



République Algérienne Démocratique et
Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de
la Recherche Scientifique
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية
الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم.....

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biologie Moléculaire des Microorganismes*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Etude de la diversité bactérienne thermophile de la source
thermale de Guelma**

Présenté par : Cissé Fanta

Le 24/06/2023

Moussa Inoua Ousseina

Jury d'évaluation :

Président: ADJEROUD Moussa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadrant : HADDI Mohamed-Laid (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinatrice: MERIANE Ilhem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire

2022 – 2023

REMERCIEMENTS

*En tout premier lieu, nous remercions l'omnipotent, **ALLAH** qui nous a éclairé le droit chemin afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions, qui nous a donné la volonté et la patience afin de finir notre étude malgré les difficultés rencontrées.*

*Nous souhaitons tout d'abord exprimer nos sincères remerciements à notre encadrant, **Mr Haddi Mohamed-Laid** professeur à l'université Frère Mentouri, pour sa bienveillance, son encadrement, sa disponibilité ainsi que ses conseils avisés.*

*Nous tenons à remercier, **Mr Adjeroud Moussa**, maitre de conférence catégorie B à l'université Frère Mentouri de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous remercions également **Mme Meriane Ilhem**, maitre de conférence catégorie B à l'université Frère Mentouri d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nos sincères remerciements vont également à l'ingénieur du Laboratoire de biopole **Mme Samira Abbaz**, sa collègue **Ramila Farès** et **Mme Insaf Betaïche** pour leur précieuse collaboration et pour son soutien.*

*Nous remercions l'ingénieur du Laboratoire Microbiologie **Mme hanane Ayoune** pour l'aide qu'elle nous a apporté*

*Nous remercions spécialement **Mme Zerguini Ouarda Nadia**, responsable du bureau des étudiantes étrangers depuis 20 ans, pour avoir réuni toutes les étudiants et étudiantes étrangers, pour nous avoir conseillés, supportés, aidés dans nos moments difficiles.*

Enfin nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A Allah le tout puissant le tout miséricordieux, pour m'avoir montré ce jour, pour la patience et le courage de finir ce travail.

*A mon adorable et aimable **famille Moussa Inoua**, pour leur amour, leur bénédiction et pour m'avoir offert une éducation digne, je suis profondément reconnaissante.*

J'en suis profondément reconnaissante pour les prières que vous reformuler à mon égard, pour votre accompagnement chaleureux depuis ma tendre enfance, sont une source de gratitude infinie.

*Je souhaite exprimer ma reconnaissance à ma merveilleuse **Maman** qui a toujours été un soutien indéniable pour moi ainsi qu'à mon **Père** pour son accompagnement tout au long de ma vie.*

*A mes chers **frères et sœurs** à qui je souhaite pleins de succès et de réussite dans votre vie.*

*A mon adorable **sœur Nana** merci d'avoir été toujours là pour moi.*

*A mes **cousins et cousines** merci pour vos encouragements.*

*A la mémoire de mes **chers grands-parents** puisse la terre vous être légère.*

*A «**A.S**», merci pour tes conseils, tes encouragements, ton soutien moral et merci de m'avoir accordé de ton temps précieux.*

*A tous mes amies **Malika, Fifi, Madjiri, Haoua, Zeina, Oumy, Rama, Aida, Hadiza, Rachida, Fatima Zara**, merci pour vos soutiens, vos encouragements et pour tous ces bons moments passés ensemble.*

Au personnel du laboratoire d'Agadez.

Moussa Inoua Ousséina.

DEDICACE

*Je dédie spécialement ce mémoire à **mes très chers parents**, qui se sont sacrifiés pour que je puisse avoir l'opportunité de venir étudier dans ce pays. Je ne les remercierais jamais assez pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, pour leurs encouragements, leurs sacrifices, leurs conseils tout au long de mon parcours scolaire et universitaire.*

*A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse ; qui s'est sacrifier pour mon bonheur ; à ma mère **Djènèbou Sow** en témoignage de ma grande affection et de mon profond attachement.*

*A mon grand frère **Mohamed Lamine Cissé**, pour m'avoir conseillée et soutenue de loin. Je te souhaite beaucoup de courage et de réussite dans tes études.*

*A tous **mes promo**, pour nos moments de joie, de folie, de tristesse. Je vous souhaite bonne chance pour le reste.*

*A mon ancienne **Sadio**, pour ces conseils et ces encouragements.*

*A tous mes amies **Fifi, Oumy, Mounira, Haoua, Malika**, pour nos soutiens mutuels.*

Cissé Fanta

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BN : Bouillon nutritif

CO : Monoxyde de carbone

CO₂ : Dioxyde de carbone

CoA : Coenzyme A

FAP : Filamentous anoxygenic phototrophs

GN : Gélose nutritif

G- : Gram négatif

G+ : Gram positif

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel Hydrogène

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

°C : Degré Celsius

µm : Micromètre

Listes des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique codé par couleur présentant les extrémophiles et les traits de résistance trouvés dans au moins chez une espèce de chaque genre.....	5
Figure 2 : Habitats naturels des microorganismes psychrophiles : (A) Montagnes enneigées, (B) Sol gelé : permafrost.	9
Figure 3: (A) Lacs d'acide verts sur le volcan Dallol, Ethiopie, (B) Un sol sulfaté acide.....	10
Figure 4: (A) Lac Natron en Tanzanie, (B) Lac Magadi au Kenya	12
Figure 5: Classification des procaryotes en fonction de leur comportement vis-à-vis de la température.....	14
Figure 6: (A) Les fumerolles sulfureuses d'Italie, (B) Solfatare en Islande	16
Figure 7: (A) Hammam Debbagh de Guelma (Algérie), (B) Source thermale d'Islande.	16
Figure 8: (A) Geysir Pohutu, Nouvelle-Zélande, (B) Geysir d'El Tatio, Chili.	17
Figure 9: Sources hydrothermales : (A) Fumeurs blancs, (B) Fumeurs noirs	17
Figure 10: Tas de compost auto-chauffés	18
Figure 11: Source thermale du Hammam Debbagh.....	30
Figure 12: Zone de prélèvement	31
Figure 13: Rinçage et remplissage des jerricans avec l'eau de source	31
Figure 14: Dispositif de filtration et filtres obtenus	33
Figure 15: Ensemencement sur milieu liquide.....	33
Figure 16: Observation des boîtes au microscope binoculaire (x200).....	36
Figure 17: Tubes après culture à 55°C/10 jours.....	37
Figure 18: Observation microscopique des lames au microscope optique (x1000).....	39
Figure 19: Observation des lames au microscope optique (x1000)	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux types d'extrêmophiles et leurs caractéristiques.....	7
Tableau 2: Température et pH de l'eau de source du Hammam Debbagh, 22 mai 2023.	36
Tableau 3: Caractérisation des bactéries dans l'eau de source telle qu'elle.....	37
Tableau 4: Caractérisation des colonies sur milieu solide (GN).....	38
Tableau 5: Caractérisation des colonies en milieu liquide (BN).....	40

Résumé :

Hamam Debbagh, situé dans la région de Guelma, est reconnu comme la deuxième source thermale naturelle la plus chaude au monde, avec une température de 97°C et un pH de 6,64. Ce lieu abrite une grande variété de microorganismes qualifiés de thermophiles et hyperthermophiles en raison de leur capacité à prospérer dans cet environnement extrême. Ces microorganismes ont développé des mécanismes physiologiques et moléculaires spécifiques pour s'adapter à ces conditions environnementales hostiles à la vie en général. Les microorganismes thermophiles sont particulièrement étudiés pour leur potentiel dans la production d'enzymes thermostables, très recherchées pour diverses applications industrielles, biotechnologiques, et médicales. Notre étude se concentre sur la diversité bactérienne présente dans l'eau de source thermale Hamam Debbagh de Guelma (Est Algérien). Après culture sur gélose nutritive, pendant 72h à 55°C, nous avons utilisé la coloration de Gram pour déterminer les différentes formes et regroupements bactériens. Nos résultats montrent une prédominance des formes bacillaires à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que la présence de cocci isolés à Gram positif et de coccobacilles à Gram positif regroupés en paires. Ces résultats nous offrent un aperçu sur la composition de la communauté bactérienne présente dans cette source thermale où la température dépasse les 90°C.

Mots clés : Source thermale Hamam Debbagh, microorganismes extrémophiles, thermophiles et hyperthermophiles, températures extrêmes.

Table des matières

REMERCIEMENTS	II
DEDICACES	III
Liste des abréviations	V
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	VII
Résumé :	VIII
Introduction	1
Chapitre I : Les microorganismes extrêmophiles	
1) Généralités :	4
1-1) Définition :	4
1-2) Découvertes :	4
1-3) Propriétés :	6
1-4) Application biotechnologique :	6
2) Classification des microorganismes extrêmophiles :	7
2-1) Les microorganismes thermophiles	7
2-2) Les microorganismes psychrophiles	8
2-3) Les microorganismes halophiles	9
2-4) Les microorganismes acidophiles	10
2-5) Les microorganismes alcalinophiles	11
Chapitre II : Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles	
1) Définition et classification	14
2) Habitats	15
2-1) Les habitats naturels	15
2-1-1) Les fumerolles et solfatares	15
2-1-2) Les sources chaudes	16
2-1-3) Les geysers.....	16
2-1-4) Les sources hydrothermales profondes	17
2-2) Les habitats artificiels	18
3) Conditions physico-chimiques de croissance	18
3-1) La température	18
3-2) Le pH.....	18
3-3) La salinité	19
4) Phylogénie des microorganismes thermophiles	19

4-1) <i>Bacteria</i>	19
4-2) <i>Archaea</i>	20
4-3) <i>Eucarya</i>	21
5) Diversité taxonomique et métabolique des bactéries thermophiles.....	21
5-1) Les bactéries autotrophes	21
5-2) Les bactéries hétérotrophes.....	21
5-3) Les bactéries phototrophes.....	22
5-4) Les bactéries chimiolithotrophes.....	22
6) Mécanismes d'adaptation des microorganismes thermophiles.....	23
6-1) Les acides nucléiques.....	23
6-2) La membranes cytoplasmique	24
6-3) Les protéines	24
7) Applications des microorganismes thermophiles	25
7-1) Applications basées sur les biomolécules	25
7-1-1) Les enzymes	25
7-1-1-1) Enzymes de l'ADN.....	25
7-1-1-2) Amylases	26
7-1-1-3) Protéases.....	26
7-1-1-4) Lipases	26
7-1-1-5) Les cellulases	27
7-1-1-6) Les xylanases	27
7-2) Applications basées sur les cellules entières.....	28
7-2-1) Les biocarburants.....	28
7-2-2) Les agents de minéralisation	28
7-2-3) Les piles à combustible microbiennes	29
Chapitre III : Matériel et méthodes	
1) Prélèvement des échantillons d'eau de la sourcee thermique	30
1-1) Préparation du matériel	30
1-2) Site de prélèvement	30
1-3) Les étapes pour l'échantillonnage	30
2) Mesure de la température et du pH	31
3) Préparation du milieu de culture	32
4) La filtration sur membrane.....	32
5) Culture en milieu liquide	33
6) Observation microscopique	34

6-1) Coloration de Gram	34
Chapitre IV : Résultats et discussion	
Résultats	36
1) Mesure de la température et du pH	36
2) Observation macroscopique.....	36
3) Observation microscopique:	37
A.- Coloration de Gram sur lames à partir de l'eau de source telle qu'elle	37
B.- Coloration de Gram sur lames à partir des colonies obtenues sur les membranes filtre sur milieu solide (GN).....	37
C.- Coloration de Gram sur lames à partir des colonies sur milieu liquide (BN) :	39
Discussion :	41
Conclusion et perspectives	44
Références bibliographiques	45
Annexes	54

Introduction

La découverte de groupes microbiens dans des environnements autrefois considérés comme dépourvus de vie a révélé que les paramètres physico-chimiques permettant le développement de la vie sont beaucoup plus larges qu'on ne le croyait. Les organismes qualifiés sous le terme d'extrêmophiles ne se contentent pas de résister aux conditions extrêmes, mais ils y trouvent un environnement propice à leur croissance (Franzetti, 2019).

Les micro-organismes procaryotes sont largement répandus et présentent une grande diversité leur permettant de subsister dans des milieux hostiles. La majorité des bactéries environnementales demeurent méconnues et leurs rôles écologiques restent obscurs. Les bactéries thermophiles résident principalement dans les sources chaudes, subsistent et prospèrent dans les conditions de températures extrêmes (45°C – 122°C) (El Gayar *et al.*, 2017).

Les sources thermales ont été identifiées comme des habitats naturels favorables à l'établissement des bactéries thermophiles. Ces microorganismes ont développé une adaptation remarquable à des températures extrêmes. Ces milieux présentent une diversité en lien avec les particularités géologiques et les caractéristiques physico-chimiques, incluant les écarts de de température (Pandey *et al.*, 2015). L'Algérie renferme de multiples sources d'eaux chaudes naturelles, généralement situées dans les zones montagneuses ou à proximité des zones volcaniques, créant ainsi un cadre magnifique pour bénéficier de leurs propriétés thérapeutiques.

Les micro-organismes thermophiles ont gagné une importance considérable dans le monde en raison de leur potentiel énorme de production d'enzymes thermostables qui ont de multiples applications dans les domaines pharmaceutiques et industriels. L'exemple le plus classique est la production d'ADN polymérase Taq à partir du microorganisme archaéa *Thermus aquaticus*. Parmi les enzymes thermostables, les protéases représentent près de 60 % des ventes totales d'enzymes à travers le monde. Les protéases les plus stables offrent un avantage certain dans les applications car elles ne se dénaturent généralement pas à des températures élevées, tout en conservant leur activité (Panda *et al.*, 2012).

Le but de ce travail est d'examiner la diversité des bactéries présentes dans la source thermale du Hammam Debbagh situé près de la ville Guelma, dans l'Est algérien. Après culture sur un milieu de culture adapté aux microorganismes extrêmophiles, l'analyse a été menée en utilisant la coloration de Gram et l'observation microscopique sur divers échantillons filtrés sur membrane 0,22 µm à partir de l'eau de la source.

Le mémoire est scindé en deux sections :

- La partie bibliographie portera sur les extrémophiles de manière générale. Nous y présenterons principales les informations relatives aux microorganismes thermophiles.
- La partie expérimentale consistera en l'observation de la diversité des bactéries au microscope, après culture suivie de la coloration de Gram. Pour cela, nous avons procédé à une filtration de l'eau de source, sur membrane 0,22 μm , ainsi qu'à des cultures en boîtes de Pétri et en tubes à essai. Enfin, nous avons réalisé des frottis à partir de ces cultures aussi en milieu liquide qu'en milieu solide.

*Chapitre I : Les
microorganismes
extrêmophiles*

1) Généralités :**1-1) Définition :**

Le terme extrêmophile a été créé par MacElroy en 1974. Le mot a été expliqué de plusieurs manières et est devenu associé à des microbes qui peuplent des habitats inhospitaliers pour les mammifères (Irwin et Baird, 2004).

Les extrêmophiles sont définis comme des organismes vivants capables de résister et de se reproduire dans des écosystèmes aux paramètres physiques extrêmes tels que la température, la pression, le rayonnement et la géochimie, extrêmes (salinité, pH, potentiel redox). Les microorganismes polyextrêmophiles sont ceux qui peuvent résister dans plus d'un de ces milieux extrêmes (LealDalmaso *et al.*, 2015).

