

---

---

## LES MICRO-ORGANISMES DE L'EXTRÊME

---

---

**Patrick GREGOIRE<sup>1,2</sup>, ML FARDEAU<sup>2</sup>, S GUASCO<sup>3</sup>, A BOUANANE<sup>4</sup>,  
V MICHOTEY<sup>3</sup>, P BONIN<sup>3</sup>, K DUBOURG<sup>1</sup>, J CAMBAR<sup>1</sup> et B  
OLLIVIER<sup>2</sup>**

### Résumé

De nombreuses équipes de recherche dans le monde étudient des micro-organismes qualifiés d'extrémophiles qui, pour certains, vivent en présence de sel à forte concentration (halophiles), pour d'autres à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles) ou sous pression (piézophiles). Ces conditions de vie non conventionnelles nous laissent penser que ces microbes de l'extrême ont mis en place des stratégies originales (enzymes spécifiques) pour s'adapter aux stress physico-chimiques auxquels ils sont confrontés. Plusieurs de ces activités enzymatiques peuvent aujourd'hui trouver des applications en biotechnologie. La plupart des écosystèmes dans lesquels ces organismes se retrouvent sont les marais salants, les sources ou lacs acides ou basiques et les sources géothermales marines terrestres ou sub-terrestres comme les aquifères dits "thermaux" du Bassin Aquitain.

*Mots clés : extrémophiles, enzymes, bio-industrie, aquifères Bassin Aquitain*

### Abstract

#### The extremophilic micro-organisms

Numerous research teams in the world are studying extremophilic micro-organisms, some of them, living at high salt concentrations (halophiles), at cold or hot temperatures (psychrophiles or thermophiles), at low or high pH (acidophiles or alcaliphiles) or under pressure (piezophiles). These unconventional conditions for life suggest that such microbes use original strategies (specific enzymes) to adapt to physico-chemical constraints that they have to face. Several of these enzymatical activities are nowadays good candidates to be used in biotechnological processes. Most of the ecosystems where these organisms are found are marine salterns, acidic and alkaline springs, together with marine, terrestrial or subterrestrial geothermal springs like the deep hot aquifers in the Aquitaine Basin.

*Key words : extremophiles, enzymes, bio-industry, aquifers, Aquitaine Basin*

---

<sup>1</sup>. Institut du thermalisme - Université Victor-Segalen-Bordeaux2, 8 rue Sainte Ursule, 40100 Dax.  
Courriel : patrick.gregoire@u-bordeaux2.fr

<sup>2</sup>. IRD, UMR 180, Universités de Provence et de la Méditerranée, CESB-ESIL case 925,  
163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09

<sup>3</sup>. LMGEM, UMR6117, Centre d'océanologie de Marseille, Campus de Luminy - Case 901,  
163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09

<sup>4</sup>. Laboratoire de microbiologie, Faculté de Biologie, Université de Bab Ezzouar U.S.T.H.B., Alger, Algérie

## 1. Le monde des extrêmophiles

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante : pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPa, température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels supérieures à 3-4 % en NaCl jusqu'à saturation (35 % en NaCl). Nous aborderons donc ici les habitats qui sont occupés par les principaux groupes d'extrêmophiles que sont les psychrophiles, les thermophiles, les acidophiles, les alcaliphiles, les halophiles et enfin les piézophiles en insistant sur les connaissances que nous avons d'un point de vue microbiologique dans ce domaine et les possibilités d'applications industrielles en relation avec les enzymes que possèdent ces micro-organismes aussi originaux.

### 1.1 Les micro-organismes psychrophiles

Les bactéries psychrophiles sont des bactéries adaptées au froid pouvant vivre dans des environnements variés : régions arctiques, glaciers pour les températures négatives, et les océans profonds pour des températures légèrement positives (aux alentours de 4°C) etc.... Selon la classification la plus répandue [4], les micro-organismes psychrophiles auraient un optimum de croissance entre 15°C et 20°C, certains pouvant se développer en dessous de 0°C. Il existerait également des bactéries dites psychrotolérantes dont l'optimum serait entre 20°C et 35°C.

Aux deux pôles, ce sont les *alpha*-, et *gamma*-protéobactéries mais également les cytophagas-flavobactéries qui dominent. Les archées représenteraient jusqu'à 30 % de la population totale dont une majorité de *Methanoarchaea*. Les genres bactériens les plus rencontrés sont : *Alteromonas*, *Colwellia*, *Glacieola*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Polaribacter*.

60 % de la surface terrestre est composée d'eaux marines à plus de 1000 mètres de profondeur ayant une température autour de 4°C. Dans ces conditions environnementales, les bactéries sont dites psychrophiles, mais peuvent être également piézophiles (voir chapitre 1.4) ; tous les genres appartiennent aux *gamma*-protéobactéries avec 5 genres dominants : *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella*, *Shewanella* et *Psychromonas*. La caractéristique commune à toutes ces bactéries est la capacité à produire des acides gras poly-insaturés entrant de 50 à 70 % dans la composition de la membrane cytoplasmique.

