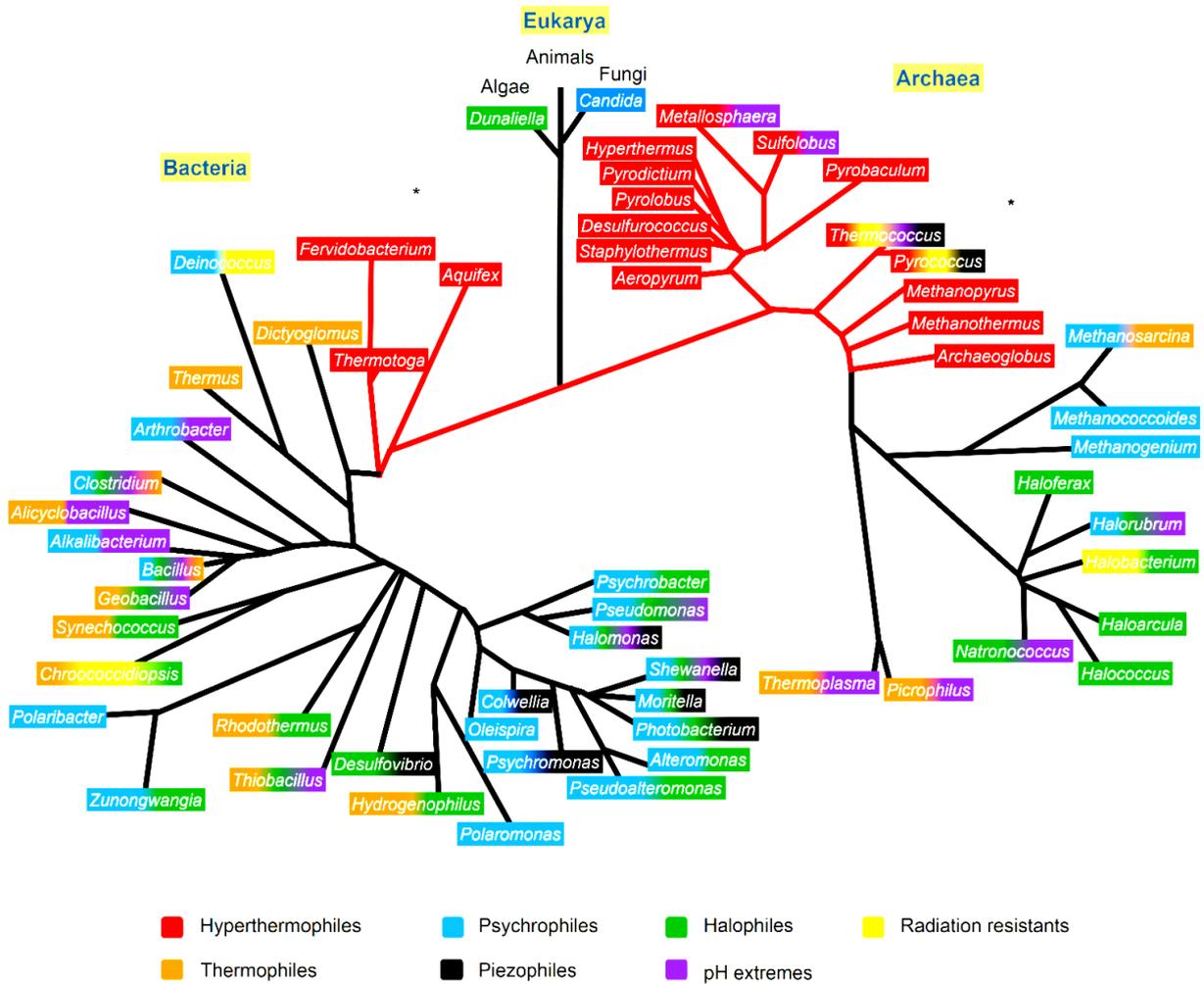


Figure I. 2 : Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifiée par un code de couleur. L'arbre phylogénétique était basé sur les travaux de Woese et al. (1990), Dereeper et al. (2008) et Lang et al. (2013).

L'existence de la vie dans les écosystèmes extrêmes a conduit à s'interroger sur les stratégies et les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques mis en jeu par ces microorganismes atypiques pour se maintenir dans de tels milieux.

2. Biodiversité des extrêmophiles

La biodiversité microbienne en milieu extrême varie de manière considérable selon le niveau d'extrémophilie et aussi en fonction des sources d'énergie et des donneurs et accepteurs d'électrons disponibles. Elle est nulle dans les fluides hydrothermaux dont les températures dépassent fréquemment 200° C. Elle peut être réduite à une seule espèce de bactérie (*Candidatus desulfurudisaxviator*) comme dans le cas des eaux souterraines

acides de drainage d'une mine d'or par 2,8 km de profondeur. Elle est faible dans de nombreuses niches écologiques extrêmes, comme les cheminées hydrothermales. Mais elle peut aussi être très élevée pour certaines sources hydrothermales profondes lorsque les sources d'énergie sont abondantes.

Grâce au développement des technologies d'exploration profonde, les scientifiques en apprennent un peu plus tous les jours sur les profondeurs océaniques. En effet, la profondeur moyenne de l'océan Atlantique est aux alentours de 3300 mètres. Dans le Pacifique, des scientifiques ont effectué des prélèvements jusqu'à 11 000 mètres de profondeur au site le plus profond connu, *Challenger Deep*, dans la fosse des Mariannes.

Pendant longtemps il était commun de parler de désert abyssal, aujourd'hui il est admis que la vie se développe dans des écosystèmes profonds tels que les sources hydrothermales, les zones d'émission de fluides froids. Si l'on prend l'exemple des écosystèmes hydrothermaux sous-marins, de grands vers accompagnés de bivalves et de crevettes colonisent les parois de cheminées hydrothermales (Figure I. 3) et cela malgré l'absence de lumière. Le fluide hydrothermal peut atteindre les 400°C et est chargé en métaux et minéraux (lithium, potassium, calcium, fer, cuivre, manganèse, zinc, ...) à la sortie des cheminées. La précipitation de ces composés au contact de l'eau froide et oxygénée forme les structures des cheminées qui varient suivant la nature des sites hydrothermaux. À travers ces composés chimiques, c'est une véritable source d'énergie qui est à la disposition des organismes capables de chimiosynthèse qui deviennent à leur tour la base de la chaîne alimentaire.

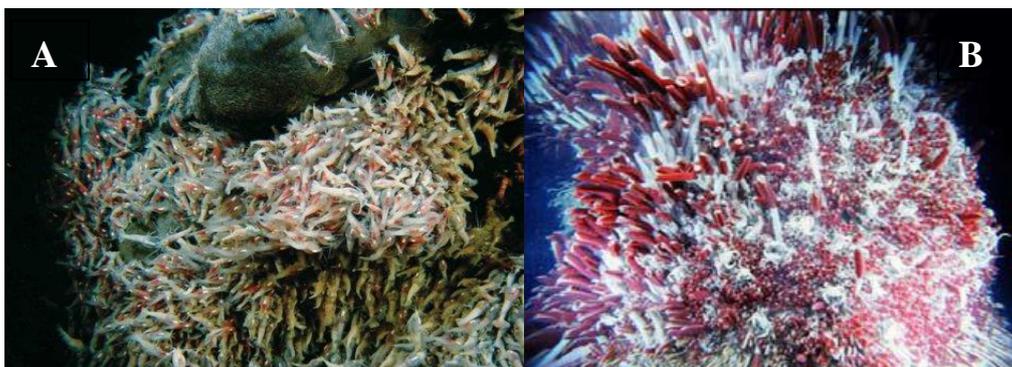


Figure I. 3 : La vie à proximité d'une cheminée hydrothermale profonde, des colonies de crevettes *Rimicaris exoculata* (A), et des vers *Riftia pachyptila* (B). (Ifremer).

Les souches extrémophiles isolées par des méthodes culturales depuis un bon nombre d'années se comptent par milliers, généralement stockées dans les laboratoires de recherche ayant réalisé les travaux. La diffusion de ces souches est généralement libre pour les activités de recherche, mais contrôlées pour des applications biotechnologiques. En revanche, les nouvelles espèces isolées, caractérisées, décrites et validées par l'International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) se limitent à quelques centaines. Ces souches sont déposées dans les collections internationales de micro-organismes (CIP, DSMZ, ATCC, JCC) et accessibles sur commande. Elles sont réparties entre les domaines *Archaea* et *Bacteria* et présentent des métabolismes extrêmement divers reflétant les conditions physico-chimiques locales. Certains représentants d'archées sont constitués exclusivement d'extrémophiles, à l'instar des *Thermococcales* ou des *Archaeoglobales* qui sont des hyperthermophiles anaérobies isolées de sources thermales et hydrothermales. D'autres familles d'archées comme les *Methanococcales* comportent des espèces réparties sur l'ensemble de la gamme de température, des psychrophiles, des mésophiles jusqu'aux hyperthermophiles. Au sein du domaine *Bacteria*, la même situation contrastée existe. À titre d'exemple, l'ordre des *Thermotogales* ne comporte que des espèces thermophiles souvent isolées à partir des sources hydrothermales mais aussi des réservoirs pétroliers. À l'inverse, le genre *Bacillus*, qui comporte 228 espèces décrites à ce jour, présente une majorité de non-extrémophiles. Toutefois, la minorité de *Bacillus* extrémophiles possède des propriétés très intéressantes. A titre d'exemples :

- *B. stearothermophilus* est une thermophile décrite en 1920 ;
- *B. halodurans* est une alcaliphile, capable de se diviser entre pH 7 et pH 11, très utilisée en l'industrie ;
- *B. stratospherus*, isolée à partir d'échantillons prélevés à 41 km d'altitude, est une alcaliphile résistante aux UV, dont les spores supportent les conditions de la stratosphère ;
- *B. arseniciselenatis* est une halo-alcalophile capable de réduire l'arsenate.

Cette diversité souligne aussi la plasticité de certains groupes microbiens. Les archées et les bactéries, ainsi que les virus qui les accompagnent, ont évolué pendant 3,5 milliards d'années, se sont diversifiées pour coloniser pratiquement tous les milieux de la planète. De ce fait, un très grand nombre de voies métaboliques ont été sélectionnées au cours de l'évolution, dont une grande partie subsiste chez les microorganismes actuels. Les enzymes impliquées dans ces voies métaboliques ainsi que les produits qui en sont dérivés sont susceptibles de présenter un intérêt en biotechnologie.

En regard des besoins de l'industrie, la nature offre, au travers des espèces isolées, un panel d'enzymes, de polymères et de métabolites secondaires qui commencent à peine à être exploré.

II. Propriétés des extrémophiles

Le concept d'extrémophilie implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adaptée aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions. Les cellules sont capables de contrôler jusqu'à un certain point les conditions intracellulaires pour certains paramètres comme l'osmolarité. De ce fait, le pH intracellulaire des souches alcaliphiles sera inférieur à celui du milieu extérieur et inversement pour les espèces acidophiles. En revanche, pour certains paramètres, comme la température et la pression, les conditions du milieu extérieur s'imposent aux cellules dans leur globalité. Ces constituants cellulaires devront être stables dans ces conditions, mais surtout, fonctionnels.

La stabilité de chacune des biomolécules prise isolément et testée dans les conditions du milieu extérieur n'est toutefois pas toujours requise, du fait que le milieu intérieur peut bénéficier de l'effet de certains solutés organiques ou d'une protection au sein de complexes macromoléculaires.

L'une des premières questions qui se pose pour les hyperthermophiles est celle de la stabilité de leur matériel génétique. Comment est préservée l'intégralité du message génétique stockée dans le chromosome et comment peuvent s'opérer la transcription et la traduction au-dessus de 100-110°C ?

Afin de répondre à ces innombrables questions, nombreux sont les travaux et publications à ce sujet (Voir chapitre II).

Dans les biotopes extrêmes tels que les sols salins, les marais salants et les lacs salins ou sodiques, la disponibilité de l'eau figure parmi les paramètres les plus importants. Les fluctuations climatiques fréquentes (sécheresse ou pluie) entraînent des changements dans la disponibilité de l'eau et causent un stress osmotique aux organismes vivant dans ces environnements.

Une pression osmotique accrue peut provoquer une déshydratation cellulaire et diminuer la viabilité. La capacité à s'adapter au stress osmotique est donc d'une importance capitale pour les organismes vivants.

Les procaryotes et les eucaryotes possèdent des mécanismes d'adaptation aux changements brusques de l'environnement. La réponse cellulaire visant à maintenir leur volume, leur turgescence et leur activité biologique normale est appelée régulation osmotique.

La recherche sur l'osmoadaptation chez les haloalcaliphiles est à la fois d'intérêt théorique et pratique. La première implique l'étude des caractéristiques spécifiques des mécanismes d'osmoadaptation de ces organismes comparés aux halophiles neutrophiles. La seconde implique les perspectives de l'application pratique des composés osmorégulateurs. (Voir chapitres III et IV)

III. Importance et applications biotechnologique des extrémophiles

1. Exploitation de l'adaptation extrémophile

L'importance des extrémophiles n'est plus à démontrer non seulement en raison de ce qu'ils peuvent nous enseigner sur la recherche fondamentale de la biodiversité biochimique et structurale mais aussi en raison de leur énorme potentiel en tant que sources d'enzymes et d'autres molécules dotées d'applications en biotechnologie et en médecine humaine et vétérinaire. Leurs propriétés uniques en font des cibles clés pour l'exploitation par les industries biotechnologiques de par le monde.

Les travaux de recherche axés sur ces organismes sont pour une grande part motivés par les applications biotechnologiques déjà acquises et par celles susceptibles de reposer sur des biomolécules aux propriétés nouvelles pouvant déboucher sur le développement de nouveaux produits.

1.1. Utilisation des cellules entières

Il s'agit d'applications pour lesquelles l'utilisation de biomolécules purifiées à partir des cultures est non rentable ou d'applications qui requièrent l'action directe d'une population microbienne, voire d'un mélange complexe de différentes espèces. C'est le cas en particulier pour les applications liées à la bioremédiation (ensemble de procédés visant à la restauration d'un écosystème grâce à la stimulation des populations microbiennes indigènes ou à l'apport de populations adaptées) et à la biolixiviation (ou procédé dans lequel les microorganismes sont utilisés pour le traitement des minerais).

Les microorganismes sont capables de réduire, oxyder, séquestrer, volatiliser ou dégrader les polluants. L'exploitation de leurs capacités métaboliques permet d'envisager leur utilisation dans des procédés efficaces et peu coûteux de bioremédiation des eaux ou sols contaminés, notamment par des métaux traces ou des radionucléides toxiques.

Il existe différents types d'interactions entre bactéries et métal. Sous le terme de biotransformation, on retrouvera des mécanismes de modification de la forme chimique du métal (ou spéciation du métal), soit par oxydation ou réduction, soit par substitution des

ligands du métal (agents complexants), soit, comme dans le cas du mercure, par changement de phase (volatilisation).

1.1.1. Réduction des métaux toxiques

l'exemple de l'uranium

Pour une grande majorité de métaux, la forme réduite est beaucoup moins soluble que la forme oxydée. C'est le cas en particulier de l'uranium, le technétium, le plutonium et le chrome. Les réactions de réduction des oxydes métalliques sont ainsi très étudiées pour envisager la maîtrise de la dispersion des métaux toxiques dans l'environnement. Dans le cas de l'uranium, la forme soluble retrouvée dans les sols, l'uranyle UO_2^{2+} (U(VI)), est réduite en UO_2 (U(IV)) qui peut précipiter sous une forme minérale, l'uraninite.

Plusieurs dizaines d'espèces réductrices d'uranium sont aujourd'hui connues qui présentent une grande diversité phylogénétique. Parmi celles-ci, on retrouve *Desulfovibrio desulfuricans*, *Geobacter metallireducens* et *sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis*.

La grande majorité des études disponibles concerne la réduction de l'uranium en anaérobiose. Ce processus a été décrit pour la première fois il y a une quinzaine d'année. Certaines espèces comme *G. metallireducens*, *G. sulfurreducens* et *S. oneidensis* sont capables de coupler cette réduction à la production d'énergie. On parle alors de réduction dissimilatrice.

Ce sont des enzymes de la chaîne respiratoire, les cytochromes c, qui interviennent dans la réaction. Chez la bactérie sulfatoréductrice *D. desulfuricans*, la réduction de l'uranium implique un transfert d'électrons depuis un cytochrome de type-c3 vers une hydrogénase, qui n'est pas productrice d'énergie.

Ces mécanismes qui ont lieu à la surface des cellules sont intéressants mais les formes de l'uranium sont susceptibles, d'être rapidement réoxydées en présence de faibles concentrations d'oxygène dans les sols. C'est pourquoi des mécanismes de réduction intracytoplasmiques, qui permettraient d'obtenir des formes plus stables d'uranium réduit, sont également recherchés.

1.1.2. Oxydation et biolixiviation

À l'inverse de la réduction, l'oxydation des sulfures métalliques peut être intéressante pour extraire les toxiques métalliques par remise en solution. Il s'agit de la biolixiviation. Cette approche est utilisée pour traiter des eaux acides de drainage de mines. Les bactéries peuvent être utilisées de façon directe ou indirecte pour réaliser la biosolubilisation de métaux toxiques ou précieux.

Les micro-organismes qui participent à ces transformations sont principalement des bactéries du genre *Thiobacillus* (*ferrooxidans*, *thiooxidans*, *acidophilus*) ou *Leptospirillum ferrooxidans*. Elles se développent dans des environnements très acides ($1 < \text{pH} < 2$) et supportent de fortes concentrations en métaux toxiques comme le cadmium, l'uranium ou le thorium.

Acidithiophilus ferrooxidans a été découverte en 1947 dans les drainages acides de mines de houille grasse. Ces bactéries sont chimiolithotrophes : elles utilisent l'énergie issue de l'oxydation du Fe^{2+} et/ou du soufre S^0 pour synthétiser des molécules organiques à partir du dioxyde de carbone.

La solubilisation des sulfures métalliques peut être directe ou indirecte, selon que les bactéries oxydent directement les sulfures métalliques (MeS_2) ou qu'elles oxydent la pyrite (FeS_2) en sulfate ferrique. Les solutions acides riches en Fe^{3+} oxydent à leur tour les sulfures métalliques (Zn, Cd, Ni, Pb, Cu, Au (or), Mn, U)

De nouvelles approches en bioréacteur utilisent des bactéries thermophiles ou des archées qui se développent à des températures élevées pour optimiser les réactions de biolixiviation (*Thiobacillus caldus* à 45-50 °C, *Sulfolobus metallicus* à 70-80 °C, ou *Acidianus brierleyi* à 70-90 °C).

1.1.3. Biominéralisation et bioimmobilisation

De nombreux articles témoignent de la capacité des bactéries à catalyser la formation de précipités minéraux insolubles contenant un métal, ce qui peut représenter un procédé intéressant pour immobiliser et confiner un métal toxique. C'est le cas notamment pour l'uranium puisque l'on peut obtenir des précipités insolubles même pour la forme oxydée UO_2^{2+} . Un mécanisme connu depuis longtemps, et utilisé pour des procédés de bioremédiation, consiste en l'exploitation de la capacité des bactéries sulfatoréductrices à produire, au cours de la réduction anaérobie du soufre élémentaire ou du sulfate, du sulfure d'hydrogène (H_2S) qui fait précipiter les cations métalliques (Me^{2+}) sous forme de sulfures MeS_2 insolubles (Figure I. 4).

Ce mécanisme existe chez des espèces affiliées aux genres *Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum*. Il a ainsi été montré dans des échantillons de sols et d'eau que ce couplage de réactions, initié par des bactéries sulfatoréductrices, peut entraîner la précipitation de l'uranium et du zinc *in situ*.

Des phénomènes de biominéralisation en aérobiose ont également été décrits chez des non extrémophiles tels que *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que chez diverses souches affiliées aux

genres *Citrobacter*, *Rahnella*, *Bacillus* et *Arthrobacter*. Chez ces bactéries, la formation intra- ou extracellulaire de précipités minéraux insolubles de phosphate d'uranyle a été observée.

Dans le cas de *Citrobacter*, la réaction met en jeu une phosphatase acide membranaire qui catalyse la synthèse de phosphate dans le périplasma. Le phosphate se complexe avec le métal, formant des précipités insolubles de NaUO_2PO_4 ou $\text{NH}_4\text{UO}_2\text{PO}_4$. Ces complexes s'accumulent alors en microcristaux à la surface de la cellule selon un processus de nucléation impliquant les lipopolysaccharides.

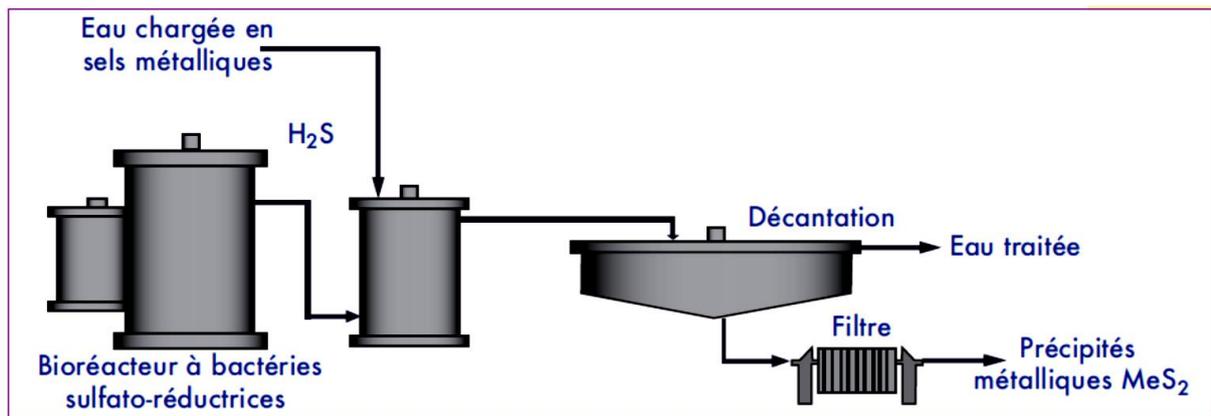


Figure I. 4 : Bioprécipitation

Le sulfure d'hydrogène produit par les bactéries sulfato-réductrices dans un premier bioréacteur anaérobie est transféré à un deuxième biotank contenant l'eau contaminée à traiter. Le gaz précipite les cations métalliques en sulfures insolubles qui sont ensuite séparés de l'eau traitée par décantation et filtration. (Berthomieu et al. 2008).

Pour *P. aeruginosa*, le mécanisme de formation des précipités met en jeu le système de synthèse/dégradation des polyphosphates cellulaires, catalysé par la polyphosphate kinase (Ppk). Lorsque le phosphate est libéré, le phosphate d'uranyle s'accumule à la surface de la cellule. Dans ce cas, à la différence de ce qui a été décrit chez *Citrobacter*, le phénomène de biominéralisation peut avoir lieu même si les bactéries sont mortes, ce qui permet d'envisager d'utiliser ces cellules comme pièges à uranium pour décontaminer des solutions aqueuses.

1.1.4. La chélation à la surface des bactéries

La chélation est un phénomène de fixation à la surface des parois cellulaires indépendant de l'activité biologique des bactéries. Certaines bactéries à Gram positif (*Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus subtilis* ou *Micrococcus luteus*) fixent ainsi des quantités importantes d'uranium à leur surface et ce, qu'elles soient vivantes ou mortes. Pour d'autres bactéries à Gram négatif, la chélation de l'uranium implique les lipopolysaccharides de la paroi.

Ce phénomène de biosorption, notamment lorsqu'il est réversible, présente un intérêt particulier pour la bioremédiation des eaux.

Les protéines de surface d'une souche de *Bacillus sphaericus*, JG-A12, isolée d'un sol contaminé par l'uranium, fixent jusqu'à 20 mg d'uranium par gramme de protéine et fixent également des métaux nobles (palladium, platine, or...). À la surface des cellules, cette protéine s'auto-organise en un réseau pseudo cristallin qui délimite des pores de 2 à 8 nm de diamètre. L'uranium ainsi que d'autres métaux sont fixés au niveau de ces pores.

La bioremédiation des sols et des eaux pollués utilisant des bactéries est une approche très prometteuse car, d'une part, elle engendre de faibles coûts de traitement et d'autre part, concerne une vaste gamme de métaux.

1.2. Utilisation des biomolécules

Ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les polymères, les extrêmolytes et une grande diversité de métabolites secondaires.

Compte tenu de la diversité structurale et métabolique, ces organites sont exploités pour un large éventail d'applications (Tableau I. 3).

Le terme «extrêmozyme» désigne des enzymes provenant de microorganismes extrémophiles. La plus connue des applications est la PCR ou amplification génique *in vitro* qui repose sur les propriétés des ADN polymérases thermostables.

1.2.1. Protéines et enzymes

Les enzymes les plus utilisées en amplification de gènes sont la *Taq* polymérase (70 % du marché) isolée de *Thermus aquaticus*. Elle a été à l'origine, découverte dans les sources thermales du parc de Yellowstone, Wyoming (USA), mais a été isolé depuis de nombreux environnements, y compris l'eau chaude du robinet.

Cette enzyme est stable à 95 °C, idéale pour une utilisation en PCR, dans laquelle l'ADN à amplifier est chauffé pour dénaturer et séparer les brins avant l'amplification par la polymérase. La stabilité thermique de la *Taq* rend ces réactions suffisamment efficaces pour être utilisées en routine, évitant l'ajout d'une polymérase supplémentaire pendant la réaction. Plus récemment, d'autres polymérases thermostables, ayant chacune des avantages différents pour différentes techniques de PCR, sont disponibles. L'une d'entre elles, la Pfu polymérase (isolée de l'hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*) présente une fidélité de réplication plus élevée que la *Taq*.