1-2) Découvertes :

Le concept d'extrêmophile est né à la suite des travaux des microbiologistes pionniers en isolant de nouvelles espèces microbiennes dans des environnements considérés jusque-là comme stériles (Ibtissem Djinni, 2017). Les premiers organismes extrêmophiles isolés appartiennent au groupe des halophiles (du grec *halo*, sel). Ces derniers évoluent dans des concentrations élevées en sel et ont été découverts dans des milieux qu'on pensait dépourvu de vie : la Mer Morte. Une découverte qui n'a attiré l'attention des chercheurs qu'après que Woese et Fox (1977) établissent le 3^{ème} domaine du vivant, les *Archaea*, auxquels ils appartiennent (Khallef, 2019).

A la fin des années soixante, Thomas Brock découvre les premières espèces qui se développent à des températures de l'ordre de 70°C dans des sources thermales du parc de Yellowstone aux États-Unis. En 1969, il isole *Thermus aquaticus* qui sera à la base de la découverte des ADN polymérases thermostables (Ibtissem Djinni, 2017). A la même période, K. Horikoshi (1969), au Japon met en évidence l'existence des microorganismes qui ne se développent que dans des conditions de pH alcalins, passé presque complètement inaperçus auparavant. Puis les microbiologistes allemands W.Zillig et K.Stetter (cités par Guézennec, 2014) donnèrent à ces recherches une impulsion décisive. Ils examinèrent systématiquement les environnements extrêmes de la planète, avec une préférence marquée pour le chaud et la mise en avant d'espèces capables de survivre à 121°C, température à laquelle les opérations de stérilisation sont couramment réalisées en laboratoire et dans l'industrie ! De 1980 à 2000, le laboratoire K.Stetter isola plus de 50 espèces inédites qui appartiennent à de nouveaux

genres, voire de nouvelles familles. De ces travaux et de ceux consacrés à d'autres types de milieux, apparaîtra la notion d'extrêmophiles (Guézennec, 2014).

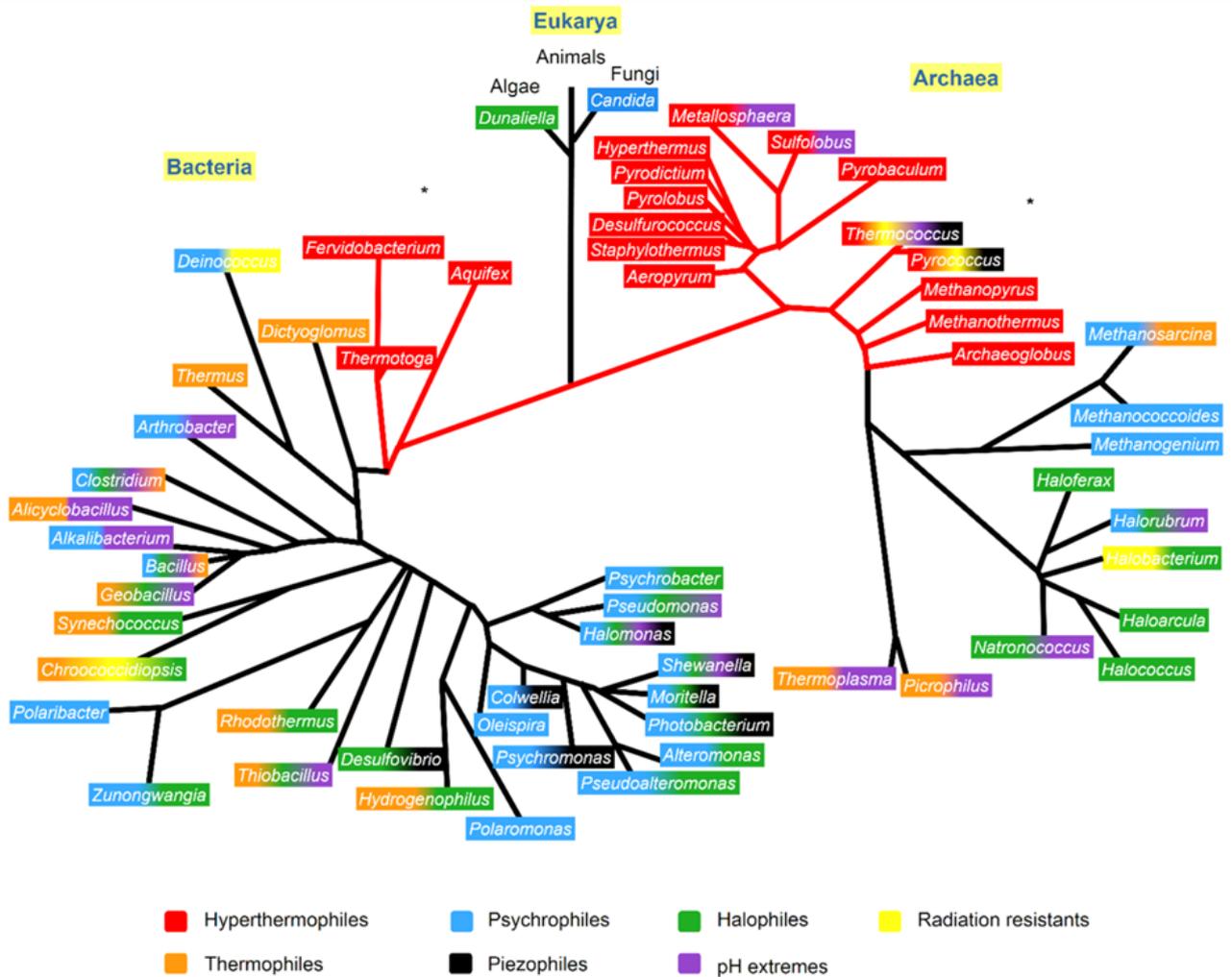


Figure 1: Arbre phylogénétique codé par couleur présentant les extrêmophiles et les traits de résistance trouvés dans au moins chez une espèce de chaque genre. (LealDalmaso *et al.*, 2015).

Les trois domaines de la vie sont désignés dans chaque type d'habitat extrême. Cependant, la grande majorité des extrêmophiles sont des bactéries et des archées, ce qui n'est pas nouveau compte tenu de leur diversité et de leur adaptabilité remarquables (Rafael *et al.*, 2022). Un

arbre phylogénétique affichant les micro-organismes de différents genres et leurs caractéristiques extrêmophiles est représenté à la figure 1. (LealDalmaso *et al.*, 2015)

1-3) Propriétés :

La notion d'extrémophilie, contrairement à celle de résistance aux conditions extrêmes, nécessite que toute la machinerie cellulaire soit adaptée aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de façon optimale dans ces conditions. Cependant, chaque composant cellulaire n'actionne pas forcément à l'optimum dans les conditions de l'environnement extérieur.

Les cellules peuvent contrôler les conditions intracellulaires dans une certaine mesure pour certains paramètres comme l'osmolarité. De ce fait, le pH interne de la cellule de souches alcaliphiles sera inférieur à celui du milieu extérieur et inversement pour les espèces acidophiles (Querellou et Guezennec, 2010).

Pour certains paramètres, comme la température, la pression, en revanche, les conditions du milieu externe se soumettent aux cellules dans leur ensemble, membranes, milieu interne et total des composants cellulaires. Ces composants cellulaires nécessitent non seulement d'être stables dans ces conditions, mais surtout, fonctionnels.

La stabilité de chaque biomolécule isolée et analysée dans les conditions du milieu externe n'est pas toujours obligatoire cependant, du fait que le milieu interne peut profiter de l'action de certains solutés organiques ou d'une protection au sein de complexes macromoléculaires (Belala seif *et al.*, 2021).

1-4) Application biotechnologique :

Les extrêmophiles ont trouvé leur place dans l'industrie, la biotechnologie, la bio-exploitation minière, la médecine, la production d'électricité et sont les meilleures alternatives pour remplacer les enzymes mésophiles (Kaur *et al.*, 2019).

On peut retrouver deux types d'applications différentes. La première consiste en l'utilisation directe des organismes. Cela concerne en particulier les applications liées à la bioremédiation (ensemble des méthodes visant à la restauration d'un environnement grâce à la stimulation des populations indigènes de microorganismes ou à l'approvisionnement de populations adaptées) et à la biolixiviation (ou techniques dans lequel les microorganismes sont utilisés

pour le traitement des minerais) (Salem, 2019). Le deuxième type d'applications se base sur l'utilisation des biomolécules provenant des extrêmophiles. Ces biomolécules sont adaptées pour agir de façon optimale dans les conditions de croissance typiques de ces organismes. Elles sont donc nettement stables dans les conditions physico-chimiques extrêmes et offrent un énorme choix d'utilisations. Parmi ces biomolécules on retrouve les protéines, les enzymes, les lipides, les polymères, les extrêmolytes, les pigments, les biocarburants, etc. (Sahli, 2021).

2) Classification des microorganismes extrêmophiles :

Les microorganismes extrêmophiles sont classés en fonction des paramètres physico-chimiques auxquels ils sont adaptés dans une valeur extrême. Par exemple, pour la température, nous avons des microorganismes hyperthermophiles, thermophiles et psychrophiles. Pour le pH, nous avons des microorganismes acidophiles et alcalophiles, et pour la salinité, nous avons des halophiles (Detay et Thomas, 2018).

Tableau 1 : Principaux types de microorganismes extrêmophiles et leurs caractéristiques.

Types	Caractéristiques
Thermophiles	➤ Se développent à une température de 40°C jusqu'à 90°C (Source hydrothermales).
Psychrophiles	➤ Adaptés au froid, ils se multiplient à des basses températures (< 5°C).
Halophiles	➤ Exige des concentrations élevées en Na Cl dans leurs milieux pour leur croissance.
Acidophiles	➤ Se développent à un pH inférieur 3
Alcalophiles	➤ Pousent de manière optimale à un pH supérieur à 8.

2-1) Les microorganismes thermophiles

Les microorganismes thermophiles ont capté le plus d'attention et sont parmi les plus étudiés des extrêmophiles (Gomes et Steiner, 2004). Ce sont des microorganismes qui ont la capacité de se reproduire à des hautes températures entre 41°C et 122°C (Dumorné *et al.*, 2017). Ils

vivent dans des habitats à haute température : géothermique terrestre, hydrothermale océanique profonde, réservoir pétrolière (Rabouhi et Benbrahim, 2022), des chaudières domestiques et industrielles, des usines de production d'électricité, de drainage minier acide, etc. Une grande diversité de microorganismes a été découverte tout au long des 150 dernières années dans les écosystèmes chauds naturels et artificiels. Cette diversité se compose essentiellement des procaryotes non photosynthétiques (Gomri, 2019).

Les travaux de recherche sur les thermophiles sont pour la plus part motivés par les applications biotechnologiques, deux types d'applications distincts peuvent être retrouvés. La première repose sur l'utilisation directe des organismes et la deuxième sur leurs biomolécules, ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les osmolytes (thermolytes) et une large diversité de métabolites secondaires (Maouchi et Medjedoub, 2020.)

2-2) Les microorganismes psychrophiles

Parmi les conditions extrêmes sur terre, les psychrophiles sont riches en notion de diversité, de biomasse et de distribution (Shukla *et al.*, 2020).

Forster a été le premier à affirmer en 1887 la présence des microbes se reproduisant à une température de 0°C, qui a été isolés de poissons. La première mention du mot « psychrophiles » a été établie par Schmidt-Nielsen en 1902 pour la description des bactéries capable de croître à 0°C (Pikuta *et al.*, 2007). Les organismes psychrophiles (amoureux du froid) se multiplient et prospèrent à une température inférieure à 5°C, généralement aux alentours de 0°C, et souvent en dessous de 0°C dans de l'eau restée liquide en raison de sa forte teneur en sel (Detay et Thomas, 2018).

Les environnements extrêmement froids comprennent les profondeurs océaniques inférieures à 1000 mètres où la température varie entre -1 et 4°C, les régions terrestres où la température des sédiments et de l'eau de mer ne dépassent pas -1°C et où celle de la banquise peut descendre jusqu'à -35°C en hiver, ainsi que les régions alpines et les glaciers où la neige éternelle recouvre 20% des sols (Besse, 2016).



Figure 2 : Habitats naturels des microorganismes psychrophiles : (A) Montagnes enneigées, (B) Sol gelé : permafrost

(Source (A) : <https://fr.freepik.com> ; Source (B) : <https://www.novethic.fr> (consulté le 17/03/2023)).

Tous les domaines de la vie, y compris les Eucaryotes, Archées et Bactéries, ont été évoqué dans des niches écologiques glaciers, les bactéries dominent les habitats glaciaires, suivies des champignons et des algues (Ilahi *et al.*, 2022). Les archées constitueraient jusqu'à 30% de la population totale dont les plus dominants sont des *Methanoarchaea*. Les genres bactériens les plus retrouvés sont : *Alteromonas*, *Colwellia*, *Glacieola*, *Pseudomonas*, *Shewanella* et *Polaribacter* (Gregoire *et al.*, 2009).

Depuis de nombreuses années, les microorganismes psychrophiles sont l'un des réservoirs biotechnologiques les plus développés. En fait, de nombreux procédés industriels impliquent nécessairement des conditions strictes. Par conséquent, les industries alimentaires, pharmaceutiques, de détergents et de papier utilisent des enzymes de ces microbes pour l'amélioration de ces processus. Les enzymes actives à froid sont très bénéfiques en particulier pour leur plus grande sélectivité et stéréospécificité, mais aussi parce qu'ils peuvent catalyser de nombreuses réactions plus efficacement à basse température (<40°C) (Ibtissem Djinni, 2017).

2-3) Les microorganismes halophiles

Le terme halophile, dérivant du grec et signifiant « qui aime le sel » ont été classifié parmi les extrêmophiles, qui ont la capacité unique de proliférer dans des environnements hypersalins (Kumar *et al.*, 2016). Ces environnements hypersalins sont présentés par les systèmes aquatiques et terrestres, ainsi que les produits salés, tels que les aliments salés, les peaux, le sel marin ou gemme, etc. La majorité des études microbiologiques ont été dirigé sur les écosystèmes aquatiques, tel que les lacs salins (Mer morte, Grand Lac Salé, lacs Africains,

Chinois, Antarctiques, etc.) et les marais salants (Ventosa *et al.*, 2014). Les microorganismes halophiles peuvent être retrouvés dans tous les trois domaines de la vie : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya*. Néanmoins, la majorité des halophiles sont des représentants procaryotes (Menasria, 2020). Dernièrement, les gens ont commencé à réaliser l'intérêt des microbes halophiles dans la biotechnologie industrielle grâce à leurs nombreux avantages, tels qu'une consommation d'eau douce infime, une consommation d'énergie limitée, une production continue et un faible investissement en capital fixe. Et de multiples hydrolases produites par les halophiles, telles que les amylases, les lipases et les cellulases, sont prometteuses pour des applications industrielles dans différentes conditions à cause de leur polyextrémophilie (Xie *et al.*, 2017).

2-4) Les microorganismes acidophiles

L'étude des acidophiles extrêmes, définis généralement comme des microorganismes se multipliant de façon optimale à des valeurs de pH inférieures à 3, a été introduite au début des années 1900 par la découverte par Waksman et Joffe (1900) d'une bactérie capable de se reproduire dans l'acide sulfurique dilué qu'elle produirait en oxydant les éléments élémentaires : Soufres (Johnson et Quatrini, 2020).

