

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

# Mémoire

Présenté par: M<sup>elle</sup> HADDAD Naima

En vue de l'obtention du diplôme de  
**Magister en Microbiologie Appliquée**

## *Thème*

**Sélection de souches hyperthermophiles  
productrices d'enzymes amylolytiques  
thermostables dans les sources hydrothermales**

**Devant le jury :**

**Présidente:** M<sup>me</sup> SADOUN D.

Professeur (UAMB)

**Rapporteur:** M<sup>r</sup> BENALLAOUA S.

Professeur (UAMB)

**Examineurs:** M<sup>me</sup> ZAIDI R.

Maître de conférences (UAMB)

M<sup>r</sup> KECHA M.

Maître de conférences (UAMB)

Année universitaire: 2008/2009

## ***Remerciements***

*Au terme de ce modeste travail, je tiens à remercier **Dieu** de m'avoir donné la volonté et le courage de mener à terme ce travail.*

*Je remercie vivement Monsieur le professeur **BENALLAOUA S.**, directeur de ce mémoire, pour sa disponibilité, ses conseils, son suivi et surtout pour m'avoir accordé sa confiance dans l'aboutissement de ce travail.*

*Je remercie Madame le Professeur **SADOUN D.** mon enseignante de graduation et de postgraduation pour l'honneur qu'elle nous fait d'avoir accepté de présider le jury et d'évaluer ce travail.*

*Je tiens aussi à remercier Madame le **Docteur ZAIDI R.**, mon enseignante de graduation pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le **Docteur KECHA M.** pour les conseils et pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.*

*Mes remerciements vont également à mes collègues du laboratoire de microbiologie appliquée.*

*Mes vifs remerciements vont également à ma soeur Fatiha, à mes cousins et à tous mes amis qui m'ont aidé et soutenu tout au long de ce parcours, ainsi toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

## *Dédicaces*

*En guise de reconnaissance, je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents.*

*A mes frères et sœurs*

*A toute ma famille surtout à mes neveux Mélissa*

*Mayès & Lyna*

*A tous mes amis.*

*A toutes les personnes qui me sont chères*

# *Sommaire*

## *Sommaire*

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

***Introduction*** ..... 1

### *Synthèse bibliographique*

<b>I. Généralités sur les archaea hyperthermophiles</b> .....	3
1. Phylogénie .....	3
2. Les Archaea.....	3
3. Les hyperthermophiles .....	5
3.1. Définition des .....	5
3.2. Habitats .....	6
3.3 Mode de vie et adaptation à l'environnement .....	7
4. Métabolisme du sucre chez les Archaea .....	9
4.1. La voie ED modifiée chez les Archaea hyperthermophiles.....	10
4.2. La voie EM modifiée chez les Archaea hyperthermophiles.....	11
5. Principales caractéristiques des archaea hyperthermophiles et mécanisme de la thermostabilité .....	13
5.1. Parois cellulaires des Archaea .....	13
5.2. La membrane cytoplasmique.....	14
5.3. Réplication de l'ADN chez les archaea.....	15
5.4. Transcription de l'ADN chez les archaea .....	16
5.5. Mécanismes de la thermostabilité de l'ADN.....	17
5.6. Mécanismes de la thermostabilité des ARNs.....	19
<b>II. Les amylases thermostables</b> .....	20
1. Généralité sur les enzymes amylolytiques .....	20
2. Les $\alpha$ -amylases thermostables et leurs applications dans la transformation de l'amidon .....	22
3. Architectures des domaines des $\alpha$ -amylases .....	26
4. Mécanisme d'action des $\alpha$ -amylases .....	27

---

4.1. Mécanisme catalytique et fixation du substrat au site actif.....	27
4.2. Structure du site actif.....	28
5. Mécanismes de la thermostabilité.....	29
5.1. Composition en acides aminés.....	29
5.2. Interactions contribuant à la stabilité des thermozyms.....	32
5.2.1. Les liaisons hydrogène.....	32
5.2.2. Les interactions électrostatiques.....	32
5.2.3. Les liaisons hydrophobes.....	32
5.2.4. Les ponts disulfures.....	32
5.2.5. Les liaisons métalliques.....	33
5.3. Propriétés conformationnelles.....	33
5.4. Facteurs extrinsèques.....	34

### ***Matériel et méthodes***

1. Prélèvements.....	35
2. Isolement et caractérisation des souches.....	35
2.1. Isolement.....	35
2.1.1. Préparation des milieux d'enrichissement.....	35
2.1.2. Ensemencement.....	35
2.1.3. Isolement.....	36
2.2. Caractérisation des souches isolées.....	36
2.2.1. Propriétés culturelles morphologiques.....	36
2.2.2. Propriétés biochimiques.....	36
a) Utilisation des substrats carbonés.....	36
*/ Utilisation des sucres.....	36
*/ Utilisation des acides aminés.....	38
*/ Autres substrats.....	37
b) Utilisation des substances minérales.....	37
2.2.3. Propriétés physiologiques.....	38
a) Température.....	38
b) pH.....	38
c) Sensibilité à l'oxygène.....	38

---

d) Sensibilité aux antibiotiques .....	38
3. Cinétique de croissance et activité enzymatique.....	39
3.1. Préparation des milieux de cultures .....	39
3.2. Extraction de l'enzyme .....	39
4. Essais d'extraction et de purification d'une amylase thermostable .....	39
4.1. Production de l'enzyme .....	39
4.2. Extraction de l'amylase .....	40
4.2.1. Méthodes de séparation.....	41
4.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	41
4.2.3. Dialyse.....	41
4.2.4. Méthodes analytiques .....	42
a) Détermination de l'activité amylolytique .....	42
*/ Protocole du dosage .....	42
*/ Calcul de l'activité amylolytique.....	43
b) Dosage des protéines totales.....	43
*/ Méthode au bleu de Coomassie .....	43
*/ Technique de dosage.....	43
4.3. Purification de l'amylase .....	44
4.3.1. Désionisation sur gel séphadex G25 .....	44
*/ Préparation de la colonne.....	44
*/ Elution sur colonne .....	45
4.3.2. Chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-cellulose .....	45
*/ Détermination du pH d'élution .....	45
*/ Détermination de la concentration du sel d'élution .....	46
*/ Elution sur colonne.....	46
4.3.3. Chromatographie d'exclusion sur gel séphadex G75 .....	46
*/ Elution sur colonne .....	47
*/ Détermination du poids moléculaire .....	47
4.4. Caractérisation de l'amylase.....	48
4.4.1. Effet de la température .....	48
4.4.2. Effet du pH.....	48
4.4.3. La thermostabilité.....	48

---

4.4.4 Effet de l'EDTA .....	48
4.4.5. Effets des ions métalliques.....	48
5. Etude statistique .....	49

### ***Résultats et discussion***

1. Isolement et caractérisation des souches.....	50
1.2. Températures et pH des sites hydrothermaux .....	50
1.3. Enrichissement et purification.....	50
2. Propriétés morphologiques.....	51
3. Propriétés biochimiques .....	52
3.1.Utilisation des sucres .....	52
3.2. Assimilation des acides aminés.....	53
3.3.Autres substrats .....	53
3.4. Croissance en présence de différents sels minéraux .....	54
4. Propriétés physiologiques .....	55
4.1. Effet de la température sur la croissance.....	55
4.2. Effet du pH sur la croissance .....	56
4.3. Sensibilité aux antibiotiques .....	59
4.4. Sensibilité à l'oxygène.....	59
5. Cinétique de croissance et test d'activité amylolytique.....	62
6. Culture et purification .....	64
7. Extraction du surnageant.....	65
8. Précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse .....	65
9. Purification de l'amylase .....	66
9.1. Désionisation sur gel séphadex G25 .....	66
9.2. Chromatographie échangeuse d'anions DEAE cellulose .....	67
9.3. Chromatographie d'exclusion sur gel séphadex G75 .....	68
9.4. Etalonnage de la colonne et détermination du poids moléculaire .....	69
9.5. Caractérisation de l'amylase.....	72
9.5.1. Effet de la température sur l'activité amylolytique .....	72
9.5.2. Effet du pH sur l'activité amylolytique .....	73