Tableau I. 3: Applications des extrémophiles en biotechnologie, médecine et industrie

| Source | Biomolécule | Process |
|------------------|-----------------------|--|
| Thermophiles | ADN polymérase | Polymerase Chain Reaction (PCR) (diagnostique) |
| Thermophiles | Protéases | Industrie alimentaire, industrie laitière |
| Psychrophiles | | |
| Thermophiles | α -amylase | Blanchiment de papier |
| Alcalophiles | Protéases, amylases, | Dégradation des polymères et détergents |
| Psychrophiles | cellulases, lipases | |
| Alcalophiles | Antibiotiques | Traitement d'infections |
| Psychrophiles | Acides gras insaturés | Suppléments alimentaires |
| Psychrophiles | Déshydrogénases | Biosensors |
| Halophiles | Solutés compatibles | Industrie pharmaceutique |
| | Glycérol | |
| Halophiles | Carotène | Additif alimentaire |
| Psychrophiles | | Bioremédiation |
| Radio-résistants | | Bioremédiation des déchets radioactifs |

Carboxylestérases : lipases et estérases

Les enzymes hydrolysant les esters carboxyliques (EC 3.1.1) sont ubiquistes. En présence d'eau, elles catalysent l'hydrolyse d'une liaison ester pour donner un alcool et un acide carboxylique. Dans un solvant organique, elles peuvent catalyser la réaction inverse ou une transestérification. Il existe deux groupes d'enzymes très connues dans la famille des hydrolases d'esters carboxyliques : les lipases et les hydrolases.

Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les acylesters à chaîne courte (inférieure à 10 atomes de carbone) et ne sont pas actives sur les substrats qui forment des micelles. Elles ne requièrent pas de cofacteur, présentent une bonne chimiosélectivité, régiosélectivité et énantiosélectivité. Ces enzymes ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales, agroalimentaires, énergie grâce à leurs propriétés en synthèse organique, production de détergent, de biodiesel, synthèse d'arômes...etc. Par ailleurs, de nombreuses carboxylestérases ont été isolées à partir d'hyperthermophiles et de psychrophiles. Ce sont des estérases à l'exception de trois lipases récemment isolées de l'archée *Archaeoglobus fulgidus*, et de la bactérie *Thermosyntropha lipolytica*. Elles présentent une grande diversité de substrats. Les pH optimaux s'échelonnent entre 6 et 9 mais la lipase de *A. fulgidus* présente un optimum à pH 11.

La majorité des carboxylestérases issues d'hyperthermophiles affiche une bonne thermostabilité et une activité optimale à des températures comprises entre 70 et 100 °C. Un nombre important de ces estérases présente une bonne stabilité en présence de solvants organiques. C'est en particulier le cas des estérases EstA et EstB isolées de *Picrophilus torridus* qui présentent une activité optimale de 55 à 70 °C et à pH de 6,5-7. Ces activités sont très bien conservées en présence de détergents, d'urée et de solvants organiques d'usage courant.

Protéases et peptidases

Les travaux sur les protéases (EC 3.4 : action sur liaison peptidique (ou peptidase)) isolées d'alcaliphiles remontent au début des années 1970. L'objectif principal visait l'obtention de protéases fonctionnelles dans les conditions usuelles d'utilisation dans des industries aussi diverses que l'industrie des détergents, alimentaires, textiles, papetières, pharmaceutiques ainsi que les tanneries, la cosmétique, la chimie fine et l'ingénierie moléculaire sont également des utilisateurs importants.

De nombreuses protéases ont été isolées telle que la protéase alcaline isolée de *Bacillus halmapalus* KSM-KP43 qui a pour origine un échantillon de sol du Japon, produite à l'échelle industrielle et utilisée avec succès dans l'industrie des détergents. La sérine protéase de KP43 présente une stabilité élevée en présence d'agents oxydants tels que le H₂O₂ (elle retient 90 % de son activité après 30 min à 30 °C à une concentration de 50 mM de H₂O₂) ; une activité maximale entre les pH 6 et 12 et les températures de 45 à 65 °C ; une absence de sensibilité à l'EDTA, l'EGTA (à 10 mM), au 2-mercaptoéthanol, au monoiodoacétate, à l'N-éthylmaléimide, au 5,5'-dithiobis-(2-acide nitrobenzoïque) 5 mM. Par ailleurs, un faible nombre de protéases a été isolé à partir des archées en particulier des archées haloalcaliphiles.

Glycosidases

Cette famille (EC 3.2 : glycosylases ; EC 3.2.1 : glycoside hydrolase) renferme de très nombreuses enzymes d'applications industrielles (disaccharidases: lactase, maltase, sucrase, tréhalase ; glucosidases: amylase, cellulase, chitinase, galactosidase, pullulanase, etc.).

Les amylases sont des enzymes hydrolysant les molécules d'amidon en monomères de glucose et peuvent être classées selon la spécificité au substrat comme décrit dans le tableau I.4. La figure I. 5 illustre la fonction des trois enzymes amylolytiques majeures.

Les enzymes amylolytiques sont l'une des enzymes les plus intéressantes pour les procédés industriels. Les α -amylases de différentes espèces du genre *Bacillus* sont les enzymes les plus utilisées dans les procédés biotechnologiques, en raison de leurs propriétés thermophiles et de leur taux de conversion élevés. L'investigation des extrêmzymes et leurs caractéristiques

particulières pour les procédés industriels a pris un essor considérable, et au fil des années, plusieurs amylases isolées à partir de thermophiles, de psychrophiles, d'alcalophiles, d'acidophiles et d'halophiles ont été rapportées. Ces enzymes ont été isolées à partir de différents genres d'archées et de bactéries extrémophiles d'origine marines, de la surface aux profondeurs marines comprennent *Desulfurococcus* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Pyrococcus* sp., *Rhodothermus* sp. et *Thermococcus* sp.

Tableau I.4 : Classification des amylases

| | Enzyme | Classification | Clivage | Produit | |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|--------------|-----------------------|------------------------|
| Amylases | Endoamylase | α -amylases | EC 3.2.1.1 | α -1,4 Interne | Dextrines |
| | | β -amylase ou maltase | EC 3.2.1.2 | | Maltose |
| | | | | Outerregions | β -cyclodextrin |
| | Exoamylases | Glucoamylase | EC3.2.1.3 | de α -1,4 | et glucose |
| | | α -glucosidase | EC 3.2.1.20 | | |
| | | Pullulanases | EC 3.2.1.41 | Liaisons | α - Maltotriose |
| | Débranchement | Isoamylases | EC 3.2.1.68 | 1,6 | Malto- |
| | | Dextrinases | EC 3.2.1.142 | Pullulane | oligosaccharides |
| | | | Liaisons | α - Maltose | |
| | | | 1,6 | | |

On citera à titre d'exemple une glycosidase hyperthermostable a activité pullulanasiq ue à 90°C isolée de *Thermococcus aggregans* a été clonée et exprimée dans *E. coli*. Contrairement à toutes les autres enzymes hydrolysant des pullulanes décrites jusqu'à présent, l'enzyme est capable d'attaquer les liaisons α -1,6- ainsi que α -1,4-glycosidiques dans le pullulane, donnant un mélange de maltotriose, de panose, de maltose et de glucose. L'enzyme est également capable de dégrader l'amidon, l'amylose et l'amylopectine formant le maltotriose et le maltose comme principaux produits.

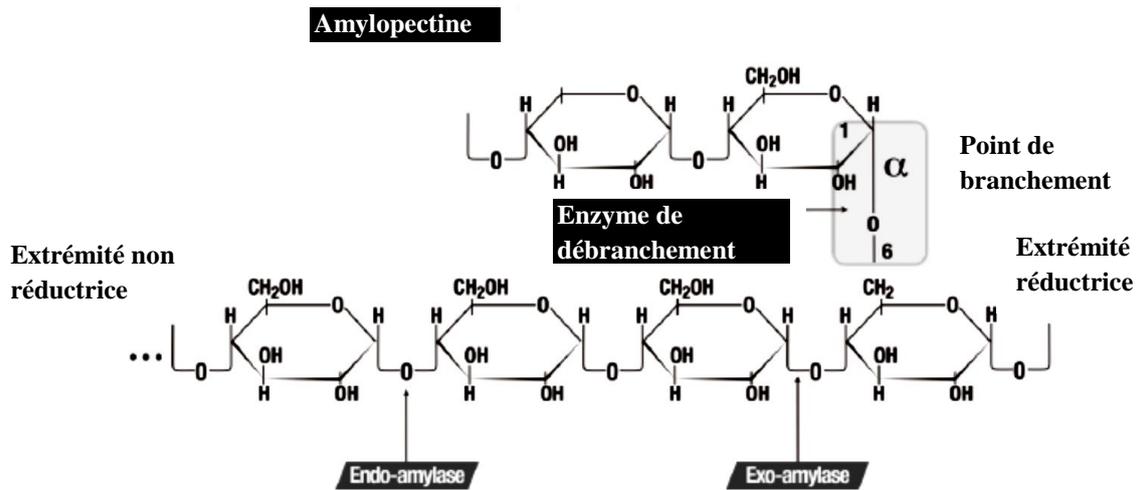


Figure I. 5 : Les trois principales enzymes amylolytiques (Zamithla el Dalmaso et al, 2015)

Des glycosidases halophiles ont également été identifiées. En effet, la purification d'une β -galactosidase halophile à partir de l'espèce *Haloferaxalicantei* a permis de mettre en évidence une capacité de clivage de plusieurs substrats de β -galactoside différents tels que le o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, le 5-bromo 4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside (X-Gal), le lactulose et la β -D-fucosidase. Toutefois, l'enzyme perd son activité en présence du lactose, et ne présente pas d'activité β -glucosidase, β -arabinosidase et β -xylosidase.

L'une des applications industrielles visant l'utilisation de ces extrêmzymes étant la filière de la production de biocarburant. Cette filière a pour objectif l'obtention d'un complexe enzymatique capable de convertir la lignocellulose en sucres pouvant ensuite être fermentés pour produire des biocarburants. Ce sont des bactéries thermophiles de l'ordre des *Clostridiales* qui présentent les propriétés les plus remarquables pour cet objectif et en particulier : *Clostridium thermocellum* (60°C), *Caldicellulosiruptor kristjansonii* (78°C) et *Anaerocellum thermophilum* (75 °C). Ces espèces se développent sur de la cellulose cristalline et produisent du lactate, de l'acétate, de l'éthanol, de l'hydrogène et du CO₂.

Un complexe multiprotéique de haut poids moléculaire sécrété par *C. thermocellum* a été identifié. Ce complexe s'attache à l'extérieur de la membrane cellulaire et constitue le cellulosome. Présents chez de nombreuses bactéries et champignons, les cellulosomes sont capables d'hydrolyser la cellulose cristalline. Outre les domaines de liaison, un cellulosome

comporte des cellulases, des xylanases, des mannanases, des arabinofuranosidases, des lichenases et des pectines lyases.

Chapitre II

Les Thermophiles

I. Définition et classification

Les organismes thermophiles (du grec *thermê*, chaleur et *philein*, aimer) sont des organismes ayant besoin d'une température élevée pour se développer. Plusieurs définitions ont été proposées pour définir la thermophilie. La plus reconnue est celle qui a été proposée par Thomas Brock, le microbiologiste à l'origine de la découverte des microorganismes thermophiles. Selon cette définition, un thermophile est un être vivant dont la température optimale de croissance se situe au-dessus de 60°C.

Une définition plus pratique et plus large a été proposée par Karl Stetter et qualifie d'organismes thermophiles, tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45°C. Cette dernière définition est intéressante car elle définit 3 sous-catégories au sein des thermophiles :

- 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.
- et les hyperthermophiles dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C (Figure II. 1).

Le terme mésophile, désigne les êtres vivants qui, comme nous êtres humains, se développent dans une gamme de température entre 10 et 50°C.

La frontière hyperthermophile est arbitraire mais sépare les organismes qui se développent aux températures élevées.

Les thermophiles sont dans leur immense majorité affiliés aux 3 domaines du vivant *Bacteria*, *Archaea*, et *Eucarya*.

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.

Chez les procaryotes, l'on compte un grand nombre d'hyperthermophiles dont beaucoup sont affiliés aux archées. Le microorganisme le plus hyperthermophile connu à ce jour est l'archée *Pyrolobus fumarii* capable de se diviser à la température maximale de 113°C et incapable de

se développer en dessous de 90°C. La croissance d'archées à des températures maximales de 121 voire 122°C a également été rapportée.

Les hyperthermophiles les plus extrêmes sont des *Archaea*, ils appartiennent aux genres *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* et *Methanopyrus*, comme l'espèce *Pyrococcus abyssi* ou « la boule de feu des abysses » qui a été isolée au niveau d'une cheminée de source hydrothermale à 2000 m de profondeur, au Nord du bassin Fidjien, dans l'océan Pacifique, son optimum de croissance est à 96°C. Alors que les bactéries, *Thermotoga maritima* et *Aquifex pyrophilus* croissent à des températures de 90°C et 95°C respectivement.

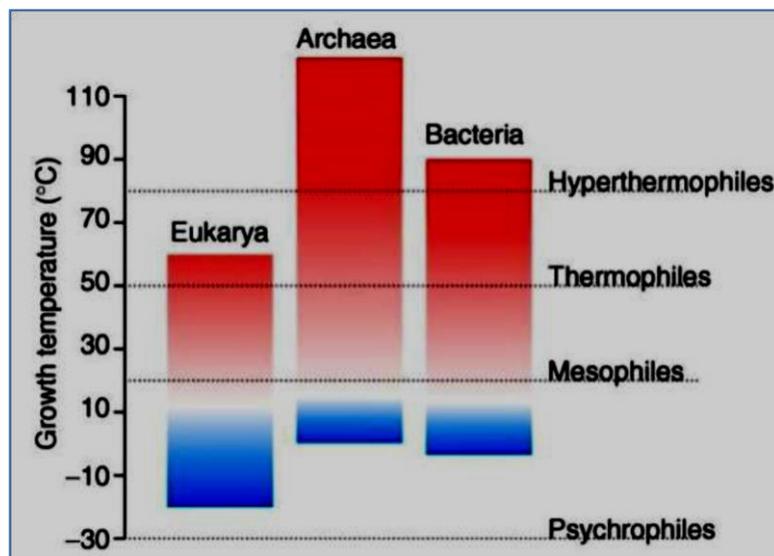


Figure II. 1 : La thermophilie dans les trois domaines du vivant (Hickey and Singer, 2004).

Les températures basses (<15 °C) déterminent également un autre groupe d'extrémophiles : les psychrophiles (affectionnent le froid). Ce groupe rassemble les espèces de microorganismes ne se développant qu'à basses températures, voire à des températures légèrement négatives. Les milieux concernés sont les grands fonds océaniques, les zones de haute altitude en montagne et les zones polaires.

II. Ecologie des thermophiles

Des organismes thermophiles ont été isolés à partir d'environnements naturels soumis au volcanisme ou au géothermalisme (sources hydrothermales océaniques profondes, sources chaudes terrestres, etc.), mais aussi de biotopes artificiels où les températures sont élevées (canalisations domestiques d'eaux chaudes, installations industrielles, etc.).

1. Les biotopes naturels

Les environnements naturellement chauds sont distribués entre les sites volcaniques terrestres, les sources thermales terrestres, les systèmes hydrothermiques sous-marins (sédiments, volcans submersibles, fumerolles), les sites souterrains, tels que les réserves de pétrole, et les sols chauffés par le soleil.

Les biotopes terrestres

Les systèmes thermiques terrestres sont retrouvés dans beaucoup d'endroits dans le monde (Islande, Parc de Yellowstone (USA), Nouvelle-Zélande, Japon, Algérie, etc.). Leur composition en minéraux, en nutriments et leur concentration en gaz diffèrent considérablement, le pH varie de 1 à 10. Par conséquent, les communautés microbiennes peuplant ces régions thermiques très variées par leurs conditions physiques et géochimiques sont également très diversifiées.

Les biotopes terrestres des hyperthermophiles sont souvent des solfatares riches en sulfures. La composition chimique des solfatares est très variable et dépend du site en question. Le CO₂ garde les sols anaérobiques et prévient la pénétration de l'oxygène dans les profondeurs. De plus, le H₂S réduit l'oxygène en eau générant du sulfure. De nombreux solfatares sont riches en minéraux ferreux tels que la pyrite, les oxydes de fer ainsi que d'autres sulfures ferriques.

Les biotopes marins

Les biotopes marins des hyperthermophiles sont constitués de divers systèmes hydrothermaux situés à des profondeurs moyennes à abyssales. Les systèmes hydrothermaux sous marins contiennent habituellement des concentrations élevées de NaCl et de sulfate et présentent un pH légèrement acide à alcalin (5-8,5). Tandis que les principaux gaz et éléments nutritifs peuvent être semblables à ceux des zones thermales terrestres.

Les sources hydrothermales profondes océaniques sont majoritairement situées sur les dorsales médio-océaniques actives (dorsale Médio -Atlantique, ride Est-Pacifique). Ces sites sont les milieux de prédilection des thermophiles et des hyperthermophiles.

Au niveau des cheminées des fumeurs noirs, les émissions sont composées de fluide hydrothermal presque pur et peuvent atteindre une température de 350°C. Il existe le long des parois des fumeurs, un gradient de température dû au refroidissement par l'eau de mer à 3°C. Les thermophiles sont isolés dans la paroi poreuse des fumeurs et dans les sédiments chauds des alentours. De plus, de nombreuses sources présentent des pH acides, voire très acides où se développent des acidophiles et/ou des acido-thermophiles. Quelques rares sources

hydrothermales, telle que Lost City (dorsale Médio-Atlantique) présentent des pH alcalins qui supportent le développement de souches alcaliphiles ou alcali-thermophiles.

Les sources hydrothermales les plus profondes connues (Ashadzé, 4100 m) ont permis d'isoler des souches telles que *Pyrococcus yayanosii* se développant uniquement dans une gamme de pression de 20 à 120 MPa, qualifiées de piézophiles (ou barophiles) strictes.

Tableau II.1 : Les biotopes des hyperthermophiles (Stetter et al., 1988).

| Caractéristiques | Type de biotope | |
|---|--|--|
| | Terrestre | Marin |
| Localisation du site | -Champs de solfatares -Sources chaudes profondes -Stratifications souterraines des hydrocarbures | -Sources hydrothermales sous-marines et fumeurs noirs -Volcans sous marins actifs |
| Températures | Surface : > 100°C Profondeur : > 100°C | > 400°C |
| Salinité | Souvent faible (0,1 -0,5% de sel) | Environ 3% de sel |
| pH | 0 -10 | 5-8,5 (rarement : 3) |
| Principaux gaz et nutriments essentiels à la vie | H ₂ O (vapeur) CO ₂ , CO, CH ₄ , H ₂ , H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ , NH ₄ ⁺ , N ₂ , NO ₃ ⁻ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , O ₂ (surface) | |

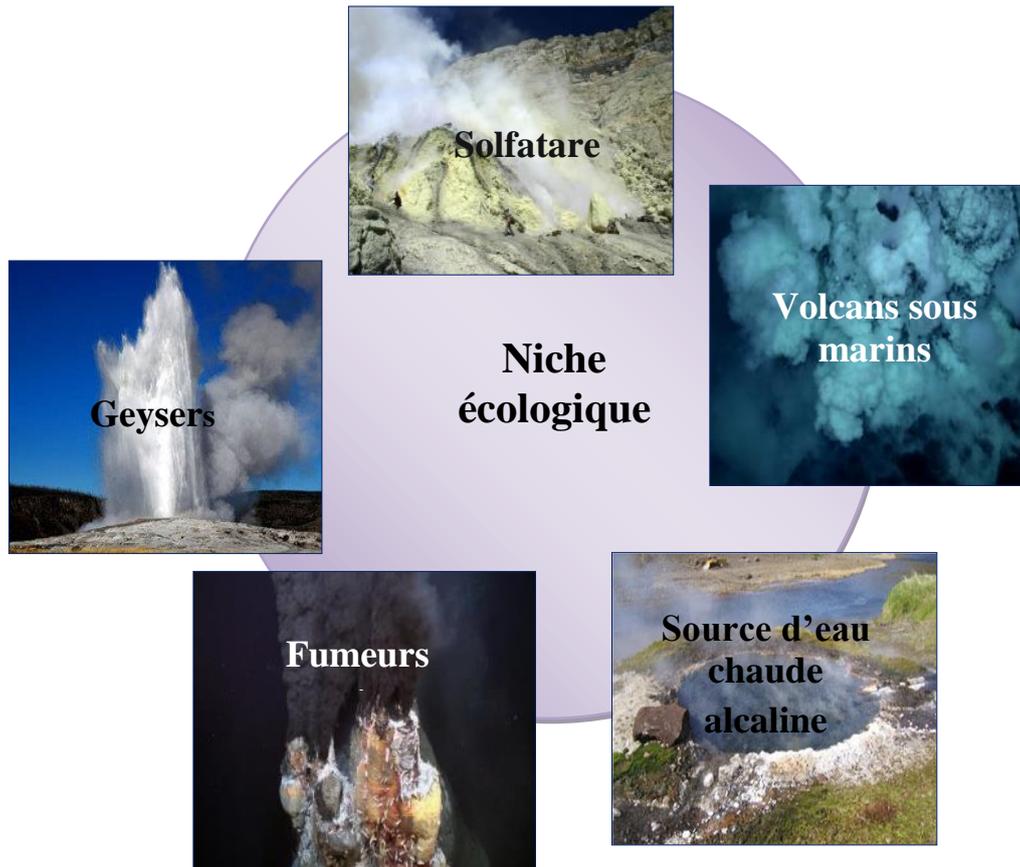


Figure II. 2: Biotopes des thermophiles et hyperthermophiles

2. Les biotopes artificiels

Les organismes thermophiles colonisent également les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puits et forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs.

III. Echantillonnage et culture

Des échantillons d'eaux chaudes, de sols, de roches et de sédiments peuvent servir de matière première pour mettre en place des cultures d'enrichissement en laboratoire. Des précautions particulières doivent être prises, lors de l'échantillonnage, pour éviter la contamination de l'échantillon par l'oxygène. Aux températures élevées de croissance, il est toxique pour les hyperthermophiles anaérobies.

En règle générale, les échantillons anaérobies sont mis dans des flacons de stockage de 100 mL. Après réduction de l'oxygène qui a pénétré pendant le prélèvement, les bouteilles sont fermées hermétiquement et transportées au laboratoire à température ambiante. Ces échantillons peuvent être stockés à 4 °C et utilisés pour des expériences de culture pendant 10 ans et plus.

Les cultures d'enrichissement peuvent être obtenues en simulant la composition géochimique et géophysique variable des environnements. Divers donneurs et accepteurs d'électrons peuvent être utilisés dans des conditions de culture anaérobie, microaérobie ou (rarement) aérobie.

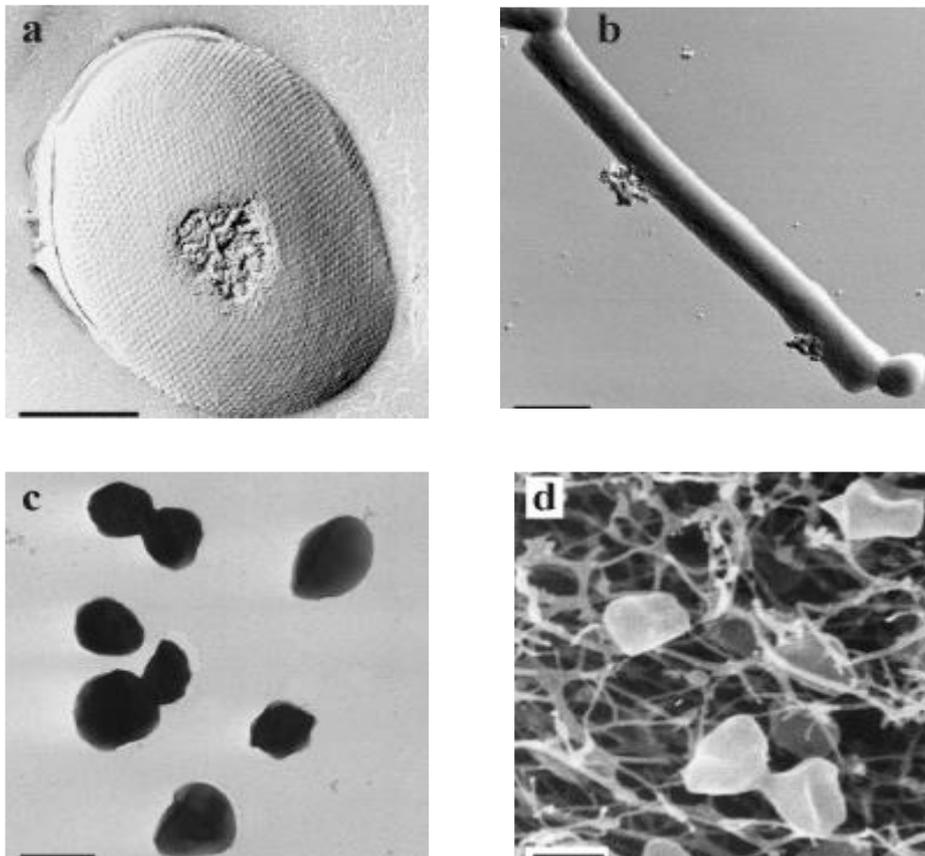


Figure II. 3 : Photographies au microscope électronique à balayage de cellules bactériennes et d'archeae hyperthermophiles (Stetter, 2007).

a. *Metallosphaera sedula*, bar, 0.2 μm ; **b.** *Thermoproteus tenax*, bar, 1.0 μm ; **c.** *Pyrolobus fumarii*, bar, 1.0 μm ; **d.** *Pyrodictium abyssi*, bar, 1.0 μm ;

IV. Diversité taxonomique et métabolique

De nos jours, environ 70 espèces de bactéries et d'Archées hyperthermophiles ont été isolées à partir de différents sites thermaux telluriques et marins de par le monde. Les hyperthermophiles sont très divergeants, tant en terme de leurs propriétés phylogénétique que physiologiques, et sont groupés en 29 genres dans 10 ordres (Tableau II.2)

Tableau II. 2 : Taxonomie et températures maximales de croissance des hyperthermophiles (Stetter, 2011)

| Ordre | Genre | Espèces | T max (°C) |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------|
| <i>Domaine : Bacteria</i> | | | |
| <i>Thermotogales</i> | <i>Thermotoga</i> | <i>T. maritima</i> | 90 |
| | | <i>T. thermarum</i> | 84 |
| | <i>Thermosipho</i> | <i>T. africanus</i> | 77 |
| | <i>Fervidobacterium</i> | <i>F. nodosum</i> | 80 |
| <i>Aquificales</i> | <i>Aquifex</i> | <i>A. pyrophilus</i> | 95 |
| | | <i>A. aeolicus</i> | 93 |
| | <i>Calderobacterium</i> | <i>C. hydrogenophilum</i> | 82 |
| | <i>Thermocrinis</i> | <i>T. ruber</i> | 89 |
| <i>Domaine : Archaea</i> | | | |
| <i>Phylum I : Crenarchaeota</i> | | | |
| <i>Sulfolobales</i> | <i>Sulfolobus</i> | <i>S. acidocaldarius</i> | 85 |
| | | <i>S. solfataricus</i> | 87 |
| | <i>Metallosphaera</i> | <i>M. sedula</i> | 80 |
| | <i>Acidianus</i> | <i>A. infernus</i> | 95 |
| | <i>Stygiolobus</i> | <i>S. Azoricus</i> | 89 |
| | <i>Sulfurococcus</i> | <i>S. mirabilis</i> | 86 |
| | <i>Sulfurisphaera</i> | <i>S. ohwakuensis</i> | 92 |
| <i>Thermoproteales</i> | <i>Thermoproteus</i> | <i>T. tenax</i> | 97 |
| | <i>Pyrobaculum</i> | <i>P. islandicum</i> | 103 |
| | | <i>P. aerophilum</i> | 104 |
| | <i>Thermophilum</i> | <i>T. pendens</i> | 95 |
| | | <i>T. librum</i> | 95 |
| | <i>Thermoeladium</i> | <i>T. modestius</i> | 80 |
| | <i>Caldivirga</i> | <i>C. maquilingensis</i> | 92 |
| <i>Desulfurococcales</i> | <i>Desulfurococcus</i> | <i>D. mucosus</i> | 97 |
| | <i>Staphylothermus</i> | <i>S. marinus</i> | 98 |
| | <i>Sulfophobococcus</i> | <i>S. zilligii</i> | 95 |
| | <i>Stetteria</i> | <i>S. hydrogenophila</i> | 102 |
| | <i>Aeropyrum</i> | <i>A. pernix</i> | 100 |
| | <i>Ignicoccus</i> | <i>I. islandicus</i> | 100 |
| | <i>Thermosphaera</i> | <i>T. aggregans</i> | 90 |
| | <i>Thermodiscus</i> | <i>T. maritimus</i> | 98 |
| | <i>Pyrodictium</i> | <i>P. occultum</i> | 110 |
| | <i>Hyperthermus</i> | <i>H. butylicus</i> | 108 |
| | <i>Pyrolobus</i> | <i>P. fumarii</i> | 113 |
| <i>Domaine : Archaea</i> | | | |
| <i>Phylum II : Euryarchaeota</i> | | | |
| <i>Thermococcales</i> | <i>Thermococcus</i> | <i>T. celer</i> | 93 |
| | <i>Pyrococcus</i> | <i>P. furiosus</i> | 103 |
| | | <i>P. abyssi</i> | 102 |
| | | <i>P. horikoshii</i> | 102 |
| <i>Archaeoglobales</i> | <i>Archaeoglobus</i> | <i>A. fulgidus</i> | 92 |
| | | <i>A. veneficus</i> | 88 |
| | <i>Ferroglobus</i> | <i>F. placidus</i> | 95 |
| <i>Methanobacteriales</i> | <i>Methanothermus</i> | <i>M. fervidus</i> | 97 |
| <i>Methanococcales</i> | <i>Methanococcus</i> | <i>M. janaschii</i> | 86 |
| | | <i>M. igneus</i> | 91 |
| <i>Methanopyrales</i> | <i>Methanopyrus</i> | <i>M. kandleri</i> | 110 |

1. Voies métaboliques des thermophiles

Qu'il s'agisse de *Bacteria* ou d'*Archaea*, pratiquement tous les types métaboliques microbiens intervenant dans les cycles biogéochimiques majeurs ont été identifiés chez les thermophiles.