### 1.2 Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles

Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles vivent à des températures optimales de croissance de l'ordre de 60°C et 80°C, respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives. Ces écosystèmes peuvent avoir une origine : (i) géothermique terrestre : la nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique ; la température de l'eau *in situ* sera fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures

à 100°C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre. C'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, aux Açores ou encore dans le Parc national de Yellowstone (figure 1) ; (ii) hydrothermale océanique profonde : le fluide hydrothermal jaillit au niveau du plancher océanique au travers de fumeurs noirs où le liquide sort à des températures variant de 20 à 400°C selon la localisation ; (iii) pétrolière : certains de ces gisements pétroliers sous-marins et continentaux sont situés entre 1,5 et 4 km de profondeur et présentent des températures allant de 60 à 130°C et des pH généralement neutres.



**Figure 1 : Sources chaudes dans le Parc national de Yellowstone – USA.**

Crédit photo : J.-L. Garcia

On retrouve dans la plupart de ces écosystèmes des gaz comme  $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $CO_2$ , ou  $CH_4$  qui pour certains peuvent servir de sources d'énergie ( $H_2$  en particulier). Les micro-organismes retrouvés dans ces zones appartiennent aux domaines des *Bacteria* et des *Archaea*. Ils possèdent des caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses et interviennent dans la plupart des grands cycles biogéochimiques et notamment celui du soufre (oxydo-réduction des composés soufrés). Chez les *Bacteria*, il existe un grand nombre de bactéries thermophiles anaérobies hétérotrophes à Gram positif de l'ordre des *Clostridiales* (*Thermoanaerobacterium*, *Carboxydibrachium*, etc.), mais également des espèces aérobies appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermus* telles que les espèces des genres *Thermus*, *Rhodothermus*, etc.... À des températures plus élevées (parfois au-delà de 80°C), on retrouve des membres des phylums *Aquificae*, *Thermotogae* et *Thermodesulfobacteria* qui sont pour la plupart anaérobies capables de réduire les composés soufrés, excepté les *Aquificae* dont les représentants sont essentiellement des micro-aérophiles pouvant croître en autotrophie en utilisant l'hydrogène comme source d'énergie [13].

Chez les *Archaea* thermophiles et hyperthermophiles, il existe deux phylums, celui des *Euryarchaeota* regroupant des hyperthermophiles (croissance possible jusqu'à 110°C pour certains) producteurs de méthane ou *Methanoarchaea*, le plus souvent chimio-litho-autotrophes et des chimio-organotrophes. On distingue chez les *Methanoarchaea* en particulier, les *Methanococcales* isolées d'environnements hydrothermaux sous-marins ou terrestres, les *Methanopyrales* dont l'unique représentant, *Methanopyrus kandleri*, est la *Methanoarchaea* la plus thermophile. Parmi les chimio-organotrophes, les *Thermoplasmatales* sont les thermophiles les plus acidophiles connues chez les

anaérobies. Elles colonisent des habitats chauds et acides tels que les terrils et des sources chaudes terrestres. En ce qui concerne les *Thermococcales* le plus souvent isolées de sources hydrothermales océaniques profondes et côtières, mais également des eaux de gisements pétroliers, elles sont capables de se développer sur des substrats organiques complexes (protéines, sucres) et ont la capacité de réduire le soufre élémentaire en hydrogène sulfuré ( $H_2S$ ). Enfin les *Archaeoglobales* représentées par seulement 3 genres (*Archaeoglobus*, *Geoglobus* et *Ferroglobus*) sont impliquées dans la réduction des composés soufrés ou du fer.

Le phylum des *Crenarchaeota* est lui composé en majorité de micro-organismes chimio-litho-autotrophes et quelques espèces chimio-organotrophes. On citera en particulier les *Sulfolobales*, qui sont plutôt spécifiques des habitats chauds terrestres alors que les *Desulfurococcales* colonisent essentiellement les habitats volcaniques sous-marins. Ces derniers sont des hyperthermophiles chimio-organotrophes aérobies ou anaérobies qui métabolisent le soufre. Ils peuvent être également chimio-lithotrophes stricts, souvent capables de réduire le soufre élémentaire. Une des caractéristiques majeures de cet ordre est qu'il comporte les organismes les plus thermophiles connus à ce jour : les espèces des genres *Pyrodictium* et *Pyrolobus* sont en effet capables de se développer à des températures supérieures à  $100^\circ C$ . *Pyrolobus fumarii* isolé d'une cheminée hydrothermale de la dorsale medio Atlantique détient le record de la température de croissance la plus élevée ( $113^\circ C$ ) chez les procaryotes. En ce qui concerne les *Sulfolobales*, les espèces du genre *Sulfolobus* plus particulièrement sont capables d'oxyder les composés soufrés ( $H_2S$  et  $S^0$ ) en acide sulfurique tandis que celles du genre *Acidianus* sont capables aussi bien d'oxyder  $S^0$  en acide sulfurique que de le réduire en  $H_2S$ .