9.5.3. Effet de l'EDTA .....	74
9.5.4. Effet des ions métalliques .....	74
9.5.5. Mesure de la Thermostabilité.....	76
<b>Conclusion</b> .....	<b>77</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative des gènes ARNr montrant la séparation des bactéries, des archaea et des eucaryotes	4
<b>2</b>	Représentation des hyperthermophiles dans l'arbre phylogénique	6
<b>3</b>	Les différentes voies métaboliques de la dégradation du glucose en acétate et en CO <sub>2</sub> chez les Archaea	10
<b>4</b>	La voie ED modifiée chez les Archaea	11
<b>5</b>	La voie métabolique du maltose chez <i>P. furiosus</i>	13
<b>6</b>	Structure de certains lipides des archaea hyperthermophiles	15
<b>7</b>	La région du promoteur archéen	17
<b>8</b>	Représentation schématique de l'action des enzymes amylolytiques sur l'amidon	22
<b>9</b>	Processus de la conversion de l'amidon	23
<b>10</b>	Vue stéréo de la structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -amylase de <i>Bacillus</i> sp. Souche KSM-K38 (AmyK38)	27
<b>11</b>	Les étapes catalytiques de l'hydrolyse de la liaison glycosidique par les enzymes de la famille des $\alpha$ -amylases.	28
<b>12</b>	Schéma représentatif du site actif et des sous sites des amylases	29
<b>13</b>	Etapes d'extraction d'une amylase thermostable selon le protocole modifié de Kwak, 1998	40
<b>14</b>	Protocole du dosage au DNS	42
<b>15</b>	Effet de la température sur la croissance de la souche HT	55
<b>16</b>	Effet de la température sur la croissance de la souche HB	55
<b>17</b>	Effet de la température sur la croissance de la souche HA	56
<b>18</b>	Effet du pH sur la croissance de la souche HT	56
<b>19</b>	Effet du pH sur la croissance de la souche HB	57

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>20</b>	Effet du pH sur la croissance de la souche HA	57
<b>21</b>	Cinétique de croissance et activité amylolytique de la souche HB	62
<b>22</b>	Cinétique de croissance et activité amylolytique de la souche HT	62
<b>23</b>	Cinétique de croissance et activité amylolytique de la souche HA	63
<b>24</b>	Corrélation entre la production d'amylase et la croissance de la souche HB	64
<b>25</b>	Profil d'élution de l'amylase après chromatographie sur séphadex G25	66
<b>26</b>	Profil d'élution de l'amylase après chromatographie sur DEAE-cellulose	67
<b>27</b>	Profil d'élution de l'amylase après chromatographie sur gel séphadex G75	68
<b>28</b>	Absorbances des fractions protéiques à 280nm après chromatographie sur séphadex G 75	69
<b>29</b>	Courbe d'étalonnage des marqueurs	70
<b>30</b>	Effet de la température sur l'activité spécifique de l'amylase	72
<b>31</b>	Effet du pH sur l'activité spécifique de l'amylase	73
<b>32</b>	Effet des ions métalliques sur l'activité spécifique de l'amylase	74
<b>33</b>	Thermostabilité de l'enzyme	76

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Les réactions de la production de l'énergie chez certains hyperthermophiles chémolithoautotrophes	8
<b>II</b>	Enzymes hydrolysant l'amidon des archaea et bactéries thermophiles et hyperthermophiles	25
<b>III</b>	Températures et pH des sites de prélèvement	50
<b>VI</b>	Souches et sites de prélèvement	51
<b>V</b>	Profil d'utilisation des sucres par les souches isolées	52
<b>VI</b>	Assimilation des acides aminés	53
<b>VII</b>	Résultats de la dégradation des autres substrats carbonés	53
<b>VIII</b>	Résultats de l'utilisation des sels minéraux	54
<b>IX</b>	Comparaison des caractéristiques des souches HB, HT, HA avec d'autres espèces du genre <i>Pyrococcus</i> et <i>Thermococcus</i> .	60
<b>X</b>	Résultats de l'activité enzymatique après précipitation au sulfate d'ammonium	65
<b>XI</b>	Calcul du log PM et du rapport $V_e/V_0$	69
<b>XII</b>	Les étapes de la purification de l'amylase	71

## *Liste des abréviations*

- ACD:** ADP-forming Acetyl-CoA synthetase
- ACS:** ADP-dependent acetyl-CoA synthetase
- ADN:** Acide DesoxyRiboNucléique
- ADP-GK:** ADP-dependent glucokinase
- ADP-PFK:** ADP-dependent phosphofructokinase
- ARN:** Acide RiboNucléique
- ARNr:** Acide RiboNucléique ribosomal
- ARNt:** Acide RiboNucléique de transfert
- ATP:** Adenosine TriPhosphate
- BSA:** Bovine Serum Albumine
- 1.3 BPG:** 1,3-bisphosphoglycerate
- DEAE-cellulose:** diéthylaminoéthyl-cellulose
- EDTA:** Ethylène Diamino Tétra Acétate
- Fdox / Fdred:** oxidized / reduced Ferredoxin
- GA:** Glyceraldehyde
- GAP:** Glyceraldehyde-3 Phosphate
- GAPDH:** NAD-dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
- GAPOR:** Glyceraldehyde-3-Phosphate: ferredoxin OxidoReductase
- KDG:** 2-Keto-3-Deoxy-Gluconate
- KDPG:** 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconate
- Mod. ED:** Modified Entner–Doudoroff pathways
- Mod. EM:** Modified Embden–Meyerhof pathways
- PEP:** PhosphoEnolPyruvate
- PEPS:** PhosphoEnolPyruvate Synthase
- 2 PG:** 2-PhosphoGlycerate
- 3 PG:** 3-PhosphoGlycerate
- PGK:** Phosphoglycerate kinase
- POR:** Pyruvate ferredoxin OxidoReductase
- Pyr:Fd OR:** Pyruvate: Ferredoxin OxidoReductase
- RP-A:** Replication Protein A

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

**SSB:** Single Strand Binding Protein

**TCA cycle:** Tricarboxylic Acid cycle.

**T<sub>opt</sub>:** temperature optimal

# *Introduction*

Les microorganismes extrêmophiles ont développé de différentes stratégies moléculaires afin de survivre dans des conditions hostiles à la vie (Bertoldo *et* Antranikian, 2002). Parmi ces organismes extrêmophiles il existe un groupe de microorganismes, les Archaea et bactéries hyperthermophiles qui se développent à des températures optimales de croissance à 80°C et peut atteindre 110°C. Cette adaptation à de hautes températures présente un grand intérêt pour les procédés biotechnologiques (Huber et Stetter, 1998). Au cours de ces dernières années, un nombre important de microorganismes thermophiles extrêmes (60-80°C) et hyperthermophiles (80°-110°C) ont été mis en évidence, ils utilisent des substrats polymérisés comme source de carbone et source d'énergie. Ces microorganismes hyperthermophiles, appartenant aux Archaea et Bacteria, peuvent faciliter la dégradation de plusieurs substrats comme l'amidon, la cellulose, le xylane, la pectine et la chitine (Bertoldo *et* Antranikian, 2002).

En effet, leurs protéines, et plus particulièrement leurs enzymes, (appelées également, thermozymes), sont thermostables et sont généralement résistantes aux protéases et aux détergents. De nombreuses études portent donc sur ces molécules, notamment, sur les amylases (enzymes amylolytiques) qui sont avec les protéases, les enzymes les plus employées dans les procédés industriels. La présence d'enzymes amylolytiques thermostables a été signalée chez de nombreuses archaea hyperthermophiles comme *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus* et *Thermococcus profundus*. Les températures optimales d'activité de ces enzymes sont 100°C, 100°C et 80°C respectivement et certains gènes codant ces enzymes ont même été clonés (Eichler, 2001).

Ces enzymes extraites des hyperthermophiles pourraient remplacer les amylases actuellement utilisées pour l'hydrolyse enzymatique de l'amidon à haute température, essentiellement issues de souches bactériennes *Bacillus* et de champignons et qui ne répondent pas complètement aux attentes des industries (Haki *et* Rakshit, 2003)

Le secteur industriel le plus demandeur des enzymes thermostables est l'industrie de l'amidon. Les enzymes thermostables hydrolysant l'amidon comme les amylases, les pullulanases et les glucoamylases jouent un rôle important dans les industries alimentaires, chimiques et pharmaceutiques (Demirjian *et al.*, 2001).

L'amidon est transformé par hydrolyse en sirops de glucose, maltose et oligosaccharides qui permettront de produire une variété de composés chimiques comme l'éthanol, la lysine ou l'acide citrique, par fermentation, ou du fructose par isomérisation. Les procédés de transformation de l'amidon s'effectuent à des températures comprises entre 55 et 110°C, à des pH variant de 4,2 à 5,5 (Bertoldo *et* Antranikian, 2002).