Les microorganismes acidophiles croissent dans des écosystèmes naturels et artificiels à pH extrêmement bas tels que les lacs acides, certains hydrothermaux, les sols sulfatés acides, les régolithes et minerais sulfurés, de la même manière que les écosystèmes impactés par les mines de métaux et de charbon (Johnson et Schippers, 2017).



Figure 3: (A) Lacs d'acide verts sur le volcan Dallol, Ethiopie, (B) Un sol sulfaté acide. (Source (A) <https://www.pascalboegli.com>; Source (B) <https://www.aquaportail.com> (consulté le 24/03/2023)).

Malgré la nature exigeant de leur milieu, les microorganismes acidophiles présentent des niveaux élevés de diversité phylogénétique (Christel, 2018).

Seuls quatre organismes, étonnement tous des eucaryotes, ont jusqu'à présent été signalés comme se multipliant à des valeurs de pH proche de 0 : le rhodophyte coccoïde *Cyanidium caldarium* ; les champignons *Aconitium cylatium*, *Cephalosporium sp.* et *Trichosporon cerebriae*. Le procaryote le plus acidophile est le mycoplasme archéen *Thermoplasma acidophilum*, qui se développe à peine à pH 0,4 et croît de façon optimale à un pH comprise entre 1,8 et 2 (Schleper *et al.*, 1995). Deux autres microorganismes sont extrêmement acidophiles à savoir *Dunaliella acidophila*, une algue verte qui se développe à un pH entre 0 et 3 avec un optimum de croissance proche de pH 1 (Pick, 1999) et *Ferroplasma acidarmanus*, une eubactérie qui se développe à pH 0 dans le drainage minier acide d'Iron Mountain, en Californie. Parmi les acidophiles, il y a des espèces hyperthermophiles, modérément thermophiles et mésophiles (Pikuta *et al.*, 2007) tels que *Picrophilus oshimae* et *Picrophilus torridus*, deux espèces d'archées hyperacidophiles et thermophiles découvert dans les zones hydrothermales solfatariques à Hokkaido, Japon. Ces deux bactéries sont capables de se reproduire à un pH 0 (Schleper *et al.*, 1996).

Les microorganismes acidophiles jouent un rôle capital dans la bioextractions des métaux à partir de minéraux soufrés en quantité limitée et dans la bioremédiation des sols et des eaux polluées par des procédures de réduction des métaux (Orellana *et al.*, 2018). Les enzymes de ces microbes acidophiles détiennent une grande capacité pour des applications biotechnologiques et industrielles dans la production de biocarburants et d'éthanol (Dumorné *et al.*, 2017).

2-5) Les microorganismes alcalinophiles

Le terme alcalophile est adopté pour désigner les microorganismes qui prolifèrent de façon optimale à un pH élevé de 9, généralement entre 10 et 12 mais ne se multiplient pas ou se multiplient que très lentement à la valeur de pH plus proches du neutre de 6,5 (Horikoshi, 1999).

Les microbes alcalophiles, en particulier les procaryotes sont beaucoup répandus et peuvent être retrouvés dans quasiment tous les écosystèmes, même ceux où le pH global n'est pas spécifiquement alcalin (Grant *et al.*, 1990). En plus d'un pH élevé, les alcaliphiles sont souvent exposés à d'autres conditions extrêmes telles qu'une température ou une salinité élevées, issue d'une combinaison de conditions géologiques, géographiques et climatiques (Mei, 2016). Nous pouvons citer quelques lacs alcalins qui sont aussi hypersalins tels que le

lac Magadi au Kenya et plusieurs autres lacs de la vallée du Rift Est-Africain, les lacs Wadi Natrun en Egypte, les lacs de soude en Chine et en Inde, Mono Lake en Californie et Big Soda Lake au Nevada, Etats-Unis (Oren, 2002).

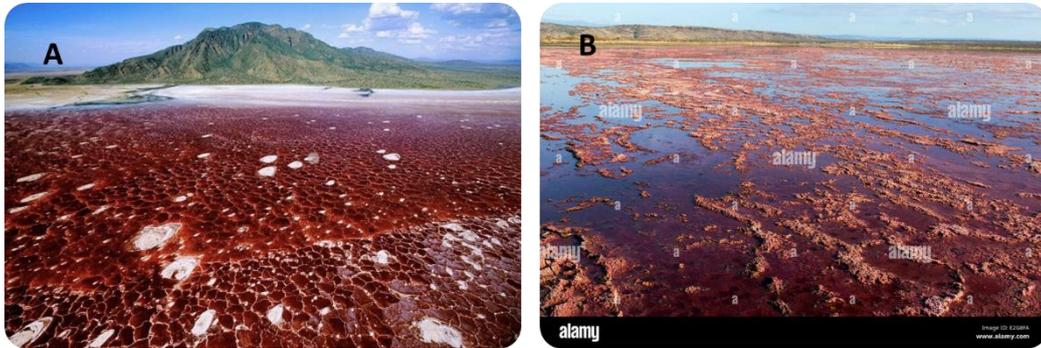


Figure 4: (A) Lac Natron en Tanzanie, (B) Lac Magadi au Kenya.

(Source (A) <https://www.jaloupe-tourisme.fr>; Source (B) <https://www.alamyimages.fr> (consulté le 31/03/2023)).

Les alcalinophiles sont divisés en trois domaines de la vie (*Bacteria*, *Archeae* et *Eukarya*). La première espèce bactérienne tolérante aux pH alcalins, *Streptococcus faecalis*, un aérobie facultatif connu depuis *Enterococcus faecalis*, a été décrite en 1928. Depuis lors, un grand nombre de microorganismes basophiles, photosynthétiques ou chimiosynthétiques ont été trouvés dans des environnements alcalins aérobie et anaérobie (Johnson et Schippers, 2017). Les activités microbiennes trouvées dans ces environnements sont diverses mais les bactéries haloalcalophiles les plus étudiés sont les principales communautés producteurs telles que les cyanobactéries filamenteuses (*Spirulina*, *Anabaenopsis*, et *Arthrospira*); et les bactéries pourpres oxygénés (*Ectothiorhodospira* et *Halorhodospira*) mais aussi des bactéries à fermentation anaérobie à Gram positive à faible GC% (Ahmed Mehdi, 2014).

Les microorganismes alcalophiles offrent de nombreuses applications réelles ou potentielles dans différents domaines de la biotechnologie. Beaucoup d'entre eux non seulement donnent des composés d'intérêt industriel, mais ils détiennent également des propriétés physiologiques intéressantes qui pourraient faciliter leur développement à des fins commerciales (Ulukandi et Digrak, 2002). Ainsi, les alcaliphiles suscitent un énorme intérêt scientifique et biotechnologique en raison de leur spécialisation de niches, de leur grande sélectivité et de leur capacité à générer des protéines stables dans diverses conditions extrêmes (Lebre Pedro et Cowan don, 2019).

*Chapitre II : les
microorganismes
thermophiles et
hyperthermophiles*

1) Définition et classification

En se basant sur leur comportement, les microorganismes sont classés en trois groupes : Les microorganismes psychrophiles et psychrotrophes, les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles.

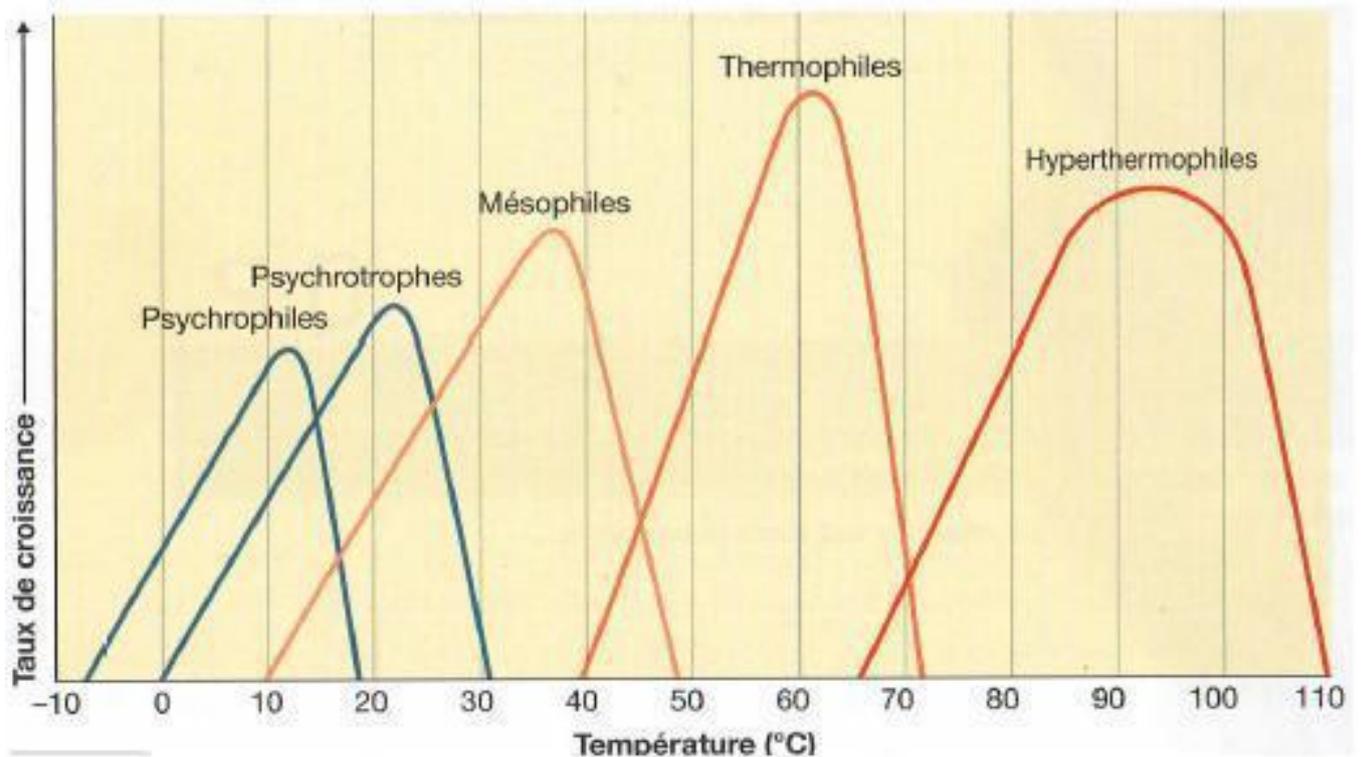


Figure 5: Classification des procaryotes en fonction de leur comportement vis-à-vis de la température.

(Source <https://moodle.iut-tlse3.fr> ; consulté le 07/06/2023)

Les thermophiles et hyperthermophiles sont des microorganismes qui se développent et survivent dans les environnements à haute température (Sarmiento *et al.*, 2015).

Une définition plus pratique et plus large a été énoncée par Karl Stetter démontrant que les organismes thermophiles sont des organismes capables de se reproduire à des températures supérieures à 45°C. Cette définition est intéressante car elle définit quatre sous-catégories parmi les thermophiles :

- **Thermophiles modérés :** Les conditions de croissance optimales sont comprises entre 55 et 65°C.
- **Thermophiles extrêmes :** leur température de croissance optimale est comprise entre 65-80°C.
- **Hyperthermophiles :** la température de croissance optimale est supérieure à 80°C

- **Hyperthermophiles extrêmes :** leurs températures de croissance optimale sont supérieures ou égale à 105°C (Righi et Chaa, 2022).

2) Habitats

Dans la nature, les microorganismes thermophiles et les hyperthermophiles sont généralement trouvés associés aux environnements géothermiques naturels, mais aussi aux biotopes artificiels qui présentent des températures élevées.

2-1) Les habitats naturels

Les habitats naturels pour l'apparition de microbes thermophiles sont distribués partout dans le monde. Ceux-ci peuvent être d'origine terrestre ou marine. Les habitats les plus importants qui abritent une grande diversité de microorganismes thermophiles comprennent les zones géothermiques et volcaniques terrestres et les sources hydrothermales profondes (Sources hydrothermales sous-marines). Les zones géothermiques et volcaniques représentent les fumerolles terrestres (par exemple, les solfatares), les sources chaudes terrestres et les geysers. D'autres écosystèmes naturels représentent des réservoirs de pétroles et de pétroles chauffés par géothermie et des sols/sédiments chauffés par le soleil (Deepika et Tulasi, 2013).

2-1-1) Les fumerolles et solfatares

Une fumerolle est une ouverture dans la croûte terrestre, généralement repérée à proximité des volcans ou dans des régions volcaniques actives, d'où s'échappent des gaz et des fumées chaudes ou très chaudes. Ces gaz ou fumées sont principalement composé de vapeur d'eau et de dioxyde de carbone, mais peuvent également renfermer des éléments toxiques tels que du chlorure, du fluorure ou du sulfure d'hydrogène (Smets, 2022).

Les solfatares se différencient des fumerolles et sont déterminés par leurs émissions de gaz sulfureux. Généralement, les solfatares sont localisés dans des champs de solfatares qui renferment des sols, des eaux de surface et boues chauffées par des activités volcaniques (chambres magmatiques) se trouvant en dessous de ces champs. Ces phénomènes peuvent se retrouver en Islande, Italie, dans le Park National de Yellowstone aux Etats-Unis, au Costa Rica, à Hawaii et aussi dans les Iles Canaries (Thiroux, 2019).



Figure 6: (A) Les fumarolles sulfureuses d'Italie, (B) Solfatare en Islande
(Source (A) <https://fr.dreamstime.com> ; Source (B) <https://www.enfant-en-voyage.com> (consulté le 08/04/2023)).

2-1-2) Les sources chaudes

Les sources chaudes sont des émissions d'eau, de vapeur d'eau à haute température. Leurs origines sont attribuées à des vapeurs d'eau émanant des régions profondes qui lorsqu'elles atteignent la surface se refroidissent et se condensent, créant ainsi des eaux à très haute température. Dans la plupart des cas, la vapeur provenant du magma rencontre un aquifère souterrain sur son chemin d'ascension et convertit son eau en eau chaude (Bouacem, 2016). Dans les biotopes terrestres, les sources chaudes sont courantes, les plus reconnus sont situés aux Etats-Unis, en Russie, en Islande, à la Nouvelle-Zélande, au Japon (Hassad et Immune, 2019).



Figure 7: (A) Hammam Debbagh de Guelma (Algérie), (B) Source thermale d'Islande.
(Source (A) <https://www.gettyimages.ch> ; Source (B) <https://www.destination-islande.com> (consulté le 08/04/2023)).

2-1-3) Les geysers

Les geysers sont des objets géologiques assez attrayants et très connus où la terre rejette occasionnellement de l'eau bouillante et de la vapeur vers le ciel. Il n'y a que quelques

endroits dans le monde où l'on peut observer des geysers, les plus remarquables sont retrouvés aux Etats-Unis, en Russie, en Nouvelle-Zélande, au Chili et en Islande (Detay et Thomas, 2013).



Figure 8: (A) Geyser Pohutu, Nouvelle-Zélande, (B) Geyser d'El Tatio, Chili.
(Source (A) <https://images.app.goo.gl/uME4g1BooENbzYAGA> ; Source (B) <https://www.offset.com> (consulté le 08/04/2023)).