### 1.3 Les micro-organismes halophiles

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

La composition physico-chimique notamment de ces lacs varie avec la topographie environnante et la géologie. Nous nous intéresserons tout particulièrement à ces lacs salés. Il en existe deux types, ceux formés par évaporation totale principalement d'eau de mer, et ceux formés par évaporation d'eaux résultant du lessivage des roches par la pluie. Dans ce dernier cas, la composition physico-chimique de l'eau est influencée par les couches géologiques traversées par ces eaux. On trouve par exemple les lacs sulfatés et les lacs alcalins (pH compris entre 9 et 12) contenant majoritairement du carbonate et une absence totale de  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  car ils précipitent dans de telles conditions de pH.



**Figure 2 : Exemple d'un écosystème hypersalé : le lac Retba du Sénégal.**

Crédit photo : P. Roger

Les micro-organismes halophiles appartiennent aux trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) [10]. Les bactéries halophiles (modérées et extrêmes) anaérobies appartiennent à l'ordre des *Halanaerobiales* [18] qui comprend deux familles : les *Halanaerobiaceae* et les *Halobacteroidaceae* dont les espèces fermentent les hydrates de carbone à l'exception d'une bactérie homoacétogène qui réduit le  $\text{CO}_2$  en acétate et croît sur bétaïne et triméthylamine, *Acetohalobium arabaticum*. La plupart de ces espèces sont des modérées halophiles avec un optimum de croissance entre 3 et 25 % de NaCl. On retrouve également dans le domaine des *Bacteria*, des micro-organismes sulfato-réducteurs modérés halophiles pouvant croître jusqu'en présence de 24 % de NaCl. Ils appartiennent en particulier au genre *Desulfohalobium* et oxydent incomplètement leurs substrats. Chez les *Archaea*, les *Methanoarchaea* anaérobies sont spécialisées dans l'utilisation de composés méthylés. En ce qui concerne les aérobies hyperhalophiles, ils appartiennent à la famille des *Halobacteriaceae*. Ils nécessitent un minimum de 10 % de NaCl pour croître et sont hétérotrophes. Certains de ces micro-organismes peuvent avoir un métabolisme fermentaire. Enfin, des organismes eucaryotes peuvent s'adapter ou survivre dans ces écosystèmes hypersalés, il s'agit d'algues, de diatomées, de protozoaires ou même de champignons.

#### 1.4 Les micro-organismes piézophiles

Les bactéries piézophiles sont largement représentées sur la planète. En effet, la profondeur moyenne des océans est de 3800 mètres (380 MPa) avec un maximum à 10790 mètres au plus profond de la Fosse des Mariannes où la pression atteint 110 MPa. Outre le milieu aquatique marin, il est possible de retrouver de tels micro-organismes dans les aquifères profonds, la croûte terrestre ou les réservoirs pétroliers.

Les bactéries piézophiles vivant dans des conditions abyssales océaniques (>5000 m) sont également des bactéries psychrophiles car la température moyenne à ces profondeurs est de l'ordre de 4°C. On parle donc dans ce cas de bactéries piézopsychrophiles. La première bactérie piézopsychrophile isolée est la souche CNPT 3, apparentée au genre *Spirillum*, retrouvée à une profondeur de 5600 mètres. Elle se développe de manière optimale entre 2 et 4°C pour une pression de 50 MPa. Une deuxième souche, la souche MT 41 collectée à 10476 mètres, pousse de manière optimale à 2°C et à 69 MPa. En étudiant plusieurs souches piézophiles, il a été conclu que les bactéries vivant à des

profondeurs de plus de 2000 mètres sont piézophiles, généralement hétérotrophes et que la pression optimale de croissance d'une bactérie piézophile est toujours inférieure à la pression de la profondeur de collecte des échantillons. Nombreuses de ces bactéries piézopsychrophiles appartiennent à la subdivision *gamma* des protéobactéries [24].

Les sources hydrothermales océaniques profondes constituent également un habitat idéal pour les bactéries piézophiles. Situées sur les dorsales océaniques, leur profondeur varie de 800 à 4000 mètres et la gamme de température s'étend de 2°C à 350°C (avec la pression hydrostatique) sur quelques centimètres. On peut donc y retrouver des thermopiézophiles. Certaines de ces souches sont apparues piézosensibles, d'autres piéztolérantes, d'autres enfin piézophiles. Ce n'est que récemment qu'une archée hyperthermophile et piézophile a été décrite [25].