Le procédé industriel de transformation de l'amidon en sirop de glucose, effectué à haute température, se déroule en deux étapes (la liquéfaction et la saccharification), en raison de l'incompatibilité des conditions de réaction des trois principales enzymes actuellement utilisées : l' $\alpha$ -amylase, l' $\alpha$ -glucosidase et la pullulanase. En plus, ce procédé est accompagné par la formation de fortes concentrations en sels qui doivent être éliminés par des échangeurs d'ions très coûteux. Pour améliorer le procédé et diminuer le coût de production, les industriels sont désireux de posséder de nouvelles enzymes amylolytiques thermostables qui permettraient d'effectuer une seule étape d'hydrolyse (Legin *et al.*, 1997).

Dans la présente étude, notre objectif peut être scindé en deux parties:

- La première est l'isolement et l'identification de souches hyperthermophiles à partir de trois stations hydrothermales algériennes : Hammam EL-Bibane (commune El Mhir) dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj, Hammam Sillal (commune Tifra) et Hammam Kiria (commune Assif El-Hammam) dans la wilaya de Bejaia.
- La seconde est la sélection de souches productrices d'enzymes à activité amylolytique, extraction et purification d'une enzyme amylolytique thermostable et enfin la caractérisation partielle de l'enzyme en se basant sur l'étude des paramètres physico-chimique, effet de l'EDTA et des sels métalliques.

*Synthèse  
bibliographique*

## I. Généralités sur les archaea hyperthermophiles

### 1. Phylogénie

Une nouvelle classification du monde vivant a été mise en évidence par Woese et Fox, (1977) par le biais des ARN ribosomiques. Ainsi un groupe de microorganismes, jusque là classé dans le domaine procaryote, s'avérait appartenir à une phylogénie différente ; il est depuis représenté par les Archaea (ou archées). Cette nouvelle classification tripartite comporte trois domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* (figure 1) (Woese *et al.*, 1990).

Au début le domaine *Archaea* comprenait que des espèces méthanogènes mais au fur et à mesure, des espèces halophiles extrêmes et thermophiles extrêmes s'y ajoutent. Cette découverte d'un troisième domaine du vivant a été une révolution pour le monde scientifique (Lévêque *et al.*, 2000).

### 2. Les Archaea

Au début, les archaea ont été associées à des habitats terrestres et aquatiques restreints ou particuliers dits extrêmes, tels que les milieux hypersalins ou à température élevée. Cependant elles ont été trouvées dans de nombreuses niches écologiques moins extrêmes comme les sols, les sédiments et même dans le tube digestif des animaux. Des études ont montré que ce domaine est largement représenté car il peut constituer jusqu'à 20% de la biomasse totale terrestre (de Long et Pace, 2001).

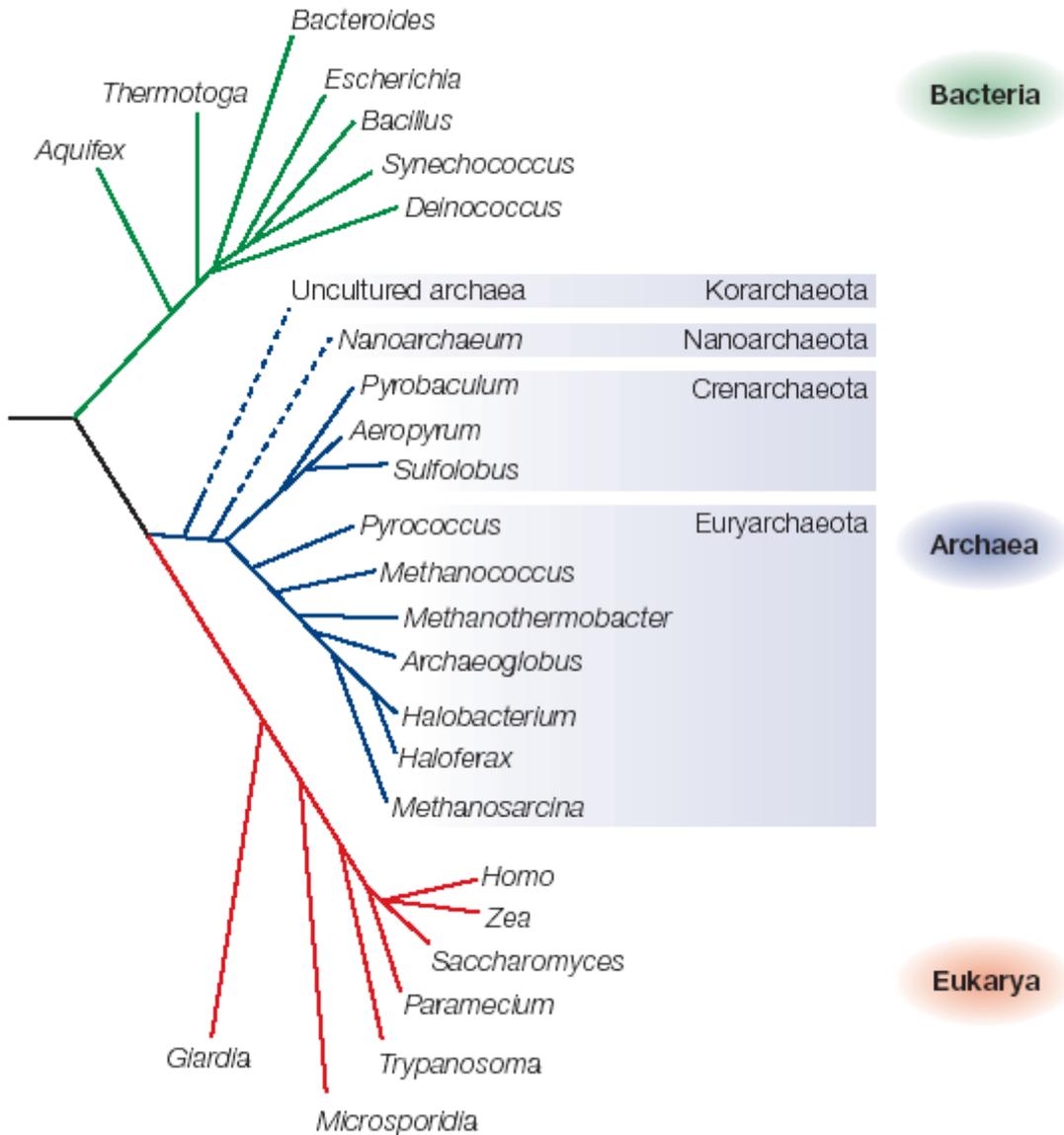
Les espèces d'archaea cultivables ont été classées dans deux grands sous domaines appelés Crenarchaeota (Burggraf *et al.*, 1997) et Euryarchaeota (Woese *et al.*, 1990)

Les Euryarchaeota est le groupe le plus varié, comprenant tous les méthanogènes et les halophiles connus, en plus des espèces thermophiles et psychrophiles. Les espèces appartenant au sous-domaine des Crenarchaeota sont des thermophiles mais il comprend une espèce psychrophile *Crenarchaeum symbiosum*. Un ensemble d'archées non cultivables, qui ne se regroupait pas avec ces deux sous-domaines, a été classé dans un troisième sous-domaine appelé Korarchaeota (Barns *et al.*, 1996).

En 2002, une nouvelle espèce archéenne (*Nanoarchaeum equitans*) a été décrite et représente la plus petite cellule vivante (Huber *et al.*, 2002). Elle possède le plus petit génome cellulaire (480 kb) et vit comme symbiote obligatoire à la surface de la crenarchée hyperthermophile *Ignicoccus* sp. (Huber *et al.*, 2003). Au niveau phylogénétique, les études faites sur les séquences ribosomiques de ce microorganisme

supposent qu'il se trouve à la base de l'évolution archéenne, avant la divergence des deux sous-domaines Crenarcheota et Euryarcheota. Cette nouvelle espèce représente un sous domaine archéen très ancien appelé Nanoarchaeota (Huber *et al.*, 2002).

Dû au manque d'espèces identifiées, les positions de ces deux derniers sous domaines sur l'arbre phylogénétique sont incertaines (Allers et Mevarech, 2005).