2-1-4) Les sources hydrothermales profondes

Les sources « hydrothermales » sont des émissions de fluides sur les fonds marins, dont la température est élevée par rapport à celle de l'eau environnante. Ces rejets mettent en évidence la circulation de l'eau de mer à travers les roches fracassées sous l'influence d'une source de chaleur (Le Bris, 2013).

Les sources hydrothermales sont localisées dans des zones d'activité tectonique intense et à des profondeurs comprises entre 700 et 4000 mètres, au niveau des dorsales médio-océaniques de l'Atlantique, du Pacifique oriental, et de l'Océan Indien, ou des bassins arrière-arcs du Pacifique occidentale (Bassin de Lau, Bassin du Nord-Fidjien, Bassin de Manus) (Pillot, 2018).

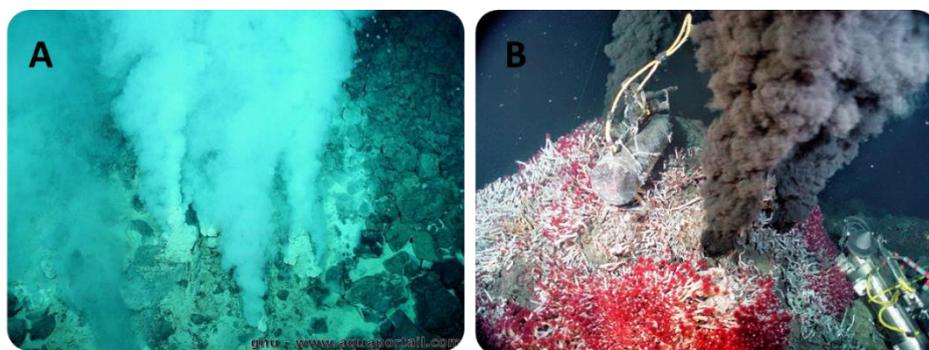


Figure 9: Sources hydrothermales : (A) Fumeurs blancs, (B) Fumeurs noirs
(Source (A) <https://www.aquaportail.com> ; Source (B) <https://odysseedelaterre.fr> (consulté le 08/04/2023)).

2-2) Les habitats artificiels

Les biotopes thermophiles artificiels comprennent le drainage minier acide et les liquides acides, les tas de compost auto-chauffants, les déchets biologiques et les usines de traitement des déchets. Ce sont des biotopes idéals pour isoler des thermophiles modérés et extrêmes, et dont la température est inférieure à celui des habitats naturels (Mayouf *et al.*, 2020). Les thermophiles demeurent aussi dans 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 pétroles, et les bioréacteurs (Gomri, 2012).



Figure 10: Tas de compost auto-chauffés

(Source <http://guidecomposteurpailleur.infini.fr> ; (consulté le 08/04/2023))

3) Conditions physico-chimiques de croissance

3-1) La température

La température est un paramètre essentiel pour la croissance microbienne, les bactéries thermophiles sont les microorganismes qui se reproduisent à des températures comprises entre 45°C et 122°C.

3-2) Le pH

Les variations du pH influencent la croissance des bactéries thermophiles, certaines se développant à une valeur de pH proche de la neutralité, entre 6,5 à 7,4.

La plupart des bactéries thermophiles prolifèrent dans des environnements acides de pH situé entre 0 à 4 et aussi dans des environnements basiques de pH supérieur à 9. Ils sont appelés respectivement les acidophiles et alcalophiles.

3-3) La salinité

Ce paramètre influence aussi sur la croissance des bactéries thermophiles avec une forte concentration en sel ou bien du chlorure de sodium NaCl (Benzerfa *et al.*, 2021).

4) Phylogénie des microorganismes thermophiles

On retrouve principalement les thermophiles chez les bactéries et les archées ainsi que chez certains eucaryotes capable de se développer jusqu'à une température de 60°C. Ces microorganismes thermophiles sont découverts dans les genres bactériens comme *Thermus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhodotherm* et *Thermobacter* ainsi que les genres archéens : *Methanobacterium* et *Thermoplasma* (Kumar *et al.*, 2019).

4-1) Bacteria

Les bactéries sont dominantes dans la majorité des habitats chauds mais leur limite de vie est moins élevée par rapport à celui des archées. Elles ont la capacité de se développer à des températures supérieures à 80°C et sont composé des phototrophes, des chimiolithotrophes, des autotrophes et des hétérotrophes. Les cyanobactéries constituent un groupe de bactéries phototrophes réalisant la photosynthèse oxygénée. On les retrouve généralement dans les sources chaudes où la température peut aller jusqu'à 74°C, elles sont dominant par rapport aux algues, qui sont incapables de se développer à de telle température. *Synechococcus lividus* forme des tapis bactériens denses à des températures de 60 à 74°C et cohabite parfois avec des bactéries phototrophes anoxygéniques comme *Chloroflexus* qui a été isolée à partir d'une source chaude au Japon. Les bactéries pourpres et vertes sulfureuses sont des exemples de phototrophes anoxygéniques se retrouvant aussi dans des sources thermales. Dans ces écosystèmes, ces bactéries oxydent le sulfure en soufre qui se concentre à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules, et après en sulfate oxydé. *Thermochromatium tepidum* est une protéobactérie thermophile qui se trouve dans plusieurs sources thermales dans le nord-est d'Amérique où la température peut aller jusqu'à 58, et *Chlorobium tepidum*, est une bactérie verte sulfureuse, cohabitant parfois avec *Thermochromatium*.

Certaines bactéries peuvent fixer le CO₂ au lieu de la lumière à l'aide de l'énergie chimique comme les membres des *Epsilonproteobacteria* et des Aquificales qui fixent le CO₂ en utilisant le cycle inverse de l'acide tricarboxylique (rTCA). Les Epsilonprotéobactéries sont généralement des thermophiles modérés se multipliant à des températures inférieures à 60°C

et sont la plupart du temps sous forme d'épibiontes sur les animaux des événements en eaux profondes. *Nautilia lithotrophica* est une bactérie chimiolithoautotrophe, anaérobie stricte qui a été découverte à partir de fragments de tubes d'*Alvinella pompejana*, un annélide polychète endémique des parois des cheminées hydrothermales de East Pacific Rise. Les Aquificales font aussi parties des chimiolithoautotrophes qui se trouvent à la fois dans les bouches d'aérations en haute mer et dans les sources thermales. Quelques espèces de cet ordre sont capables de se reproduire en utilisant des composés organiques la majorité utilisent l'hydrogène, le soufre et le thiosulfate comme donneurs d'électrons et l'oxygène ou le nitrate en tant qu'accepteurs d'électrons.

Bien que la majorité des bactéries situées dans les sources hydrothermales sont des Epsilonproteobacteria, Thermales, Thermotogales and Aquificales, mais des groupes de *Gammaproteobacteria* habitent aussi dans ces écosystèmes comme par exemple l'espèce *Sulfurivirga caldicurarii* qui a été découverte dans une source hydrothermale marin en faible concentration en schiste présent dans les récifs coralliens au Japon (Ferrera et Reysenbach, 2007).

4-2) Archaea

Plusieurs espèces thermophiles et hyperthermophiles font parties des deux principaux phylums du domaine des Archaea : les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota*. Parmi les *Crenarchaeota*, les hyperthermophiles constituent une large gamme de micro-organismes chimiolithotrophes autotrophes et quelques espèces chimiorganotrophes. Quant aux *Euryarchaeota*, ils réunissent physiologiquement diverses Archaea hyperthermophiles telles que les *Methanoarchaea* productrices de méthane et des espèces chimioorganotrophes.

Ils existent également trois autres embranchements retrouvés dans le domaine des Archaea à savoir : l'embranchement des *Korarchaeota* qui représente un ensemble de microorganismes non cultivés, découverts dans une source chaude du parc national de Yellowstone. Leur découverte, ainsi que leurs emplacements dans l'arbre des Archaea, laisse prédire un potentiel caractère thermophile. Les *Nanoarchaea* tel que *Nanoarchaeum equitans* et les *Thaumarchaea* ont été dernièrement identifiés comme étant une lignée indépendante réunissant les *Crenarchaeota* mésophiles (Byrne, 2008).

4-3) Eucarya

Chez les eucaryotes, le phénomène de thermophilie n'est pas aussi extrême que chez les procaryotes, Seul quelques espèces d'algues et de champignons sont capables de se reproduire à des températures légèrement élevées (60°C). *Mucor pusillus* a été le premier champignon modérément thermophile à être isolés du pain, il y a plus d'un siècle. Présentement, environ 30 espèces de champignons ont été découvertes parmi lesquelles nous avons les phycomycètes, les ascomycètes, *Mycelia sterilia* qui sont des thermophiles modérés dont leur limite de croissance est aux alentours de 62°C.

En ce qui concerne les algues, leur température de croissance maximale est aux alentours de 60°C. *Galdiera sp.*, *Cyanidiochyzon sp.*, *Cyanidium caldarium* sont des algues thermophiles unicellulaires considérées comme le seul groupe phototrophe oxygénique dans les bassins acides en dessous de pH 5 où il y a absence de cyanobactéries (Ferrera et Reysenbach, 2007).

5) Diversité taxonomique et métabolique des bactéries thermophiles

Les organismes thermophiles ont une grande diversité métabolique et comprennent des organismes photosynthétiques, des organismes qui tirent leur énergie de réactions chimiques, des organismes qui produisent leur propre nourriture et des organismes qui dépendent d'autres organismes pour se nourrir. Les bactéries thermophiles présentent une grande variété de caractéristiques physiologiques et métaboliques, y compris des organismes photosynthétiques, des organismes chimiolithotrophes, des organismes autotrophes et des organismes hétérotrophes.

5-1) Les bactéries autotrophes

L'autotrophie est un processus qui implique la fixation de carbone inorganique, comme le CO, CO₂ et les ions carbonates HCO₂⁻. L'absorption du CO₂ par les autotrophes est souvent associée au cycle de Calvin (Pillot, 2018). Toutefois, ce processus est rare chez les bactéries thermophiles et totalement absentes chez les archées. Ces organismes possèdent des alternatives pour assimiler le CO₂, notamment la voie du CoA, le cycle d'acide citrique réducteur, le cycle du 3-hydroxypropionate et le cycle du 4-hydroxybutyrate (Holden, 2009).

5-2) Les bactéries hétérotrophes

La plupart des micro-organismes thermophiles sont des hétérotrophes facultatifs, qui se servent de la matière organique comme source de carbone. Les sucres et les peptides sont les composés les plus fréquemment catabolisés à des températures élevées (Holden, 2009). Les cheminées hydrothermales abritent des bactéries hétérotrophes alpha et gamma, telles que *Marinobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas* et *Pseudomonas* (Zeng *et al.*, 2021).

5-3) Les bactéries phototrophes

Les microorganismes phototrophes tirent profit de l'énergie lumineuse comme source d'énergie en utilisant les pigments photosensibles tels que la chlorophylle ou la bactériochlorophylle. Ce mode métabolique est inexistant dans les sources hydrothermales profondes qui sont plongées dans l'obscurité (Pillot, 2018). Les biofilms bactériens fréquemment observés dans les sources d'eau chaude neutres et alcalines sont généralement constituées de bactéries photosynthétiques. Ces thermophiles qui forment des biofilms comprennent des organismes photosynthétiques oxygéniques, notamment des cyanobactéries qui contiennent des pigments photosynthétiques tels que la chlorophylle a et la phycobiline.

Les cyanobactéries sont principalement des organismes photosynthétiques oxygéniques qui réalisent la photosynthèse avec libération d'oxygène, tout comme les plantes supérieures et les algues. Un autre groupe de bactéries phototrophes, appelé FAP, contient de la bactériochlorophylle ((S)) en tant que pigment photosynthétique et effectue la photosynthèse sans produire d'oxygène (Hanada, 2003).

5-4) Les bactéries chimiolithotrophes

Les micro-organismes chimiolithotrophe ont la capacité d'obtenir leur énergie à partir de composé minéraux, ce qui rend présents dans le puits profonds. Bien qu'ils ne soient pas pathogènes pour l'homme, ces organismes sont moins étudiés dans les eaux minérales que les chemoorganotrophes en raison de la complexité et de la durée de leur culture. Cependant ils jouent souvent un rôle crucial dans les cycles géochimiques majeurs tels que le carbone, l'azote, le soufre et le fer en diminuant successivement ces éléments.

Dans les eaux riches en soufre, il existe des micro-organismes capables d'oxyder les sulfures tels que *Beggiatoa* qui sont des bactéries filamenteuses qui stockent le soufre élémentaire en granules réfringents à l'intérieur de leurs cellules. On trouve également d'autres types de

bactéries telles que *Thiotrix* et *Thiobacillus* qui sont des bacilles à Gram négatif, aux caractéristiques physiologiques diverses : certains peuvent survivre dans des environnements très acides, tandis que d'autres peuvent résister à des températures élevées (Capdepy et Canellaa, 1995).

6) Mécanismes d'adaptation des microorganismes thermophiles

Les microorganismes thermophiles subissent régulièrement des conditions de stress thermiques, ce qui exige qu'ils développent des mécanismes d'adaptation tels que : une perméabilité membranaire altérée, une composition en ADN à teneur élevée en G+C, des structures protéiques modifiées ainsi qu'une altération des séquences d'acides aminés... afin de garantir la stabilité (homéostasie) de leurs fonctions physiologiques dans des conditions extrêmement élevées (Mangrola *et al.*, 2022 ; Sang *et al.*, 2020).

6-1) Les acides nucléiques

Les nucléotides sont les éléments de base des molécules d'acides nucléiques qui contiennent soit une base purique, soit une base pyrimidique. On suppose que la présence d'une teneur élevée en GC dans des régions spécifiques (la boucle de tige) confère une plus grande stabilité à l'ADN double brin, puisque l'adénine se lie à la thymine par deux liaisons hydrogènes tandis que la cytosine et la guanine sont liées par trois liaisons hydrogènes. Ce mécanisme pourrait être le principal moyen de protection contre la dénaturation de l'ADN chez les extrêmophiles (Vavitsas *et al.*, 2022). Une teneur plus élevée en GC dans la région de la tige double brin assure également une stabilité thermique des molécules d'ARN (Mehta *et al.*, 2016).

Les archées hyperthermophiles possèdent une enzyme particulière d'ADN topoisomérase de type I, la gyrase inverse qui insère des super-tours positifs dans l'ADN en utilisant de l'ATP, ce qui contribue à stabiliser la double hélice de l'ADN et à protéger sa structure face à la dénaturation thermique. Cette enzyme a été découverte chez les microorganismes thermophiles extrêmes et hyperthermophiles étudiés jusqu'à présent, appartenant soit au domaine archéen ou soit au domaine bactérien et ayant une température de croissance optimale supérieure à 75°C (Forterre et Bergerat, 1996).

6-2) La membranes cytoplasmique

Les membranes cellulaires agissent comme une barrière de perméabilité, régulant l'entrée et la sortie des composés de faible poids moléculaire (Mehta *et al.*, 2016). Chez les microorganismes thermophiles, la dénaturation de la bicouche lipidique est bloquée grâce à la biosynthèse des membranes contenant majoritairement les acides gras saturés à chaîne droite et moins d'acides gras insaturés. Les acides gras saturés créent une zone hydrophobe plus forte que les acides gras insaturés et les acides gras à longue chaîne ont un point de fusion plus important que les acides gras à chaîne courte. Ces deux facteurs contribuent largement à la stabilité de la membrane cellulaire (Vavitsas *et al.*, 2022).