### 1.5 Les micro-organismes acidophiles

Les environnements où sont retrouvés les micro-organismes acidophiles ont généralement un  $\text{pH} < 4$ , et sont souvent riches en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...) et métalloïdes. Ils peuvent avoir pour origine des activités volcaniques où l'acidité résulte de l'activité oxydative aérobie microbienne (mésophile ou thermophile) du soufre élémentaire ( $\text{S}^0$ ) en sulfates et ions hydrogène ( $\text{H}^+$ ) et les activités minières où les composés sulfurés (principalement la pyrite :  $\text{FeS}_2$ ) subissent les attaques abiotiques et biotiques en conditions oxydantes pour donner des écoulements d'eaux minières acides composées d'hydroxyde de fer, de sulfates et d'ions hydrogène ( $\text{H}^+$ ). La plupart de ces micro-organismes sont des chimio-lithotrophes acidophiles dont le métabolisme cellulaire est basé sur l'oxydation des composés ferreux et soufrés.

L'écosystème acide le plus étudié est le Río Tinto en Espagne avec un  $\text{pH} < 2$ , une longueur de 100 km de long, une concentration importante en métaux lourds et un surprenant niveau de diversité microbienne [6].

On compte dans ces environnements acides des chimio-lithotrophes capables d'oxyder le fer et les composés minéraux soufrés appartenant aussi bien au domaine des *Bacteria* (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum* spp. etc... chez les mésophiles et *Sulfobacillus* spp. chez les thermophiles) qu'à celui des *Archaea* (*Ferroplasma* et *Sulfolobus* spp. ; ces espèces sont essentiellement thermophiles). Les hétérotrophes strictes et facultatives colonisent également les environnements acides, elles appartiennent aux genres *Acidiphilium* et *Acidimicrobium* du domaine des *Bacteria*.

### 1.6 Les micro-organismes alcaliphiles

Les bactéries alcaliphiles vivent à un  $\text{pH} \geq 9$ . Parmi celles-ci, on reconnaît les alcalitolérantes capables de se développer à  $\text{pH} \geq 9$  mais avec un pH optimum de croissance proche de la neutralité et les alcaliphiles dont le pH optimum de croissance est  $\geq 9$ . Les bactéries alcaliphiles peuvent également être halophiles et se développer jusqu'à des concentrations en sel ( $\text{NaCl}$ ) proches de la saturation (35 % de  $\text{NaCl}$ ), notamment dans les lacs et déserts sodiques ou les sources alcalines. L'alcalinité du milieu ambiant est induite par la forte concentration en carbonate, mais la différence d'un milieu à un autre se situe au niveau de la salinité.

En ce qui concerne les environnements alcalins salés à fortement salés, ce sont des bassins fermés où la vitesse d'évaporation est élevée et permet d'atteindre une salinité de 35 % en NaCl pour des pH compris entre 8 et 12. Ces lacs aux couleurs pouvant aller du vert au rouge, en passant par le rose ou l'orange selon la saison et l'ensoleillement se retrouvent sur les continents américain, australien, africain, asiatique et même en Europe. La diversité microbienne retrouvée dans ces environnements est très variée mais les bactéries halo-alcaliphiles les plus étudiées sont les communautés productrices primaires telles que les cyanobactéries filamenteuses (*Spirulina*, *Anabaenopsis* et *Arthrospira*) ; et les bactéries pourpres anoxygéniques (*Ectothiorhodospira* et *Halorhodospira*) mais également les bactéries fermentaires anaérobies Gram positif à faible G+C %.

À l'inverse les environnements alcalins faiblement salés sont plus rares. Ces sources thermales alcalines présentent de fortes concentrations en calcium avec un pH > 11. Ces sources sont localisées en Californie, Oman, Chypre, en ex-Yougoslavie et en Jordanie.

## 2. Les micro-organismes extrêmophiles : cas des aquifères thermaux du bassin aquitain

En réponse à la réglementation du 19 juin 2000 (DGS/VS 4 N°2000-336) relative à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux recommandant l'absence totale de germes pathogènes dans les eaux minérales naturelles, il semble opportun de caractériser la flore indigène thermophile des eaux thermales. La diversité géologique, hydrogéologique et physico-chimique (températures modérément chaudes, pHs neutre ou alcalin) des systèmes profonds du Bassin Aquitain laisse supposer l'existence d'une biodiversité microbienne qui demeure à ce jour inconnue. En regard des différents aquifères thermaux du Bassin Aquitain et en l'absence de connaissances microbiologiques, l'étude menée sur les eaux minérales naturelles de Dax, Saint-Paul-Lès-Dax et Bagnères-de-Luchon (figure 3) vise à identifier les micro-organismes thermophiles pouvant y exister, en utilisant des outils microbiologiques et d'écologie moléculaire. Les premiers résultats microbiologiques nous ont permis d'identifier une espèce apparentée à la souche *Thermus scotoductus* (figure 4). L'importance écologique de ce micro-