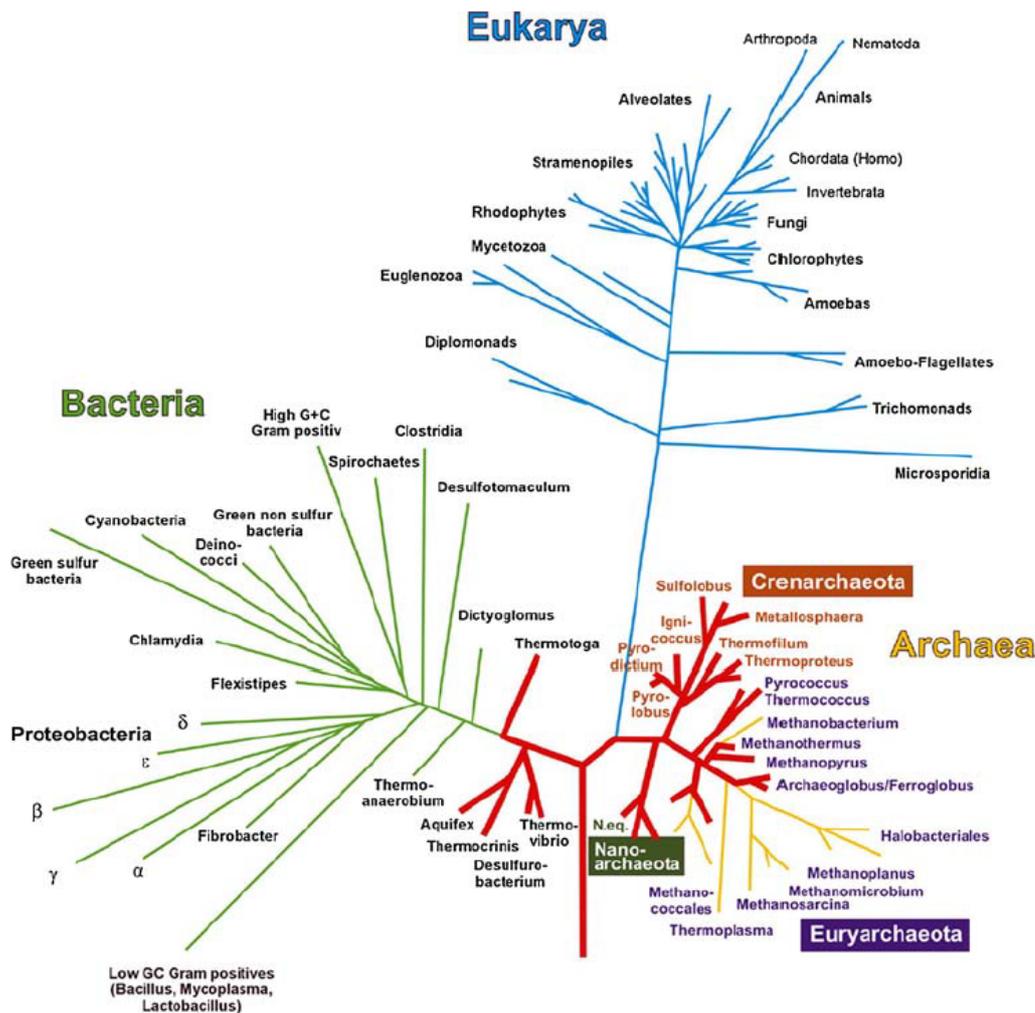
**Figure 1:** Arbre phylogénétique issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques montrant la séparation des bactéries, des archaea, et des eucaryotes (Allers et Mevarech, 2005).

### 3. Les hyperthermophiles

#### 3.1 Définition

Suite à la découverte des archaea *Pyrolobus fumarii* et la souche 121 qui peuvent croître à des températures optimales de 113°C et 121°C, respectivement, les microorganismes qui ont une température optimale de croissance de 80 à 85°C et plus sont classés parmi les hyperthermophiles. On pense que la limite supérieure de la vie n'a pas été encore découverte et peut atteindre 140 à 150°C. (Kashefi et Lovley, 2003; Cowan, 2004). La majorité des microorganismes hyperthermophiles appartiennent au domaine des Archaea. Parmi les bactéries il y'a seulement peu d'espèces qui sont classées parmi les hyperthermophiles, tels que *Thermotoga* et *Aquifex* qui ont une  $T_{opt}$  dans une gamme de températures 90 à 95°C (Huber *et al.*, 2000).

L'arbre phylogénique (figure 2) indique que la séparation du domaine *Bacteria*, des deux domaines *Archaea* et *Eucaria* aurait eu lieu très tôt dans l'évolution. Toutes les branches les plus profondes et les plus courtes dans l'arbre phylogénétique universel sont représentées par des hyperthermophiles, incluant deux genres du domaine *Bacteria* (*Aquifex* et *Thermotoga*) et les autres espèces appartiennent au domaine *Archaea* (*Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Pyrobaculum*, *Desulfurococcus*, *Sulfolobus*, *Methanopyrus*, *Thermococcus*, *Methanothermus*, *Archaeoglobus*...). A partir de ces observations, il semble que les hyperthermophiles sont les organismes les plus primitifs et l'ancêtre commun pourrait être un hyperthermophile (Huber et Stetter, 1998).



**Figure 2:** Représentation des hyperthermophiles dans l'arbre phylogénétique. Les branches en rouge représentent les genres hyperthermophiles (Stetter, 2006)

### 3.2. Habitats

Les hyperthermophiles ont été découverts dans des milieux ayant des températures inférieures à 50°C et qui peuvent dépasser 110°C, leurs pH varient entre 0,5 à 11. Les sources chaudes sont souvent riches en sources de carbone et de nitrogène et pourvus en donneurs et accepteurs d'électrons (Baross et Holden, 1996).

Parmi les habitats des hyperthermophiles, on retrouve des sources d'eau chaudes terrestres, alcalines (les geysers) ou acides (les sulfatares), dont le pH dépend essentiellement de la vitesse de la remontée de l'eau. Les sites les plus connus sont les geysers du parc de Yellowstone aux Etats-Unis et les sources d'Islande (Lévêque *et al.*, 2000).

De nombreuses espèces ont été également isolées à partir des résurgences sous-marines profondes, notamment au niveau des fumeurs noirs, ou à partir de sources chaudes sous marines peu profondes, dont l'exemple le plus connu est le site Vulcano, en Italie. Ces environnements contiennent des concentrations élevées en sels (environ 3%) et présentent une gamme de pH de 5 à 8,5 (Huber et Stetter, 1998).

Ces biotopes sont liés à l'activité tectonique de la terre. Ils sont souvent caractérisés par leur activité volcanique. Mais on trouve également des hyperthermophiles dans des sites qui ne sont pas liés à l'activité volcanique, à titre d'exemple, les sols ou les mares fortement chauffés par le soleil, les réservoirs pétroliers ou les sites liés aux activités humaines comme les mines de charbon (Lévêque *et al.*, 2000).

La solubilité de l'oxygène à des températures élevées et la présence des gaz réduits, font que les biotopes hyperthermophiles soient principalement anoxiques. Cependant, les surfaces des zones solfatariques peuvent contenir des quantités raisonnables en oxygène. Bien que les hyperthermophiles soient incapables de croître à des températures ambiantes, ils peuvent survivre pour une longue période. Ces capacités jouent un rôle important dans la propagation à travers l'atmosphère et l'hydrosphère froide. Par conséquent des hyperthermophiles vivants ont pu être isolés à partir de l'eau froide de la mer de Beaufort et l'eau du pacifique, avoisinant les volcans de la mer Macdonald (Huber et Stetter, 1998).

### **3.3. Mode de vie et adaptation à l'environnement**

Les hyperthermophiles s'adaptent à différents facteurs environnementaux tel que la composition en minéraux et en gaz, le pH, le potentiel redox, la salinité et la température. La majorité des hyperthermophiles impliquent un mode de nutrition "chémolithoautotrophe". Les réactions d'oxydoréduction inorganiques servent de sources d'énergie (chémolithotrophie) et le CO<sub>2</sub> est la seule source de carbone exigée pour la synthèse du matériel cellulaire organique (autotrophie).

Par conséquent, ces organismes qui fixent le CO<sub>2</sub> par chimiosynthèse sont nommés les chémolithoautotrophes. Les réactions énergétiques chez les hyperthermophiles chémolitoautotrophes sont de type anaérobie ou aérobie. Le H<sub>2</sub> est un donneur important d'électrons. Dans un milieu naturel, il peut être un composant des gaz volcanique. Les autres donneurs d'électrons sont le sulfure, le soufre et les fers ferreux. Tout comme dans

la respiration des organismes mésophiles, certains hyperthermophiles peuvent utiliser l'oxygène comme un accepteur d'électrons. Cependant, ces hyperthermophiles sont des microaérophiles, donc ils se développent seulement à des concentrations faibles en oxygène. Les hyperthermophiles anaérobies utilisent pendant la respiration le nitrate, le fer ferreux, le sulfure, le soufre, et le dioxyde de carbone (Tableau I).

Plusieurs espèces hyperthermophiles chémolithoautotrophes sont des "hétérotrophes facultatifs". Ils sont capables d'utiliser le matériel organique alternativement aux nutriments inorganiques, existant dans l'environnement (par la décomposition cellulaire). Les hyperthermophiles hétérotrophes tirent leur énergie soit par voie aérobie ou par les différents types de la respiration anaérobie, en utilisant le matériel organique comme donneur d'électrons, ou par la fermentation (Stetter, 1999).