6-3) Les protéines

Une propriété marquant des thermophiles et hyperthermophiles est la grande stabilité thermique des protéines dans toutes les catégories et formes fonctionnelles. Il existe une corrélation inverse entre la stabilité thermique des protéines et leur flexibilité moléculaire (c'est-à-dire qu'une protéine moins flexible sera plus résistante à la chaleur). Un équilibre doit être atteint entre les interactions stabilisantes et déstabilisantes pour répondre aux exigences contradictoires de la stabilité thermique et de la fonction catalytique respectivement des protéines. La base structurelle de la stabilité thermique dans les protéines hyperthermophiles varie selon les protéines, bien qu'il y ait quelques similitudes entre certains exemples.

Une analyse des structures cristallines des protéines orthologues hyperthermophiles, thermophiles et mésophiles révèle que certains des changements les plus courants observés dans les protéines thermophiles sont les suivants :

- Une augmentation du nombre de paires ioniques.
- Une augmentation du nombre de liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales chargées positivement et les oxygènes neutres.
- Une structure secondaire en hélice plus étendue
- Une diminution du nombre de cavités internes
- Une diminution du rapport surface/volume des boucles de surface
- Une augmentation du nombre de résidus hydrophobes en corrélation avec l'effet hydrophobe qui augmente avec la température
- Une oligomérisation des boucles

Outre ces facteurs fournis, il y a d'autres facteurs qui influencent la stabilité des protéines à des hautes températures. Les archées hyperthermophiles possèdent une protéine chaperon unique appelée thermosome, qui est très présente à toutes les températures de croissance hyperthermophiles et est la principale protéine produite le choc thermique. Les hyperthermophiles produisent aussi des osmolytes non protéiques qui stabilisent les protéines à des températures élevées. On suppose que la pression élevée provoque une compaction accrue de la molécule, ce qui conduit à une rigidité structurelle et une stabilité thermique accrue de ces protéines (Holden, 2009).

7) Applications des microorganismes thermophiles

Il existe deux types d'applications biotechnologiques pour les thermophiles. La première se base sur l'utilisation directe des organismes, ça concerne surtout les applications liées à la biolixiviation et à la bioremédiation. Le deuxième type est basé sur l'utilisation des biomolécules produites par les thermophiles. Ce sont principalement des enzymes, mais il y a aussi les protéines, les lipides, les polymères, et une majorité de métabolites secondaires (Ibtissam et Mekki, 2019).

7-1) Applications basées sur les biomolécules

La majorité des applications impliquant des organismes extrêmophiles reposent sur leurs biomolécules, principalement des enzymes, mais aussi sur d'autres protéines, lipides et diverses petites molécules.

7-1-1) Les enzymes

Les enzymes et les composés organiques des thermophiles sont exploités pour différents procédés qui se produisent à température élevée. Ils sont utilisés dans divers domaines tels que la chimie, la pharmacie, l'agro-alimentaire, ou encore la biologie moléculaire. Les enzymes provenant des microorganismes des sources hydrothermales montrent un énorme potentiel grâce à leur stabilité thermique. On pourrait trouver également ces enzymes thermophiles dans d'autres applications à savoir le blanchiment du papier, la conversion de l'amidon en dérivés sucrés, la dégradation de composés protéiques résistants, l'industrie textile ou encore le travail de laboratoire sur l'ADN (Ibtissam et Mekki, 2019).

7-1-1-1) Enzymes de l'ADN

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont des sources d'ADN polymérase thermostables. Ces enzymes sont particulièrement utiles pour la PCR (Polymerase Chain Reaction et le séquençage cyclique. La Taq polymérase, initialement purifiée à partir de *Thermus aquaticus*, isolée du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis, a été adoptée pour l'application de la PCR classique en raison de sa thermostabilité (stable à 80°C). Un autre ADN polymérase, Tth de *Thermus thermophilus*, est spécialement utilisé dans la RT-PCR (Reverse transcription) en raison de son activité de transcription inverse distincte (Ishino et Ishino, 2013).

7-1-1-2) Amylases

Les amylases sont un groupe essentiel qui hydrolyse l'amidon en sirops riche en fructose, glucose et maltose, et peuvent être classées en endoamylases et exoamylases. Des souches d'actinomycètes, telles que *Streptomyces erumpens* et *Thermobifida fusca*, sont capables de sécréter des amylases à l'extérieur des cellules pour une digestion extracellulaire. Ces enzymes résistantes à la chaleur peuvent être utilisées dans divers industries telles que la boulangerie, la pharmacie, la production de papier et de pâte à papier. Les amylases de certaines souches d'actinomycètes alcaliphiles peuvent être utilisées dans la formulation des détergents pour améliorer la détergence des composés. Les amylases provenant de *Streptomyces* spp. ont une grande importance dans les domaines de la biotechnologie dans diverses industries et représentent environ 25% de la demande sur le marché mondial des enzymes (Mukhtar *et al.*, 2018).

7-1-1-3) Protéases

Les enzymes protéolytiques ont de multiples applications dans divers secteurs, mais leur utilisation la plus courante se trouve dans les produits lessiviels, où elles interviennent dans la décomposition et l'élimination des taches de protéines. Les enzymes protéolytiques sont également largement utilisées dans la production de fromage, la brasserie et la boulangerie. En général, les enzymes protéolytiques microbiennes utilisées sont mésophiles et proviennent d'espèces de *Bacillus*, produites par des entreprises telles que Novozymes et Genencor (Coker, 2016).

7-1-1-4) Lipases

Les enzymes lipasiques constituent une industrie d'une valeur d'un milliard de dollars et sont hautement attractives pour une utilisation en milieu industriel en raison de leur grande variété de substrats, de leur spécificité élevée et leur stabilité. Bien que les applications dans les détergents à lessive et la synthèse organique nécessitent que les enzymes lipasiques soient actives dans des conditions extrêmes, la plupart des enzymes lipasiques utilisées sont mésophiles. De nombreuses enzymes lipasiques mésophiles, qui sont généralement issues d'organismes tels que les espèces de *Bacillus* et *Aspergillus*, sont actives à des températures élevées. Par conséquent, les enzymes lipasiques extrêmophiles sont souvent négligées. Cependant, il a été démontré que les lipases thermophiles de *Bacillus* sont plus efficaces que les enzymes actuellement utilisées (Coker, 2016).

7-1-1-5) Les cellulases

Les cellulases représentent des enzymes industrielles d'une importance moyenne pour la production durable de biocarburants puisqu'elles sont capables de transformer la cellulose en sucres fermentescibles. Les cellulases de *Streptomyces spp.* qui comprennent notamment le *S. ruber*, *S. lividans* et *S. rutgersensis* sont extrêmement résistantes à la chaleur. Ces enzymes sont spécialement employées dans les secteurs des détergents, du textile, des additifs pour les animaux, du papier et de la pâte. Les cellulases d'environnement extrême, telles que celles produites par les *Thermobifida*, sont stables à des températures et des valeurs de pH élevées et sont employées pour détériorer le coton et l'avicel (Mukhtar *et al.*, 2018).

7-1-1-6) Les xylanases

Les hémicellulases, enzymes thermostables sans cellulase telles que les xylanases, ont constitué une avancée majeure dans le procédé de bioblanchiment des pâtes et papiers, permettant ainsi de réduire la pollution environnementale provoquée par des halogènes. Le xylane, principal composant des hémicelluloses végétales, est constitué d'une chaîne principale de résidus D-xylopyranosyle liés en β -1,4. L'action de dépolymérisation de l'endoxylanase entraîne la conversion du substrat en xylooligosaccharides. Les xylanases thermostables peuvent être utilisées pour la production d'aliments pour animaux. En combinaison avec des cellulases, des xylanases thermoactives permettent de convertir efficacement ces polymères en xylose et glucose. Les enzymes xylanolytiques thermostables peuvent être également utilisées comme agents de pré-blanchiment pour la pâte de kraft. L'utilisation de xylanases peut aider à réduire l'indice kappa (mesure de la teneur résiduelle

en lignine) de la pâte, réduisant ainsi les besoins en chlore lors du blanchiment. Des xylanases, actives de façon optimale à des températures supérieures à 100°C ont été détectées chez *Pyrodictium abyssi*, *Thermotoga thermarum*, *Thermogota neapolitana*, *Thermogota maritima* et *Thermogota sp.* souche FjSS3-B.1 (Verma et Kanwar, 2012).

7-2) Applications basées sur les cellules entières

7-2-1) Les biocarburants

Les biocarburants peuvent être classés selon les différents produits finaux qu'ils produisent : butanol, éthanol, hydrogène, méthane et biodiesel. Les procédés classiques de production de biobutanol et bioéthanol impliquent l'utilisation d'un procédé chimique combiné à l'utilisation de micro-organismes mésophiles tels que *Saccharomyces cerevisiae* et les espèces *Clostridium*. La production d'hydrogène repose généralement sur un procédé chimique/catalyseur, cependant, des systèmes à grande échelle basés sur des microorganismes utilisant les thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* et *Thermogota elfu* ont été récemment développés. Contrairement aux autres produits, le méthane est toujours produit à l'aide d'un consortium de micro-organismes, notamment les méthanogènes.

Outre les biocarburants, les extrémophiles et leurs enzymes ont une autre application importante dans le domaine minier. Ce procédé appelé biolixiviation, consiste à éliminer les sulfures ou les oxydes métalliques insolubles en utilisant des micro-organismes. Il s'agit d'une méthode plus sûre et plus respectueuse de l'environnement pour extraire les métaux que la lixiviation conventionnelle, qui nécessite l'utilisation de divers produits chimiques, y compris le cyanure, pour lier et séparer des minéraux/métaux spécifiques des autres (Coker, 2016).

7-2-2) Les agents de minéralisation

Des études ont prouvé la faisabilité de l'utilisation de microorganismes soufrés pour la désulfuration du caoutchouc.

Dans le but de découvrir de nouvelles méthodes de désulfuration biotechnologique, nous avons examiné l'utilisation d'une archéobactérie anaérobie réductrice de soufre *Pyrococcus furiosus*, pour réduire le soufre contenu dans le caoutchouc. *P. furiosus* est un hétérotrophe, thermophile découvert pour la première fois par Fiala et Stetter (1986), sa croissance est

entravée par l'hydrogène moléculaire produit lors de son développement (Bredberg *et al.*, 2001).

7-2-3) Les piles à combustible microbiennes

L'objectif de cette recherche est de produire de l'énergie électrique à partir des bactéries thermophiles présentes dans les sédiments marins, sans avoir recours à un transporteur d'électron externe et de vérifier si la communauté bactérienne thermophile est en mesure de générer des courants électriques plus élevés que celle qui évolue dans un environnement mésophile (Mathis *et al.*, 2008).

*Chapitre III : Matériel et
méthodes*

1) Prélèvement des échantillons d'eau de la source thermique**1-1) Préparation du matériel**

Pour le prélèvement, nous avons utilisé des jerricans : 3 jerricans de 20 litres et 2 jerricans de 5 litres.

Etapas de préparation des jerricans:

- On lave les jerricans avec de la liquide vaisselle et de l'eau du robinet 10 fois de suite.
- On remplit complètement avec de l'eau les jerricans de 5 L et à moitié pour les 20 L.
- On ajoute 5 ml d'eau de javel pour les jerricans de 5L et 15 ml pour les jerricans de 20L.
- On laisse reposer pendant 2 h maximum.
- On vide les jerricans, rince avec l'eau de robinet ensuite avec l'eau distillée et enfin avec l'eau distillée stérile

1-2) Site de prélèvement

Le Hammam Debbagh se trouve à une distance de 110 kilomètres de Constantine et de 20 kilomètres de Guelma, dans l'Est Algérien. C'est un lieu surprenant situé à 320 mètres d'altitude, au cœur de collines et de montagnes boisées, à proximité de cascades solidifiées qui donnent un aspect lunaire. La source Hammam Debbagh est la plus prospère d'Algérie et ses eaux sont les plus chaudes. Il y a neuf sources hyperthermales avec une température de l'eau variant entre 90 et 98°C, et le débit total des sources est d'au moins 55 litres/seconde. Les eaux sont salines, ont une odeur sulfureuse et un faciès chimique composé de bicarbonates calciques, de chlorures sodiques, de radioactivité, et de dégagement d'hydrogène sulfuré. (Ouali, 2008)



Figure 11: Source thermique du Hammam Debbagh

1-3) Les étapes pour l'échantillonnage

Le prélèvement a été effectué à une distance de 10 mètre de la source principale en suivant les étapes de prélèvement suivantes :

- Etape de rinçage :

Avant de prélever les échantillons, nous avons procédé à une étape de rinçage qui consiste à rincer les jerrycans avec de l'eau de la source.

- Etape de remplissage :

Les jerricans ont été remplis à l'aide d'un seau dans les conditions aseptiques en évitant tout contact avec les sédiments.



Figure 12: Zone de prélèvement



Figure 13: Rinçage et remplissage des jerricans avec l'eau de source

2) Mesure de la température et du pH

La température a été mesurée au moment du prélèvement des échantillons d'eau à l'aide d'un thermomètre alors que la mesure du pH a été effectuée au laboratoire après refroidissement des échantillons d'eau de source à l'aide d'un pH-mètre.

3) Préparation du milieu de culture

Nous avons préparé deux milieux de culture en utilisant l'eau de source thermale au lieu de l'eau distillée: un milieu solide avec la gélose nutritive (GN) et un milieu liquide avec le bouillon nutritif (BN).

En ce qui concerne milieu solide, nous avons mélangé 28 g de GN dans un bécher avec de l'eau de source thermale stérilisée, puis le mélange a été chauffé à ébullition sur un agitateur magnétique afin de dissoudre complètement le milieu à l'aide d'un barreau magnétique. Et enfin le milieu a été stérilisé à l'autoclave 121°C pendant 15 minutes.

Pour le milieu liquide ou bouillon nutritif, nous avons mélangé les différents composants dans de l'eau de source thermale stérilisée, ensuite le mélange a été également chauffé à ébullition sur un agitateur magnétique et stérilisé à l'autoclave.

4) La filtration sur membrane

Nous avons effectué trois séries de filtration sur membrane 0.22 µm, d'un volume de 10 litres par répétition, pour une durée de 4 h 45 minutes.

Etapas de la filtration sur membrane :

- On place un filtre de 0,22 micron dans un appareil à filtration relié à une pompe à vide.
- On homogénéise l'échantillon puis à l'aide d'un bécher stérile on prélève une certaine quantité d'eau et on le verse dans l'appareil et on allume la pompe. L'eau passe à travers le filtre tandis que les microorganismes sont retenus par le filtre.
- On répète l'opération jusqu'à la saturation du filtre.

Pour chaque répétition, nous avons filtré 10 L d'eau de source thermale. Après les filtrations, les 3 filtres sont déposés chacun dans une boîte de pétri en verre à l'aide d'une pince stérile. La gélose nutritive est coulée dans les boîtes de pétri pour recouvrir entièrement le filtre. Les boîtes sont recouvertes de papier aluminium puis incubées dans une étuve à 55°C pendant 3 jours.