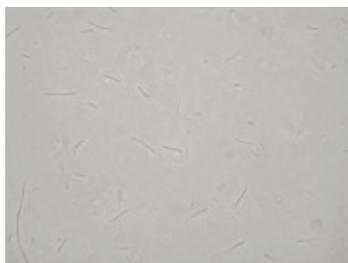


**Figure 3 : Photo de l'émergence d'un griffon d'eau minérale naturelle de Bagnères-de-Luchon**

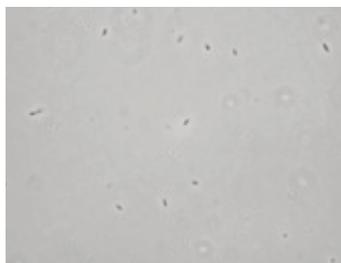
organisme dans cet aquifère est confirmée par les études moléculaires qui mettent également en avant ce micro-organisme ; une souche apparentée à *Desulfotomaculum kuznetsovii* a également été isolée (figure 5), il s'agit d'une bactérie sulfato-réductrice anaérobie stricte qui interviendrait, selon les milieux, dans des processus de biodétérioration [14]. Il a été possible également d'isoler un micro-organisme proche de *Geobacillus stearothermophilus* à partir du forage SPDX.

Les espèces du genre *Thermus* spp. sont anaérobies facultatives [1], elles poussent à un optimum de température compris entre 42°C et 73°C [12]. Selon les souches, elles peuvent être pigmentées en jaune, non-pigmentées [21] ou brun clair [1]. Elles ont été isolées de sources chaudes au Portugal, dans le parc national de Yellowstone aux USA, en Angleterre, en Nouvelle Zélande, en Afrique du Sud, dans les mines d'or au Japon [1, 21,16] et même dans l'eau chaude du robinet en Islande [12].

Le genre *Geobacillus* compte 17 espèces chimio-organotrophes anaérobies facultatives et thermophiles (37-75°C) ayant une croissance optimum entre 55 et 65°C. Certaines espèces sont capables de produire des pigments. Ces micro-organismes sont généralement localisés dans des sources chaudes de Russie, des sols australiens, des réservoirs pétroliers à haute température notamment en Lituanie ou encore des échantillons de sol chaud dans le parc national de Yellowstone (USA) [17].



**Figure 4 : Photo de  
*Thermus scotoductus***



**Figure 5 : Photo de  
*Desulfotomaculum kuznetsovii***

Le genre *Desulfotomaculum* spp. compte 27 espèces anaérobies strictes, capables de respirer le sulfate, le sulfite et les composés soufrés oxydés avec production d'H<sub>2</sub>S. Leur température optimale de croissance se situe entre 20 et 65°C et elles ont la capacité de sporuler. Les diverses espèces ont été isolées d'échantillon de sédiments de fjords en Norvège, d'eaux douces, de zones géothermales actives au Japon, Australie ou en Islande, de fermes moscovites, de rumen, de champs pétrolifères ou même de rizières [23].

Les espèces des genres *Thermus* et *Geobacillus* sont connues pour être des représentants notoires des sources hydrothermales qu'elles soient terrestres ou sub-terrestres. À ce titre, on peut d'ores et déjà considérer que ces souches pourraient avoir un rôle géomicrobiologique significatif dans l'écosystème étudié.

Les résultats d'écologie moléculaire, obtenus à partir de sondes destinées à la détection d'organismes bactériens, nous permettent d'élargir la visibilité de la biodiversité existante notamment dans les eaux minérales naturelles de Dax (forages St Christophe) grâce

à la détection de 7 clones (6 appartenant au règne des *Bacteria* et 1 au règne des *Archaea*) et de Saint-Paul-Lès-Dax (forage SPDX) avec la détection de 6 clones (5 appartenant au règne des *Bacteria* et 1 au règne des *Archaea*).

Parmi les clones repérés, il existerait une prédominance de micro-organismes thermophiles aérobies ou micro-aérobies avec en particulier la possible présence d'organismes hydrogénotrophes (*Hydrogenophilus* spp.), l'hydrogène pouvant être une source d'énergie d'origine géothermique conséquente. De ce fait, la présence d'espèces bactériennes du genre *Thermus* spp. associé à d'autres thermophiles aérobies pourrait nous laisser penser que l'oxygène, même en faible concentration, pourrait être utilisé en tant qu'accepteur d'électrons dans les aquifères étudiés.