Les peptides, les acides aminés et les hydrates de carbone servent de sources de carbone et d'énergie pour les hyperthermophiles ayant un métabolisme hétérotrophe. Ces substrats sont complètement oxydés en CO<sub>2</sub> par les accepteurs d'électrons (S<sup>0</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou O<sub>2</sub>) dans le cas d'une respiration, et convertis en acétate et divers acides organiques dans le cas d'une fermentation (Stetter, 1996).

**Tableau I:** Les réactions de la production d'énergie chez certains hyperthermophiles chémolithoautotrophes (Stetter, 1999).

Réaction énergétique	Genre
2S <sup>0</sup> +3O <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O @ 2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2FeS <sub>2</sub> +7O <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O @ 2FeS <sub>2</sub> O <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	<i>Sulfolobus</i> <sup>a</sup> , <i>Acidiamus</i> <sup>a</sup> , <i>Metallosphaera</i> <sup>a</sup> , <i>Aquifex</i>
H <sub>2</sub> +1/2O <sub>2</sub> @ H <sub>2</sub> O	<i>Aquifex</i> , <i>Acidiamus</i> <sup>a</sup> , <i>Metallosphaera</i> <sup>a</sup> , <i>Pyrobaculum</i> <sup>a</sup> , <i>Sulfolobus</i> <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> +HNO <sub>3</sub> @ HNO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O	<i>Aquifex</i> , <i>Pyrobaculum</i> <sup>a</sup>
4H <sub>2</sub> +HNO <sub>3</sub> @ NH <sub>4</sub> OH+2H <sub>2</sub> O	<i>Pyrolobus</i>
H <sub>2</sub> +6Fe(OH) <sub>3</sub> @ 2Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> +10H <sub>2</sub> O	<i>Pyrobaculum</i> <sup>a</sup>
2FeCO <sub>3</sub> +HNO <sub>3</sub> +5H <sub>2</sub> O @ 2Fe(OH) <sub>3</sub> +HNO <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	<i>Ferroplasma</i>
4H <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> @ H <sub>2</sub> S+4H <sub>2</sub> O	<i>Archaeoglobus</i> <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> +S <sup>0</sup> @ H <sub>2</sub> S	<i>Acidiamus</i> , <i>Stygiolobus</i> , <i>Pyrobaculum</i> <sup>a</sup> , <i>Thermoproteus</i> <sup>a</sup> , <i>Pyrodicticum</i> <sup>a</sup> , <i>Igneococcus</i>
4H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> @ CH <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> O	<i>Methanopyrus</i> , <i>Methanothermus</i> , <i>Methanococcus</i>

<sup>a</sup>Hétérotrophes facultatifs

#### 4. Métabolisme du sucre chez les Archaea

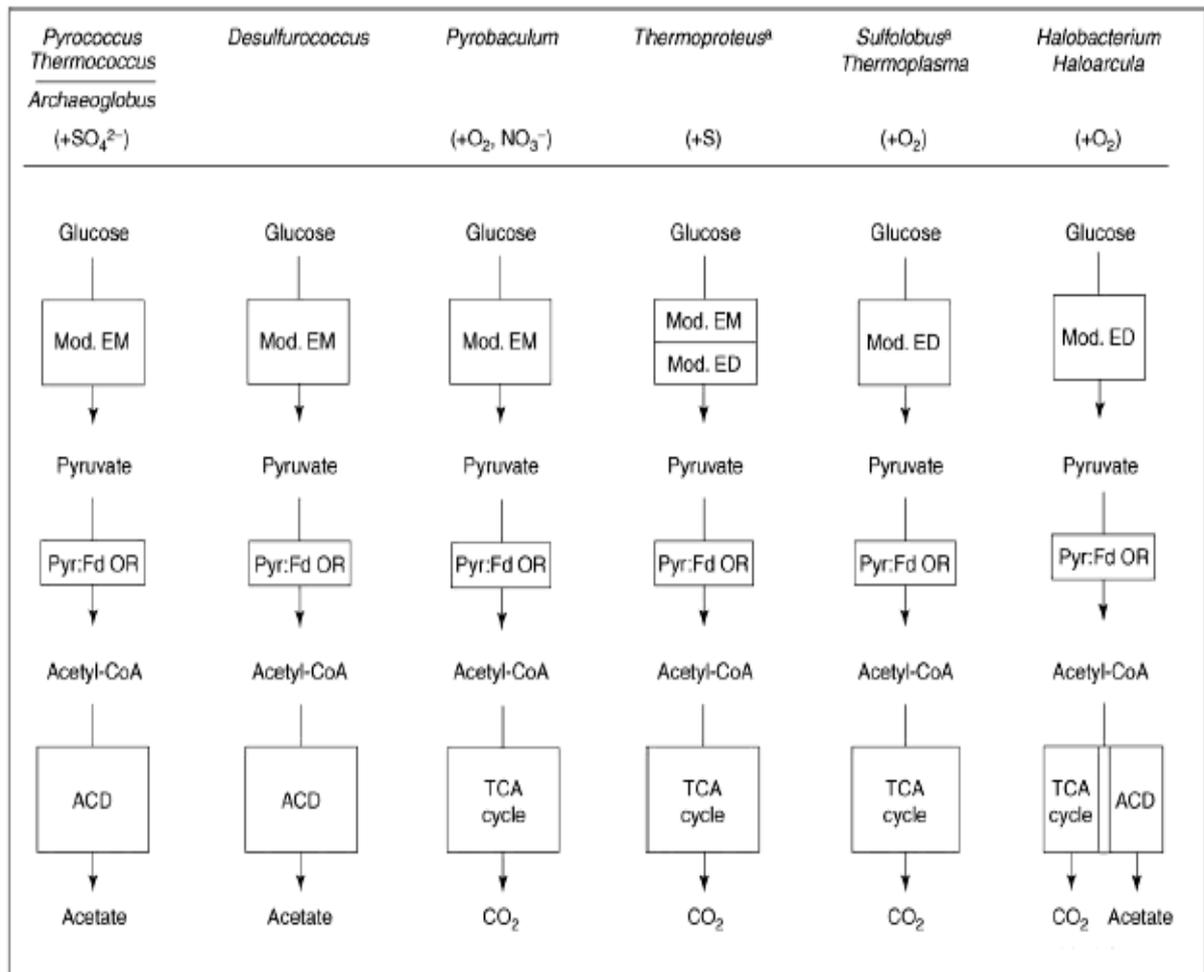
Les Archaea métabolisant le sucre, peuvent dégrader le glucose et les polymères glucosidiques en acétate ou en  $\text{CO}_2$  en utilisant l' $\text{O}_2$ , les nitrates, le soufre ou le sulfate comme accepteurs d'électrons. Les analyses comparatives des voies glycolytiques chez ces organismes indiquent la présence de plusieurs différences avec les voies classiques Emden-Meyerhof (EM) et Entner-Doudoroff (ED) des bactéries et des eucaryotes (figure 3).

Chez les Archaea aérobies, hyperthermophile et thermophile (*Sulfolobus solfataricus*, *Thermoplasma acidophilum*, respectivement) le glucose est métabolisé par des versions de la voie ED, tandis que les espèces hyperthermophiles anaérobies fermentatives (incluant *Pyrococcus furiosus*, *thermococcus sp*, *Desulfurococcus amylolyticus*, le sulfato-réducteur *Archaeoglobus fulgidus* souche 7324 et le microaérophile *Pyrobaculum aerophilum*) utilisent de différentes versions de la voie EM (Labes, 2001).

La seule archaea connue pour son utilisation des deux voies EM et ED en parallèle pour la dégradation du glucose est l'hyperthermophile aérobie soufre-dépendant: *Thermoproteus tenax*.

La dégradation du pyruvate formé par les différentes voies glycolytiques implique une oxydation en acétyl-CoA qui est catalysée chez toutes les Archaea par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase.

Chez les archaea anaérobies et fermentatives, l'acétyl-CoA est converti en acétate par une enzyme unique: l'acétyl-CoA synthétase (ACD). Cependant, chez les archaea réductrices du soufre, des nitrates ou de l' $\text{O}_2$ , l'acétyl-CoA est oxydé en  $2\text{CO}_2$  par le cycle d'acide tricarboxylique (TCA) (Siebers et Schönheit, 2005).