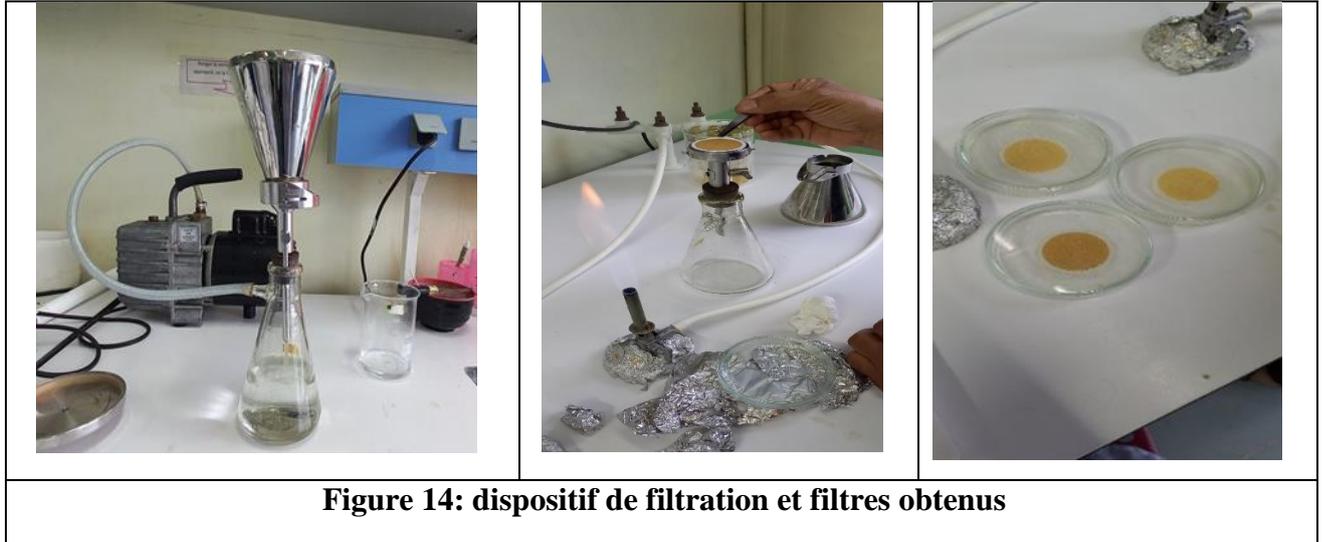


Figure 14: dispositif de filtration et filtres obtenus

5) Culture en milieu liquide

Pour l'ensemencement du milieu liquide nous avons procédé comme suit :

- 5 ml du bouillon nutritif sont versés dans un tube à essai et 6 tubes sont préparés de cette manière, comme répétition.
- ensuite à l'aide d'une pipette graduée stérile, 5 ml d'eau de source thermique sont ajoutés dans chaque tube à essai.
- Les tubes inoculés sont incubés à 55°C pendant 3 jours.

Ces manipulations ont été effectuées dans des conditions aseptiques près de deux becs bunsen.

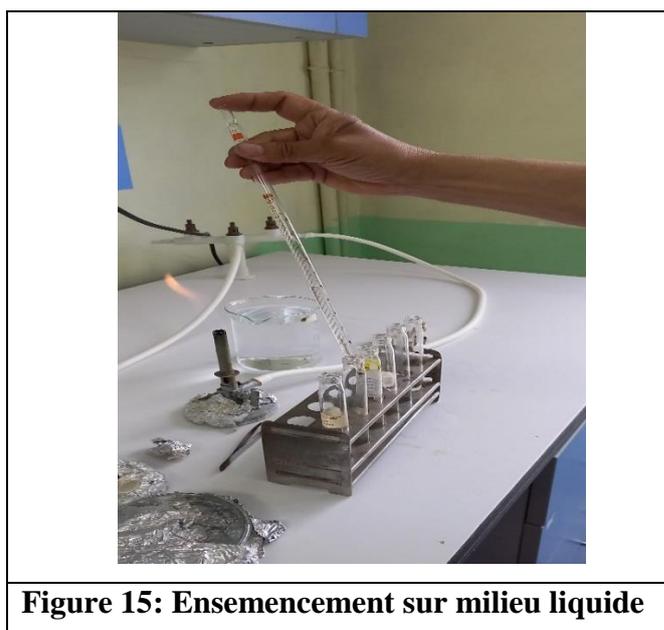


Figure 15: Ensemencement sur milieu liquide

6) Observation microscopique**6-1) Coloration de Gram**

La coloration de Gram est la technique de coloration différentielle la plus fréquemment employée en microbiologie. Elle permet de distinguer les bactéries présentes dans un échantillon en fonction de leurs formes (paires, groupes, chaînes...) et de leur capacité à réagir avec des colorants. Cette méthode de coloration affine la caractérisation des bactéries en les classant en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, ainsi qu'en bacilles ou en coques selon leur morphologie.

Dans notre travail, nous avons effectué plusieurs séries de coloration de Gram :

- coloration de l'eau de source telle qu'elle est,
- coloration des colonies issues des cultures en boîtes de pétri
- et coloration des résidus issus des cultures en tubes.

➤ Pour la coloration de l'eau de source :

Les lames ont été plongées directement dans l'eau de source thermale, séchées au bec bunsen à 20 centimètres de la flamme. Après, nous avons effectués la coloration de Gram sur les lames. Nous avons coloré quatre lames en tout.

➤ Pour la coloration des boîtes de pétri:

La surface du filtre a été grattée à l'aide d'une spatule stérile, puis diluée avec de l'eau distillée et déposée le mélange sur une lame. La lame est ensuite séchée au bec bunsen puis une coloration de Gram a été effectuée. Nous avons préparé trois frottis pour chaque boîte de pétri.

➤ Pour la coloration des tubes :

Les tubes ont été vidés et à l'aide de pipette pasteur, nous avons prélevé le dépôt au fond des tubes et l'avons étalé sur les lames (six lames au total). Puis les lames sont séchées au bec bunsen et une coloration de Gram a été effectuée sur chaque lame.

Toutes les lames ont été observées au microscope optique à (grossissement 1000

*Chapitre IV : Résultats et
discussion*

Résultats

1) Mesure de la température et du pH

Dans le tableau 2, nous avons reporté la température de l'eau qui varie de 89,6°C à 94,3°C et le pH de 6,4 à 6,64.

Tableau 2: Température et pH de l'eau de source du Hammam Debbagh, 22 mai 2023.

Paramètres	Source principale	Zone de prélèvement
Température	94,3°C	89,6°C
pH	Température excessive pour l'électrode	6,64

2) Observation macroscopique

- **Culture sur milieu solide :**

Comme les colonies étaient transparentes, nous n'avons pas observé de colonies visibles à l'œil nu dans les trois boîtes mais après avoir ajouté quelques gouttes de bleu de méthylène, nous avons pu détecter la présence de colonies sur les boîtes à l'aide d'un microscope binoculaire.

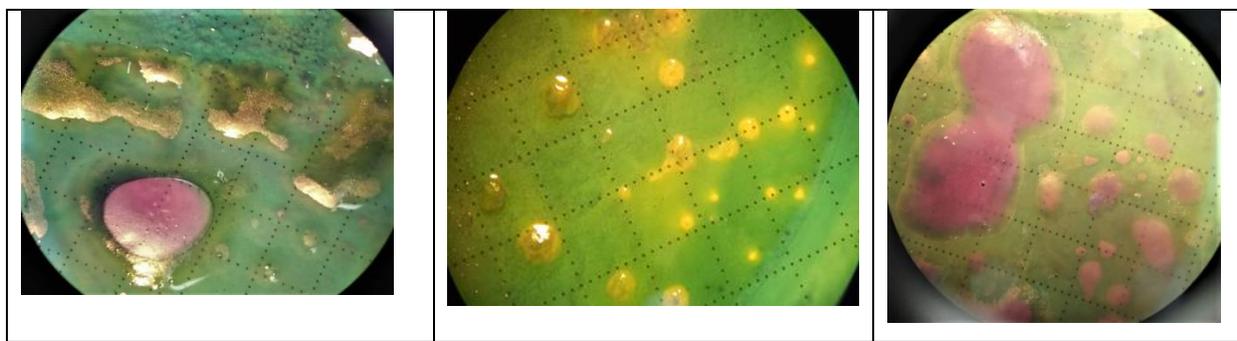


Figure 16: Observation des boîtes au microscope binoculaire (x200).

- **Culture en milieu liquide**

Il n'a pas eu de croissance visible dans les tubes, en milieu liquide.



Figure 17: Tubes après culture à 55°C/10 jours

3) Observation microscopique:

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram nous a permis d'observer diverses formes bactériennes présentes dans les sources thermales ainsi que leur mode de regroupement.

Les résultats de la coloration sont répertoriés dans les tableaux ci-après.

A.- Coloration de Gram sur lames à partir de l'eau de source telle qu'elle

Il y a absence totale de bactéries sur toutes les lames.

Tableau 3: Caractérisation des bactéries dans l'eau de source telle qu'elle.

Lame 0 ₁	Absence de bactéries
Lame 0 ₂	Absence de bactéries
Lame 0 ₃	Absence de bactéries
Lame 0 ₄	Absence de bactéries

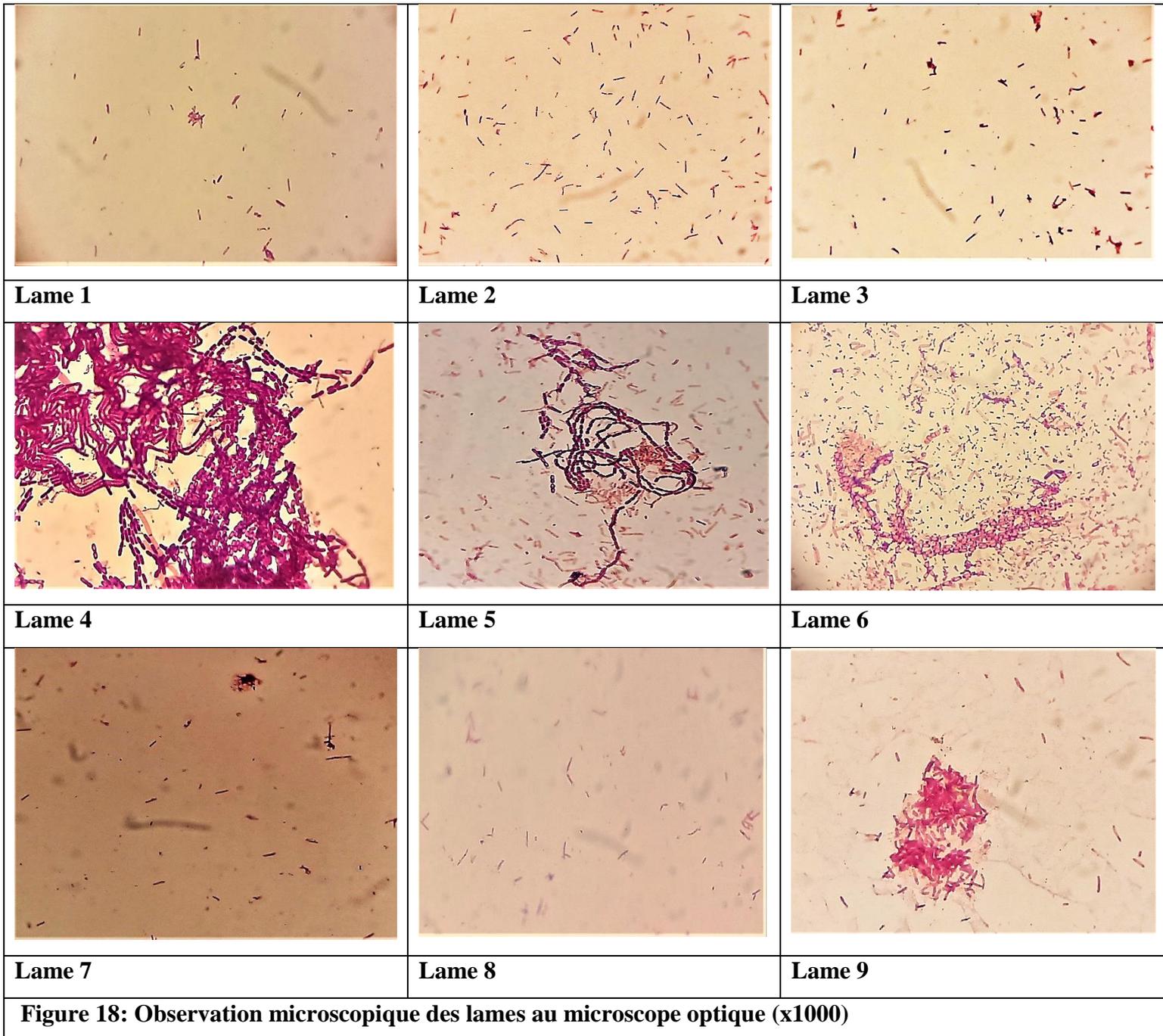
B.- Coloration de Gram sur lames à partir des colonies obtenues sur les membranes filtre sur milieu solide (GN)

Sur le tableau 4, nous reportons les caractéristiques des colonies dans les boîtes de pétri sur milieu solide. Nous avons observé des bacilles à G+ et G-, des cocci et des coccobacilles à G+.

Tableau 4: Caractérisation des colonies sur milieu solide (GN).

Boîtes	Lames	Formes	Gram +	Gram -	Mode de regroupement
Boite 1	Lame 1	Bacilles	+	+	Isolées, en paires
		Cocci	+	/	Isolées
		Coccobacilles	+	/	Isolées et en paires
	Lame 2	Cocci	+	/	Isolés, en paires
		Bacilles	+	+	Isolés, en paires
	Lame 3	Cocci	+	/	Isolés
Bacilles		+	+	Isolés	
Boite 2	Lame 4	Cocci	+	+	Isolés, en chaînettes
		Bacilles (D)	+	+	Isolés, en paires, en chaînettes
		Coccobacilles	+	/	En paires, en chaînettes
	Lame 5	Cocci	+	/	Isolés, en paires, en chaînettes
		Bacilles (D)	/	+	Isolés, en paires, en chaînettes
		Coccobacilles	+	/	En paires, en chaînes
	Lame 6	Cocci (D)	+	/	Isolés ; en paires
		Bacilles	+	+	Isolés, en paires, en chaînettes
		Coccobacilles(D)	+	/	En paires, en chaînettes
Boite 3	Lame 7	Cocci	+	/	Isolés
		Bacilles	+	+	Isolés, en paires
	Lame 8	Bacilles	+	+	Isolés, en paires
	Lame 9	Bacilles	+	+	Isolés