Il faut cependant rester prudent dans la mesure où d'autres accepteurs d'électrons tels que les métaux ou métalloïdes, présents dans la biosphère profonde, pourraient également servir d'accepteurs finaux d'électrons [14]. En l'occurrence, le fer ferrique pourrait être un candidat sérieux pour pallier éventuellement à l'absence d'oxygène *in situ*. Les analyses moléculaires font état de la présence de clones dont les plus proches parents phylogénétiques sont classés parmi les hyperthermophiles anaérobies (membres de l'ordre des *Thermotogales*, *Thermococcales* ou *Archaeoglobales*). Ces organismes ont régulièrement été détectés dans l'écosystème chaud et profond de la croûte terrestre (eaux de gisements pétroliers ou eaux profondes).

## 2.1 Études microbiologiques d'autres eaux "thermales"

Deux autres projets de recherche ont été effectués sur des eaux minérales naturelles chaudes française et algérienne utilisées en établissement thermal.

La première source hydrothermale terrestre est située dans le bassin thermominéral de Chaudes-Aigues au sud-est du Cantal dont la géologie du sous-sol est d'origine volcanique. La station thermale de Chaudes-Aigues est reconnue pour posséder la source hydrothermale la plus chaude d'Europe, appelée "source du Par", profonde de 2200 m et pouvant atteindre à l'émergence une température de 82°C. Dans le cadre des programmes de recherches conduits à l'IRD (Institut de recherche pour le développement) en collaboration avec le LMGEM à Marseille (Laboratoire de microbiologie, géochimie et écologie marines), cette source thermale a été choisie pour étudier la biodiversité des bactéries thermophiles anaérobies. Les résultats obtenus d'un point de vue microbiologique ont permis d'identifier une flore bactérienne à la fois aérobie et anaérobie. Quatre espèces indigènes aérobies ou anaérobies facultatives ont été isolées : *Thermus scotoductus*, *Thermus oshimai*, *Geobacillus kaue* et *Anoxybacillus flavithermus*. Les études microbiologiques destinées à rechercher des bactéries anaérobies ont permis d'isoler 2 espèces indigènes, *Moorella glycerini* et *Hydrogenobacter subterraneus*, dont le rôle géo-microbiologique au travers de l'oxydation de l'hydrogène est certainement important dans les sources chaudes de Chaudes-Aigues [6].

La deuxième source minérale naturelle terrestre étudiée est une source chaude située au nord-est de l'Algérie. Cette eau minérale naturelle a une température à l'émergence de 98°C (la plus chaude d'Algérie), une minéralisation totale de 1650 mg/L à pH 7,3. La composition physico-chimique sulfatée-chlorurée-sodique et magnésienne lui confère

des propriétés thérapeutiques permettant principalement de soigner des affections rhumatologiques et respiratoires. L'étude de biodiversité menée sur cette eau a permis d'isoler des bactéries thermophiles aérobies et anaérobies. La flore indigène aérobie est composée de 3 espèces : *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenar* et *Anoxybacillus hidirlerensis*. Les isollements d'anaérobies mettent en évidence l'espèce thermophile *Caloramator australicus* ainsi que deux nouvelles bactéries appartenant, l'une à la famille des *Clostridiaceae* et la seconde à la famille des *Thermoanaerobacteriaceae* [3].

Au final, l'analyse de la biodiversité bactérienne de ces sources thermales nous permet de mettre particulièrement en évidence deux genres bactériens thermophiles aérobies communs à ces trois sources étudiées *Thermus* et *Geobacillus* spp. Ces micro-organismes apparaissent comme des représentants notoires des sources hydrothermales terrestres ou sub-terrestres, et communs aux écosystèmes chauds de la planète que ce soit sur le continent européen, américain, africain ou asiatique. Ils peuvent être considérés comme des marqueurs biologiques de sources thermales qu'elles soient terrestres ou sub-terrestres.

### 3. Les micro-organismes extrêmophiles et leurs applications

Les micro-organismes en général sont d'abondantes sources d'enzymes uniques pouvant être utilisées en particulier en biotechnologie. Pour faire face à la demande croissante des industriels notamment dans le domaine des biocatalyses et en se basant sur le modèle de la synthèse organique "traditionnelle" pour aboutir à une chimie "verte" plus respectueuse de l'environnement, de nombreux efforts ont été fournis pour la recherche d'enzymes d'intérêt. Ceci est particulièrement vrai pour les enzymes provenant de micro-organismes extrêmophiles. Grâce à des générations de sélection naturelle dans les milieux extrêmes, les micro-organismes extrêmophiles ont développé des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimiques auxquelles ils doivent faire face (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront sans nul doute d'un grand intérêt pour intervenir dans un futur proche dans les procédés industriels conduits en conditions de haute température ou de grande salinité en particulier.