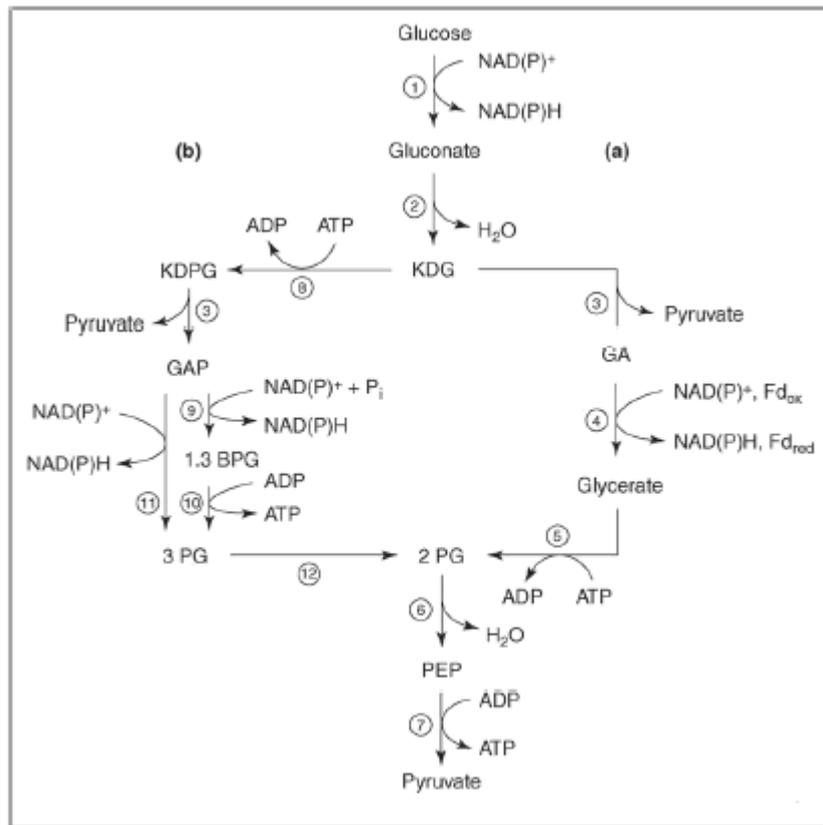
**Figure 3** : Les différentes voies métaboliques de la dégradation du glucose en acétate et en CO<sub>2</sub> chez les Archaea (Siebers et Schönheit, 2005)

#### 4.1. La voie ED modifiée chez les Archaea hyperthermophiles

Des études ont révélé la présence de la voie ED non-phosphorylée chez les Archaea (hyper)thermophiles (*Sulfolobus solfataricus*, *Thermoplasma acidophilum* et *Thermoproteus tenax*) (figure4). Elle implique le clivage de 2-céto-3-desoxy gluconate (KDG), l'oxydation du glycéraldéhyde et la phosphorylation du glycérate. La voie ED semi phosphorylée, impliquant l'action de KDG kinase, le clivage du 2-céto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) et l'oxydation du glyceraldehyde-3 phosphate (GAP) par la glyceraldehyde-3 phosphate déshydrogénase (GAPDH), a été identifiée chez des Archaea halophiles.

Cependant, une autre version de la voie ED dite "branched" (la combinaison de la voie semi phosphorylée et non-phosphorylée) a été mise en évidence chez les hyperthermophiles *S. solfataricus* et *T. tenax* qui implique la KDG kinase,

KD(P)G aldolase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylative (GAPN) (Siebers et Schönheit, 2005).



**Figure 4:** Les voies ED modifiées chez les Archaea (a) la voie ED non-phosphorylative (enzymes 1–7) chez *Thermoplasma acidophilum*. (b) La voie ED semi-phosphorylative (enzymes 1, 2, 8, 3, 9–12, 6 et 7) présente chez les Archaea halophiles (Siebers et Schönheit, 2005)

1, glucose dehydrogenase; 2, gluconate dehydratase; 3, KD(P)G aldolase; 4, glyceraldehyde dehydrogenase, glyceraldehyde:ferredoxin oxidoreductase ou glyceraldehyde oxidoreductase; 5, glycerate kinase; 6, enolase; 7, pyruvate kinase; 8, KDG kinase; 9, GAPDH; 10, phosphoglycerate kinase; 11, GAPN; 12, phosphoglycerate mutase.

#### 4.2. La voie EM modifiée chez les Archaea hyperthermophiles

Toutes les études réalisées sur la fermentation des sucres chez les hyperthermophiles, ont montré qu'ils utilisent la voie EM. Cependant cette voie présente des différences significatives avec la voie conventionnelle EM. Les différences les plus importantes sont observées chez des espèces appartenant à l'ordre *Thermococcales* (figure 5), qui possèdent plusieurs enzymes particulières: deux nouvelles kinases ADP-dépendantes et la glycéraldéhyde-3-phosphate oxidoréductase ferrédoxine dépendante. (Sakuraba et Ohshima, 2002)

Les kinases ADP-dépendantes concernent la glucokinase ADP-dépendante et la phosphofructokinase ADP-dépendantes, elles sont présentes chez *P.furiosus*, *Thermococcus litoralis* et *Thermococcus celer*. L'une des explications de l'existence des kinases ADP-dépendante est que l'ADP montre une thermostabilité plus élevée que l'ATP, notamment en présence des cations divalents. Cependant, chez l'hyperthermophile *Thermoproteus tenax* il existe une phosphofructokinase pyrophosphate-dépendante.

Une autre nouvelle enzyme la glycéraldéhyde 3-phosphate oxidoréductase qui est une enzyme ferredoxine-dépendante a été découverte chez *P. furiosus* et par la suite elle a été identifiée chez *Thermococcus litoralis* et *Desulfurococcus amylolyticus*.

La glycéraldéhyde 3-phosphate oxydoréductase catalyse une nouvelle conversion en une seule étape, la production du phospho-glycérate et la ferrédoxine réduite à partir du glycéraldéhyde-3-phosphate. Dans la voie EM conventionnelle cette étape est catalysée par deux enzymes: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase qui génère le NADH, et la phosphoglycérate kinase impliquant la formation de l'ATP.

Cette modification particulière de la voie EM peut refléter l'adaptation à des hautes températures vue que les pyridines nucléotides sont moins thermostables que les ferrédoxines. Cependant, chez l'hyperthermophile *Thermoproteus tenax*, il existe une enzyme alternative pour cette conversion, une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante (de Vos *et al.*, 1998).

L'étape finale de la fermentation des sucres par les hyperthermophiles, est la conversion de l'acétyl-CoA en acétate, pour produire de l'ATP. Cette étape est aussi particulière chez les archaea hyperthermophiles car elles possèdent une enzyme unique, l'acétyl-CoA synthétase (de Vos *et al.*, 1998), alors que chez les bactéries (incluant l'hyperthermophile *Thermotoga maritima*) cette réaction implique deux enzymes différentes, la phosphate acétyltransférase et l'acétate kinase (Selig *et al.*, 1997).

Plusieurs hyperthermophiles ont la capacité de convertir le pyruvate en alanine. Cette réaction a été découverte chez *P. furiosus* (figure 5), implique l'activité combinée de deux enzymes l'alanine aminotransférase et la glutamate déshydrogénase (Sakuraba *et al.*, 2004; de Vos *et al.*, 1998).