Légende : D= dominant ; += présence ; /= absence

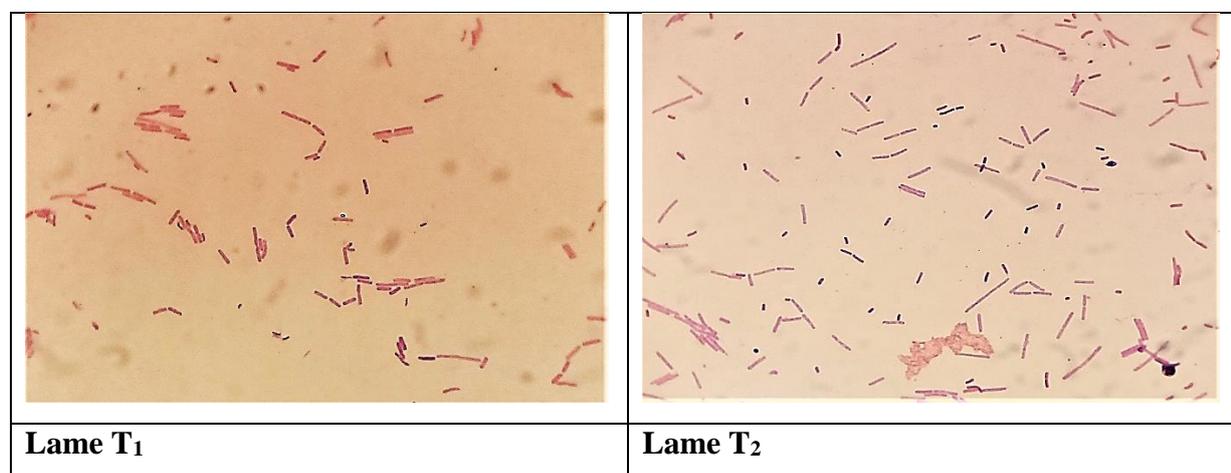


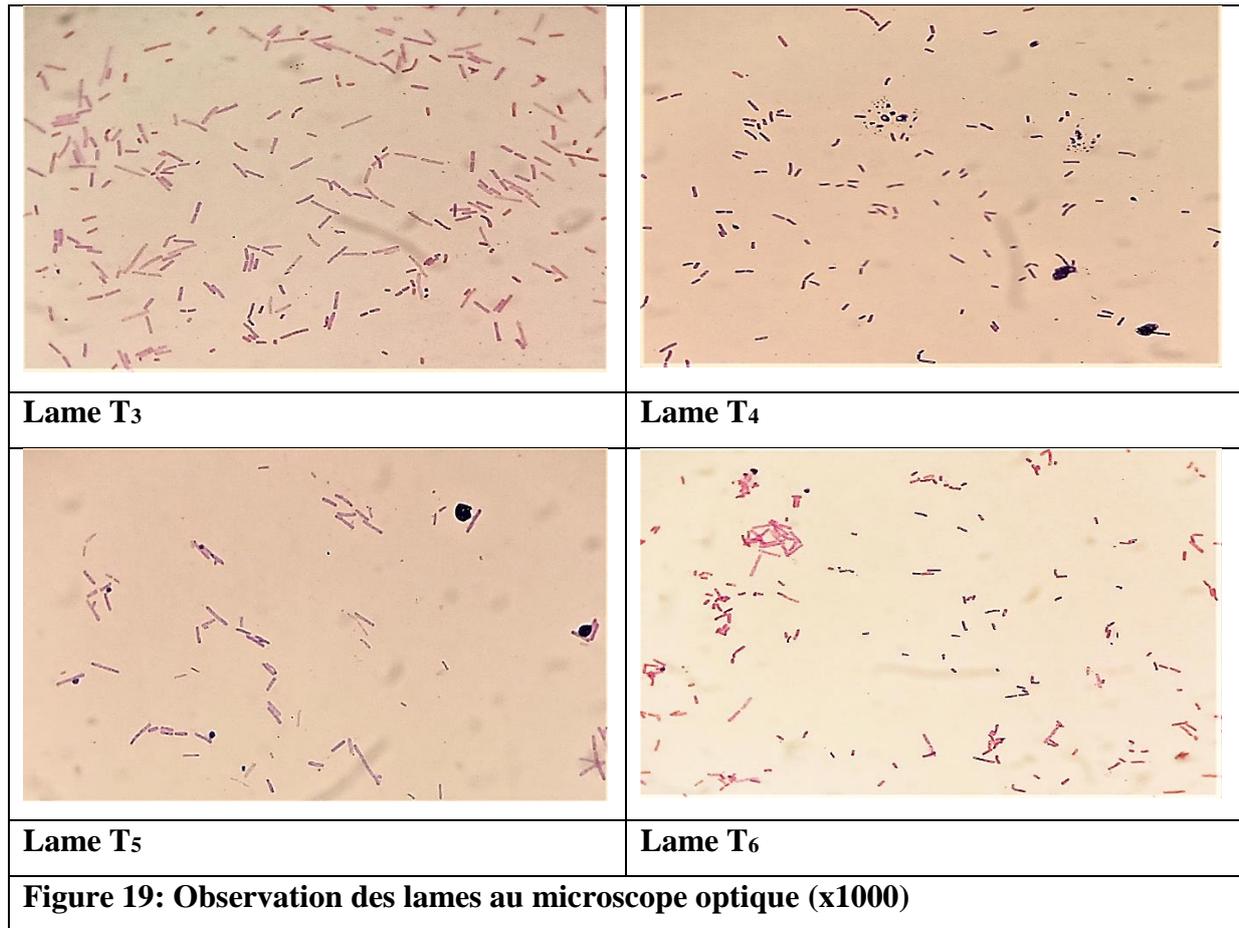
C.- Coloration de Gram sur lames à partir des colonies sur milieu liquide (BN) :

Sur le tableau 5, nous reportons les caractéristiques des colonies dans les tubes sur milieu liquide. Nous avons observé des bacilles à G+ et à G- ainsi que des cocci à G+.

Tableau 5: Caractérisation des colonies en milieu liquide (BN).

Lames	Formes	Gram +	Gram -	Mode de regroupement
Lame T ₁	Bacilles	+	+	Isolés, en paires, en chainettes
Lame T ₂	Cocci	+	/	Isolés, en paires
	Bacilles	+	+	Isolés, en paires, en chainettes
Lame T ₃	Cocci	+	/	Isolés
	Bacilles	+	+	Isolés, en paires, en chainettes
Lame T ₄	Cocci	+	/	Isolés
	Bacilles	+	+	Isolés, en paires, en chainettes
Lame T ₅	Cocci	+	/	Isolés
	Bacilles	+	/	Isolés, en paires
Lame T ₆	Bacilles	+	+	Isolés, en paires





Discussion :

La température de l'eau de la source thermale Hammam Debbagh est extrêmement élevée, elle atteint les 94,3°C. Cela peut être attribué à des flux géothermiques souterrains intenses qui réchauffent l'eau avant qu'elle ne remonte à la surface. Le pH de cette eau est de 6,6, indiquant une légère acidité. Cette acidité peut être due à la présence de certains minéraux ou à des réactions chimiques dans l'environnement géologique.

Lors de l'observation au microscope, la plupart des bactéries observées se sont révélées être principalement des bacilles à G+ et à G-. Ces bactéries se présentaient sous différentes formes : elles peuvent être isolées, se trouver en paires ou en chainettes. Les bactéries à G+ se caractérisent par une paroi cellulaire épaisse composée principalement de peptidoglycane. Cette paroi épaisse retient la coloration violette lors de la coloration de Gram, ce qui lui confère une teinte violette foncée au microscope. En revanche, les bactéries à G- présente une paroi cellulaire plus mince et complexe qui ne retient pas la coloration violette mais prend

plutôt une coloration rose avec la contre-coloration à la fuschine. Cette caractéristique confère aux bacilles à G- une teinte rose pâle au microscope.

Les formes cocci sont principalement des bactéries à G+, cependant sur la lame 4 (GN), nous avons observé la présence de cocci G-. Ces bactéries G-sont une exception pour les cocci, qui sont généralement classés comme Gram positifs. La grande majorité des cocci sont isolés, cependant certains d'entre eux se regroupent en chainettes, ce qui peut être le résultat de divers facteurs tels que des conditions environnementales spécifiques ou des interactions entre les bactéries elles-mêmes.

Malgré leur faible nombre, on observe également des formes coccobacilles dans l'échantillon. Ces bactéries sont observées uniquement sur les lames 1, 4,5 et 6 (GN), où elles sont principalement regroupées en paires. Ces coccobacilles attirent l'attention en raison de leur forme distinctive qui combine les caractéristiques des cocci et des bacilles.

Certaines de ces caractéristiques morphologiques peuvent indiquer la présence des bactéries pathogènes, cependant, il est important de noter que l'apparence seule des bactéries ne permet pas de déterminer leur pouvoir pathogène. Une étude plus approfondie est nécessaire, notamment des tests de laboratoire supplémentaire, tels que des tests biochimiques, des cultures bactériennes ou des analyses génétiques, pour confirmer la présence de bactéries pathogènes spécifiques et en plus des études moléculaires pour identifier les différents groupes taxonomiques des bactéries.

Une étude similaire a été réalisée par Larbi en 2015, qui a isolé 59 souches bactériennes de diverses sources thermales telles que Hammam Debbagh à Guelma, Hammam Bouhnifia à Mascara, Hammam Bouhdjar à Temouchent, Hammam Rabi à Saida, Hammam Righa à Ain Defla. Les résultats de cette étude ont révélés que 44 isolats étaient des bactéries à G+, dont la majorité était sous formes bacilles. Ils y avaient aussi présence de forme cocci et coccobacilles. Les résultats ont révélés également que 15 isolats étaient des bacilles à G- (Larbi, 2015).

Conclusion et perspectives

L'étude de la diversité bactérienne thermophile dans une source thermale offre un aperçu fascinant de l'adaptation de la vie aux conditions extrêmes. Les bactéries thermophiles sont capables de prospérer dans des températures élevées, ce qui leur confère des caractéristiques uniques et des mécanismes de survie adaptés à leur environnement.

En somme, grâce à cette recherche nous avons réussi à réaliser une coloration de Gram sur 15 échantillons, ce qui nous a permis de différencier les bactéries Gram positives et Gram négatives en analysant leurs formes et leurs modes de regroupement et offre un aperçu précieux de la richesse microbienne présente dans cet environnement unique. Ces observations sont d'une importance capitale pour approfondir notre compréhension des bactéries et pour appliquer ces connaissances dans des domaines tels que la microbiologie, la médecine, la biotechnologie, la recherche des molécules bioactives et l'identification des agents pathogènes.

L'identification et la caractérisation des bactéries thermophiles peuvent conduire à la découverte de nouvelles enzymes ayant des applications biotechnologiques importantes, notamment dans les domaines de la santé, de l'industrie et de l'environnement. L'étude de la diversité bactérienne thermophile peut également fournir des informations précieuses sur l'origine et l'évolution de la vie sur terre. Cette étude peut nous donner des indices sur les mécanismes adaptatifs et les processus évolutifs qui ont conduit à la diversité de la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui. Enfin, la recherche future devrait également se concentrer sur l'étude des interactions entre les différentes espèces bactériennes thermophiles présentes dans les sources thermales. Ces interactions peuvent nous renseigner sur le fonctionnement des écosystèmes en général et sur les mécanismes de coexistence et de compétition entre les organismes.

En résumé, l'étude de la diversité bactérienne thermophile de la source thermale ouvre de nouvelles perspectives passionnantes dans les domaines de la biotechnologie, de l'origine de la vie et de l'écologie microbienne.

Références bibliographiques

- Ahmed Mehdi, B. (2014). Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkhia d'Oran (Caractérisation phénotypiques). Mémoire de Master : Microbiologie. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, 100p.
- Belala seif, E., Cherouat, B. et Bouseba, A. (2021). Les extrêmophiles dans leurs environnements et leurs applications biotechnologiques. Mémoire de Master : Ecologie microbienne. Constantine : Université des frères Mentouri, Constantine, 46p.
- Benzerfa, D., Chenina, N., et Cherouine, N. (2021). Isolement et identification des bactéries thermophiles à partir de la station thermale de Hammam Sidi Aïssa wilaya de Saïda. Mémoire de Master : Microbiologie Appliquée. Tiaret : Université Ibn Khaldoun, 72p.
- Besse, A. (2016). Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrêmes : peptides antimicrobiens d'archées halophiles. Thèse de doctorat : Microbiologie. Paris : Ecole doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227, 313p.
- Bouacem, K. (2016). Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir des sources thermale du Nord-Algérien : Etude des propriétés enzymatiques. Thèse de Doctorat : Microbiologie Appliquée. Bab Ezzouar : Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, 248p.
- Bredberg, K., Person, J., Christiansson, M., Stenberg, B. et Holst, O. (2001). Anaerobic desulfurization of ground rubber with the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*- a new method for rubber recycling: *Microbiol Biotechnol*, 55: 43-48.
- Byrne, N. (2008). Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des sources hydrothermales océaniques. Thèse de Doctorat : Microbiologie. Bretagne : Université de BREST : Ecole Doctorale des Sciences de la Mer, 206p.
- Capdepy, M. Canellaa, J. (1995). La flore bactérienne des eaux thermales et minérales. *La Huille blanche*. N°2-3, p70-72.
- Christel, S. (2018). Function and Adaptation of Acidophiles in Natural and Applied Communities. *Linnaeus University Press*, N° 328, 99p.
- Coker, J.A. (2016). Extremophiles and Biotechnology: Current uses and prospects. *F1000 Research*. 5: 396, 7p.
- Deepika, M. et Tulasi, S. (2013). Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes in Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: *Biotechnology of Thermophiles*. Springer Science-Business Media Dordrecht, p3-60.

- Detay, M. et Thomas, P. (2013). Hydrovolcanologie appliquée à la phase hydrothermale: fumeroles, solfatares, geysers, lacs acides, mofettes, sources chaudes... Planet Terre, 25p.
- Detay, M. et Thomas, P. (2018). Les extrémophiles dans leurs environnements géologiques – Un nouveau regard sur biodiversité et sur la vie terrestre et extraterrestre. Planet-terre, 28p.
- Dr Khadir Abdelmounaim, TD de microbiologie, Université de Oran 1 Ahmed Ben Bella, Département de biologie. Année universitaire 2017-2018, 19p.
- Dumorné, K., Camacho cordova, D., Astorga-Ela, M. et Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A Potential source for industrial applications. J. Microbial.Biotechnol, 27(4): 649-659.
- El-Gayor, K.E., Al Abboud, M.A. et Essa.A.M. (2017). Characterization of thermophilic bacteria isolated from two hot springs in Jazan, Saudi Arabia. J Pure Appl Microbiol, 11(2), 743-52.
- Ferrera, I. et Reysenbach, A.L. (2007). Thermophiles. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 9p.
- Forterre, P., Bergerat, A., Purificacion, L.G. (1996). The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. FEMS Microbiology Reviews, 18: 237-248.
- Franzetti B. (2019). Microbes des environnements extrêmes. Encyclopédie de l'environnement, 9p. En ligne ISSN2555-0950
- Gomes, J. et Steiner, W. (2004). The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. Food Technol. Biotechnol, 42(4): 223-235.
- Gomri, M.A. (2012). Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. Mémoire de Master : Département de Biotechnologie alimentaire. Constantine : Université Mentouri-Constantine, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), 136p.
- Gomri, M.A. (2019). Contribution à l'étude de la diversité des bactéries thermophiles de quelques environnements chauds algériens et essai de production et caractérisation de leurs protéases extracellulaires. Thèse de Doctorat : Sciences Alimentaires. Constantine : Université Frère Mentouri Constantine 1, Institut de la nutrition, de l'alimentation et de technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A), 336p.