En effet, d'après Ferrera et Reysenbach, (2007), les thermophiles et hyperthermophiles incluent des phototrophes, des chimiotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes (Tableau II. 3).

La plupart des microorganismes hyperthermophiles présentent un mode de nutrition chimiolithoautotrophe : les réactions redox servent de sources d'énergie (chimiolithotrophe) et le CO₂ est la seule source de carbone nécessaire pour la synthèse des éléments cellulaires (autotrophie). Par conséquent, ces microorganismes fixent le CO₂ par chimiosynthèse et sont désignés de chimiolithoautotrophe.

L'hydrogène moléculaire joue le rôle d'un important donneur d'électrons. D'autres éléments sont également connus tels que les ions ferreux, les sulfures et les sulfides.

Comme pour les microorganismes mésophiles, l'oxygène peut servir de récepteur d'électrons chez certains hyperthermophiles. Toutefois, ces derniers sont souvent micro-aérophiles et par conséquent se développent uniquement à faible concentration d'oxygène (aussi bien inférieur à 10 ppm).

Les respirations anaérobies sont de type nitrate, sulfates, sulfure et dioxyde de carbone. Alors que les hyperthermophiles chimiolithoautotrophes produisent de la matière organique, il en existe d'autres qui dépendent de la matière organiques comme source d'énergie et de carbone. Ils sont désignés de chimioorganohétérotrophes (hétérotrophes).

De nombreux hyperthermophiles chimiolithoautotrophes sont des hétérotrophes facultatifs (Tableau II.3). Ceux-ci sont capables d'utiliser la matière organique comme alternative aux nutriments inorganiques. Les hyperthermophiles hétérotrophes obtiennent de l'énergie soit par voie aérobie ou par différents types de respiration anaérobies, en utilisant des matières organiques comme donneurs d'électrons ou par fermentation.

Tableau II. 3 : Exemple de la diversité métabolique des thermophiles (Ferrera et Reysenbach, 2007)

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

V. Adaptations physiologiques à la thermophilie

1. Aspects physiologique et morphologique

Les microorganismes thermophiles ont acquis diverses techniques d'adaptation telles que la teneur élevée en GC dans leurs génomes, la substitution d'acides aminés dans les protéines et contiennent des composants spécifiques dans leur paroi cellulaire. Les facteurs

affectant la tolérance aux températures élevées des organismes thermophiles sont les suivants :

1.1. La perméabilité membranaire

Les membranes cellulaires fonctionnent comme des barrières perméables, contrôlant les échanges intra et extracellulaires des composants à faibles poids moléculaires. L'entretien de la fluidité membranaire, essentielle pour un fonctionnement cellulaire normal, et les mécanismes de maintien de la stabilité et de l'adaptabilité membranaire diffèrent chez les archées et les bactéries hyperthermophiles.

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

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

1.2. Teneur en G+C

La teneur en G+C des molécules d'ARNr et ARNt des organismes thermophiles est plus importante que celle retrouvée chez les mésophiles. Ainsi, un contenu élevé en G+C des ARN de transfert et des ARN ribosomiques stabilise ces conformations. A l'opposé, la teneur en G+C de l'ADN génomique des hyperthermophiles est souvent plus faible. Cette observation suggère que la stabilité thermique des ARNr pourrait être un facteur important pour la vie dans des conditions hyperthermophiles.

2. Les protéines

La plupart des thermophiles sont connus pour incorporer une quantité élevée d'acides aminés chargés (Asp, Glu, Arg et Lys) comparativement aux acides aminés polaires

(Asn, Gln, Ser et Thr) dans leurs protéines, provoquant une augmentation importante du nombre de ponts de sel intramoléculaires.

Néanmoins, les mécanismes intrinsèques les plus fréquemment rencontrés font appel à :

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

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

Le nombre de résidus chargés aurait un impact sur la solubilité tandis que leur position serait importante pour la stabilité. Par ailleurs, les ponts disulfures possèdent également un rôle important dans la stabilisation des protéines thermostables.

En plus de ces facteurs intrinsèques, il existe de nombreux facteurs extrinsèques qui contribuent à la thermostabilité des protéines. Ils incluent des protéines chaperonnes (thermosomes) rencontrées chez les archées hyperthermophiles. Elles sont thermostables et résistantes à la protéolyse. Les chaperonnes de *Sulfolobus solfataricus* empêchent l'agrégation de la protéine-cible dénaturée et catalysent son repliement par addition d'ions K^+ .

3. Accumulation de solutés compatibles

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

D'autres types d'osmolytes sont rencontrés chez les hyperthermophiles tels que le dimyoinositol 1 phosphate (DIP) et les polyamines polycationiques. Des concentrations allant jusqu'à 0,4% (de la biomasse cellulaire) de putrescine, de spermidine, de norspermine, de thermospermine, et de spermine ont été détectées chez de nombreuses souches de *Sulfolobus*.

VI. Applications biotechnologiques des thermophiles

La capacité des microorganismes à survivre dans des conditions extrêmes a incité les chercheurs à les étudier pour mieux comprendre leurs caractéristiques et éventuellement les utiliser dans diverses applications.

En effet, nombreuses sont les études et les brevets dirigés et axés sur l'utilisation des microorganismes thermophiles et/ou leurs biomolécules dans divers domaines (Tableau II. 4).

Tableau II. 4 : Brevets des principales études réalisées sur les thermophiles et leurs applications (Mehta et al, 2016)

| Domaine d'étude | Application | Références |
|---|---|------------------------------|
| Bioconversion de la biomasse Lignocellulosique en biofuels en utilisant des bactéries thermophiles extrêmes | Bioconversion de la biomasse lignocellulosique en biofuels | Curvers et al. (2014) |
| Utilisation des bactéries thermophiles et des protéines extracellulaires | Fixation des métaux | Han et al. (2014) |
| Fermentation du saccharose par des bacilles thermophiles modérés | Modifications génétiques d'une souche de <i>Bacillus</i> thermophile modérée pour l'utilisation du saccharose comme source de carbone | Van Kranenburg et al. (2014) |
| Bioremédiation des polluants organiques par des bactéries thermophiles | Dégradation des polluants organiques | O'Driscoll et al. (2014) |
| Bactéries productrices de phytases | Rôle dans l'alimentation animale, la protection de l'environnement, la nutrition et santé humaine et les applications industrielles | Chu et al. (2001) |
| Procédé de production de microorganismes modifiés pour le traitement du pétrole à hautes températures, pressions et salinités | Utilisation dans la récupération de carburants par des microorganismes | Eugene et al. (1996) |

1. Conversion de la lignocellulose en hydrogène

Les sources thermales sont une source potentielle de microorganismes thermophiles producteurs d'hydrogène (H₂) et d'éthanol. Comparativement aux mésophiles, les microorganismes thermophiles sont plus résistants pour la dégradation de la cellulose et la production d'hydrogène. En effet, selon Wiegel et Ljungdahl (1986) et Blumer-Schuette et al. (2008), le taux de cellulolyse est plus rapide à des températures élevées. En conséquence, les microorganismes thermophiles isolés de divers environnements sont une perspective intéressante pour la production de biohydrogène cellulolytique (CBP) à partir de biomasse lignocellulosique complexe. A cet effet, des co-cultures bactériennes entre la bactérie

cellulolytique thermophile et thermophiles extrême *Clostridium thermocellum* et *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* avec des bactéries anaérobies thermophiles non cellulolytiques ont été réalisées pour la production d'hydrogène à base de cellulose.

Biodégradation et modification de la lignocellulose

La lignocellulose est une matière première très abondante du fait qu'elle est composée de lignine, de pectine, de cellulose et d'hémicellulose à des proportions variables. Elle représente l'un des constituants majoritaire de la paroi cellulaires végétale, du bois et de la paille. Ces constituants s'organisent en polymères de forme fibrillaire. Elle provient aussi bien des résidus agricoles et forestiers ou des sous-produits de transformation du bois que de cultures, qu'il s'agisse de plantes ligneuses ou de plantes herbacées. De nombreuses enzymes sont impliquées dans la dégradation de cette ressource. De plus, étant donné que les matières lignocellulosiques sont souvent soumises à des traitements thermiques pour faciliter leur dégradation, les enzymes thermostables présentent un avantage évident. Ainsi, un grand nombre d'enzymes hydrolysant la lignocellulose en intermédiaires métabolisables plus courts ou qui réduisent la viscosité du polysaccharide non amylicé dans les céréales fourragères (tels que l'orge, le seigle, l'avoine) sont rapportées. En outre, plusieurs microorganismes produisent plusieurs enzymes qui peuvent agir de manière synergique. La figure II.3 montre un aperçu de certains polymères présents dans la lignocellulose et les sites d'attaque d'un certain nombre d'enzymes agissant sur ces substrats.

Conversion de la cellulose par des cellulases

La cellulose est un homopolysaccharide composé d'unité β -D-glucopyranose, liées par des liaisons glycosidiques de type β -(1 \rightarrow 4).

Les cellulases sont classées en 3 groupes principaux : les endoglucanases, les cellobiohydrolases (exoglucanases) et les β -glucosidases, les trois groupes hydrolysent les liaisons glycosidiques β -(1 \rightarrow 4). Les endoglucanases ([EC 3.2.1.4], classées dans 12 familles différentes) catalysent le clivage aléatoire des liaisons internes dans la chaîne cellulosique, tandis que les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) attaquent les extrémités de la chaîne, libérant le cellobiose. Les β -glucosidases (EC 3.2.1.21) ne sont actives que sur les cello-oligosaccharides et le cellobiose, libérant du glucose (Figure II.4.A).

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose en glucose est aujourd'hui essentiellement réalisée par des champignons, tels que *Trichoderma*, *Penicillium* et *Aspergillus*, mais pour concurrencer les résultats de l'hydrolyse acide, une dégradation plus efficace, à une température plus élevée est nécessaire, et certaines enzymes ont été décrites à partir de thermophiles et hyperthermophiles.

Les années 1990 ont vu l'importance de l'utilisation des cellulases atteindre des niveaux industriels, principalement dans les textiles, les détergents et l'industrie du papier et de la pâte (dans le désencrage du papier recyclé) et de ce fait, plusieurs enzymes thermostables ont été caractérisées.

La dégradation de la cellulose (figure 3A) en sucres fermentescibles fait partie du domaine du bioraffinage qui a investi d'énormes efforts en recherche car c'est une condition préalable à la production d'énergie. Elle est réalisée au moins partiellement à des températures élevées pour faciliter la dégradation, rendant ainsi souhaitables l'utilisation d'enzymes thermostables (ou des microorganismes thermophiles).

Bien que les cellulases clivent un seul type de liaison, les substrats cristallins avec leur motif de liaison étendu nécessitent l'action d'un consortium d'enzymes libres ou alternativement des complexes multicomposants appelés cellulosomes.

Conversions de l'hémicellulose

L'hémicellulose est la deuxième biomasse renouvelable la plus abondante et représente 25 à 35% de la biomasse lignocellulosique. Les hémicelluloses sont des polymères hétérogènes constitués de pentoses (D-xylose, D-arabinose), d'hexoses (D-mannose, D-glucose, D-galactose) et d'acides sucrés. Les hémicelluloses du bois dur contiennent principalement des xylanes (Figure 3B), tandis que dans les résineux, les glucomannanes (Figure 4C) sont les plus courantes.

Diverses enzymes sont responsables de la dégradation de l'hémicellulose. Pour la dégradation du xylane, on retrouve par exemple : Endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8), la β -xylosidase (EC 3.2.1.37), l' α glucuronidase (EC 3.2.1.139), l' α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) et l'acétylxylanestérase EC 3.1.1.72) (Figure 4B). Toutes ces enzymes agissent sur les différents hétéropolymères retrouvés dans nature.

Pour la dégradation du glucomannane, la β -mannanase (EC 3.2.1.78) et la β -mannosidase (EC 3.2.1.25) clivent le squelette polymère (Figure 4C). Les enzymes endo-clivant de la chaîne principale (xylanases et mannanases) sont parmi les plus connues.

L'hémicellulose est, comme la cellulose, une source importante de sucres fermentescibles pour les applications de bioraffinage ; et une dégradation efficace est vitale pour son utilisation. Comme illustré plus loin, il est possible de prédire un potentiel d'application dans la production d'intermédiaires pour des produits de la chimie verte (par exemple le xylitol).

L'utilisation des endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8.) dans le procédé de blanchiment des pâtes pour la fabrication du papier est un concept introduit par des chercheurs finlandais, qui présente un grand intérêt environnemental en raison de la possibilité de diminuer l'utilisation de produits chimiques.

Les xylanases sont également produites à l'échelle industrielle en tant qu'additifs dans l'alimentation des volailles et comme additifs à la farine de blé pour améliorer la qualité des produits de boulangerie. Les mannanases ont un potentiel de blanchiment de la pâte, en particulier en combinaison avec une xylanase, et les applications dans l'alimentation comprennent l'action de diminution de la viscosité dans les extraits de café lors de la production de café instantané.

Conversion des pectines

Les pectines sont le troisième groupe principal de polysaccharides des parois cellulaires végétales, abondant dans la pulpe de betterave sucrières et les fruits tels que les agrumes et les pommes, où elles peuvent former jusqu'à la moitié de la teneur en polymère de la paroi cellulaire. Le squelette de la pectine, qui se compose de régions d'acide homogalacturonique (parfois méthylées) et des régions comportant à la fois le rhamnose et l'acide galacturonique (Figure 4D), possède des chaînes latérales de sucres neutres constituées de L-rhamnose, arabinose, galactose et xylose. Les résidus L-rhamnose comportent des chaînes latérales contenant de l'arabinose et du galactose. De plus, des chaînes latérales de xylogalacturonanes sont également retrouvées.

La pectine a trouvé une utilisation commerciale généralisée, en particulier dans l'industrie textile et alimentaire comme épaississant, texturant, émulsifiant, stabilisant, rencontrée dans les confiseries, produits laitiers et produits de boulangerie, etc. La pectine est également étudiée pour son potentiel dans l'industrie pharmaceutique, et est intéressante en tant que supplément alimentaire en raison de son effet hypocholestérolémiant. Par ailleurs, possède également un potentiel dans la fabrication de films biodégradables. En dépit de ces applications, les pectines sont, semblables à la cellulose et aux hémicelluloses, des déchets courants qui peuvent être convertis en sucres solubles, en éthanol et en biogaz.

Les pectinases microbiennes représentent 25% des ventes mondiales d'enzymes alimentaires et sont largement utilisées pour la clarification et l'extraction des jus de fruits, la fabrication de pectines sans amidon, raffinement des fibres végétales, dégomme des fibres naturelles, traitement des eaux usées, durcissement du café, du cacao et du tabac. De nombreuses enzymes sont impliquées dans la dégradation de la pectine (quelques exemples majeurs sont montrés dans la Figure II. 4.

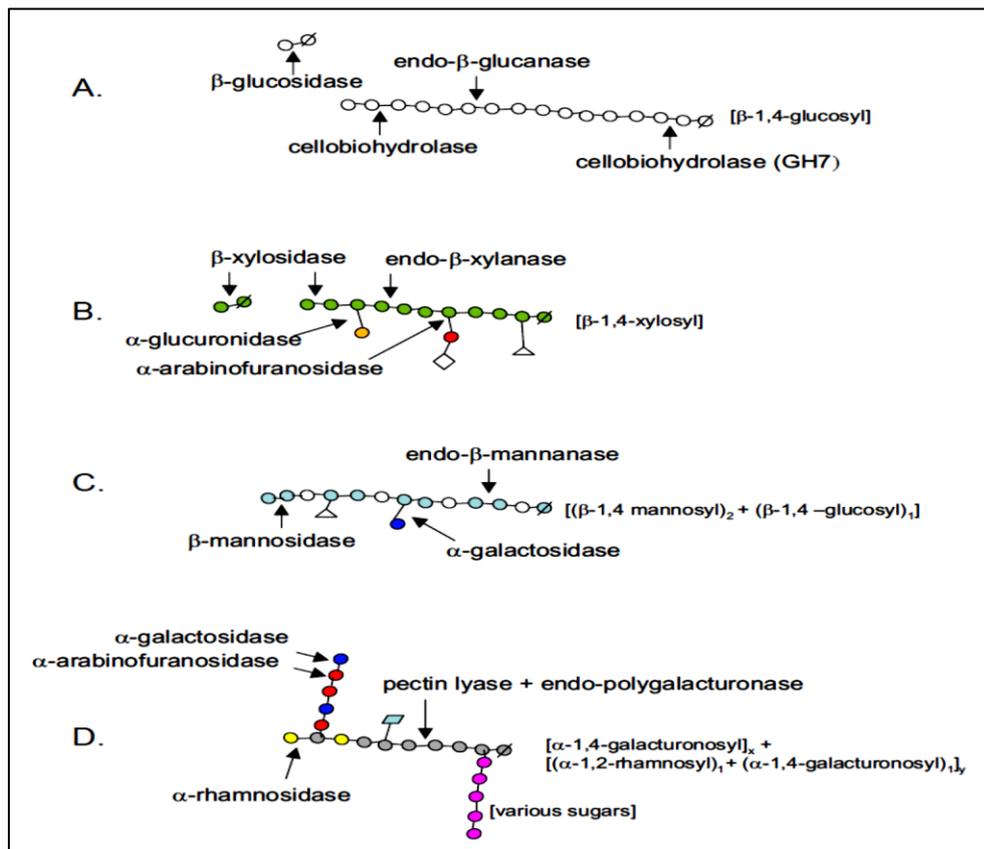


Figure II. 4: Structures simplifiées et sites d'hydrolyse enzymatique sur les polymères de lignocellulose. Chaînes de fragments de cellulose (A), fragment d'hémicellulose xylane (B), glucomannane (C), et pectine (D). Les sites d'hydrolyse de quelques enzymes majeures agissant sur les matériaux sont indiqués par des flèches.

2. Le biofuel

Pendant la crise pétrolière mondiale dans les années 70, l'intérêt pour l'utilisation de cellulases afin de produire des sucres fermentescibles a vu le jour dans l'objectif de devenir moins dépendants et de réduire les importations de pétrole.

Le bioéthanol est aujourd'hui le carburant renouvelable le plus courant. Il est couramment dérivé du maïs (amidon) ou de la canne à sucre (saccharose).

Le saccharose peut être fermenté directement en éthanol, mais l'amidon est hydrolysé en glucose avant qu'il puisse être fermenté, généralement par *Saccharomyces cerevisiae* (Figure II. 5). La fermentation de l'éthanol à partir d'amidon peut être améliorée en utilisant des enzymes et des souches microbiennes. La biomasse agricole et forestière est disponible en quantités assez importantes pour être considérée pour la production de carburants à base d'alcool.

Les déchets urbains sont une source supplémentaire de biomasse; il est estimé que la cellulose représente 40% des déchets solides municipaux. Les produits à base de cellulose peuvent être compétitifs par rapport aux produits dérivés des ressources fossiles, à condition que les coûts de transformation soient réduits.

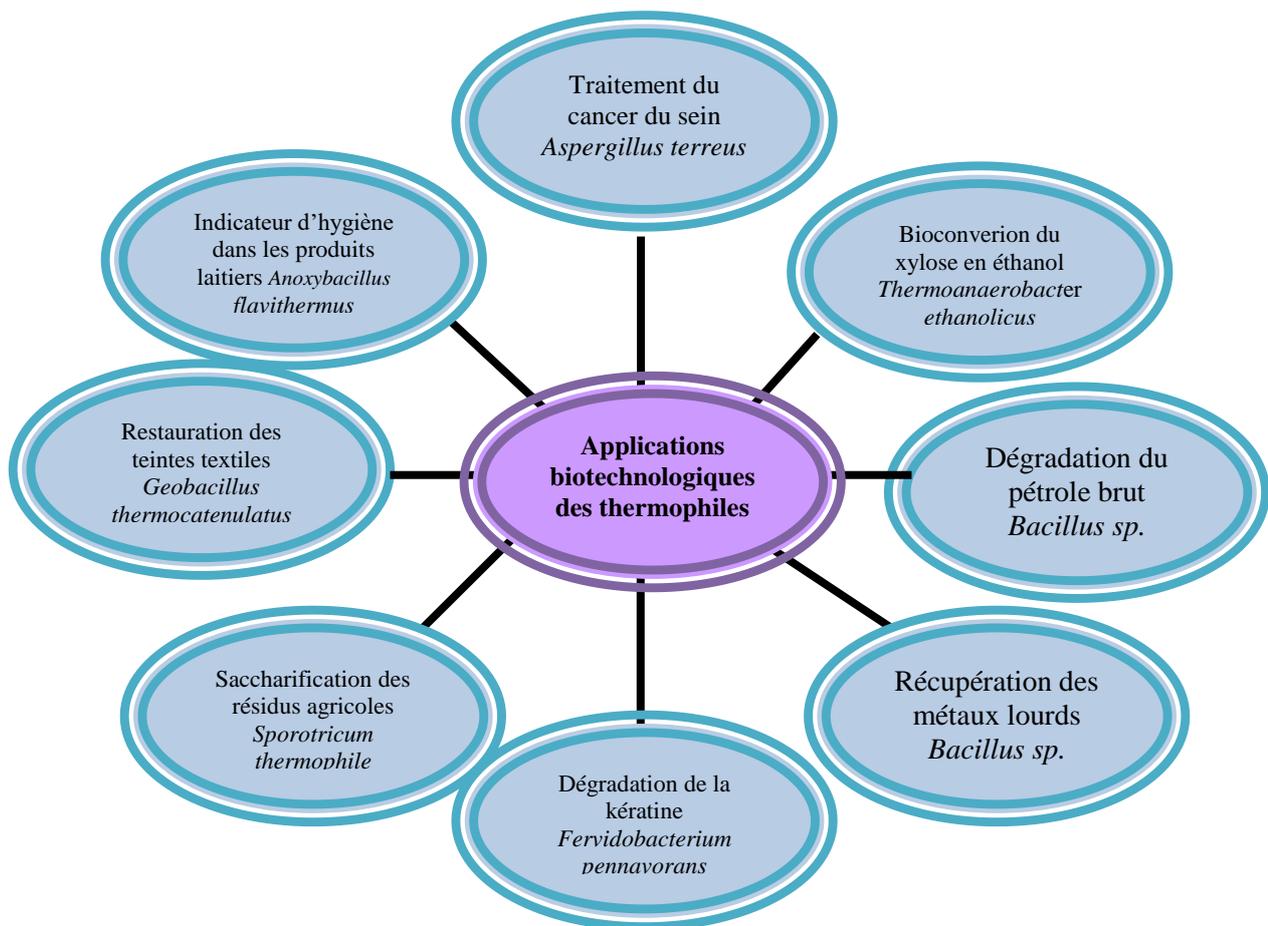


Figure II. 5: Différentes applications des microorganismes thermophiles (d'après Mehta et al, 2016)

Chapitre III

Les Halophiles

I. Définition et classification

Les organismes halophiles (du grec *halos*, sel et *philein*, aimer) sont des microorganismes qui requiert du sel (NaCl) pour leur croissance. Ils sont retrouvés dans les environnements salins ou hypersalins tels les lacs, les océans, les salines et les marais salants. Par ailleurs, environ 25% des terres émergées se présentent sous forme de dépôts salins.