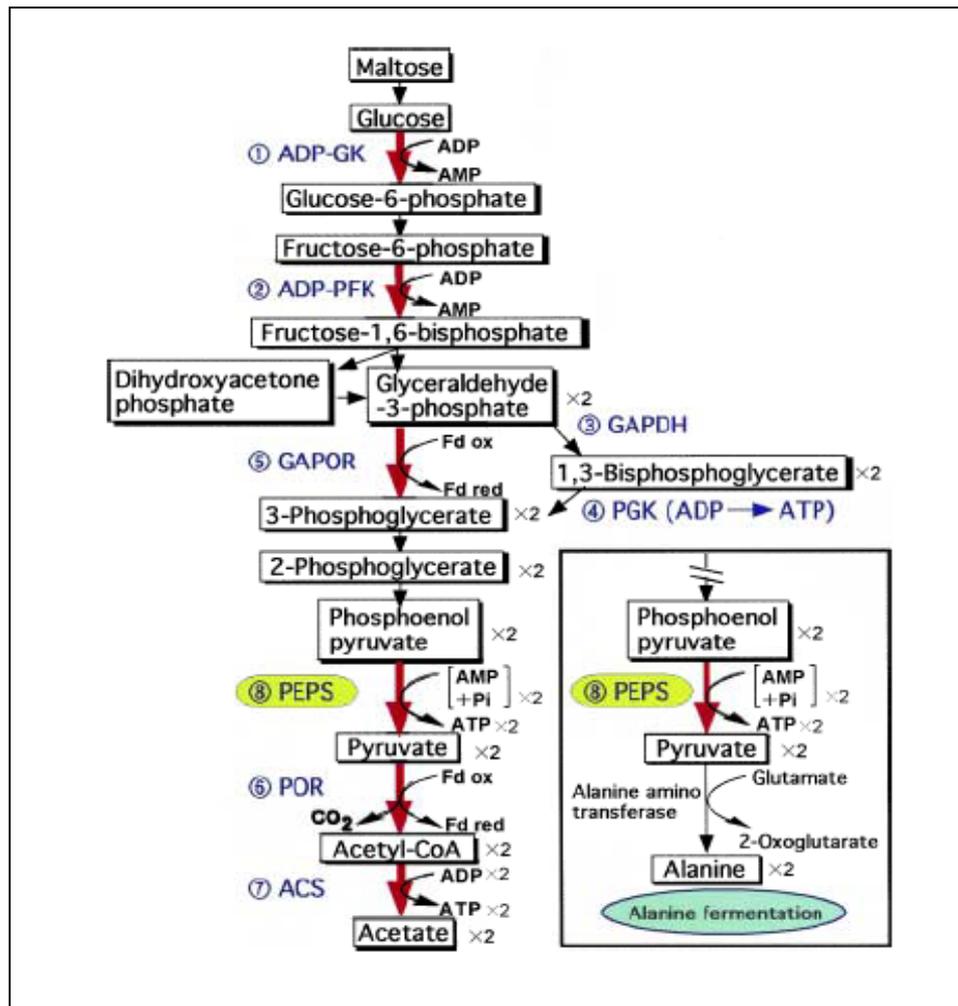


Figure 5 : La voie métabolique du maltose chez *P. furiosus* (Sakuraba *et al.*, 2004)

## 5. Principales caractéristiques des archaea hyperthermophiles et mécanisme de la thermostabilité

### 5.1. Parois cellulaires des Archaea

Les parois cellulaires des Archaea sont différentes des parois bactériennes. On ne trouve jamais de paroi composée de muréine (ou peptidoglycane). A la place, on trouve une structure appelée la couche de surface (ou S-layer) composée de sous unités protéiques. Des polysaccharides sont souvent associés à l'enveloppe cellulaire, mais dans de nombreux cas leur structure reste inconnue.

L'enveloppe cellulaire de certains Archaea est semblable à celle des Bacteria. L'archaea *Thermoplasma* est dépourvue de paroi, comme les mycoplasmes bactériens. Certains méthanogènes, comme *Methanobacterium*, contiennent dans leur paroi un polymère appelé pseudomuréine qui ressemble beaucoup au peptidoglycane (muréine) des Bacteria (Daniel et Cowan, 2000).

## 5.2. La membrane cytoplasmique

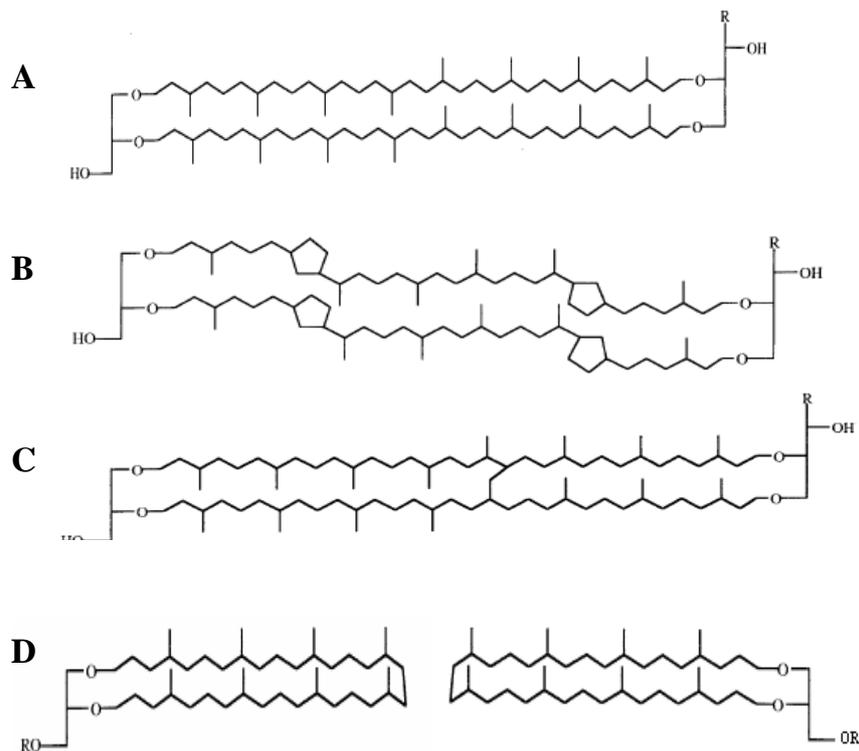
Plusieurs organismes peuvent adapter le degré de saturation de leurs membranes comme réponse aux changements de la température environnementale. Chez les bactéries thermophiles, l'adaptation des lipides de la membrane à la vie à des hautes températures inclue une augmentation de la longueur des chaînes acyle et le degré de saturation des acides gras, embranchement et cyclisation.

Chez les archaea hyperthermophiles, la composition de la membrane est l'une des différences biochimiques la plus remarquable qui distingue les archaea des bactéries.

Les phospholipides des archaea sont formés de chaînes latérales hydrophobes isoprénoides reliées au glycérol par une liaison éther au lieu d'une liaison ester, qui relie les acides gras au glycérol dans la membrane de la majorité des bactéries et des eucaryotes (figure 6).

La forme la plus commune chez les archaea non thermophiles est le monomère diphytanylglycerol éthers (archaeols). Tandis que, le dimère dibiphytanyldiglycérol tétraéthers (caldarchaeols) formant une monocouche et le dibiphytanylglycérol nonitol tétraéthers (nonitolcaldarchaeols) fournissant un degré élevé de rigidité, sont typiquement trouvés chez les archaea hyperthermophiles (figure 6). Chez certains hyperthermophiles comme *Sulfolobus* les chaînes biphytanyl C40 peuvent subir des modifications comme la cyclisation interne (cyclopentane) (Charlier et Droogmans, 2005). L'addition des structures cycliques dans la partie transmembranaire des lipides semble être une réponse de thermoadaptation, ce qui augmente la rigidité de la membrane et réduit sa fluidité (Daniel et Cowan, 2000).

Face aux effets néfastes de la perméabilité accrue aux protons des membranes à une température élevée, certains hyperthermophiles se servent d'un système antiport non-stœchiométrique à proton-sodium pour produire un gradient de sodium secondaire dont le maintien ne dépend pas de la température (Charlier et Droogmans, 2005).



**Figure 6:** Structure de certains lipides des archaea hyperthermophiles. (Charlier et Droogmans, 2005).

(A) Dibiphytanyl diglycérol tétraéthers, (B) Cyclisation interne du dibiphytanyl diglycérol tétraéthers, (C) liaisons covalentes internes, (D) diphytanyl glycérol diéther cyclique.  
 R = H (caldarchaeols). R = (CH<sub>2</sub>OH)-(CHOH)<sub>3</sub>-CH(OH)<sub>2</sub> (nonitolcaldarchaeols).

### 5.3. Réplication de l'ADN chez les archaea

Le génome des archées est généralement composé d'un ADN circulaire, avec une seule origine de réplication mise en évidence chez les euryarchées, tandis qu'il en existe plus d'une chez les crénarchées (Robinson *et al.*, 2004).

La reconnaissance de l'origine se fait par l'intermédiaire de facteurs qui, par leur séquence, sont homologues à ceux des eucaryotes ; ils sont associés à la famille Cdc6/orc1p (Uemori *et al.*, 1997). Ces facteurs permettent le recrutement d'une hélicase répliquative homologue au MCM (minichromosome maintenance) des eucaryotes, en particulier dans le genre *Pyrococcus*, où les séquences sont hautement conservées (Myllykallio et Forterre, 2000). Après ouverture de la double hélice, l'ADN simple brin est stabilisé, chez les euryarchées, par un facteur homologue au RP-A des eucaryotes. Le facteur de stabilisation de l'ADN simple brin présent chez les crénarchées présente, quant à lui, des similitudes avec le RP-A des eucaryotes et le facteur SSB bactérien. Chez les

crénarchées, plusieurs polymérases, issues de la famille B, impliquées dans la réplication, ont été identifiées et caractérisées. Les euryarchées possèdent également une ADN polymérase de la famille B, en plus d'une ADN polymérase associée à une nouvelle famille, la famille D, absente pour l'instant chez les autres organismes. Comme pour les cellules eucaryotes, la question du rôle de chacune de ces ADN polymérases répliquatives, de famille différente, a été posée (Henneke *et al.*, 2005).