En ce qui concerne la stabilité des enzymes actives à des températures élevées d'intérêt industriel, nous pouvons citer les protéases, les lipases et d'autres hydrolases comme les cellulases, les chitinases et les amylases, sans oublier la Taq polymérase [22]. En effet, une des bactéries thermophiles les plus connues dont les enzymes ont trouvé une application industrielle est *Thermus aquaticus*, bactérie thermophile aérobie, isolée en 1969 dans une source chaude du parc national de Yellowstone par le microbiologiste américain Thomas Brock. La Taq polymérase est régulièrement utilisée pour la réaction d'amplification de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dans la plupart des laboratoires de recherche publics ou privés dans le cadre des expériences en biologie moderne. Cette enzyme est capable de supporter les nombreux cycles de montée en température atteignant 94°C [7].

Les applications d'enzymes actives à des basses températures sont également étudiées en partie pour des raisons d'économie d'énergie. L'exemple le plus connu est l'utilisation d'enzymes psychrophiles (protéases, lipases) dans les détergents ménagers. Il est également possible d'utiliser ce type d'enzymes dans l'industrie du papier grâce à des enzymes dégradant les polymères (xylanases). L'adaptation de ces enzymes à leur environnement est expliquée par la relation "activité-stabilité-flexibilité". Celle-ci suggère que les enzymes psychrophiles augmentent leur flexibilité globale ou celle de leur site actif afin de compenser la rigidification induite par le froid. De ce fait, elles gagnent en activité malgré une perte de stabilité [4]

Les bactéries halophiles à hyperhalophiles ont la capacité de croître dans des conditions hypersalées grâce à une régulation osmotique intracellulaire aboutissant à l'accumulation de molécules de bas poids moléculaires leur permettant de vivre en isotonie avec le milieu naturel. Ces molécules de bas poids moléculaires, comme la glycine-bétaine ou l'ectoïne, présentent un grand intérêt notamment dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Ceci est particulièrement vrai pour l'ectoïne qui est un des composants importants de certaines crèmes à vocation hydratante. En ce qui concerne les enzymes halophiles, elles peuvent supporter des concentrations très élevées de sel (par exemple, 30 % en NaCl ou KCl) [22,5] et sont tout à fait applicables dans des procédés industriels qui génèrent des sels (neutralisation des acides dans l'industrie). Certaines bactéries, comme *Halomonas eurihalina*, produisent de grandes quantités d'un polysaccharide extracellulaire poly-anionique (EPS V2-7) aux propriétés émulsifiantes utilisé en industrie alimentaire ou pharmaceutique. Une multitude d'autres utilisations peut être envisagée en biotechnologie : élimination du sel, des composés aromatiques, organophosphorés et phénoliques, etc.... Concernant la production d'une enzyme par *Halobacterium halophilum*, la bactériorhodopsine, son imprégnation sur des puces informatiques augmenterait les performances de ces dernières.

Des bactéries halophiles se développant à 19 % de NaCl interviennent également en industrie alimentaire, notamment dans la fermentation de la sauce soja ou dans la préparation de la sauce poisson appelée "nuoc mam". Dans le cadre de la biologie moderne, il est concevable de réaliser des transferts génétiques permettant de donner des capacités de résistance au sel et à la sécheresse à des céréales comme le blé, le riz ou l'orge, tenant compte de l'information génétique générée par le séquençage de génomes de bactéries halophiles.

Les bactéries acidophiles et alcaliphiles sont capables de produire des protéases, des amylases, des lipases et autres enzymes résistantes et actives à pH élevé et à des hautes concentrations chélatrices de détergents.

Dans cet esprit, des processus d'hydrolyse de polymères à pH acide ont fait intervenir des biocatalyseurs d'acidophiles. C'est le cas de plusieurs enzymes utilisées pour l'hydrolyse de l'amidon (les amylases, pullulanases, glucoamylases et glucosidases qui doivent être actives à pH acide) [2,20].

Enfin les protéines résistantes à la pression peuvent être utiles, en particulier pour la production alimentaire où la haute pression est appliquée pour le traitement et la

stérilisation de produits alimentaires [9]. Contrairement au traitement à haute température, les hautes pressions sont spécifiques dans la mesure où : (a) elles ne provoquent pas la réaction de Maillard, (b) elles ne modifient pas les liaisons covalentes, et donc ne peuvent pas détruire les arômes naturels ou les colorants, comme c'est le cas avec la température.

#### 4. Conclusion

Les procaryotes montrent une extraordinaire capacité d'adaptation aux conditions physico-chimiques drastiques régnant dans certains environnements dits "extrêmes" tant en termes de température, de salinité, de pH que de pression hydrostatique. Dans de tels écosystèmes, on retrouve des chimio-lithotrophes, mais également des chimio-hétérotrophes pouvant croître en présence ou en absence d'oxygène et appartenant aux trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) selon les cas. Les enzymes de ces micro-organismes trouvent, d'ores et déjà, des applications en biotechnologie et l'on peut penser que cette gamme d'applications devrait s'élargir à court terme. Grâce aux approches microbiologiques et moléculaires, le biofonctionnement de niches écologiques qu'occupent ces extrémophiles est de mieux en mieux appréhendé, mais il reste encore de grandes inconnues biogéomicrobiologiques, notamment dans le domaine de la biosphère profonde où un certain nombre d'évènements métaboliques n'ont toujours pas été complètement élucidés (biogradation anaérobie des hydrocarbures par exemple, importance de la sulfato-réduction par rapport à la ferro-réduction, la méthanogénèse ou l'homoacétogénèse etc...). Cependant, c'est très certainement en continuant d'étudier ces micro-organismes aussi particuliers que nous pourrions améliorer les conditions de vie sur notre planète en passant à une chimie "verte" plus en adéquation avec notre environnement, mais également apporter des réponses à la possible existence de vie sur d'autres planètes ?