Ainsi, les organismes halophiles sont des microorganismes qui affectionnent les environnements hypersalins. Ce groupe d'organismes renferme aussi bien des procaryotes que des eucaryotes qui possèdent la capacité de maintenir en équilibre la pression osmotique cellulaire mais aussi, parviennent à résister aux effets dénaturants des sels.

Les microorganismes halophiles ont été regroupés suivant les exigences en sel par des microbiologistes tels que Kushner (1987), Larsen (1986), Vreeland (1987), Ramos-Cormenzana, Tang *et al.*, (2003) et Echigo *et al.*, (2005).

Selon la concentration optimale de sel pour la croissance, ils sont classés en cinq catégories selon la classification proposée par Kushner, (1987) rapportée par Tang *et al.*, (2003):

- Non halophiles < 0,2 mol/L
- Faiblement halophiles 0,2 - 0,5 mol/L
- Halophiles modérés 0,5 – 2,5 mol/L
- Halophiles extrêmes 2,5 – 5,2 mol/L
- Halotolérants : échelle de tolérance 0,2 - 2,5 mol/L. Ce sont des organismes qui sont capables de se développer en présence de très faibles concentrations en sel tout en tolérant des concentrations élevées. A titre d'exemple, l'espèce *Halobacillus salinus* qui a été isolée à partir d'un lac salé en Corée, cette espèce se développe en absence de sel et dans des milieux contenant plus de 23% de NaCl.

Par ailleurs, Oren, (2002) proposa une autre définition : ce sont des microorganismes qui sont capables de se développer au-delà de 100 g/L (1,71 mol/L) de sel.

Quelques exemples de vitesses de croissance en fonction de la concentration en NaCl de quelques microorganismes halophiles sont illustrés dans la figure III.1.

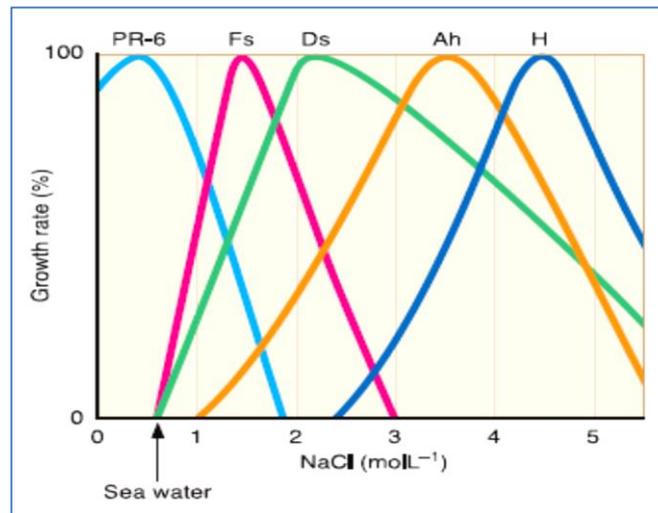


Figure III.1 : Variation du taux de croissance en fonction de la concentration en NaCl pour *Synechococcus* sp. PCC 7002 (PR-6), *Fabrea salina* (Fs), *Dunaliella salina* (Ds), *Aphanothece halophitica* (Ah), *Halobacterium* sp. NRC-1 (H) (DasSarma, 2006).

II. Ecologie des halophiles

Quels sont les environnements hypersalins ? Les géologues et les géochimistes définissent les lacs salins dans le sens littérale comme des masses d'eau dont la salinité est supérieure à 3 g/L (0.3%), alors que selon le sens stricte (hypersalins) sont des étendues d'eau qui possèdent une concentration excédant 35 g/L (3,5%) de sel.

De nombreux microbiologistes utilisent le terme hypersalin afin de définir des lacs salants bien connus, tels que la mer Morte et le grand lac salé ou étangs et salars cristallisés, des environnements souvent saturés en sel. La figure III.2 présente quelques sites naturels où prolifèrent des microorganismes halophiles.

De nombreux écosystèmes hypersalins sont rencontrés dans la nature à travers le monde, naturels soient ils ou artificiels. Les dépôts de sel rocheux étaient la source de chlorure de sodium utilisé par l'homme. Ces environnements hypersalins sont très sévères pour l'existence d'une vie normale, cependant, une variété de microorganismes : *Bacteria* et *Archaea* arrivent à survivre.

Les organismes halophiles sont largement distribués dans les environnements hypersalins de par le monde, dans des saumures naturelles hypersalines en zones arides, côtières et même en mer profonde, dans les marais salants et les lacs alcalins hypersalins, certains peuvent même se développer sur des cristaux de sel et des aliments salés.

Les environnements hypersalins sont généralement définis comme étant des environnements où la concentration en sel est supérieure à celle de l'eau de mer (35%).

Ces écosystèmes représentent un réservoir de microorganismes spécifiquement adaptés. En effet, les organismes des trois domaines de la vie ont adapté leur croissance aux environnements hautement salins, cependant, plus la concentration de sel augmente plus la diversité des groupes physiologiques diminue.

Les microorganismes halophiles se développent dans les saumures presque saturées. Ils sont remarquablement tolérants aux contraintes multiples telles que la dessiccation, la température, les métaux toxiques, le rayonnement, etc. Des souches halophiles ont même été rapportées survivant aux conditions spatiales.

Les lacs de saumures sont divisés en deux groupes : thalassiques et athalassiques. Le premier groupe résulte de l'évaporation progressive de l'eau d'une mer ou d'un lac.

Les lacs athalassiques ont des compositions salines sans rapport avec celle de l'eau de mer. Pour le premier groupe, les concentrations en sel dépassent 5 % de NaCl. Ce sont les lieux de prédilection des espèces halophiles. Les lacs continentaux résultent de processus variés. Certains tels que la mer d'Aral sont des lacs continentaux en voie d'assèchement. D'autres comme la mer Morte sont issus d'un isolement tectonique (des eaux du golfe d'Aqaba) et subissent une salinisation progressive. Le lac Natron situé au nord de la Tanzanie dans une dépression du grand rift africain, est une immense saline naturelle dont les eaux ont un pH de 9 à 10,5. De nombreux lacs continentaux, notamment dans les régions désertiques présentent cette même gamme de pH, hébergeant des espèces alcali-halophiles.

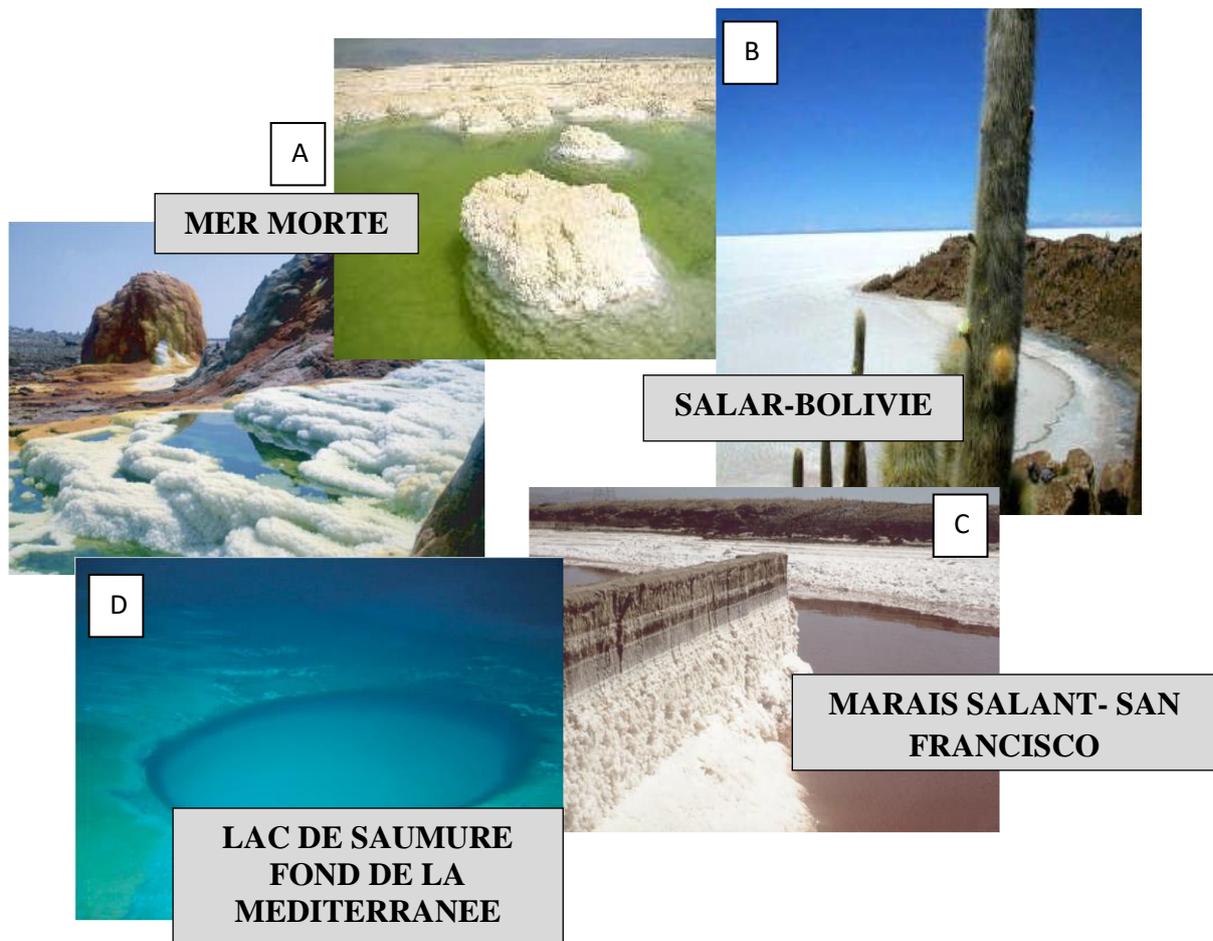


Figure III.2 : Exemples de milieux extrêmes propices à l'isolement d'espèces halophiles

A : Sécration de sel en mer Morte, Israël, **B** : Salar, Bolivie, **C** : Marais salants près de San Francisco, **D** : Lac de saumure au fond de la Méditerranée.

III. Diversité taxonomique et métabolique des microorganismes halophiles et halotolérants

1. Les archaea halophiles

Les Archaea halophiles (ordre *Halobacteriales*, famille *Halobacteriaceae*) sont les halophiles extrêmes par excellence. Presque sans exception, ils sont pigmentés de rouge rose en raison de la présence de dérivés de bactériorubérine, pigments caroténoïdes de 50 atomes de carbones qui assurent une protection contre les dommages photo-oxidatifs aux cellules. Aujourd'hui, plus de 40 genres et plus de 150 espèces d'halobactéries ont été décrites. La plupart des membres de la famille requièrent au moins 100-150 g/L de sels pour la croissance. En suspension dans des solutions contenant moins de sel, les cellules sont irréversiblement endommagées et de nombreuses espèces sont lysées après exposition à l'eau fraîche. Seuls

quelques membres de la famille peuvent croître et survivre à des concentrations en sel inférieures à 50 g/L.

Les pigments rouges des bactéries halophiles (Figure III.3) sont responsables de la coloration rougeâtre des saumures (red heat) et des poissons (yeux rouges). En plus de la bactériorubérine, la bactériorodopsine est une protéine membranaire rencontrée également chez les archées halophiles plus particulièrement chez les *Halobacteria* de la classe des *Euryarchaeota* pouvant occuper près de 50% de la surface de la cellule. Elle agit comme une pompe à protons capturant l'énergie lumineuse pour le déplacement des protons hors de la cellule à travers la membrane. Le gradient de protons résultant est ensuite converti en énergie chimique.

La huitième édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1975) a placé les halophiles extrêmes en forme de bâtonnets dans le genre *Halobacterium* avec deux espèces, *Halobacterium salinarium* et *Halobacterium halobium*, ainsi que des halophiles extrêmes coccoïdes du genre *Halococcus*, avec comme seule espèce *Halococcus morrhuae* (Gibbons 1974). Plus tard, *Hbt. Halobium* a été suggéré d'être un membre des *Archaeobacteria* par Magrum et al. (1978). Tindall et al. (1980) ont été les premiers à isoler les haloarchaea alkaliphiles qui se développent uniquement dans des milieux à pH supérieur à 7,5, et ils ont introduit les nouveaux genres *Natronobacterium* et *Natronococcus*. Deux autres genres, *Haloarcula* et *Haloferax*, ont été proposés pour accueillir de nouveaux isolats et plusieurs espèces du genre *Halobacterium*. Depuis lors, de nombreuses souches ont été isolées des environnements hypersalins réparties dans le monde entier (Figure III.4) (Tableau III.1).

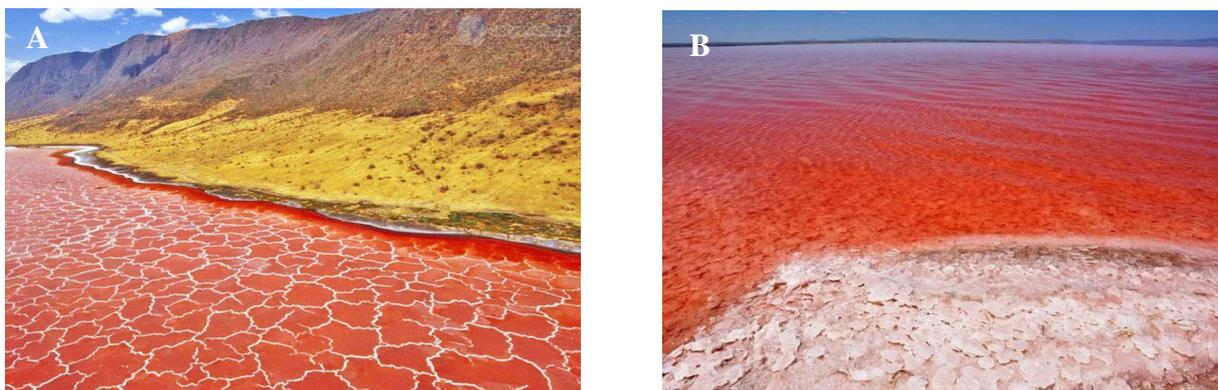


Figure III. 3 : Saumure de sel cristallisé

Saumure saturée de NaCl **A** : Lac Natron-Tanzanie, **B** : Lac Tuz-Turquie de couleur rouge due à des communautés denses d'Archaea halophiles (*Haloquadratum walsbyi* et autres), l'algue unicellulaire riche en bêta carotène *Dunaliella salina*, et probablement des bactéries pigmentés.

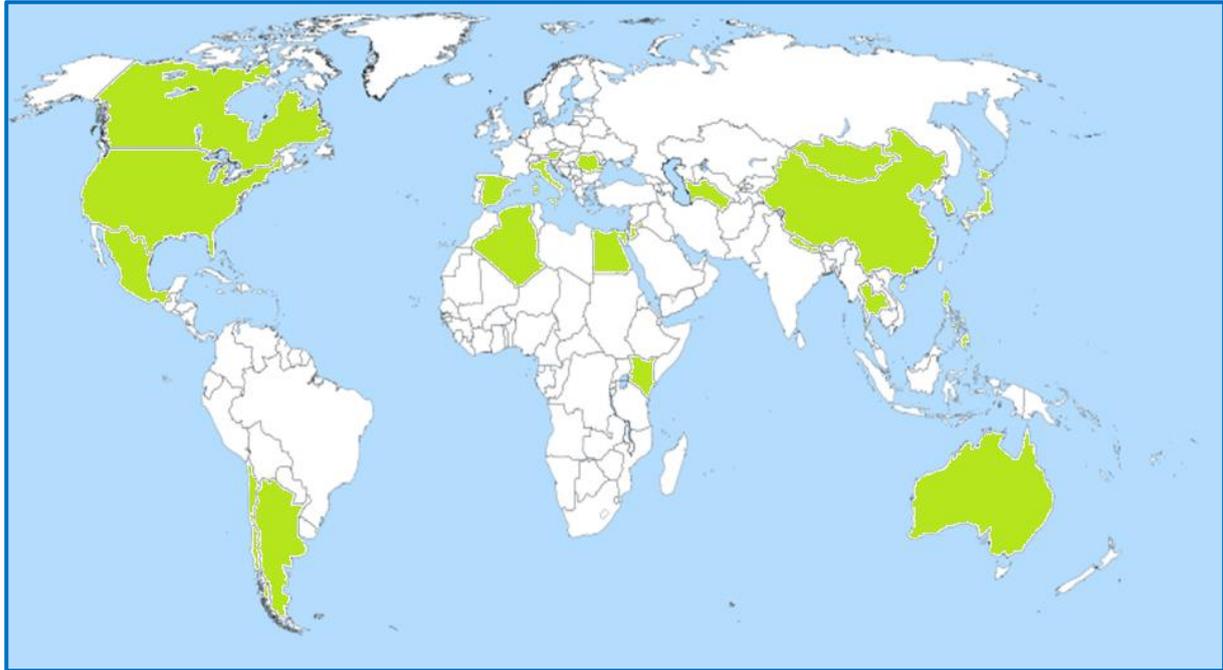


Figure III. 4 : Distribution des Archaea halophiles de par le monde

Tableau III.1 : Distribution des espèces d'Archaea halophiles et leur site d'isolement (Stan-Lotter *et al.* (2012).

| Pays | Environnement salin | Archaea |
|--------------------|--|--|
| Algérie | sabkha Ezzemoul | <i>Halorubrum ezzemoulense</i> |
| Antarctique | Deep Lake | <i>Halorubrum lacusprofundi</i> |
| Argentine | Salt flats (not specified) | <i>Haloarcula argentinesis</i> <i>Halomicrobium mukohataei</i> |
| Australie | Hamelin Pool, Shark Bay, Western Australia | <i>Halococcus hamelinensis</i> <i>Haloferax elongans</i> <i>Haloferax mucosum</i> |
| | Cheetham Salt Works, Geelong, Victoria | <i>Halonotius pteroides</i> <i>Haloquadratum walsbyi</i> <i>Halorubrum coriense</i> <i>Natronomonas moolapensis</i> |
| | Mine de sel, Altaussee | <i>Halobacterium noricense</i> |
| | Rock salt, mine de sel Bad Ischl | <i>Halococcus dombrowskii</i> <i>Halococcus salifodinae</i> |
| Canada | Salted cowhide | <i>Halobacterium salinarumb</i> |
| Chili | Lac Tebenquiche, Atacama Saltern | <i>Halomicrobium katesii</i> <i>Halorubrum tebenquichense</i> |
| | Sol salé, Daqing, Province de Heilongjiang | <i>Haloterrigena daqingensis</i> |
| Chine | Fuqing solar saltern, Province de Fujian | <i>Halorubrum litoreum</i> |
| | Rudong marine solar saltern, Province de Jiangsu | <i>Haladaptatus litoreus</i> <i>Halogeometricum rufum</i> <i>Halogramum rubrum</i> <i>Halopelagius inordinatus</i> <i>Haloplanus vescus</i> <i>Halosarcina limi</i> |
| | Solar saltern, Zhoushan | <i>Haloferax larsenii</i> |

| | | | |
|--|---|--|-------------------------------------|
| | archipelago, province Zhejiang | | |
| | Sel de mer, Qingdao, province Shandong | <i>Halococcus qingdaonensis</i> | |
| | Lac de soude Baerhu | <i>Natronolimnobius baerhuensis</i> <i>Natronolimnobius innermongolicus</i> | |
| | Lac Bagaejinnor | <i>Halorubrum kocurii</i> | |
| | Lac Chagannor, 17(C, pH 10.5 | <i>Halorubrum luteum</i> <i>Natronorubrum sediminis</i> | |
| | Lac de soude Chahannao | <i>Halobiforma nitratreducens</i> <i>Natrialba chahannaoensis</i> | |
| Chine (Région autonome de Mongolie) | Lac Ejinor | <i>Halorubrum ejinorensis</i> <i>Halorubrum orientale</i> <i>Halovivax asiaticus</i> <i>Natrinema ejinorensis</i> | |
| | Lac salé Jilantai | <i>Halobacterium jilantaiense</i> | |
| | Lac Shangmata | <i>Halopiger xanaduensis</i> | |
| | Lac Xilin Hot | <i>Halostagnicola larsenii</i> <i>Haloterrigena salina</i> <i>Halovivax ruber</i> | |
| | Unnamed lac de soude, prefecture de Hulunbeir | <i>Natrialba hulunbeirensis</i> | |
| | Bange | <i>Natronorubrum bangense</i> | |
| | Lac salé alcalin, pH 10 | <i>Natronorubrum tibetense</i> | |
| Chine (Région autonome de Tibet) | Lac Zabuye, pH 9.4 | <i>Halalkalicoccus tibetensis</i> <i>Halorubrum tibetense</i> | |
| | Lac salé Aibi (or Ebinur) | <i>Haloarcula amylolytica</i> <i>Halorubrum lipolyticum</i> <i>Haloterrigena limicola</i> <i>Haloterrigena longa</i> <i>Haloterrigena saccharevitans</i> <i>Natrinema versiforme</i> <i>Natronorubrum aibiense</i> | |
| Chine (Région autonome de Xinjiang Uygur) | Lac salé Aiding | <i>Halorubrum aidingense</i> <i>Natronorubrum sulfidifaciens</i> | |
| | Lac Xiao-Er-Kule | <i>Halorubrum xinjiangense</i> | |
| | Lac salé | <i>Halorubrum alkaliphilum</i> | |
| | Lac salé Ayakekum, Montagnes Altun, pH 7.8 | <i>Halobiforma lacisalsi</i> <i>Halorubrum arcis</i> <i>Natrinema altunense</i> | |
| Egypte | Eau salée, Sinai | <i>Haloarcula quadrata</i> | |
| | Sol salé, Aswan | <i>Halobiforma haloterrestris</i> <i>Halopiger aswanensis</i> <i>Natrialba aegyptiaca</i> | |
| | Solar saltern, Alexandria | <i>Haloferax alexandrinus</i> | |
| | Oued Natrun | <i>Natronomonas pharaonis</i> | |
| Israel/Jordanie | La mer Morte | <i>Haloarcula marismortui</i> <i>Halobaculum gomorrense</i> <i>Halococcus morrhuaec</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Haloplanus natans</i> <i>Halorubrum sodomense</i> | |
| | Italie | “Red heat” in salted hides | <i>Natrinema pellirubrumd</i> |
| | | Sel, Trapani, Sicily | <i>Halorubrum trapanicumd</i> |
| | | Sel, Niigata | <i>Natronoarchaeum mannanylicum</i> |
| | Japon | Terrain salé, Ishikawa | <i>Haloarcula japonica</i> |
| Sable de mer | | <i>Natrialba asiatica</i> | |

| | | |
|---------------------|---|--|
| Kenya | Lac Magadi | <i>Halorubrum vacuolatum</i> <i>Natrialba magadii</i> <i>Natronobacterium gregoryi</i> <i>Natronococcus amylolyticus</i> <i>Natronococcus occultus</i> |
| Mexique, | Eau salé, Baja California | <i>Halorubrum chaoviator</i> |
| Phillipines | Eau salé | <i>Halarchaeum acidiphilum</i> |
| Puerto Rico | Eau salé, Cabo Rojo | <i>Halogeometricum borinquense</i> <i>Haloterrigena thermotolerans</i> |
| Mer Rouge | Shaban Deep, interface de sédiments (profondeur de 1,447 m, pH 6.0) | <i>Halorhabdus tiamatea</i> |
| Roumanie | Lac Telega, Prahova | <i>Haloferax prahovense</i> |
| Korée du Sud | Sédiments salés Jeotgal | <i>Haladaptatus cibarius</i> <i>Halalkalicoccus jeotgali</i> <i>Halorubrum cibi</i> <i>Haloterrigena jeotgali</i> <i>Natronococcus jeotgali</i> |
| Espagne | Lac salé Fuente de Piedra, Malaga | <i>Haloterrigena hispanica</i> |
| | Sel, San Fernando, Cadiz | <i>Halococcus saccharolyticus</i> |
| | Sel, Santa Pola, Alicante | <i>Haloarcula hispanica</i> <i>Haloferax gibbonsi</i> <i>Haloferax lucentense</i> <i>Haloferax mediterranei</i> |
| Taiwan | Sel | <i>Natrialba taiwanensis</i> |
| Thaïlande | Aliments salés fermentés (Ka-pi, Nam-pla, Pla-ra) | <i>Halobacterium piscisalsi</i> <i>Halococcus thailandensis</i> <i>Natrinema gari</i> |
| Turkmenistan | Sol salin | <i>Halorubrum distributum</i> <i>Halorubrum terrestre</i> <i>Haloterrigena turkmenica</i> |
| USA | Legrand lac salé, Utah | <i>Halorhabdus utahensis</i> |
| | La vallée de la mort, Californie | <i>Haloarcula vallismortis</i> |
| | Saumure, San Francisco Bay, Californie | <i>Haloferax denitrificans</i> <i>Halorubrum saccharovororum</i> |
| | Cargill Solar Salt Plant, Newark, Californie | <i>Halorubrum californiense</i> |
| | Cristaux de roche saalins, Carlsbad, New Mexico Zodletone Spring, Oklahoma | <i>Halosimplex carlsbadense</i> <i>Haladaptatus paucihalophilus</i> <i>Haloferax sulfurifontis</i> <i>Halosarcina pallida</i> |

^a*Natrinema pallidum* NCIMB 777 a été isolés à partir d'un poisson d'eau de mer, le site d'isolement n'est pas défini. ^bLochhead (1934), ^cKocur and Hodgkiss (1973), ^dOn-line catalog de NCIMB

2. Caractéristiques générales des archaea halophiles extrêmes

2.1. Caractères culturels et morphologiques

Les colonies des archaea halophiles sont caractérisées par une couleur rouge, rose voir rouge mauve sur milieu solide et très rarement incolores. Cette coloration typique est principalement due à la présence de la bactériorubérine, pigment caroténoïde qui joue un rôle

de protection contre les dommages photo-oxidatifs et de la bactériorhodopsine qui participe à la synthèse d'ATP et au transport actif.