- Grant, W.D., Mwatha, W.E., Jones, B.E. (1990). Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 6(2-3), p 255-269.
- Gregoire, P., Fardeau, M.L., Guasco, S., Bouanane, A., Michotey, V., Bonin, P., Dubourg, K., Cambar, J. et Ollivier, B. (2009). *Les micro-organismes de l'extrême*. Press Therm Climat, 146 : 49-61.
- Guézennec, J. (2014). *Bactéries marines et biotechnologies*. Editions Quae, collection Carnets de sciences, 176p.
- Hanada, S. (2003). Filamentous Anoxygenic phototrophs in Hot Springs. Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced industrial Science and Technology, 18(2): 51-61p.
- Hassad, C. et Immoune, R. (2019). Caractérisation de bactéries thermophiles : Criblage d'activités enzymatiques. Mémoire de Master : Biotechnologie Microbienne. Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 76p.
- Holden, J.F. (2009). Extremophiles: Hot Environments in *Encyclopedia of microbiology*. Elsevier, 3:127-146.
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: Some Applications of their products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(4). P735-750.
- Ibtissam, A. et MEKKI, N. (2019). Isolement et caractérisation de bactéries de la source naturelle de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie). Mémoire de Master : Microbiologie Appliquée. M'SILA : Université Mohamed Boudiaf, 57p.
- Ibtissem Djinni, Cours de micro-organismes des milieux extrêmes, Université Abderahmane MIRA-Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie, Année Universitaire 2016/2017, 100p.
- Ilahi, N., Bahadur, A., Wang, W., Degen, A., Kang, S., Sajjad, W. et Shang, Z. (2022). Diversity, distribution, and function of bacteria in the supraglacial region hit by glacial lake outburst flood in northern Pakistan. *Environmental Sciences Europe*, 34(1) : 18p.
- Irwin, J. A. et Baird, A. pW. (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal* 57 (6): 7p.
- Ishino, S. et Ishino, Y. (2013). DNA Polymerases and DNA ligases. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, p: 429-457.
- Johnson, D.B. et Quatrini, R. (2020). Acidophile Microbiology in Space and Time. *Current Issues in Molecular Biology*, 39.

- Johnson, D.B. et Schippers, A. (2017). Editorial: Recent Advances in Acidophile Microbiology: Fundamentals and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 8 (428).
- Kaur, A., Capalash, N. et Sharma, P. (2019). Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications. *Microbiological Research*, 221, 15-22.
- Khallef, S. (2019). Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides d'Ouargla. Thèse de Doctorat : Microbiologie appliquée. Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammere de Tizi Ouzou, 170p.
- Kumar, S., Dangi, A.K., Shukla, P., Baishya, D. et Khare, S.K. (2019). Thermozyms: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 278: 372-382.
- Kumar, S., Grewal, J., Sadaf, A., Hemamalini, R. et Khare, S.K. (2016). Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2(1): 1-26.
- Larbi, D.K. (2015). Isolement et caractérisation des souches productrices de lipase. Thèse de doctorat : Microbiologie moléculaire et protéomique. Sidi Bel Abbès : Université DJILLALI LIABES, 165p.
- Le Bris, N. (2013). Géochimie des sources hydrothermales. Institut Océanographique, 3p.
- LealDalmaso, G., Ferreira, D. et Vermelho, A.B. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Mar. Drugs*, 13: 1925-1965.
- Lebre Pedro, H. et Cowan don, A. (2019). Genomics of Alkaliphiles. *Advances in Biochemical engineering/Biotechnology*, 172, p135-155.
- Mangrola, A., Patel, R.K., Dudhagara, P., Gandhi, H., Ghelani, A., Jain, K.R., Shah, H. et Mevada, V. (2022). Thermophiles: Physiology, Metabolism, Enzymology, and Adaptation Mechanisms. In *Physiology, Genomics, and Biotechnological Applications of Extremophiles*, p: 65-93.
- Maouchi, S. et Medjedoub, D. (2020). Etude bibliographique portant sur les environnements chauds : Les microorganismes thermophiles et leurs applications. Mémoire de Master : Biotechnologie Microbienne. Tizi-Ouzou : Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, 52p.

- Mathis, B.J., Marshall, C.W., Milliken, C.E., Makkar, R.S., Creager, S.E. et May, H.D. (2008). Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Microbiol Biotechnol*, 78:147-155.
- Mayouf, A. Aribi, F. et Chelgham, N. (2020). Evaluation de l'activité enzymatique des souches thermophiles isolées à partir des sources hydrothermales de MEDEA et BOUIRA. Mémoire de Master : Microbiologie Appliquée. Medea : Université Yahia Fares Medea, 102p.
- Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D. et Sharma, A.K. (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, 6(1): 81.
- MEI, N. (2016). Ecologie des micro-organismes producteurs d'hydrogènes des sources hydrothermales alcalins associées à la serpentinisation en Baie de Prony, Nouvelle-Calédonie. Thèse de doctorat : Océanographie. Marseille : Aix-Marseille Université, 215p.
- Menasria, T. (2020). Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien. Thèse de Doctorat : Microbiologie Appliquée. Batna : Université Mustapha Ben Boulaid- Batna 2, 196p.
- Mukhtar, S., Zaheer, A., Dalaq, A., Kauser, A., et Mehnaz, S. (2018). Actinomycetes: A source of industrially Important Enzymes. *Journal of proteomics & Bioinformatics*, 10(12): 316-319.
- Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valence, R., Rojas, C. et Seeger, M. (2018). Living at the Frontiers of life: Extremophiles in chile and their Potential for Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 9: 25.
- Oren, A. (2002). *Halophilic Microorganisms and their Environments*. Kluwer Publishers, Dordrecht, p 471-491.
- Ouali, S. (2008). Les sources thermales en Algérie. *Division Energie Solaire Thermale et Géothermie*, 13 : 16-18.
- Panda, M.K., Sahu, M.K., et Tayung, K. (2012). Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian journal of microbiology*, 5(2), 159-165.
- Pandey, A., Dhakar, K., Sharma, A., Priti, P., Sati, S. et Kumar, B. (2015). Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the soldhar (95°C) and Ringigad (80°C) hot springs of Uttarakhand, India. *Ann Microbiol*, 65: 809-816.

- Pick, U. (1999). *Dunaliella Acidophila* – - a most extreme acidophilic alga. In: Enigmatic microorganisms in extreme environments, ed. J. Seckbach. Kluwer Academic Publishers, 465-478.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B. et Tang, J. (2007). Micro Extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(3):183-209.
- Pillot, G. (2018). Biodiversité électroactives issues de sources hydrothermales profondes. Thèse de Doctorat : Océanographie. Marseille : Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement, 231p.
- Querellou J, Guezennec J. (2010). Biotechnologie des extrêmophiles. *Techniques de l'ingénieur*, BIO 580, 26p.
- Rabouhi, L. et Benbrahim, R. (2022). Essai de caractérisation d'exoenzymes produites par une bactérie extrêmophile du genre *Halorubrum*. Mémoire de Master : Microbiologie Appliquée. Ouargla : université Kasdi Merbah, Ouargla, 76p.
- Rafael R. de la Haba1, Antunes, A. et Hedlund, B P. (2022). Editorial: Extremophiles: Microbial genomics and taxogenomics. *Frontiers in microbiology*, 13: 7.
- Righi, F.Z. et Chaa, Z.M. (2022). Les microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase. Mémoire de Master : Microbiologie appliquée. Biskra : Université de Biskra, 56p.
- Sahli, K. (2021). Etude des *Archaea* halophiles extrêmes isolées d'environnements hypersalins algériens et caractérisation de leurs caroténoïdes. Thèse de Doctorat : Biotechnologie. Constantine : Université des frères Mentouri, Constantine, 239p.
- Salem, F. (2019). Profil des enzymes hydrolytiques des champignons filamenteux isolés d'un milieu extrême (Chott Tigudidine). Mémoire Master : Microbiologie Appliquée. Biskra : Université Mohamed Khider de Biskra, 62p.
- Sang, P., Liu, S.Q. et Yang, L.Q. (2020). New Insight into Mechanisms of Protein Adaptation to High Temperatures: A Comparative Molecular Dynamics Simulation Study of Thermophilic and Mesophilic Subtilism-Like Serine Proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 3128.
- Sarmiento, F., Peralta, R. et Blamey, J.M. (2015). Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(148).
- Schleper, C., Pühler, G., Klenk, H.P., et Zillig, W. (1996). *Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., Two Species of Hyperacidophilic,

Thermophilic, Heterotrophic, Aerobic Archaea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3): 814-816.

- Schleper, C., Puhler, G., Kuhlmoorgen, B., et W. Zillig. (1995). Life at extremely low pH. *Nature*, 375: 741-742.
- Shukla, P.J., Bhatt, V.D., Suriya, J. et Mootapally, C. (2020). Marine Extremophiles: Adaptations and Biotechnological Applications. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 5(1): 1753-1771.
- Smets, L. (2022). Exploration des fumerolles volcaniques (Lanzarote, Iles Canaries, Espagne). *Regards*, N°91, 10p.
- Thiroux, S. (2019). Etudes des interactions entre virus et hôtes archéens hydrothermaux hyperthermophiles. Thèse de Doctorat : Microbiologie. Bretagne : Université de Bretagne Occidentale, 304p.
- Ulukanli, Z. et Digrak, M. (2002). Alkaliphilic micro-organisms and habitats. *Turkish Journal of biology*, 26, 181-191.
- Vavitsas, K., Glekas, P.D. et Hatzinikolaou, D.G. (2022). Synthetic Biology of Thermophiles: Taking Bioengineering to the Extremes? *App. Microbiol.* 2, 165-174.
- Ventosa, A., Fernández, A.B., León, M.J., Sánchez-Porro, C. et Rodríguez-Valera, F. (2014). The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles*, 18: 811-824.
- Verma, M.L. et Kanwar, S.S. (2012). Harnessing the Potential of Thermophiles: The Variant of Extremophiles. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 6: 13.
- Xie, K., Deng, Y., Zhang, S., Zhang, W., Liu, J., Xie, Y., Zhang, X. et Huang, H. (2017). Prokaryotic Community Distribution along an Ecological Gradient of Salinity in Surface and Subsurface Saline Soils. *Scientific Reports*, 7(1): 11.
- Zeng, X., Alain, K. et Shao, Z. (2021). Microorganisms from deep sea hydrothermal vents. *Marine Life Science Technology*, 3:204:230.

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de culture (en g/l).

- **Gélose nutritive**

Tryptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
Agar-agar	15g
Eau de source du Hammam Debbagh q.s.p.....	1 L

- **Bouillon nutritif**

Tryptone	10g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
Eau de source du Hammam Debbagh q.s.p.....	1L

Annexe 2 :

Coloration de Gram

➤ **Réactifs fournis prêts à l'emploi**

- Violet de gentiane
- Lugol
- Ethanol
- Fuschine

➤ **Protocole**

- A partir d'un prélèvement, un frottis est réalisé, séché à l'air et fixé à la chaleur, on recouvre la lame de violet de gentiane pendant une minute après la lame est ensuite rincée à l'eau distillée.
- On recouvre la lame de Lugol pendant une minute, on lave à l'eau distillée.
- On décolore à l'alcool jusqu'à la lame devient claire. On lave à l'eau distillée.
- On recouvre la lame de fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute. On lave à l'eau distillée. On sèche la lame entre deux feuilles de papier filtre.
- On observe la lame au microscope optique au grossissement 1000.

Abstract

Hamam Debbagh, located in the Guelma region, is recognized as the second hottest natural thermal spring in the world, with a temperature of 97°C and a pH of 6,64. This spring holds a wide variety of microorganisms known as thermophiles and hyperthermophiles due to their ability to thrive in an extreme environment. These microorganisms have developed specific physiological and molecular mechanisms to adapt to these harsh environmental conditions that are generally hostile to life. Thermophilic microorganisms are particularly studied for their potential in producing thermostable enzymes, which are highly sought after for various industrial, biotechnological, and medical uses. Our study focuses on the bacterial diversity in the thermal spring water of Hamam Debbagh in Guelma (East Algeria). After culture on nutrient agar, for 72h at 55°C, we used Gram staining to determine the different bacterial forms and groupings. Our results showed a predominance of Gram-positive and Gram-negative bacillary forms, as well as the presence of isolated Gram-positive cocci and Gram-positive coccobacilli grouped in pairs. These results provide insight into the composition of the bacterial community present in this thermal spring where the temperature exceeds 90°C.

Keywords: Thermal spring of Hamam Debbagh, microorganisms extremophiles, thermophiles and hyperthermophiles, extreme temperatures.

المخلص

حمام دباغ الواقع في منطقة قالمة, يعتبر منبع الثاني في العالم للمياه الطبيعية الساخنة حيث تصل درجة الحرارة إلى 97 درجة مئوية و درجة حموضة تساوي 6,64، وهذا الوسط يحتضن كائنات حية دقيقة متنوعة وخاصة محبة لدرجة الحرارة العالية و المرتفعة جدا وهذا راجع إلى قدرتها لتحمل ظروف هذا الوسط المتطرف هذه الكائنات لها القدرة على تطوير آليات فيزيولوجية وجزئية خاصة من أجل التأقلم في هذه الظروف القاسية الكائنات الحية الدقيقة المحبة لدرجة الحرارة العالية هي كائنات منتجة لأنزيمات مستقرة حراريا والتي تستعمل في الصناعة البيو تكنولوجيا وفي مجال الطب بحثنا يتركز على التنوع البكتيري الموجود في المنبع الساخن لحمام دباغ قالمة، بعد زرع في وسط الاجار المغرب لمدة 72 ساعة على درجة حرارة 55 درجة مئوية, واستعملنا في هذا البحث صبغة الغرام لمعرفة شكل البكتيريا والى أي مجموعة تنتمي والنتائج المتحصل عليها, اثبتت وجود البكتيريا العضوية غرام موجب موجودة بكثرة, وأيضا بكتيريا الكروية الثنائية غرام موجب وايضا البكتيريا العضوية صغيرة غرام موجب متجمعة في ثنائيات هذه النتائج جعلتنا نلقي نظرة على المجموعات البكتيريا الموجودة في هذا المنبع الحراري التي تتجاوز درجة حرارته 90 درجة مئوية .

الكلمات المفتاحية: منبع حراري c متطرفة، محبة للحرارة، محبة لدرجة حرارة قصوى، درجة حرارة متطرف.

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biologie Moléculaire des Microorganismes*

Etude de la diversité bactérienne thermophile de la source thermale de Guelma

Résumé :

Hammam Debbagh, situé dans la région de Guelma, est reconnu comme la deuxième source thermale naturelle la plus chaude au monde, avec une température de 97°C et un pH de 6,64. Ce lieu abrite une grande variété de microorganismes qualifiés de thermophiles et hyperthermophiles en raison de leur capacité à prospérer dans cet environnement extrême. Ces microorganismes ont développé des mécanismes physiologiques et moléculaires spécifiques pour s'adapter à ces conditions environnementales hostiles à la vie en général. Les microorganismes thermophiles sont particulièrement étudiés pour leur potentiel dans la production d'enzymes thermostables, très recherchées pour diverses applications industrielles, biotechnologiques, et médicales. Notre étude se concentre sur la diversité bactérienne présente dans l'eau de source thermale Hammam Debbagh de Guelma (Est Algérien). Après culture sur gélose nutritive, pendant 72h à 55°C, nous avons utilisé la coloration de Gram pour déterminer les différentes formes et regroupements bactériens. Nos résultats montrent une prédominance des formes bacillaires à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que la présence de cocci isolés à Gram positif et de coccobacilles à Gram positif regroupés en paires. Ces résultats nous offrent un aperçu sur la composition de la communauté bactérienne présente dans cette source thermale où la température dépasse les 90°C.

Mot clés : Source thermale Hammam Debbagh, microorganismes extrémophiles, thermophiles et hyperthermophiles, température extrême.

Jury d'évaluation :

Président: ADJEROUD Moussa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadrant : HADDI Mohamed-Laid (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinatrice: MERIANE Ilhem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Présenté par : Cissé Fanta et Moussa Inoua Ousséïna

Année universitaire 2022-2023