#### Bibliographie

1. Balkwill DL, Kieft TL, Tsukuda T, Kostandarithes HM, Onstott TC, Macnaughton S, Bownas J, Fredrickson JK. Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* 2004;8,1:37-44.
2. Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic *Archaea* and *Bacteria*. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:151-160.
3. Bouanane A, Grégoire P, Hedi A, Guasco S, Bonin P, Michotey V et al. Biodiversité bactérienne de sources thermales algériennes. 4<sup>èmes</sup> journées scientifiques de microbiologie, Tunisie 2008.
4. D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. Psychrophilic micro-organisms : challenges for life. *EMBO* 2006 Rep;7: 385-389.
5. Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS. Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5:144-151.
6. Fardeau ML, Gounant C, Dorléac N, Cayol JL and Ollivier B. Isolation and phylogenetical characterization of anaerobic thermophiles originating from thermal springs in France. In *Thermophiles 05 – From evolution to revolution. International Conference, Griffith University, Australia* 2005;86.

7. Forterre P. *Microbes de l'enfer*. 2007; Edited by Forterre P. Belin-Pour la science-Paris.
8. Gros M, Jainicke R. Protein under pressure. *Eur J Biochem* 1994;221:617-630.
9. Hayashi R. *Use of high pressure in bioscience and biotechnology*. In High pressure Bioscience and Biotechnology, Edited by Hayashi R, Balny C. Elsevier. 1996:1-6.
10. Kamekura M. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 1998;2:289-295.
11. Kocabiyik S, Erdem B. Intracellular alkaline proteases produced by thermoacidophiles: detection of protease activity by gelatine zymography and polymerase chain reaction (PCR). *Bioresource Technol* 2002;84:29-33.
12. Kristjansson JK, Hjörleifsdóttir S, Marteinsson, VT et Alfredsson, GA. *Thermus scoto-ductus*, sp. nov., a pigment-producing thermophilic bacterium from hot tap water in Iceland and including *Thermus* sp. X-1, *Syst Appl Microbiol* 1994;17:1:44-50.
13. Madigan M, Martinko J. *Brock Biologie des micro-organismes*. Pearson Éducation, France. 2007.
14. Magot M. *Introduction à la microbiologie*. Biodétérioration des matériaux. Edited by Lemaitre C, Pèbère N, Festy D. EDP Science. 1998:27-46.
15. Marhuenda-Egea FC, Piere-Velazquez S, Cadenas C, Cadenas E. An extreme halo-philic enzyme active at low salt in reversed micelles. *J Biotechnol* 2002;93:159-164.
16. Moreira LM, Da Costa MS, Sá-Correira I. Plasmid RFLP profiling and DNA homology in *Thermus* isolated from hot springs of different geographical areas. *Arch Microbiol* 1995;164:7-15.
17. Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova A et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli : descriptions of *Geobacillus subter-raneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:433-446.
18. Ollivier B, Caumette P, Garcia JL et Mah RA. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* 1994;58,1:27-38.
19. Saeki K, Hitomi J, Okuda M, Hatada Y, Kageyami Y, Takaiwa M et al. A novel species of alkaliphilic *Bacillus* that produces an oxidatively stable alkaline serine protease. *Extremophiles* 2002;6:65-72.
20. Serour E, Antranikian G. Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacido-philic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophylus torridus* and *Picrophylus oshhimae*. Antonie Van Leeuwenhoek 2002;81:73-83.
21. Tenreiro S, Nobre MF, Hoste B, Gillis M, Kristjansson JK, Da Costa MS. DNA: DNA hybridization and chemotaxonomic studies of *Thermus scotoeductus*. *Res Microbiol* 1995;146,4:315-324.
22. Van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6:213-218.
23. Widdel F. *The Genus Desulfotomaculum* In The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria – Thrid Edition, Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. Springer. 2006;4:787-794.
24. Yayanos AA. Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995;49:777-805.
25. Zeng X, Birrien JL, Fouquet Y, Cherkashov G, Jebbar M, Querellou J et al. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile : extending the upper pressure-tempe-rature limits for life. *ISME Journal* 2009;1-4,Sous presse.