Les cellules archéennes sont des microorganismes à Gram négatif, de formes diverses : cocci, bacilles, triangulaire ou encore sphériques. Elles peuvent être immobiles ou mobiles grâce à des flagelles polaires lophotriches.

2.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Depuis que les deux genres représentatifs des archées halophiles *Halobacterium* et *Halococcus* ont été isolées pour la première fois, à partir d'un aliment salé il y'a plus d'un siècle, ces microorganismes ont longtemps fasciné les scientifiques grâce à leurs propriétés non communes et uniques par rapport aux autres formes de vie sur Terre, comme la publication de Larsen en 1973 : « The Halobacteria's confision to Biology ».

Les *Halobacteriaceae* sont typiquement des organismes aérobies qui utilisent des substrats organiques comme source de carbone et d'énergie. Leur potentiel métabolique a été considéré par le passé comme limité aux acides aminés et acides organiques; de nombreuses espèces utilisent également des sucres simples ainsi que des polymères tels que l'amidon, les protéines et les lipides. Suite aux études de Falb et al. (2008) et Andrei et al. (2012), il a été mis en évidence que la diversité métabolique de ce groupe de microorganismes a été sous-estimé par le passé. En effet, certains représentants ont la capacité de métaboliser des hydrocarbures et des composés aromatiques. Certaines espèces du genre *Halobacterium* arrivent à se développer en absence d'oxygène moléculaire par fermentation de l'arginine. De nombreuses espèces se développent en anaérobiose avec le nitrate comme accepteur final d'électrons tandis que d'autres membres arrivent à se développer en utilisant d'autres accepteurs d'électrons tels que le diméthylsulfoxyde, le triméthyl-N-oxide, ou encore le fumarate. De plus, certaines espèces d'*Halobacteriaceae* sont polyextrêmophiles combinant la capacité de croitre en présence de fortes concentrations en sel, pour aussi bien la croissance que pour la stabilité structurale, avec la capacité de se développer en présence de conditions extrêmes de pH et de températures. De nombreux genres de la famille sont haloalcaliphiles qui ne se développent qu'en condition alcalines du milieu pH 9-11. Par ailleurs, une espèce unique acidophile a été décrite : *Halarchaeum acidiphilum*. Cet organisme se développe uniquement en conditions acides de pH entre 4,1 et 4,8. Franzmann et al. (1988) ont isolé l'espèce *Halorubrum lacusprofundi* à partir des profondeurs d'un lac en Antarctique. C'est une espèce psychrophile facultatif qui peut croitre à une température inférieure à 4°C alors que sa température optimale de croissance est aux alentours de 30°C.

D'autre part, Tous les membres halophiles des Archaea ne font pas partie de l'ordre des *Halobacteriales*. Il existe également quelques genres méthanogènes halophiles obligatoires (*Methanohalophilus*, *Methanohalobium*) pouvant tolérer des concentrations très élevées en sel.

La classe *Halobacteria* renferme 3 ordres *Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales*. L'ordre *Halobacteriales* comporte 3 familles : *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* et *Halococcaceae*. L'ordre *Haloferacales* est constitué de la famille représentative de l'ordre *Haloferacaceae* et *Halorubraceae*. Tandis que l'ordre des *Natrialbales* renferme une famille unique *Natrialbaceae*.

3. Les bactéries halophiles

3.1. Taxonomie et physiologie

Les bactéries halophiles constituent un groupe de microorganismes physiologiquement hétérogène qui appartiennent à plusieurs genres. Depuis 1980, uniquement six espèces halophiles modérées ont été approuvées et la plupart des souches ont été isolées à partir d'aliments cuits salés, de sel non raffiné ou même de contaminants de culture au laboratoire.

L'étude intensive des écosystèmes hypersalins de par le monde a permis l'isolement et la caractérisation taxonomique d'un nombre important d'isolats halophiles modérés. Ainsi, les halophiles sont représentées par des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, Gram positif ou négatif.

Malgré que certaines espèces Gram négatif aient été considérées comme des membres de différents genres (*Halomonas*, *Deleya*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Halovibrio*, ou *Chromobacterium*), ils sont inclus actuellement dans la famille *Halomonadaceae* comme membre de deux genres: *Halomonas* et *Chromohalobacter*.

Parmi les membres de la famille *Halomonadaceae*, de nombreuses autres espèces Gram négatif aérobies strictes ou anaérobies facultatifs ont été décrites comme des halophiles modérés appartenant aux genres renfermant des espèces non halophiles telles que *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Spirochaeta* alors que d'autres sont placées dans des genres représentés par des espèces halophiles : *Salinivibrio*, *Arhodomonas*, ou *Dichotomicrobium*

Parmi ces organismes, trois espèces ont été intensivement utilisées pour des analyses physiologiques et biochimiques afin d'étudier les mécanismes de l'haloadaptation: *Salinivibrio costicola*, *Halomonas elongata*, et *Halomonas israelensis*.

La figure III.5 et le tableau III.2 illustrent la distribution et les sites d'isolement des bactéries halophiles de par le monde ainsi que leur intervalle de tolérance et la concentration optimale de NaCl.

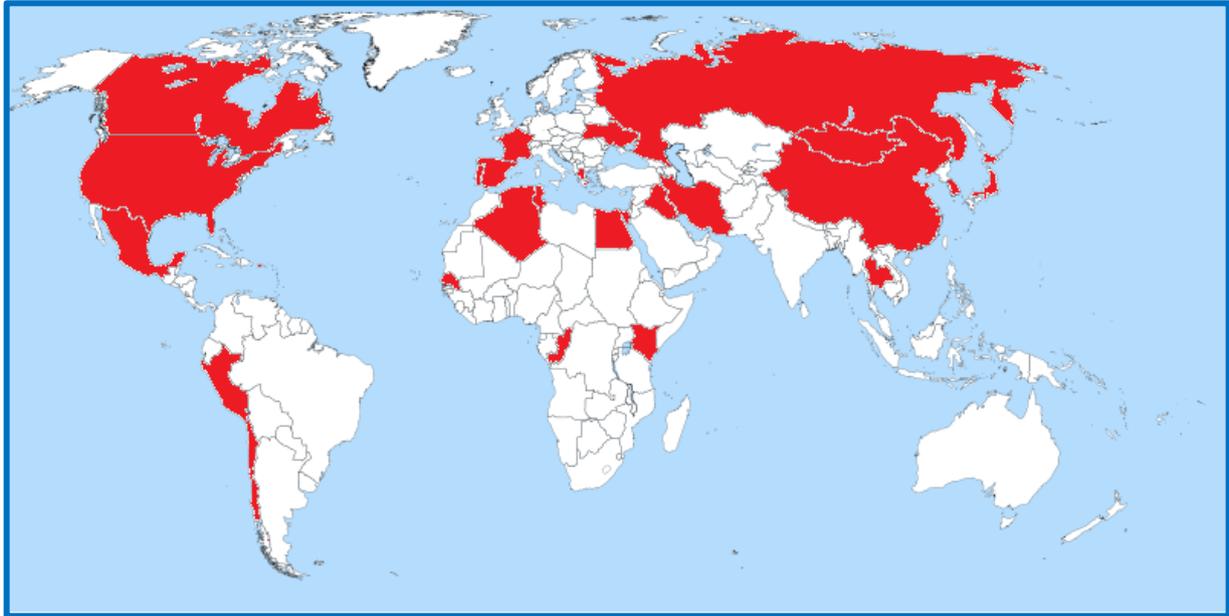


Figure III.5 : Distribution des bactéries halophiles de par le monde

Tableau III.2 : Distribution des bactéries halophiles de par le monde (Stan-Lotter *et al.*, 2012).

| Pays | Environnement salin | Bactéries | Intervalle de NaCl (%) | Optimum NaCl (%) |
|---------|---|-------------------------------------|------------------------|------------------|
| Algérie | Sabkha Ezzemoul | <i>Halomonassabkhae</i> | 5-25 | 7,5 |
| | | <i>Salicola salis</i> | 10-25 | 15-20 |
| Canada | Contaminant sur boîte de gélose | <i>Actinopolyspora halophile</i> | 10-33 | 15-20 |
| Chili | Solar saltern, Cahuil, Pichilemu | <i>Halomonasnitroreducens</i> | 3-20 | 5-7,5 |
| Chine | Lac salé Xiaochaidamu, Qinghai province | <i>Gracilibacillus halophilus</i> | 7-30 | 15 |
| Congo | Echantillons à partir de puits de pétrole | <i>Halanaerobium congolense</i> | 4-24 | 10 |
| Egypte | Oued Natrun | <i>Natronaerobius thermophilus</i> | 18-29 | 19-32 |
| | | <i>Natronaerobius trueperi</i> | 19-31 | 22 |
| | | <i>Natronovirga wadinatrunensis</i> | 19-31 | 23 |
| | | <i>Thiohalospira alkaliphila</i> | 3-23 | 12 |
| France | Salin-de-Giraud, Camargue | <i>Halanaerobacter salinaricus</i> | 5-30 | 14-15 |
| | | <i>Halorhodospira neutriphila</i> | 6-30 | 9-12 |
| | | <i>Thiohalocapsa halophila</i> | 3-20 | 7 |
| Grèce | Saltworks, Mesolongi | <i>Bacillus halocharis</i> | 6-23 | 15 |
| Iran | Lac Aran-Bidgol Lac Howz Soltan | <i>Lentibacillus persicus</i> | 3-25 | 7,5-10 |
| | | <i>Bacillus persepolensis</i> | 5-20 | 10 |

| | | | | |
|------------------------------------|---|---------------------------------------|------------------|----------|
| Iraq | Sol salin | <i>Actinopolyspora iraqiensis</i> | 5–20 | 10–15 |
| Israel/Jordanie | Mer Morte | <i>Rhodovibrio sodomensis</i> | 6–20 | 12 |
| | | <i>Salisaeta longa</i> | 5–20 | 10 |
| | | <i>Selenihalanaerobacter shriftii</i> | 10–24 | 21 |
| | | <i>Virgibacillus marismortui</i> | 5–25 | 10 |
| Japon | Sel | <i>Nesterenkonia halobia</i> | 3–25 | – |
| | Aliments salés | <i>Chromohalobacter japonicus</i> | 5–25 | 7,5–12,5 |
| | | <i>Halanaerobium fermentans</i> | 7–25 | 10 |
| Kenya | Lac Magadi | <i>Natroniella acetigena</i> | 10–26 | 12–15 |
| Koweït | Salt marshsoil | <i>Saccharomonospora halophila</i> | 10–30 | – |
| Mexico | Solar saltern, Baja California | <i>Halospirulina tapeticola</i> | 3–20 | 10 |
| | Brine water, Gulf of Mexico | <i>Halanaerobium acetethylicum</i> | 5–22 | 10 |
| Mongolie | Barun-Davst-Nur | <i>Halovibrio denitrificans</i> | 12–30 | 12–15 |
| Perou | Maras salterns, Andes | <i>Salicola marasensis</i> | 10–30 | 15 |
| Portugal | Terminal pond of a saltern | <i>Rhodovibrio salinarum</i> | 3–24 | 9–15 |
| Puerto Rico | Black mangrove, solar saltern de Cabo Rojo | <i>Halobacillus mangrove</i> | 5–20 | 10 |
| Russie | Kulunda Steppe, Altai | <i>Halospina denitrificans</i> | 12–30 | 15–18 |
| | | <i>Methylohalomonas lacus</i> | 3–23 | 12 |
| | | <i>Thiohalorhabdus denitrificans</i> | 9–23 | 18 |
| | | <i>Thiohalospira halophila</i> | 12–30 | 15–18 |
| | | <i>Thiomicrospira halophila</i> | 3–20 | 9 |
| Senegal | Lac Retba | <i>Halanaerobium lacusrosei</i> | 7,5 à saturation | 18–20 |
| | Byunsan solar saltern, Yellow Sea | <i>Lentibacillus salinarum</i> | 3–24 | 10–12 |
| | | <i>Alkalibacillus flavidus</i> | 4–26 | 10 |
| | | <i>Salinisphaera dokdonensis</i> | 4–21 | 10 |
| Corée de Sud | Kunsan solarsaltern | <i>Nocardopsis kunsanensis</i> | 3–20 | 10 |
| | Jeotgal (salty condiment) | <i>Lentibacillus jeotgali</i> | 3–20 | 10–15 |
| Espagne | Sol de Fuente de Piedra, saline wetland, Malaga | <i>Halomonas fontilapidosi</i> | 3–20 | 5–7,5 |
| | Cabo de Gata solar saltern, Almeria | <i>Halomonas almeriensis</i> | 5–25 | 7,5 |
| | | <i>Kushneria indalinina</i> | 3–25 | 7,5–10 |
| | | <i>Salinicola halophilus</i> | 3–25 | 7,5–10 |
| | Mallorca solar saltern, Iles Baléare | <i>Salinibacter rubber</i> | 15–33 | 20–30 |
| Santa Pola solar saltern, Alicante | <i>Halomonas cerina</i> | 7,5–20 | 7,5–10 | |
| | <i>Virgibacillus salxingens</i> | 7–20 (salts) | 10 (salts) | |
| Thaïlande | Aliments fermentés salés (Kapi, Nampla, Plara) | <i>Lentibacillus halophilus</i> | 12–30 | 20–26 |
| | | <i>Lentibacillus juripiscarius</i> | 3–30 | 10 |
| | | <i>Lentibacillus kapialis</i> | 5–30 | 15 |
| Tunisie | Chott El Guettar | <i>Halothermothrix orenii</i> | 4–20 | 10 |
| | Chott El-Djerid | <i>Halanaerobaculum tunisiense</i> | 14–30 | 20–22 |
| Ukraine | Lac Sivash, Crimée | <i>Halanaerobium saccharolyticum</i> | 3–30 | 10 |
| | | <i>Halocella cellulositytica</i> | 5–20 | 15 |

| | | | | |
|-----|--|--------------------------------------|-----------------|------------|
| | | <i>Orenia sivashensis</i> | 5–25 | 7–10 |
| | Le grand lac salé, Utah | <i>Halomonas variabilis</i> | 7–29 | 9 |
| | La vallée de la mort, Californie | <i>Actinopolyspora mortivallis</i> | 5–30 | 10–15 |
| | Saltern, Bay de San Francisco, Californie | <i>Halanaerobacter chitinivorans</i> | 3–30 | 12–18 |
| USA | Eau de mer évaporée, Oregon | <i>Rhodothalassium salexigens</i> | 5–20 | 12 |
| | Saline oil field | <i>Arhodomonas aquaeolei</i> | 6–20 | 15 |
| | brine, Oklahoma | <i>Halanaerobium salsuginis</i> | 6–24 | 9 |
| | Lac de Searles, California | <i>Halarsenatibacter silvermanii</i> | 20 à saturation | saturation |

IV. Mécanismes d'adaptation à la vie en milieu hypersalin

Un grand nombre d'extrémophiles ont été isolés à partir de niches écologiques où leur développement n'était pas attendu. En effet, l'intégrité des microorganismes halophiles en milieu salin exige le maintien d'un équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu environnant. Pour ce faire, ils ont développé des mécanismes afin de s'adapter à l'environnement hypersalin.

Ainsi, les microorganismes halophiles possèdent la capacité d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement et de résister aux effets dénaturants des sels par la sécrétion d'osmolytes tels que la glycine, la betaine, l'ectoïne, les sucres simples, certains acides aminés, dérivés d'acides aminés et autres. Les composés portent le nom de solutés compatibles en raison de leur compatibilité avec le métabolisme cellulaire à des concentrations élevées en sel.

Les solutés compatibles, plus spécialement, la glycine, la bétaine et l'ectoïne agissent comme agents protecteurs contre le stress salin, stabilisateurs d'enzymes, d'acides nucléiques ainsi que des parois cellulaires.

1. Régulation de la pression osmotique

A faible concentration, le sel (NaCl) est indispensable au fonctionnement cellulaire, mais à forte dose, il entraîne la mort cellulaire par sortie d'eau due à la perméabilité membranaire.

La propriété de base de tous les microorganismes halophiles est le fait que leur cytoplasme est iso-osmotique avec les milieux environnants.

Deux stratégies fondamentales différentes ont été identifiées chez les microorganismes halophiles afin d'équilibrer la pression osmotique de leur cytoplasme avec leur milieu.

➤ La première permet l'accumulation de concentrations molaires de KCl.

Cette stratégie nécessite l'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire, telles que les protéines qui doivent maintenir leur conformation propre ainsi que leur activité à des concentrations saturantes en sel. Le protéome de tels organismes est hautement acide et la plupart des protéines se dénaturent lorsqu'elles sont en suspension dans des concentrations faibles en sel. De tels microorganismes sont généralement incapables de survivre dans des milieux de culture à faible concentration en NaCl.

Cette stratégie d'adaptation « *salt-in* » est rencontrée chez les archaea halophiles extrêmes de la famille *Halobacteriaceae* mais également chez quelques groupes bactériens.

➤ La seconde stratégie est l'exclusion du sel à partir du cytoplasme et/ou de l'accumulation de solutés compatibles organiques qui n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique.

La seconde stratégie est, toutefois, la plus largement rencontrée dans la nature, basée sur la biosynthèse et /ou l'accumulation de solutés compatibles organiques, et peut être rencontrée dans les trois domaines du vivant.

La plupart de ces composés sont des sucres et polyols tels que le tréhalose et le glycérol, des acides aminés tels que le glutamate et la proline et des dérivés d'acides aminés tels que la bétaine et l'ectoïne. Ces osmolytes peuvent être soit synthétisés par la cellule ou bien transportés du milieu vers la cellule.

Leurs accumulations aide à maintenir la pression, le volume cellulaire ainsi que la concentration des électrolytes; tous, des éléments importants pour le développement cellulaire. En plus de leurs fonctions comme substances osmotiquement actives, les solutés compatibles peuvent jouer le rôle de chaperons protégeant les protéines de la dénaturation.

Les osmolytes organiques sont classés en général en trois catégories chimiques (Figure III. 6):

(i) Solutés zwitterions : tels que : la bétaine, l'ectoïne et l'hydroxyectoïne,

(ii) Solutés non chargés : tels que les hydrates de carbone : α -glucosylglycerol et tréhalose.

Le tréhalose est un soluté compatible rencontré chez l'espèce *Actinopolyspora halophila* qui peut atteindre une concentration supérieure à 9,7% du poids sec.

(iii) Solutés anioniques : tels que : β -glutamate et β -Hydroxybutyrate.

Le β -glutamate est rencontré chez l'espèce halophile *Nocardiopsis halophila*.

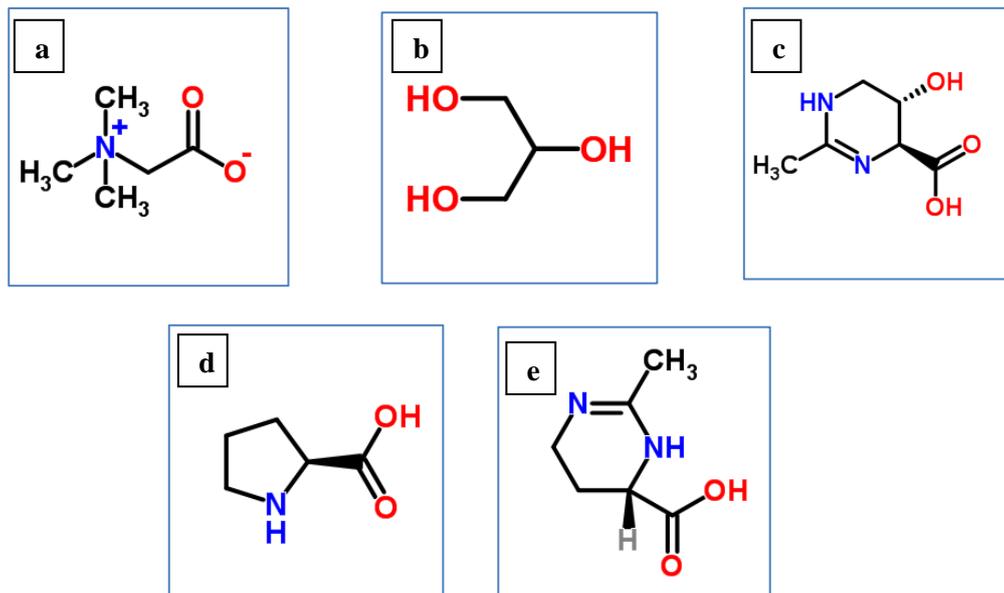


Figure III. 6 : Quelques exemples de structures de solutés compatibles : **a)** Glycine bétaine **b)** Glycerol **c)** hydroxyectoine **d)** L–Proline **e)** ectoine

2. Adaptation des protéines à l'hypersalinité

La stabilité, l'activité et la dynamique des protéines sont des paramètres d'une grande importance, non seulement, dans les processus physiologiques, mais également dans l'ingénierie des protéines. La présence de concentrations molaires en sels est généralement préjudiciable aux protéines et aux autres macromolécules. En effet, cela cause des agrégations et des effondrements de la structure tertiaire à cause de l'augmentation des interactions hydrophobes, qui interfèrent avec des interactions électrostatiques intra ou inter macromoléculaires dues aux charges, mais également à cause de l'hydratation des ions de sel qui réduit la disponibilité des molécules d'eau libres en dessous du taux requis au maintien des processus biologiques essentiels.

L'évolution des structures protéiques vers une stabilité extrême est vitale pour les halophiles. En général, les protéines de ces organismes sont intrinsèquement résistantes à la dénaturation. Cependant, ils possèdent également des protéines intracellulaires qui ne sont pas particulièrement stables, ce qui implique l'existence de stratégies alternatives pour leur stabilisation in vivo.

Deux stratégies peuvent être utilisées pour répondre à ce type de stress :

➤ **Stratégie du « *Salt in* »**

En accumulant dans leur cytoplasme des quantités de sel proche de la saturation, les bactéries halophiles empêchent la sortie d'eau mais se soumettent à un nouveau type de stress cellulaire : le stress salin. Avec de telles concentrations, des protéines « normales » deviennent insolubles et précipitent. Toutefois, les organismes halophiles ne semblent pas connaître ce stress cellulaire : leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles à de fortes concentrations en KCl, mais elles se dénaturent lorsque la concentration en sel diminue. L'analyse des concentrations ioniques intracellulaires, chez différentes espèces d'archaea halophiles, montre que ces microorganismes maintiennent leur milieu intracellulaire à des concentrations relativement élevées en sel.

Pour ce faire, les protéines halophiles concentrent fortement le sel près de leur surface et utilisent ses capacités hygroscopiques pour capturer les molécules d'eau nécessaires à leur repliement, leur stabilisation et leur solubilité. Ce phénomène est rendu possible par une abondance d'acides aminés acides tels que les acides glutamique et aspartique, connus pour interagir fortement avec les molécules d'eau et les cations tels que K^+ , comparativement aux protéines des bactéries non halophiles qui sont chimiquement neutres.

➤ **Stratégie du « *low salt in* »**

La seconde stratégie est rencontrée chez la plupart des bactéries halophiles, elle implique la maintenance d'une concentration en sel plus faible que celle du milieu extracellulaire et l'accumulation ou la production de solutés compatibles.

Les halophiles accumulent des niveaux élevés d'osmolytes chargés en réponse à des concentrations importantes en sel, et cette observation a conduit à l'hypothèse que ces composés jouent un rôle dans l'haloprotection des macromolécules *in vivo*.

Cette accumulation est une réponse secondaire faisant suite à une réponse primaire à un choc hyperosmotique, cette dernière consiste en l'accumulation d'ions K^+ empêchant la plasmolyse et conduisant à la restauration de la pression de turgescence en préservant l'équilibre osmotique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, c'est une réponse à court terme et survenant dès qu'il y a modification de l'osmolarité extracellulaire.

La réponse secondaire qui consiste en l'accumulation de solutés compatible est une réponse à long terme, car ces osmoprotecteurs peuvent être accumulés à de très fortes concentrations dans le cytoplasme des cellules exposées au stress osmotique.

Plusieurs mécanismes possibles de stabilisation des protéines par les osmolytes ont été proposés. Arakawa et Timasheff (1983, 1985) ont proposé un modèle d'hydratation préférentiel pour expliquer la stabilisation des protéines par des solutés compatibles: les

molécules de soluté sont exclues de la surface de la protéine, rendant ainsi la dénaturation entropiquement moins favorable.

Une autre approche, proposée par Bolen et ses collègues (1995, 1998), décrit la nature stabilisante des interactions entre les solutés et les groupes exposés dans la structure protéique. Dans cette proposition, l'effet stabilisant est attribué principalement à une large contribution des interactions avec les groupes exposés dans un état partiellement déplié.

3. Adaptation des acides nucléiques à l'hypersalinité

Les effets des solutés compatibles sur les propriétés des acides nucléiques et les complexes acide nucléique/protéine sont connus depuis un certain temps. Outre leur exploitation pour des applications *in vitro*, ils sont également d'une grande importance *in vivo* et ont un impact important sur les fonctions vitales.

Selon l'étude de Kurz (2008), la construction d'un modèle pour décrire les interactions entre les solutés compatibles et les acides nucléiques est plus complexe que pour les interactions entre les solutés et les protéines car plusieurs effets doivent être pris en considération comme il est résumé dans la figure III. 7 : interactions directes avec les bases d'acides nucléiques ou encore avec le squelette phosphaté chargé négativement et des interactions indirectes via les changements dans les propriétés des solvants.

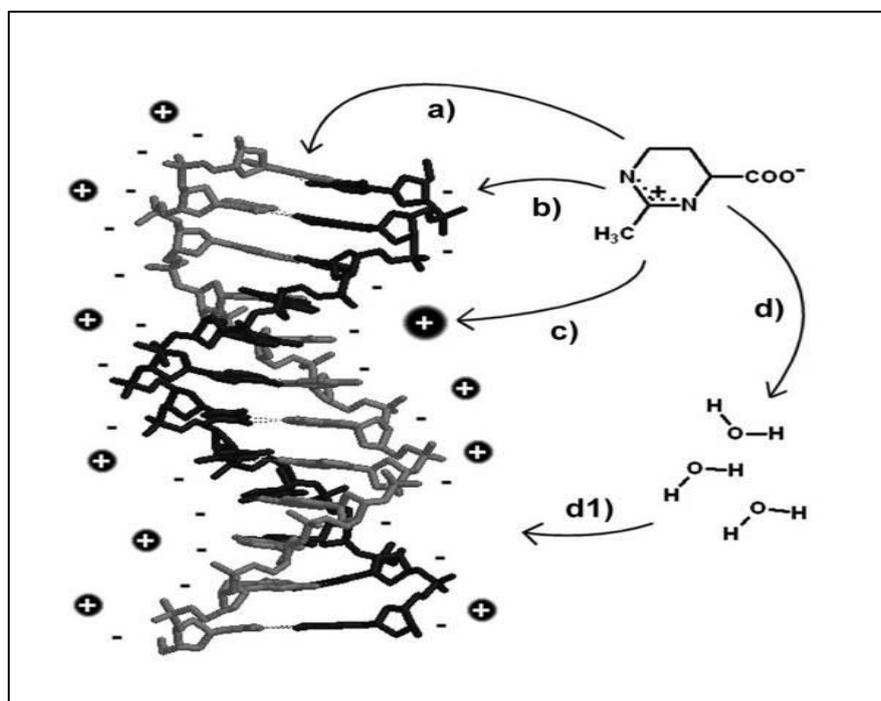


Figure III. 7 : Interactions des solutés compatibles avec l'ADN.

Les interactions peuvent être directes avec **a)** les bases simples, les paires de bases **b)** le squelette phosphate-sucre chargé négativement ou indirectement par l'influence sur **c)** contre-ions **d)** les propriétés du solvant qui influencent ensuite l'ADN (Kurz, 2008).

V. Potentiel biotechnologique des organismes halophiles

Les microorganismes halophiles ont été explorés pour leur potentiel biotechnologique dans différents domaines. Les applications vont de l'utilisation de différents produits, tels que les solutés compatibles, les biopolymères ou les caroténoïdes dans une variété d'industries ainsi qu'en bioremédiation. En plus d'être intrinsèquement stable et actives à haute teneur en sel, les enzymes halophiles offrent des opportunités importantes dans les applications biotechnologiques, telles que la transformation des aliments, la bioremédiation et les processus de biosynthèse. Dans ce sens, la découverte de nouvelles enzymes montrant des activités optimales dans différentes gammes de concentrations de sel, de températures et de valeurs de pH revêt une grande importance.

Les microorganismes halophiles possèdent des propriétés physiologiques très intéressantes qui facilitent leur exploitation dans le domaine commercial. En effet, la plupart de ces microorganismes sont capables de se développer à des concentrations élevées en sel minimisant ainsi les risques de contamination. De plus, ils sont facilement cultivables car leurs exigences nutritionnelles sont simples: la majorité sont capables d'assimiler une large gamme de composés comme source de carbone et d'énergie. Ces capacités caractéristiques font des organismes halophiles un précieux potentiel biotechnologique. Les microorganismes halophiles peuvent produire une large variété de molécules à intérêt biotechnologique tels que : bactériorhodopsine, halorhodopsine, solutés compatibles, biopolymères, biosurfactants, exopolysaccharides, des agents de saveurs, des enzymes hydrolytiques telles que hydrolases, nucléases, amylases, cellulases, protéases, lipases, des agents antitumoraux, et des liposomes.

D'après l'étude effectuée par Heinrich et al. (2007), l'ectoïne produite par les microorganismes halophiles, appartenant au groupe des solutés compatibles, pour répondre au stress salin, est utilisée dans de nombreuses préparations cosmétiques. Cette molécule présente un potentiel immunoprotecteur contre les radiations UV du soleil, car elle permet de prévenir les mutations induites par les UVA sur l'ADN mitochondrial au niveau des fibroblastes dermiques. L'ectoïne joue le rôle d'un produit antiâge car protégeant la peau des effets nocifs des radiations solaires.

Par ailleurs, les microorganismes halophiles modérés sont utilisés dans le traitement des effluents salins rejetés par les industries, comme les industries pharmaceutiques et chimiques, grâce à leur capacité à dégrader les composés toxiques. L'espèce *Dietzia maris*, actinobactérie d'origine marine est capable de dégrader la paraffine ainsi que d'autres dérivés de pétrole à des concentrations de NaCl supérieures à 10%. L'actinobactérie halotolérante *Streptomyces albiacialis* est capable de croître à un taux de salinité supérieur à 30% en utilisant du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie.

Les microorganismes halophiles possèdent de nombreuses autres potentialités, utilisées en biotechnologie qui peuvent être exploitées car étant une source potentielle de nouvelles molécules actives et sables aux conditions extrêmes de salinité.

1. Production d'enzymes

Un nombre limité de bactéries halophiles présentant des activités hydrolytiques ont été isolées et caractérisées à partir de différents habitats hypersaliens (Tableau III. 3).

Trois types d'activités enzymatiques sont à distinguer : i) Les enzymes intracellulaires, qui ne sont pas exposées au sel du milieu, dans la plupart du temps caractérisées par la présence de concentrations faibles en ions ainsi que les solutés compatibles. ii) Les activités enzymatiques liées à la membrane renfermant les protéines de transport, qui détectent à la fois l'environnement intracellulaire et le milieu extérieur et iii) les enzymes extracellulaires, exposées aux conditions salines du milieu extérieur.

Les travaux de Sanchez-Poro et al. (2003) ont démontré l'abondance de cinq hydrolases de type amylases, protéases, lipases, DNase et pullulanases dans une communauté de bactéries halophiles modérées isolées à partir d'eau et de sédiments en Espagne, rapportant l'abondance de producteurs d'amylases.

La plupart des isolats capables de produire des enzymes hydrolytiques sont des bactéries à Gram négatif appartenant aux genres *Salinivibrio* et *Halomonas* et les genres *Bacillus* et *Salibacillus* sont les représentants prédominants des bactéries à Gram positif. Les isolats producteurs de lipases sont très diversifiés du point de vue phylogénétique. Toutefois, les microorganismes producteurs de pullulanases sont limités aux genres *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Bacillus* et *Salibacillus*.

Tableau III. 3 : Microorganismes producteurs d'enzymes hydrolytiques isolées de différents environnements hypersalins (Moreno et al. 2013).

| Site d'isolement | Activité hydrolytique | Activité hydrolytique la plus abondante | Genres |
|---|--|---|--|
| Salterns Almeria, Cadiz and Huelva (Spain) | amylase protéase lipase DNase pullulanase | amylase | <i>Salinivibrio</i> <i>Halomonas</i> <i>Chromohalobacter</i> <i>Bacillus-Salibacillus</i> <i>Salinicoccus</i> <i>Marinococcus</i> |
| Saltern Huelva (Spain) | lipase protéase amylase nucléase | amylase | <i>Halorubrum</i> <i>Haloarcula</i> <i>Halobacterium</i> <i>Salicola</i> <i>Salinibacter</i> <i>Pseudomonas</i> |
| Lac Howz Soltan (Iran) | lipase amylase protéase xylanase DNase inulinase pectinase cellulase pulullanase | lipase | <i>Salicola</i> <i>Halovibrio</i> <i>Halomonas</i> <i>Oceanobacillus</i> <i>Thalassobacillus</i> <i>Halobacillus</i> <i>Virgibacillus</i> <i>Gracilibacillus</i> <i>Salinicoccus</i> <i>Piscibacillus</i> |
| Lac Maharlu Salt (Iran) | protéase lipase | ND | <i>Bacillus</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Halobacterium</i> <i>Aeromonas</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Alcanivorax</i> <i>Bacillus</i> <i>Cobetia</i> <i>Halomonas</i> |
| Deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough (China) | amylase protéase lipase DNase | amylase | <i>Methylarcula</i> <i>Micrococcus</i> <i>Myroides</i> <i>Paracoccus</i> <i>Planococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Psychrobacter</i> <i>Sporosarcina</i> <i>Sufflavibacter</i> <i>Wangia</i> |
| Mine de sel -Slanic Prahova (Romania) | amylase gelatinase lipase protéase cellulase xylanase | lipase protéase | ND |
| Desert d'atacama (Chili) | amylase protéase lipase DNase xylanase pullulanase | DNase | <i>Bacillus</i> <i>Halobacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Halomonas</i> <i>Staphylococcus</i> |

| | | | |
|--------------------------|---------|----|-----------------|
| Saline desert (India) | amylase | ND | <i>Bacillus</i> |
|--------------------------|---------|----|-----------------|

Bien que les enzymes halophiles sont considérées comme une nouvelle alternative dans différentes industries, il existe, toutefois, relativement peu d'études et d'applications industrielles, généralement dans la manufacture du sel de mer, les aliments fermentés, le textile, les industries pharmaceutique et du cuir (Tableau III.4).

1.1. Les enzymes lipolytiques

Les enzymes lipolytiques bactériennes sont des biocatalyseurs d'une grande importance grâce à leur large spécificité au substrat et leur grande chemo-regio et stéréosélectivité. Ainsi, ces enzymes sont utilisées comme additifs aux détergents, en industries papetière et alimentaire ainsi que biocatalyseurs pour la production de composés chimiques. Cependant, les applications industrielles des lipases sont souvent entachées par leur faible stabilité durant les procès industriels, en particulier, une faible thermostabilité et la perte d'activité en présence de solvants organiques.

Tableau III. 4 : Applications biotechnologiques de quelques enzymes obtenues de bactéries halophiles modérées et extrêmes (Moreno, 2013).

| Source | Bactéries | Enzyme | Localisation |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Bactéries halophiles extrêmes | <i>Salicola marasensis</i> | Lipase LipL | Extracellulaire |
| | sp. IC10 | ProteaseSaliPro | Extracellulaire |
| | <i>Marinobacter Lipolyticus</i> | Lipase LipBL | Intracellulaire |
| | <i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> | Haloprotease CP1 | Extracellulaire |
| | Bactéries halophiles modérées | <i>Halobacillus Karajensis</i> | Protéase |
| | <i>Nesterenkonia</i> sp. strain F | α -amylase | Extracellulaire |
| | <i>Thalassobacillus</i> sp. LY18 | α -amylase | Extracellulaire |

1.2. Les enzymes protéolytiques

Les protéases constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles constituant actuellement la majorité des ventes mondiales. Elles ont été largement utilisées en industrie depuis longtemps, particulièrement dans le secteur de la lessive, de la brasserie, de l'industrie du fromage et du tannage.

De nombreuses protéases ont été isolées à partir de bactéries halophiles telles que l'haloprotéase CP1 isolée de la bactérie halophile modérée *Pseudoalteromonas ruthenica* en présence de 7,5% de NaCl. Un autre exemple de protéase produite par la bactérie halophile modérée *Halobacillus karajensis* a été rapporté. Par ailleurs, l'effet de plusieurs températures, des valeurs initiales de pH et de concentrations en sel ainsi que différentes sources de nutriments sur la production a été étudié en révélant une sécrétion maximale de l'enzyme à 34°C, pH 8-8,5 et en présence de gélatine.

1.3. Les enzymes amylolytiques

Les amylases constituent un groupe d'enzymes d'intérêt biotechnologique certain. Les applications les plus intéressantes concernent les chimies cliniques et analytiques, la saccharification de l'amidon et dans les industries du textile, de l'alimentation et de la distillation. Au cours des dernières années, de nombreuses α -amylases halophiles extracellulaires ont été purifiées à partir de bactéries halophiles modérés. L'une de ces enzymes a été purifiée à partir *Nesterenkonia* sp.. Cette enzyme présente une activité maximale à pH 7-7,5 pour une température optimale de 45°C. L'enzyme purifiée était hautement active dans une large gamme de concentrations de NaCl (0-4 M) avec une activité optimale à 0,25 M. Par ailleurs, une amylase extracellulaire a été purifiée à partir de la souche halophile *Thalassobacillus* sp. LY18. L'enzyme présente une activité optimale à 70°C à pH 9 et 10% de NaCl. L' α -amylase était très stable sur une large gamme de températures (30-90 °C), de pH (6-12) et de concentrations en NaCl (0% -20%), présentant une excellente nature thermostable et halotolérante.

Chapitre IV

Autres extrémophiles

I. Introduction

Les microorganismes représentent les formes de vie les plus polyvalentes et versatiles de tous les organismes vivants, envahissant presque tous les écosystèmes et les niches connus, y compris l'homme. Leur survie dans de tels environnements, souvent hostiles et peu communs, est attribuée en partie au développement de stratégies de gestion de stress, permettant à la cellule de répondre aux changements environnementaux externes.

II. Les psychrophiles

1. Définition

Les microorganismes psychrophiles, psychrotolérants ou encore cryophiles (du grec *psukhros* : froid) sont des organismes adaptés et affectionnant les températures basses des environnements froids en permanence, des fonds océaniques (abysses) aux régions polaires (sols gelés ou dans les glaciers).

C'est en 1877 que Forster décrit pour la première fois la croissance de bactéries adaptées au froid provenant du tube digestif de poissons et c'est en 1902 que le terme « psychrophile » fut proposé par Schmidt-Nielsen pour décrire des organismes peuplant des environnements froids en permanence et des températures voisines de 0°C. Cette propriété unique implique que les psychrophiles ont réussi à surmonter deux défis principaux :

- i) Les basses températures, car toute diminution de la température affecte de manière exponentielle le taux de réactions biochimiques,
- ii) La viscosité du milieu aqueux, qui augmente d'un facteur supérieur à deux entre 37 °C et 0 °C. Ainsi, plusieurs interrogations ont été soulevées telles que : comment les microorganismes psychrophiles arrivent-ils à assurer un métabolisme approprié à des températures aussi basses que -20°C ?

En effet, la vitesse des réactions chimiques est exponentiellement dépendante de la température selon la loi d'Arrhenius, $k=A.e^{-E_a/RT}$ dans laquelle k est la vitesse de la réaction ; A un facteur préexponentiel dans lequel on retrouve notamment l'entropie d'activation de la réaction, ΔS^* , et la température, T ; E_a est l'énergie d'activation égale à ΔH^*+RT (ΔH^* est l'enthalpie d'activation de la réaction) ; R la constante des gaz parfaits et T la température en degrés Kelvin. Suivant cette loi, une diminution de la température de 10°C

entraîne, dans beaucoup de cas, une diminution de la vitesse des réactions chimiques par un facteur proche de 3, valeur dépendant de l'énergie d'activation de la réaction.

2. Biodiversité des microorganismes psychrophiles

Les écosystèmes de basse température sont très abondants sur Terre ; ils constituent environ 70% de la surface terrestre si l'on tient compte non seulement des régions polaires mais aussi des zones de permafrost, des régions montagneuses et des océans, dans lesquels la température est inférieure à 5°C en dessous de 1000m de profondeur.

Les environnements froids sont colonisés par une grande diversité de microorganismes : bactéries, archaea, levures, champignons filamenteux, algues et même des virus. Ces microorganismes sont retrouvés dans les sols, les eaux (fraîches et salées en plein écoulement), associés à des plantes et à des animaux à sang froid, les déserts, les lacs, les grottes et la haute atmosphère (Figure IV.1). Un nombre considérable de nouveaux microorganismes psychrophiles a été recensé ces dernières années de par le monde (Tableau IV.1).

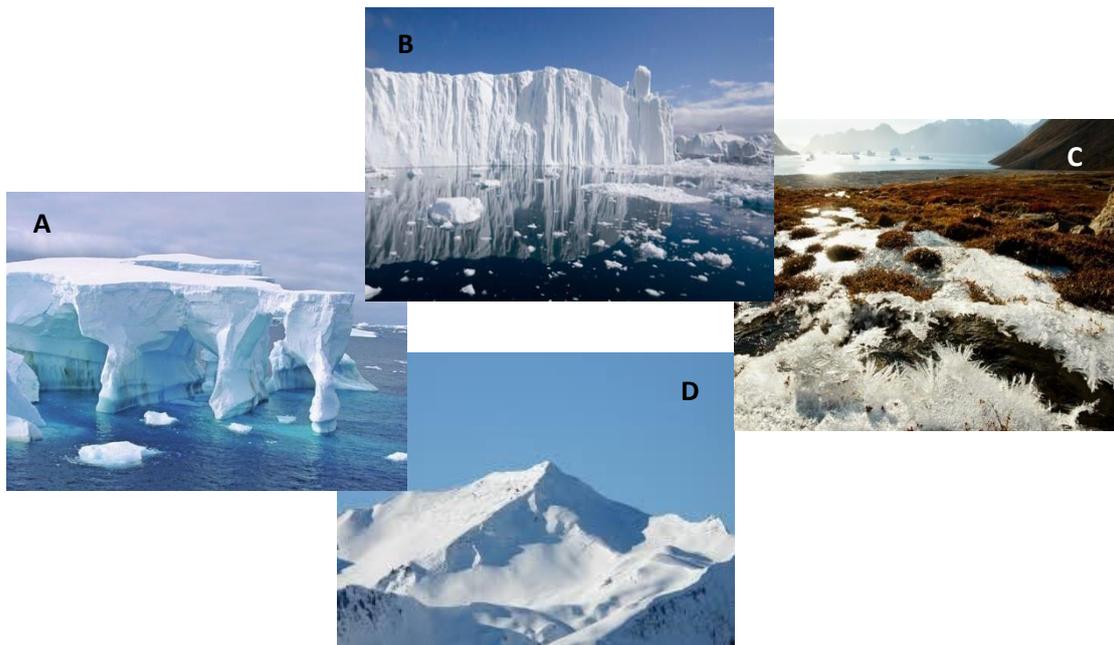


Figure IV. 1 : Habitats naturels des microorganismes psychrophiles : (A) Glace de la mer Antarctique, (B) Glacier de l'arctique, (C) Sol gelé : permafrost, (D) Montagnes enneigées (Alpes).

Tableau IV.1 : Exemples de microorganismes psychrophiles isolés des habitats marins (Poli et al. 2017).

| Microorganismes | Site et température d'isolement |
|--|--|
| <i>Arthrobacter ardleyensi</i> | Sédiments de lac de l'île Ardley, Antarctique ; 25°C |
| <i>Arthrobacter halodurans</i> | Eau de mer de Chine ; 28°C |
| <i>Arthrobacter kerguelensis</i> | Eau de mer, île de Kerguelen, Antarctique ; 22°C |
| <i>Arthrobacter subterraneus</i> | Eau de surface profonde de la côte Sud de Corée ; 28°C |
| <i>Bizionia algorithergocola</i> | Glace marine-eau de mer, Antarctique Est ; -2°C |
| <i>Cotwellia chukchiensis</i> | Mer Chukchi en océan Arctique ; 23-25°C |
| <i>Cotwellia maris</i> | Eau de mer, cote d'Abashiri-mer d'Okhotsuku, Hokkaido ; 0-22°C |
| <i>Cotwellia piezophila</i> | Sédiments marins profonds, Japon ; 10°C |
| <i>Cotwellia psychrerythraea</i> | Glace marine et sédiments marins ; Arctique 8°C |
| <i>Pseudoalteromona shaloplankti</i> | Eau de mer de la cote Antarctique ; 12°C |
| <i>Psychrobacter arenosus</i> , <i>P. maricola</i> , <i>P. maritimus</i> , <i>P. submarinus</i> , <i>P. fulvigenes</i> | Glace marine côtière et sédiments de la mer du Japon ; 25-28°C |
| <i>Psychroserpens jangbogonensis</i> | Mer de Ross dans l'océan Sud, Antarctique ; 15°C |
| <i>Psychrobacteroceanii</i> | Sédiments de l'océan pacifique à une profondeur de 1767 m ; 10-15°C |
| <i>Psychrobacter okhotskensis</i> | Cote Monbetsu, de la mer Okhotsk-Okkaido, Japon ; 25°C |
| <i>Psychrobacter pacificensis</i> | Eau de mer profonde dans la fausse du Japon- île de Hachijo ; 25°C |
| <i>Psychromonas ingrahamii</i> | Glace marine, Alaska-USA ; -12-10°C |
| <i>Shewanella frigidimaris</i> et <i>S. gelidimaris</i> | Terres côtières des collines du vestfold- Antarctique, glace marine de l'antarctique ; 15-17°C |

Les bactéries psychrophiles sont plus Gram-négatifs que Gram-positifs, certains des genres fréquemment isolés sont *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter* et *Cytophaga*.

Taxonomiquement, les microorganismes psychrophiles et psychrotolérants sont rencontrés aussi bien dans le domaine Bacteria que le domaine Archaea et sont distribués sur de nombreux genres tels que *Arthrobacter*, *Colwellia*, *Exiguobacterium*, *Gelidibacter*, *Glaciacola*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Hyphomonas*, *Listeria*, *Marinobacter*, *Methanococcoides*, *Methanogenium*, *Moritella*, *Planococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Psychroflexus*, *Psychromonas*, *Psychroserpens*, *Shewanella* et *Sphingomonas*.

Les défis particuliers pour les microorganismes dans les écosystèmes froids comprennent des taux de réactions enzymatiques réduits, une biodisponibilité limitée des nutriments et souvent des extrêmes de pH et de salinité. Selon les conditions locales, l'activité

de l'eau (la quantité d'eau disponible pour les microorganismes) peut également être limitée. Pour prospérer dans des environnements à basse température, les psychrophiles ont développé des stratégies d'adaptations structurelles et fonctionnelles.

2.1. Les écosystèmes aquatiques froids

2.1.1. Atmosphère et nuages

Des bactéries Gram-positif ont été retrouvées en altitude notamment en atmosphère jusqu'en stratosphère et en mésosphère (41-77 km) où la température peut atteindre les -100°C. La survie microbienne dans cet environnement à basse température est également influencée par un intense rayonnement UV, un stress oxydatif, de faibles nutriments et une dessiccation.

L'omniprésence de microorganismes dans l'atmosphère a soulevé la question de leur activité métabolique et le rôle actif possible dans les processus atmosphériques, en particulier, dans la formation des nuages. En effet, l'eau des nuages est considérée comme un habitat microbien plus favorable que l'air sec, car les gouttelettes des nuages restent liquides aux températures bien au dessous de 0°C où les cellules peuvent métaboliser les composés organiques.

Divers bactéries et champignons ont été retrouvés dans l'eau des nuages troposphérique, dans la gamme de 10^3 - 10^5 par mL comprenant des espèces nouvelles telles que *Deinococcus aethius*, *Bacillus stratosphericus*.

2.1.2. Neige

La neige est une composante majeure de la cryosphère qui couvre de façon permanente ou saisonnière jusqu'à 35% de la surface terrestre.

Les caractéristiques spécifiques d'importance écologique de la neige sont saisonnières. Les fluctuations de température, les conditions aérobies, la lumière très élevée ainsi que l'irradiation UV en sont les principales raisons. En tant qu'habitat, la neige est liée à l'atmosphère en raison des flux éolien constants de la poussière, des microorganismes et d'autres matériels biologiques.

L'abondance et la diversité bactérienne des différents écosystèmes saisonniers et permanents des neiges ont été étudiées de manière intensive en utilisant à la fois des méthodes moléculaires et de culture. En effet, l'abondance microbienne dans la couverture de neige varie avec l'altitude et la latitude. Le nombre d de cellules bactériennes varient de 10^3 à 10^5 par mL dans la neige fondu. L'abondance est toutefois plus faible en Antarctique que dans la neige montagneuse et l'Arctique et augmente avec l'altitude. Aussi, une diversité procaryote a

été constatée, représentée par des bactéries hétérotrophes, des cyanobactéries et des eucaryotes. Cependant, aucune nouvelle espèce n'a été décrite dans la neige contrairement à d'autres environnements froids.

2.1.3. Glaciers

La glace des glaciers est considérée comme l'environnement le plus sévère pour les organismes vivants, par rapport aux autres parties de la cryosphère, en raison des températures allant de -56°C à 10°C , à la pression hydrostatique élevée, à la faible teneur en nutriments et la disponibilité de l'eau, à l'obscurité...etc. Cependant, le vaste glacier polaire et glaces couvrant 15861766 km^2 contiennent un énorme réservoir de vie microbienne qui est conservée en couche chronologique. Les glaciers sont des écosystèmes dynamiques avec différents régimes thermiques, physiques, caractéristiques hydrologiques et géochimiques.

L'abondance microbienne varie entre les glaciers, avec la profondeur et l'altitude et varie de <102 à 106 cellules par mL.

Le travail pionnier d'Abyzov (1993) en Antarctique a montré que ces fluctuations sont directement proportionnelles à la charge de poussière dans les précipitations annuelles de neige.

Les études microbiologiques intensives des glaciers polaires et non polaires ont démontré une grande variabilité de la diversité morphologique, physiologique et phylogénétique des microorganismes avec une prédominance majeure des groupes d'Actinobactéries, Firmicutes, Proteobactéries, BFC (Bacteroides-Flavobacterium-Cytophaga), incluant les eucaryotes microbiens psychrophiles (champignons et levures), certaines plantes et des virus bactériens et quelques Archaea.

De nombreux isolats bactériens et fongiques ont été isolés à partir d'anciens échantillons de glace au Groenland, en Antarctique et au Tibet ; le plus ancien avait 750 000 ans.

3. Stratégies d'adaptation des microorganismes psychrophiles et leur études métaboliques

Ils peuvent être Gram positif et Gram négatif, autotrophes et hétérotrophes, aérobies et anaérobies, phototrophes et non phototrophes, les microorganismes psychrophiles sont dotés de mécanismes cellulaires adaptés au froid qui les rendent de plus en plus attrayants aux yeux de la communauté scientifique.

Les mécanismes d'adaptation au stress froid ont, en effet, fait l'objet d'une attention considérable au cours des dernières décennies, en particulier à la lumière du potentiel biotechnologique perçu de ces organismes et leurs biomolécules.

3.1. Adaptation environnementale

Les communautés psychrophiles sont souvent associées à des habitats lithiques, cryptoendolithiques et chasmolithiques. En effet, les communautés hypolithiques, qui se développent à la surface des roches translucides, sont protégées de l'instabilité physique, de la dessiccation et des radiations UV. Par ailleurs, les microorganismes psychrophiles de la glace de mer sont localisés principalement dans les poches hypersalines et les interstices dans la glace car ces poches de saumure présentent un microenvironnement riche en matières organiques en solution.

Toutefois, certains microorganismes semblent disparaître à des températures froides pour refaire surface lorsque les températures deviennent plus favorables, cet état est appelé état inactif viable mais non cultivable (VBNC) dans lequel les microorganismes sont capables de respiration et d'absorption de substrat sans possibilité de réplication. Ce phénomène a été observé pour des bactéries Gram négatif tels que les espèces d'origine marine des genres *Vibrio* et *Aeromonas*.

3.2. Adaptation moléculaire

Structure du génome

L'analyse comparée du génome de certains microorganismes psychrophiles a indiqué que ces derniers contiennent des régions riches en G+C, qui codent principalement pour des protéines d'information (ARN_t, facteurs d'élongation, ARN polymérase). De plus un niveau élevé de redondance est observé dans leurs génomes, codant pour des copies d'ARN_t pour la biosynthèse de tous les acides aminés ainsi qu'une variété et un nombre considérable de molécules chaperons suggérant une forte capacité de traduction et de traitement post traductionnel pour la croissance à basse température. Par ailleurs, l'analyse de nombreux génomes psychrophiles a indiqué la présence d'un grand nombre de fonctionnalités contribuant à la plasticité du génome telles que les plasmides, les éléments transposables et autres éléments génétiques mobiles qui peuvent être directement liés à l'adaptation au froid, tels que la biosynthèse des acides gras insaturés.

Protéines et enzymes

Certaines des principales barrières à la synthèse des protéines à basse température comprennent: une activité réduite des enzymes transcriptionnelles et translationnelles; réduction du repliement des protéines, principalement en raison d'un taux réduit d'isomérisation du prolyle; et une stabilisation des structures secondaires d'ADN et d'ARN.

Les enzymes psychrophiles doivent donc être adaptées pour maintenir des taux catalytiques adéquats pour la fonction cellulaire. En effet, elles se caractérisent généralement

par un degré plus élevé de flexibilité structurale, une thermostabilité plus faible et une activité spécifique plus élevée à basse température que leurs homologues mésophiles. La flexibilité structurale accrue des enzymes adaptées au froid peut être globale ou restreinte aux régions catalytiques. Cette flexibilité améliore le degré de complémentarité entre site catalytique et substrat, réduisant ainsi les énergies d'activation et augmentant les taux de rotation du substrat.

De nombreux mécanismes sont utilisés dans le but d'augmenter la flexibilité et l'activité enzymatiques, ainsi que la diminution de la thermostabilité. L'un de ces mécanismes consiste à réduire le contenu d'arginine et de proline. Ces acides aminés forment de multiples liaisons hydrogènes et des ponts salés réduisant ainsi la flexibilité conformationnelle. Des niveaux réduits de ces acides aminés ont été observés chez un certain nombre d'enzymes psychrophiles. Par ailleurs, une teneur réduite en alanine a été observée chez les protéines de l'espèce psychrophile *Shewanella* spp., tandis qu'une faible teneur en proline/arginine a été détectée au niveau du génome de l'espèce *Psychrobacter arcticus*, en particulier chez les protéines impliquées dans la reproduction et la division cellulaire.

D'autres différences de composition observées chez les protéines psychrophiles comprennent l'augmentation des teneurs en asparagine, en méthionine et en glycine, regroupant la glycine au site catalytique de l'enzyme – augmentant ainsi la mobilité locale – et une augmentation du rapport lysine -arginine, ce qui réduit la formation de liaisons hydrogène et des ponts ioniques. De plus, il a été rapporté la présence d'acides aminés dotés de chaînes latérales petites/neutres dans les régions en boucles des structures secondaires ce qui contribue à la flexibilité des protéines dans ces boucles, tandis que les régions hélicoïdales contiennent moins d'acides aminés capables d'interactions inter-domaines et inter-sous-unités que les protéines mésophiles. Une augmentation de la teneur en acides aminés avec des chaînes latérales hydrophobes dans les régions exposées aux solvants de la protéine et moins de résidus hydrophobes dans le noyau enzymatique a également été observée.

Des variations dans les structures tridimensionnelles des protéines psychrophiles par rapport à leurs homologues mésophiles ont également été identifiées. Les études sur les protéines psychrophiles ont montré que le nombre et la taille des cavités chez les protéines adaptées au froid est plus important que chez les homologues mésophiles. En effet, les cavités semblent conserver un nombre élevé de groupes hydrophiles, liant un plus grand nombre de molécules d'eau, ce qui augmente la flexibilité enzymatique en améliorant la solvatisation interne (Figure IV. 2).

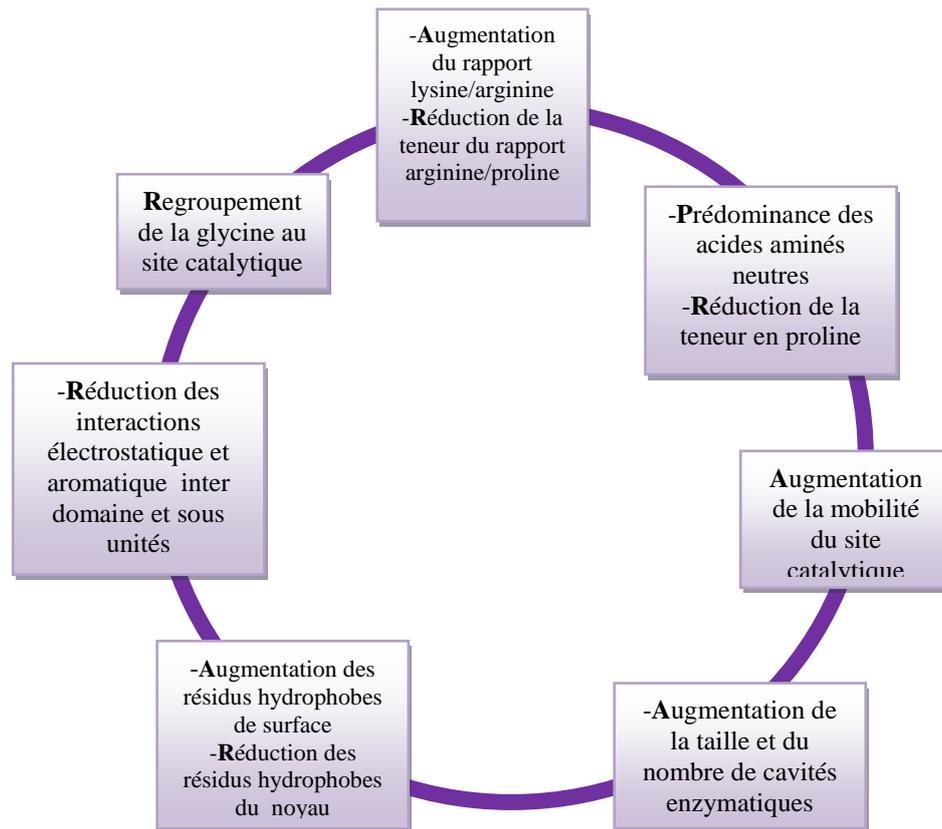


Figure IV. 2 : Modifications structurales communes des enzymes psychrophiles, entraînant une diminution de la stabilité thermique, une flexibilité accrue et une augmentation de l'activité spécifique (De Maayer et al. 2014).

3.3. Adaptations physiologiques

Fluidité membranaire

Les basses températures ont un effet néfaste sur les propriétés physiques et les fonctions des membranes cellulaires, conduisant généralement à une réduction de la fluidité de la membrane, à l'apparition d'une transition en phase de gel et en final, à une perte de fonction. La composition lipidique régit les propriétés physiques des membranes. En effet, des teneurs plus élevées en acides gras insaturés, polyinsaturés et ramifiés et/ou une longueur de chaîne acylée plus courte ont été rapporté, avec de forte proportions de doubles liaisons cis-insaturées et d'acides gras anteiso-ramifiés.

Cette composition joue un rôle clé dans l'augmentation de la fluidité membranaire en introduisant des contraintes stériques modifiant l'empaquetage ou réduisant le nombre d'interactions.

D'autres adaptations ont également été rapportées comprenant une teneur accrue en groupes lipidiques, protéines et pigments caroténoïdes non polaires.

Par ailleurs, les analyses de transcriptomes corroborent le travail physiologique antérieur et ont montré que l'exposition des microorganismes psychrophiles aux basses températures induit une régulation rapide et une surreprésentation des gènes impliqués dans la biogenèse membranaire, tels que les acides gras, le LPS, le peptidoglycane, les glycosyltransférases et les protéines de la membrane externe.

Les études protéomiques et transcriptomiques ont montré que les protéines de transport membranaire sont régulées. En particulier, l'amélioration de l'absorption des nutriments, des solutés compatibles et le recyclage des peptides membranaires pour la biosynthèse du peptidoglycane. En revanche, l'expression de gènes codant pour les protéines de structure de la membrane externe, telles que les flagelles, les récepteurs d'absorption de fer sont généralement supprimés à basses températures (Figure IV. 3).

Les pigments caroténoïdes représentent une autre classe de modulateurs de fluidité membranaire. Les pigments caroténoïdes polaires et non polaires sont produits par diverses bactéries de l'Antarctique qui aident au maintien de la fluidité membranaire lors des fluctuations de température.

Cryoprotecteurs et protéines antigél

La congélation cellulaire induit la formation de cristaux de glace cytoplasmiques, entraînant des dommages cellulaires et un déséquilibre osmotique. L'accumulation de solutés compatibles, tels que la glycine, la bêtaïne, le saccharose et le mannitol, entraîne une diminution du point de congélation cytoplasmique, assurant ainsi une protection contre le gel, ainsi que contre la dessiccation et l'hyper-osmolalité. De plus, le tréhalose peut empêcher la dénaturation et l'agrégation des protéines, éliminer les radicaux libres et stabiliser les membranes cellulaires dans des conditions de froid.

Par ailleurs, certains psychrophiles produisent des protéines antigél qui se lient à la formation et à la recristallisation des cristaux de glace en réduisant le point de congélation. Ces protéines peuvent empêcher le sursurcoolissement de l'eau en facilitant la formation de cristaux de glace à des températures proches du point de fusion.

La production d'exopolysaccharides (EPS) représente un autre mécanisme potentiel de cryoprotection. La teneur élevée en polyhydroxyle d'EPS diminue le point de congélation de l'eau. En outre, les EPS peuvent piéger l'eau, les nutriments et les ions métalliques et faciliter l'adhésion de surface, l'agrégation cellulaire et la formation de biofilms et peut également

jouer un rôle dans la protection des enzymes extracellulaires contre la dénaturation à froid et l'autolyse.

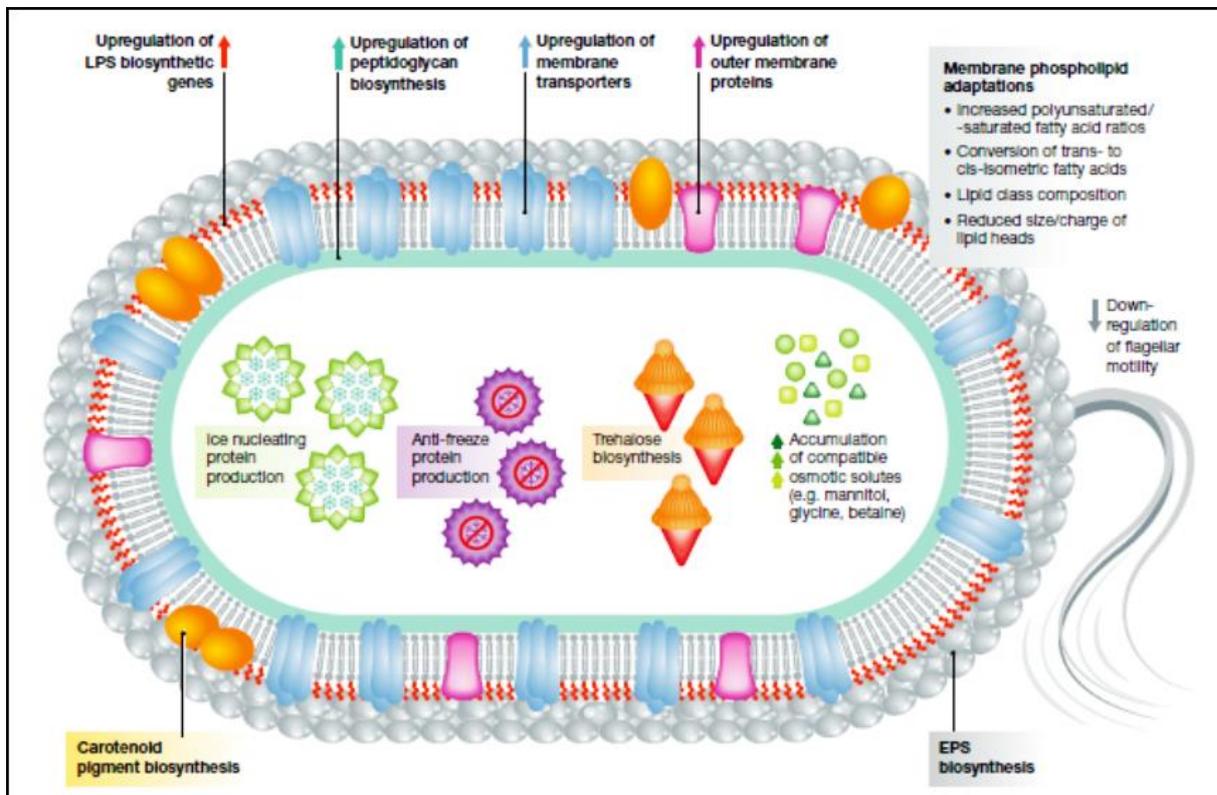


Figure IV. 3 : Adaptations physiologiques chez les procaryotes psychrophiles (De Maayer et al. 2014).

4. Applications biotechnologiques des microorganismes psychrophiles

Les microorganismes psychrophiles comptent depuis quelques années l'un des réservoirs biotechnologiques les plus exploités.

En effet, de nombreux processus industriels incluent des procédures nécessitant des conditions rigoureuses. Ainsi, les industries alimentaires, pharmaceutiques, de détergents et de papier, entre autres, exploitent les enzymes de ces microorganismes à des fins d'amélioration de ces processus. Les enzymes actives à froid sont très bénéfiques, notamment pour leur sélectivité accrue et leur stéréospécificité, mais également grâce à leur capacité à catalyser de nombreuses réactions à de faibles températures (<40 ° C) plus efficacement. Ces applications et quelques avantages des psychrophiles et de leurs composés sont rapportés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Quelques utilisations potentielles des microorganismes psychrophiles et de leurs produits (Russel, 1998)

| Produit psychrophile | Applications |
|--------------------------------------|--|
| Protéinases, lipases, cellulases | Lavage à l'eau froide |
| Protéinases | Attendrissement de la viande |
| Carbohydrases | Procès alimentaire |
| Différentes enzymes spécifiques | Modification de saveurs |
| β - galactosidases | Hydrolyse du lactose du lait |
| Acides gras polyinsaturés | Additifs alimentaires, compléments nutritionnels |
| Différentes enzymes (oxydases) | bioremédiation |
| Différentes enzymes (déshydrogénase) | biotransformation |
| Protéases | Nettoyage des lentilles de contact |
| Phosphatase alcaline | Marquage de l'extrémité 5' de l'acide nucléique |

III. Les alcaliphiles et acidophiles

1. Les alcaliphiles

1.1. Définition et écologie

Le terme microorganismes alcalins ou «alcaliphiles» désigne généralement des microorganismes se développant à des valeurs de pH supérieures à 9, souvent dans la gamme de pH 10-13. Les alcaliphiles obligatoires est un terme utilisé pour les organismes alcaliphiles ne se développant qu'à des valeurs de pH supérieure ou égale à 9, tandis que les alcaliphiles facultatifs sont des souches qui se développent de manière optimale dans des conditions alcalines rigoureuses mais qui sont également capables de se développer à des pH proches de la neutralité.

La découverte des microorganismes alcaliphiles est assez récente. Toutefois, selon Horikoshi (1999), l'utilisation de microorganismes alcalins a une longue histoire au Japon, puisque, depuis les temps anciens, l'indigo a été naturellement réduit dans des conditions alcalines en présence de carbonate de sodium. Les travaux pionniers de Horikoshi et al, a conduit à l'isolement d'un nombre important de souches alcaliphiles ainsi que la purification et la caractérisation d'enzymes alcaliphiles.

Les niches écologiques des alcaliphiles sont diverses, allant des lacs de soude alcalins aux sols soumis à l'ammonification et aux processus industriels humains générant un pH élevé. Par ailleurs, ils ont été isolés principalement à partir d'environnements neutres parfois même à partir d'échantillons de sols acides, de selles et des sédiments profonds (10898 m : fausse des marianes). Les haloalcaliphiles sont retrouvés dans les environnements salins

alcalins tels que les lacs du Rift Valley de l'Afrique de l'Est et les lacs de soude aux Etats Unis.

1.2. Distribution et isolement des alcaliphiles

Les microorganismes alcaliphiles coexistent avec des microorganismes neutrophiles et occupent des environnements extrêmes spécifiques. Afin d'isoler les alcaliphiles, un milieu de culture alcalin est nécessaire. En effet, le carbonate de sodium est généralement utilisé pour ajuster le pH à une valeur de 10. Le tableau IV. 3 rapporte la composition d'un milieu de culture alcalin adapté à leur isolement. La fréquence des microorganismes alcaliphiles dans les échantillons de sol ordinaire est de 10^2 à 10^5 /g de sol qui correspond à 1/10 à 1/100 de la population des microorganismes neutrophiles

Une importante diversité de microorganismes alcaliphiles, y compris les bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* et les eucaryotes tels que les levures et les champignons filamenteux, ont été isolés à partir de divers environnements. De nombreuses équipes de recherche sont parvenues à isoler de nouvelles souches alcaliphiles à partir de divers écosystèmes, notamment les haloalcaliphiles tel que le genre *Natronorubrum* et l'espèce *Tindallia magadi* ; les méthanogènes, les cyanobactéries.

Tableau IV.3 : Composition de milieux de base pour l'isolement de microorganismes alcaliphiles.

| Ingrédients | Quantité (g/L) dans | |
|---------------------------------------|---------------------|--------------|
| | Horikoshi-I | Horikoshi-II |
| Glucose | 10 | 0 |
| Amidon soluble | 0 | 10 |
| Extrait de levure | 5 | 5 |
| polypeptone | 5 | 5 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 | 1 |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0,2 | 0,2 |
| Na ₂ CO ₃ | 10 | 10 |
| Agar | 20 | 20 |

1.3. Adaptations physiologiques des microorganismes alcaliphiles

Le défi majeur des bactéries alcaliphiles est le maintien d'un pH cytoplasmique significativement inférieur à celui du milieu extérieur hautement alcalin. Comme il est illustré en figure IV. 4, *Bacillus pseudofirmus* OF4, se développe dans un milieu à pH 10,5. Dans ces conditions, les souches de *Bacillus* alcaliphiles utilisent des transporteurs pour catalyser un échange d'ions sodium ou potassium vers le milieu extérieur, pour le transport d'un nombre plus important de protons vers l'intérieur de la cellule.

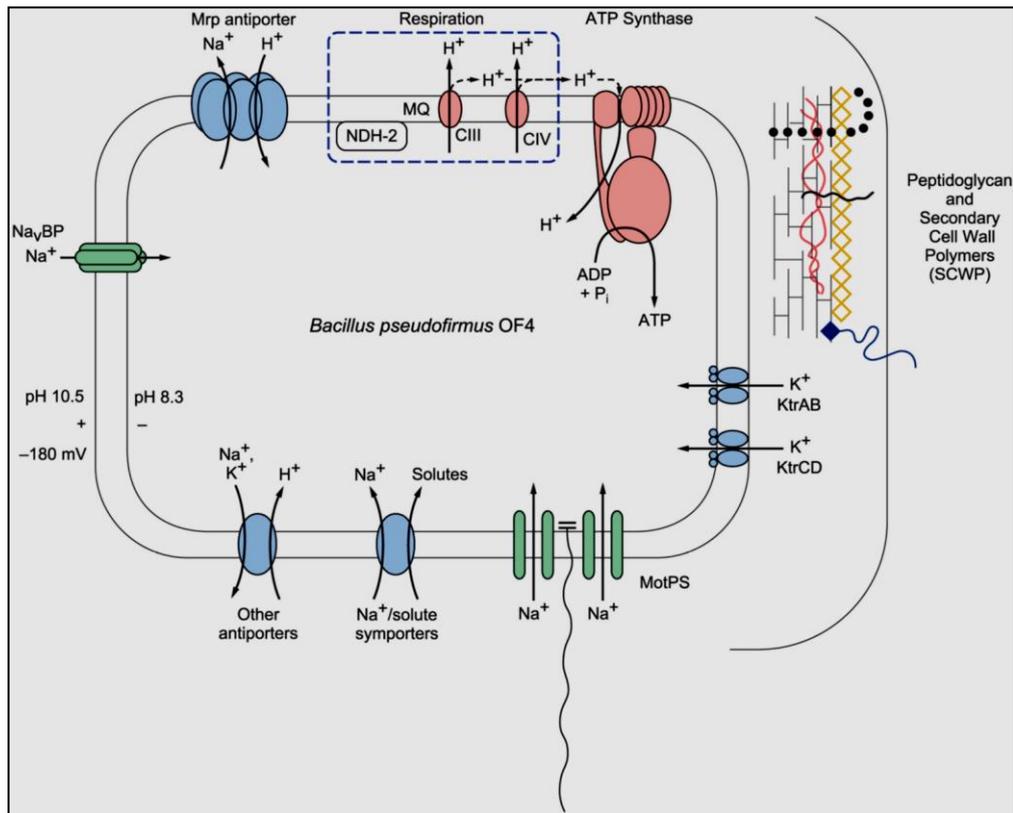


Figure IV. 4 : Représentation schématique de la bioénergétique et des propriétés de surface cellulaire de la bactérie alcaliphile *Bacillus pseudofirmus* OF4.

Le transfert d'électrons est initié par une déshydrogénase (NADH déshydrogénase, désignée NADH-2). La déshydrogénase transfère des électrons aux ménaquinones (MQ) de la membrane. À partir de la MQ réduite, les électrons se déplacent à travers deux complexes de pompes à protons, le ménaquinol: cytochrome *c* oxydoréductase (complexe III, noté CIII dans la figure) et cytochrome *c* oxydase (complexe IV, noté CIV dans la figure), qui pompe les protons hors de la cellule dans le milieu extérieur comme oxygène moléculaire réduit. Ces protons sont présentés en ligne continue. La rétention d'autres protons est mise en évidence sur ou à côté de la membrane où ils seront orientés latéralement pour atteindre l'ATP synthétase avant l'équilibration avec le milieu extérieur. Ces protons sont présentés en ligne discontinue. En plus d'alimenter la synthèse de l'ATP, la force motrice du proton générée par la respiration stimule les transporteurs de cations/proton qui catalysent l'importation d'un nombre plus important de protons par rapport au nombre d'ions sodium. Le mouvement des protons vers l'intérieur contribue au maintien d'un faible pH dans le cytoplasme alcalin par rapport au pH dans le milieu. Cela facilite la maintenance d'un pH de 8,3 dans le cytoplasme tandis que le pH extérieur est de 10,5. Des ions sodiums supplémentaires entrent à travers les canaux ioniques MotPS.

L'une des caractéristiques principales de l'alcaliphie est associée à la surface de la cellule, qui distingue et maintient l'environnement intracellulaire neutre et séparé de l'environnement alcalin extracellulaire.

En effet, en plus du peptidoglycane, les alcaliphiles du genre *Bacillus* contiennent certains polymères acides, tels que l'acide galacturonique, l'acide gluconique, l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'acide phosphorique. Les charges négatives sur les composants acides non-peptidoglycaniques peuvent donner à la surface cellulaire sa capacité à adsorber les ions sodium et hydronium et la répulsion des ions hydroxyles, pouvant ainsi aider les cellules à se développer dans des environnements alcalins. Par ailleurs, la composition du peptidoglycane de ce genre bactérien est caractérisée par un excès d'hexosamines et d'acides aminés dans les parois cellulaires comparé à celui des neutrophiles

1.4. Applications biotechnologiques des microorganismes alcaliphiles

Les propriétés singulières de certaines de ces microorganismes ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies : chercheurs, ingénieurs, et entreprises pour exploiter ce nouveau gisement de ressources naturelles en biomolécules, notamment les enzymes, les biopolymères et les métabolites secondaires.

Le premier rapport concernant une enzyme alcaline, publié en 1971, décrit une protéase alcaline produite par une espèce de *Bacillus* sp. 221. De nombreuses nouvelles enzymes ont par la suite été isolées et purifiées par l'équipe de Horikoshi et même produites à l'échelle industrielle.

La principale application industrielle des enzymes alcaliphiles concerne l'industrie des détergents qui représentent environ 30% de la production mondiale d'enzymes telles que les cellulases et les lipases. Des enzymes dégradant l'amidon ont également été rapportés telles que les α amylases produites par le genre alcaliphile *Bacillus*. D'autres enzymes ont également été isolées et purifiées à partir de microorganismes alcaliphiles à des fins industriels tels que des xylanases, des pectinases et des chitinases. Par ailleurs, nombreux sont les métabolites secondaires isolés à partir de ces microorganismes tels que les sidérophores, les caroténoïdes, des acides organiques, des antibiotiques et même des inhibiteurs d'enzymes (Figure IV.5)

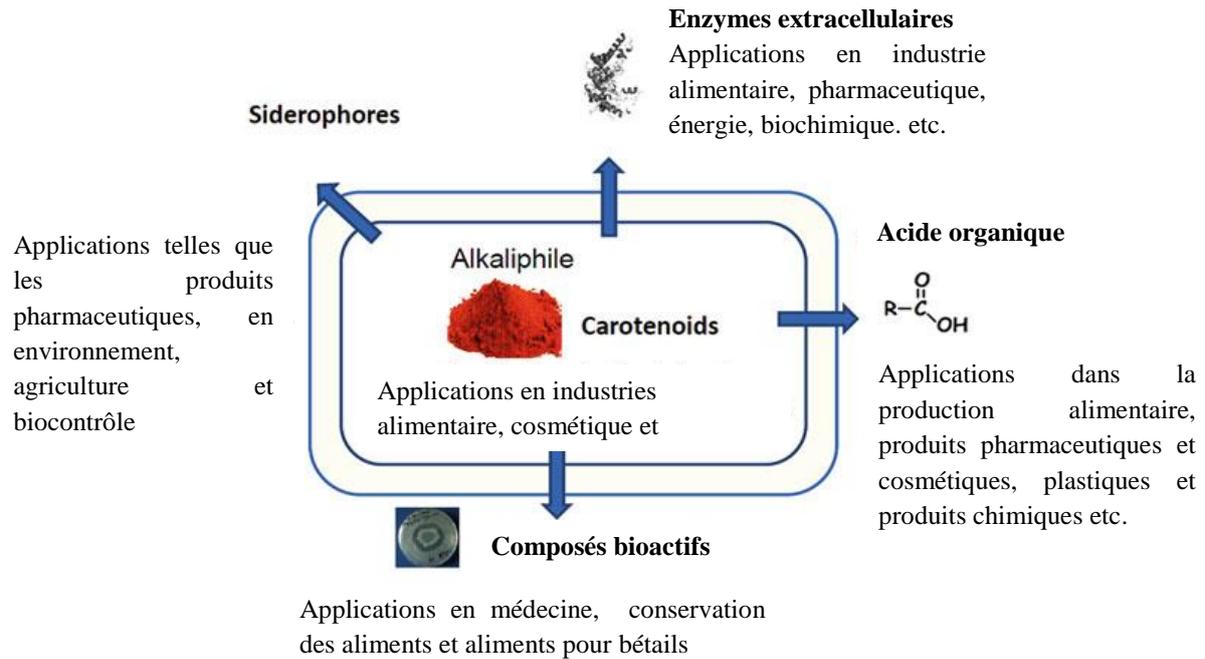


Figure IV. 5 : Quelques mécanismes d'adaptation des microorganismes alcaliphiles et leurs applications biotechnologiques potentielles (Mamo et Mattiasson, 2016).

2. Les acidophiles

2.1. Définition et écologie

Les acidophiles sont des organismes qui prospèrent dans des milieux acides avec un pH inférieur à 4. Ce sont des groupes divers d'organismes inclus dans les 3 domaines du vivant *Archea*, *Bacteria* et *Eucarya*, se développant dans des conditions acides, isolés à partir d'environnements naturels tels que des champs solfatariques, des geysers et des environnements artificiels comme les zones associées aux activités humaines telles que l'extraction de charbon et minerais métalliques.

Les écosystèmes acides peuvent être formés par des processus entièrement naturels. Cependant, les effets anthropiques (directs et indirects) sont devenus de plus en plus importants dans la création de tels environnements, en particulier depuis le début de la révolution industrielle. En effet, la majorité des sites extrêmes acides actuellement existants dans le monde ont pour origine des activités humaines particulières, des extractions de métaux et de charbon.

Il existe un certain nombre de processus biologiques qui génèrent de l'acidité, comme la fermentation et la nitrification. L'oxydation des minéraux sulfurés peut entraîner la production d'un acide sulfurique, et c'est ce processus abiotique, biologiquement accéléré, qui

est responsable de la génération de la plupart des niches extrêmement acides retrouvées sur Terre. De tels sites peuvent se former naturellement, par exemple, dans les zones volcaniques où le soufre élémentaire (formé par la condensation du sulfure d'hydrogène et du dioxyde de soufre dans les gaz volcaniques) est oxydé par des archées et des bactéries oxydant le soufre, souvent à des températures élevées. Les niveaux d'acidité élevés qui en résultent provoquent la destruction partielle ou complète des minéraux à proximité et la formation de pots de boue acides (les champs de solfatars du parc national de Yellowstone, Wyoming et Krisuvik, en Islande, par exemple). Les valeurs de pH mesurées de ces pots de boue acides et des sources acides associés sont fréquemment de l'ordre de 3.

Les systèmes hydrothermaux sous-marins déchargent également de grandes quantités de minéraux sulfuriques, toutefois, la capacité tampon de l'eau de mer limite cette acidité. L'oxydation du soufre par des microorganismes autotrophes et hétérotrophes génère de l'acide sulfurique ($S^0 + H_2O + 1,5O_2 \longrightarrow H_2SO_4$) qui, s'il n'est pas neutralisé par des carbonates ou d'autres minéraux présents, peut entraîner une baisse de pH. D'autre part, la plupart des environnements extrêmes acides contiennent des concentrations relativement faibles (< 20 mg/L) de carbone organique dissous et peuvent donc être classés comme oligotrophes.

2.2. Diversité microbienne

Quelques espèces microbiennes appartenant aux genres *Acidithiobacillus* et *Sulfolobus* génèrent de l'acide par oxydation du soufre. Par ailleurs, les espèces du genre *Picrophilus* (*Picrophilus torridus* et *Picrophilus oshimae*) i solés des sites solfatariques dans le nord du Japon sont des archées hétérotrophes modérément thermophiles, caractérisées par un pH optimal de croissance de 0,7, sont des acidophiles obligatoires. L'eau acide provenant des mines et des sources géothermales renferme des bactéries hétérotrophes appartenant aux genres *Acidiphilium* et *Alicyclobacillus* ayant un pH optimal de croissance compris entre 2,5 et 6,0. Toutefois, la plupart des acidophiles extrêmes appartiennent à un groupe d'archées des genres *Acidianus*, *Desulphurolobus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus*, *Sulfolobus*, *Sulphurisphaera*, *Sufurococcus*, *Thermoplasma* et *Picrophilus* (Figure IV.6) .

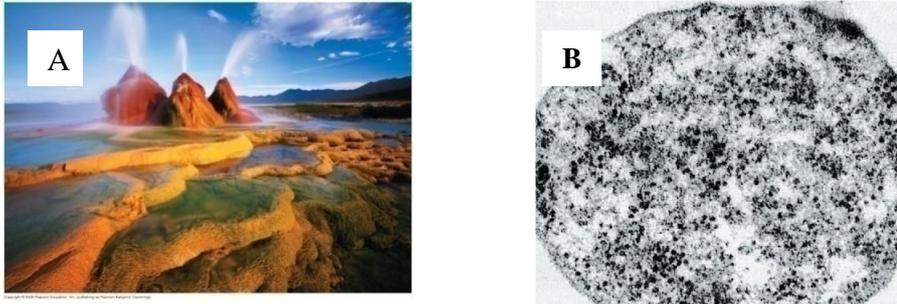


Figure IV. 6 : A : Habitat des microorganismes acidophiles (Geyser acide), B : *Thermoplasma*, phylogénétiquement proche de *Picrophilus* est une *Archaea* dépourvue de paroi et capable de croître à des températures relativement élevées et des pH extrêmement acides.

2.3. Adaptations physiologiques des microorganismes acidophiles

Le record de l'acidophilie est atteint par l'archée thermoacidophile *Picrophilus torridus* dont l'optimum de croissance se situe à pH 0,7 et 65 °C, capable de se diviser à pH 0 et dont le milieu intracellulaire est à pH 4,6. Cette adaptation est due principalement à sa capacité de produire des enzymes extracellulaires, dégradant les polymères, résistantes aux conditions du milieu extérieur, d'une part, à et à la composition de sa paroi cellulaire, d'autre part. En effet, elle présente une faible perméabilité aux protons (H^+), une grande stabilité aux acides et perd sa cohésion à pH 7. Elle comporte une couche S composée de protéines et une membrane monocouche possédant une structure originale à base de lipides polaires de type caldarchaeol. Pour lutter contre les concentrations importantes en protons du milieu extérieur, *P. torridus* possède des pompes à protons particulièrement efficaces et limite les dépenses d'énergie en laissant pénétrer une quantité importante de charges positives sous la forme d'ions potassium (K^+). De plus, les thermoacidophiles ont développé des mécanismes de résistance aux métaux lourds qui sont physiologiquement toxiques pour la plupart des microorganismes.

Ainsi, les acidophiles et les acidotolérants ont une membrane cellulaire hautement imperméable ou une faible fluidité de la membrane pour limiter l'afflux de protons au cytoplasme. Par ailleurs, les membranes de certaines archées acidophiles sont composées de lipides tétraéthers qui les rendent plus imperméables aux protons. En outre, les liaisons éther sont moins sensibles à l'hydrolyse acide que les liaisons ester, couramment retrouvées dans les membranes cellulaires bactériennes et eucaryotes. En outre, les lipides membranaires sont également caractérisés par une teneur sensiblement plus élevée en glycolipides, dans lesquels une ou plusieurs unités de sucre sont exposées à la surface extérieure de la cellule.

La réduction de la taille et de la perméabilité des canaux membranaires est un autre mécanisme d'adaptation aux pH acides chez les acidophiles. La taille réduite des pores de la membrane permet la sélection des ions en fonction de leur charge et de leur taille.

Un autre mécanisme adopté par les acidophiles pour réduire l'afflux de protons est le maintien d'une différence de potentiel électrique entre l'environnement intra et extra-cellulaire appelé potentiel de Donnan.

La faible valeur de pH des environnements acides peut endommager les biomolécules dans la cellule, ce qui nécessite des mécanismes de réparation. Cela peut expliquer le grand nombre de gènes de réparation d'ADN et de protéines présents dans les génomes de plusieurs acidophiles. En effet, à faible pH, les protéines chaperons impliqués dans le repliement des protéines sont fortement exprimées dans une large gamme d'acidophiles, ce qui suggère qu'ils peuvent jouer un rôle dans la survie des microorganismes dans des conditions acides.

Les études de Ferrer et al. (2007) ont détecté la présence d'une grande quantité de protéines de fer dans les protéomes de nombreux acidophiles contribuant à la stabilité des enzymes en présence de pH acides. Le fer joue un rôle important dans le maintien des structures tridimensionnelles des protéines (Figure IV.7)

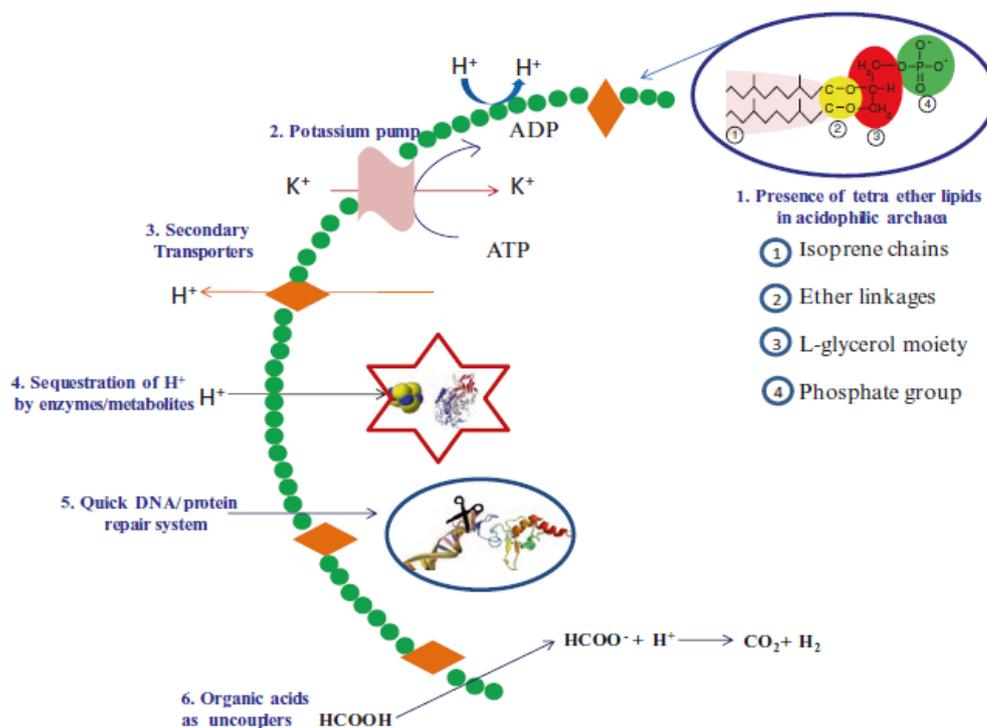


Figure IV.7 : Adaptation des microorganismes acidophiles aux environnements acides (Sharma et al. 2016)

2.4. Applications biotechnologiques des microorganismes acidophiles

Les acidophiles jouent un rôle important dans la biomination des métaux à partir de minerais et les enzymes qu'ils produisent ont trouvé plusieurs applications dans l'alimentation et l'industrie alimentaire. Elles vont des catalyseurs pour la synthèse de composés dans des solutions acides aux additifs pour l'alimentation animale.

Les autres applications des acidophiles comprennent la bioremédiation et la production d'électricité.

Le schéma en figure IV.8 illustre les applications potentielles des acidophiles

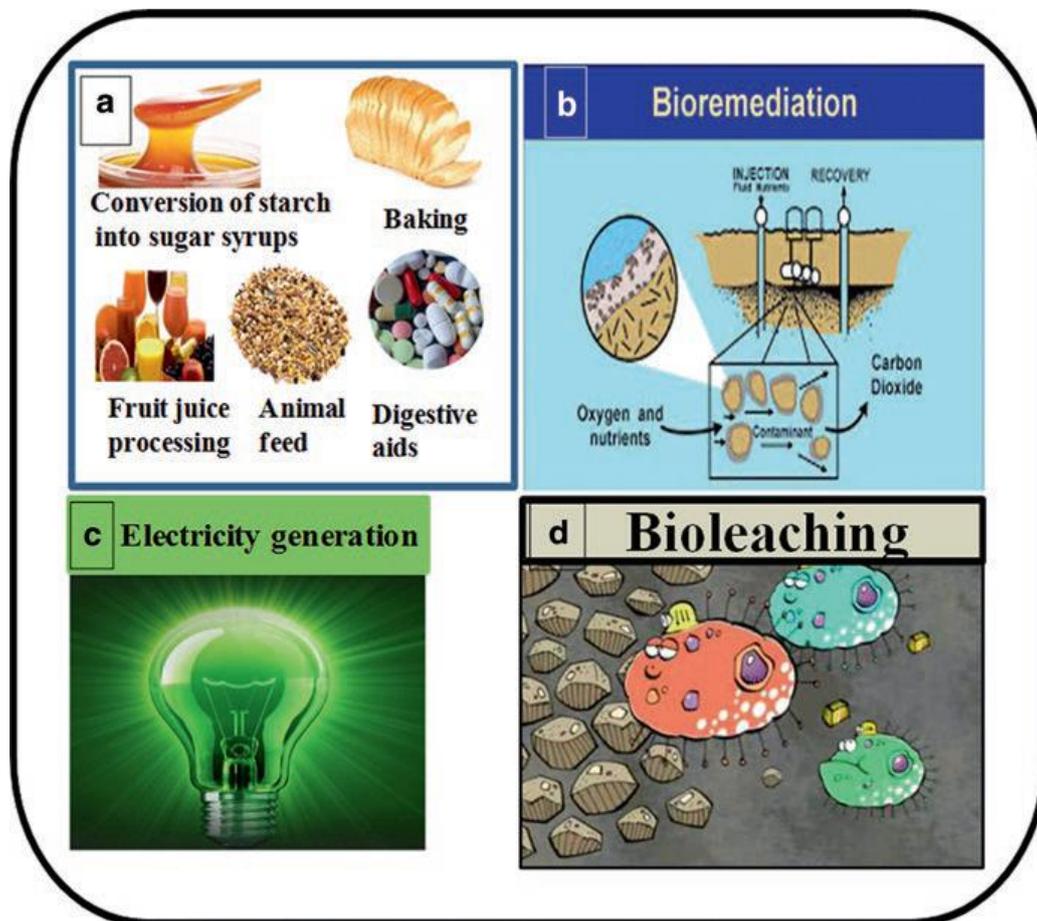


Figure IV. 8 : Applications potentielles des acidophiles et de leurs enzymes (Sharma et al. 2016)

Les microorganismes acidophiles ont eu un impact significatif sur l'extraction et la récupération des métaux à partir de minerais et de déchets. En effet, vers le milieu du vingtième siècle, la dissolution des minéraux sulfurés contenant des métaux, par des bactéries, a été découverte, conduisant à la notion de biomination c'est-à-dire l'application

biotechnologique des microorganismes aux processus miniers. La biomination a été exploitée pour l'extraction du cuivre, de l'or, de l'uranium et du cobalt, ainsi que d'autres métaux, y compris le nickel et le zinc.

De nombreuses enzymes sont explorées à partir de bactéries et d'archées acidophiles. Les propriétés des enzymes dérivées de ces microorganismes montrent une activité à pH acide et à haute température, paramètres potentiellement significatifs dans de nombreuses applications industrielles telles que les industries de l'amidon, des jus de fruits, d'aliments pour animaux et de panification. Ainsi, des enzymes amylolytiques, xylanolytiques et protéolytiques, les cellulases, les phosphatases acides ont été rapporté chez les acidophiles.

IV. Les piezophiles

Parmi tous les organismes extrémophiles, les piezophiles sont retrouvés dans une large gamme d'écosystèmes avec une source de carbone disponible diversifiée. L'environnement à haute pression altère la fluidité de la membrane et afin de surmonter ces conditions extrêmes, les piezophiles augmentant la proportion d'acides gras insaturés principalement monoinsaturés dans les bicouches lipidiques. Par ailleurs, cela permet également de maintenir la perméabilité aux ions à des fins bioénergétiques et ajuster la forme de la membrane pour résister à des contraintes plus élastiques à haute pression. Le second défi des piezophiles est la réduction de l'efficacité des transporteurs. Toutefois, ces microorganismes sont parvenus à compenser cela en augmentant le nombre de régulateurs.

Comme les piezophiles colonisent aussi bien des environnements froids que chauds, ils produisent de nombreuses protéines de choc thermique et des protéines de choc froid. Ils produisent également des solutés intracellulaires tels que β -hydroxybutyrate et ses oligomères pour résister à la pression hydrostatique. Par ailleurs, de nombreux piezophiles vivent dans des environnements en haute mer où il existe de nombreux polymères complexes, et les piezophiles ont de nombreuses enzymes dégradant ces polymères, ayant des potentialités pour des applications industrielles.

Références bibliographiques

- Andrade CMMC, Pereira Jr. N, Antranikian G. (1999). Extremely thermophilic microorganisms and their polymer hydrolytic enzymes. *Rev. Microbiol.* 30 : 287-298.
- Arakawa T, Timasheff SN (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47, 411–414.
- Bayer EA, Chanzy H, Lamed R, Shoham Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:548-557.
- Brock TD. (1978). *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures.* Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin
- Brown I, Dafforn TR, Fryer PJ, Cox PW. (2013). Kinetic study of the thermal denaturation of a hyperthermostable extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1834, 2600–2605.
- Berthomieu C, Chapon V, Gilbin R. (2008). Utiliser des bactéries pour dépolluer les environnements contaminés par des radionucléides
- Clarke JH, Davidson K, Rixon JE, Halstead JR, Fransén MP, Gilbert HJ, Hazlewood GP, (2000) A comparison of enzyme-aided bleaching of soft wood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 661-667.
- DaSarma S. (2006). Extreme Halophiles are models for astrobiology. *Microbes.* 1 :120-126.
- DasSarma S, Arora P. (2001). Halophiles in *Encyclopedia of life sciences.* London,
- Delgado-García M, Nicolaus B, Poli A, Aguilar C N, Rodríguez-Herrera R. (2015). Isolation and Screening of Halophilic Bacteria for Production of Hydrolytic Enzymes. In Maheshwari DK, Saraf M. (eds.), *Halophiles, Sustainable development and biodiversity 6,* Springer International Publishing Switzerland.
- De Maayer P, Anderson D, Cary C, Cowan D A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO reports.* 15 : 508-517.
- Detkova E N, Boltyanskaya YV. (2007). Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: role of osmoregulators and their possible practical application. *Microbiol.* 76: 511–522.
- Echigo A, Hino, M, Fukushima T, Mizuki. T; Kamekura M, Usami R. (2005). – Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems.*1, 8. ecology. *Res. Microbiol.* 159:67-73.
- Empadinhas N, da Costa MS. (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.* 11:151-161
- Feller G, Gerday C. (2003). Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1 : 200–208.
- Ferrera I, Reysenbach A L. (2007). Thermophiles in : *Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons, p: 1-9.

- Gomes I, Gomes J, Steiner W. (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresour. Technol.* 90, 207–214.
- Gomes J, Gomes I, Steiner W. (2000). Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties, *Extremophiles*, 4 227–235.
- Gomes J, Steiner W. (1998). Production of a high activity of an extremely thermostable mannanase by the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Biotechnol. Lett.* 20 : 729–733.
- Gomes I, Gomes J, Steiner W, Highly (2003(thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Production and partial characterization. *Bioresour. Technol.* 90 : 207–214.
- Gurumurthy DM, Neelagund SE. (2012). Molecular characterization of industrially viable extreme thermostable novel alpha-amylase of *Geobacillus* sp. Iso 5 isolated from geothermal spring. *J. Pure Appl. Microbiol.* 6 : 1759–1773.
- Henriksson G, Akin DE, Slomczynski D, Eriksson KEL. (1999). Production of highly efficient enzymes for flaxretting by *Rhizomucorpusillus*. *J. Biotechnol.* 68:115-123.
- Holmes M L, Scopes R K, Moritz R L, Simpson R. J, Englert C, Pfeifer F, Dyall-Smith M L. (1997). Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *BiochimBiophys. Acta.* 1337:276-286.
- Horikoshi K. (1999). Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 : 735-750.
- Horikoshi K, Bull AT. (2011). Prologue Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emergingfields of extremophiles In *Extremophiles Handbook*; Horikoshi K, Antranikaian G, Bull AT, Robb FT, Stetter KO, Eds. Springer: Tokyo, Japan.
- Irwin J A, Baird A W. (2004). Extrêmophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal* 57 (6).
- Jackson RB, Carpenter, SR, Dahm CN, McKnight D M, Naiman R J, Postel SL.; Running, S.W. (2001). Water in a changing world. *Ecol. Appl.*, 11, 1027–1045.
- Joseph B, Ramteke PW, Thomas G. (2008). Cold active microbial lipases : some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.*, 26 : 457-470.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector. *Bioresource Technol.* 77: 215-227.
- Krahe M, Antranikian G, Mäirkl H. (1996)Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 271-285.
- Kuddus, M.; Roohi; Arif, J.M.; Ramteke, P.W. (2011). An overview of cold-active microbial α -amylase: Adaptation strategies and biotechnological potentials. *Biotechnol.*10, 246–258.
- Lang JM, Darling AE, Eisen JA. (2013). Phylogeny of bacterial and archaeal genomes using conserved genes: Supertrees and supermatrices. *PLoS ONE*, 8, e62510.
- Levisson M, Van der oost J, Kengen SW. (2009). Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*, 13, 567-581.

- Liu Y, Shi J, Langrish TAG. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chem Engineering J.* 120: 203-209.
- Maheshwari D K, Saraf M. (2015). Halophiles biodiversity and sustainable exploitation. Springer International Publishing AG Switzerland.
- Margesin R, Feller G. (2010). Biotechnological applications of psychrophiles. *Env. Technol.* 31 : 835-844.
- Mehta R, Singhal P, Singh H, Damle D, Sharma A. (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech.* 6 :81.-90
- Moreno ML, Pérez D, García MT, Mellado En. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life.* 3 : 38-51.
- Niehaus F, Bertoldo C, Kähler M, Antranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:711-729
- Oren A. (2003). Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publishers.
- Oren A. (2010) Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Env. Technol.* 31: 825-834
- Prakash O, Jaiswal N. (2010). Alpha-Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, 2401–2414.
- Preiss L, Hicks DB, Suzuki S, Meier T, Krulwich T A. (2015). Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 : 75
- Prieur D, Jebbar M, Derrien J-L. (2010). Les thermopiezophiles ou la vie dans un autocuiseur ! *Biofutur.* 310 : 39-44.
- Quérellou J, Guezennec J. (2010). Biotechnologie des extrêmophiles. *Techniques de l'ingénieur, BIO 580.*
- Rampelotto P H. (2016). Biotechnology of extremophiles. *Advances and challenges.* Ed : Grand challenges in biology and biotechnology. Springer International Publishing Switzerland.
- Sachslehner A, Foidl G, Foidl N, Gubitza G, Haltrich D (2000). Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotechnol.* 80:127-134
- Saha BC. (2000). α -L-Arabinofuranosidases – biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Advances.* 18:403-423.
- Sarethy IP, Saxena Y, Kapoor A, Sharma M, Sharma S K, Gupta V, Gupta S. (2011). Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38:769–790
- Satyanarayana T, Littlechild J. (2013). Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. Springer Dordrecht Heidelberg – New York, 2nd Ed.
- Schiraldi C, De Rosa M. (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol.* 20:515-521.
- Schiraldi C., Marulli F, Di Lernia I, Martino A, De Rosa M. (1999). A microfiltration bioreactor to achieve high cell density in *Sulfolobus solfataricus* fermentation, *Extremophiles*, 3, 199–204.

Références bibliographiques

- Sharma A, Satyanarayana T. (2013). Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochem.* 48, 201–211.
- Sharma A, Kawarabayasi Y, Satyanarayana T. (2012). Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles.* 16:1–19.
- Shivlata L, Satyanarayana T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic *Actinobacteria*: biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6 : 1014.
- Singh SA, Ramakrishna M, Appu Rao AG. (1999). Optimisation of down stream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochem.* 35:411-417.
- Stanier RY, Van Niel CB. (1962). The Concept of a Bacterium. *Arch. Mikrobiol.* 42:17-35.
- Stan-Latter H. (2012). Physico-chemical boundaries of life. In *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*; Stan-Latter H, Fendrihan S, Eds. Springer-Verlag: New York, NY, USA, pp. 1–14.
- Tomme P, Warren RAJ, Gilkes NR. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. In *Advances in Microbial Physiology*. Poole RK edition. London: Academic Press. V 37.
- Turner P, Mamo G, Nordberg Karlsson Eva. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Fact.* 6:9.
- Ventosa A, Nieto JNJ, Oren A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 504–544
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4576–4579.
- Wyman CE. (2003). Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. *Biotechnol. Progress.* 19:254-262.
- Zamith L, Dalmaso G, Ferreira D, Beatriz Vermelho A. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Mar. Drugs* .13 : 1925-1965.

Références électroniques

<http://www.ifremer.fr/serpentine/fiches/fiche3.htm>

<http://www.bacterio.cict.fr/>