Les ADN polymérases B sont retrouvées chez les crénarchées et les euryarchées, tandis que celles de la famille D sont présentes uniquement chez les euryarchées (Ishino *et al.* 1998). Toutes les deux possèdent une activité exonucléase 3'-5'.

Au niveau de la réparation, une ADN polymérase, apparentée à la famille Y, a été mise en évidence chez le crénarchée *Sulfolobus solfataricus* (Boudsocq *et al.*, 2001; Gruz *et al.*, 2001).

#### 5.4. Transcription de l'ADN chez les archaea

La machinerie de la transcription des organismes archéens est à la base similaire à celle des eucaryotes, mais elle est plus simple.

L'initiation de la transcription des gènes codant pour des protéines chez les eucaryotes nécessite plus de 40 molécules différentes, incluant les facteurs essentiels, les sous unités de l'ARN polymérase (RNAP), les facteurs associés au TBP (TAFs) et d'autres protéines nécessaires, par contre seulement environ 16 molécules sont nécessaires chez les archaea.

Pour initier la transcription des gènes codants, les organismes eucaryotes utilisent l'ARN polymérase II (RNAPII) composée de divers sous unités et plusieurs facteurs essentiels, comme TATA-binding protein (TBP), les composants du facteur de transcription TFIID et les facteurs de la transcription, TFIIB, TFIIA, TFIIE, TFIIF, et TFIIH

Les Archaea contiennent des molécules homologues aux TBP, TFIIB, la sous unité alpha TFIIE et l'RNAPII eucaryotes: TBP, TFB, TFE, et RNAP respectivement.

Les archaea possèdent un TBP, mais il n'existe pas de facteurs associés à TBP (TAFs) qui sont des composants du TFIID chez les eucaryotes (Hickey *et al.*, 2002).

#### Régulation

Les archaea doivent aussi avoir des facteurs accessoires, pour réguler la fonction des facteurs essentiels. La majorité des régulateurs identifiés ressemblent plutôt aux

régulateurs bactériens qu'aux régulateurs eucaryotes. Une minorité semble avoir un mécanisme d'action plus étroit avec les activateurs eucaryotes.

Les promoteurs archéens sont tripartites (figure 7). Une structure riche en AT (TATA like) est reconnue par une protéine appelée TBP (TATA-binding protein). Le facteur de transcription TFB se fixe sur le complexe TBP-DNA, et active l'ARN polymérase (RNAP) qui initie la transcription à la séquence située à 25 paires de bases (pb) en aval de la boîte TATA (Reeve, 2003).

L'efficacité du complexe d'initiation est assurée par BRE (Transcription factor B Recognition Element) qui active les interactions entre une séquence spécifique avec le TFB en amont de la boîte TATA, et contrôle la direction du complexe de la transcription et l'initiation. Le TFE (transcription factor inhancer) joue un rôle dans l'activation de certains promoteurs, et stabilise les interactions entre TBP, la polymérase et la boîte TATA (Ouhammouch, 2004).

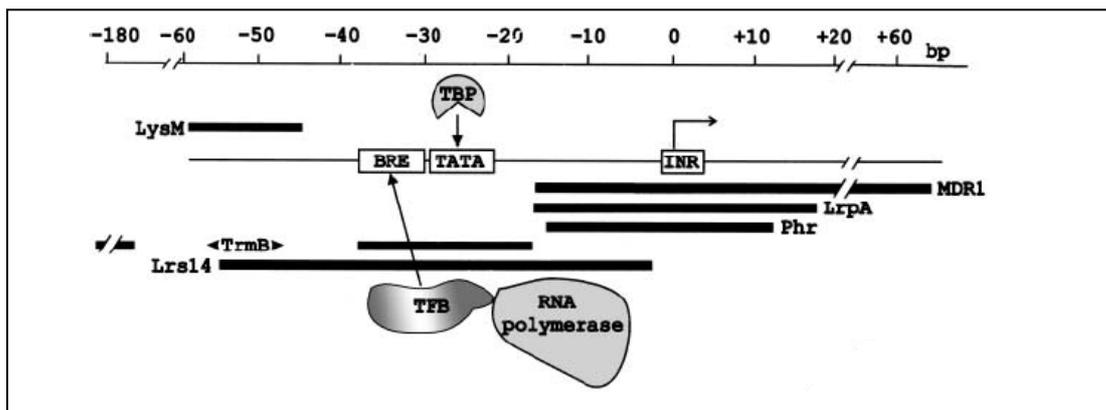


Figure 7: La région du promoteur archéen (Reeve, 2003)

## 5.5. Mécanismes de la thermostabilité de l'ADN

- **La forme circulaire**

Le maintien de la structure secondaire de l'ADN double brin à des hautes températures n'est pas un problème majeur. L'ADN linéaire est facilement dénaturé par la séparation des brins, mais les molécules circulaires sont plus résistantes à la dénaturation par la chaleur. En plus, le superenroulement négatif ou positif peut davantage, augmenter la température de fusion (Daniel et Cowan, 2000).

- **Concentration élevée en sels**

La découverte que certains hyperthermophiles contiennent des concentrations élevées en potassium di-inositol-1,1'-phosphate ou de tripotassium cyclic-2,3-diphosphoglycerate, laisse supposer un possible mécanisme pour la stabilisation de la structure secondaire de l'ADN, *in vivo* (Charlier et Droogmans, 2005).

- **Polyamines particuliers**

Les analyses sur les polyamines chez des bactéries et des archaea montrent que certains polyamines (norspermine et norspermidine) existent seulement chez des archaea hyperthermophiles et ces organismes se sont avérés contenir une plus grande diversité de polyamines que les autres organismes (Terui *et al.*, 2005).

- **Teneur élevée en G-C**

La stabilisation de la structure des acides nucléiques peut être atteinte par l'augmentation du rapport G-C, mais il y'a aucune corrélation entre le pourcentage G-C et la température optimale de croissance chez la plupart des archaea hyperthermophiles (Charlier et Droogmans, 2005).

- **Superenroulement et la reverse gyrase**

Les mécanismes alternatifs de la stabilisation de la structure secondaire de l'ADN incluent le superenroulement et l'association avec des protéines cationiques. La découverte de l'activité d'une topoisomerase I ATP-dépendante ('reverse gyrase', qui crée des superenroulements positifs) chez toutes les archaea hyperthermophiles testées et certains bactéries hyperthermophiles laisse supposer que cela est un mécanisme spécifique pour la stabilisation de l'ADN, et probablement une véritable caractéristique des hyperthermophiles (Charlier et Droogmans, 2005).

- **Protéines associées à l'ADN**

La topologie de l'ADN est aussi affectée par l'interaction avec des protéines cationiques. *In vitro*, Ces petites protéines basiques s'attachent à l'ADN et engendrent une augmentation de la température de fusion, et elles ont été observées soit liées à l'ADN ou formant des structures en nucléosomes (Daniel et Cowan, 2000).

- **Systèmes de réparation efficaces**

Le maintien de la structure primaire des acides nucléiques à des hautes températures semble problématique. Le chromosome dans ces conditions, est susceptible à un taux élevé de dommages: désamination, dépurination, coupures simples ou double brin ou des dommages causés par le stress oxydatif. Les hyperthermophiles sont capables de

maintenir l'intégrité de leur matériel génétique à des températures néfastes pour l'intégrité des génomes mésophiles. Par conséquent, et puisque le taux des mutations chez les hyperthermophiles sont pas significativement différents de ceux observés chez les mésophiles, les hyperthermophiles devraient avoir un système de réparation efficace (Daniel et Cowan, 2000).

- **Copies multiples du chromosome**

Les archaea hyperthermophiles, pendant la phase exponentielle de croissance peuvent contenir plusieurs copies du chromosome. Cela pourrait être très important pour la réparation des coupures double brin, induites par la chaleur, par l'adhésion directe aux extrémités ou par recombinaison (Daniel et Cowan, 2000).

## 5.6. Mécanismes de la thermostabilité des ARNs

Comme pour l'ADN, la concentration en sels semble jouer un rôle important dans la stabilisation de l'ARNr et l'ARNt. Contrairement à l'ADN, la teneur en G-C de l'ARNr corrèle linéairement avec la température de croissance de l'organisme.

Une autre contribution importante à la stabilité thermique de l'ARNr pourrait être la grande affinité des protéines ribosomales pour l'ARNr.

Les modifications post transcriptionnelles sont particulièrement abondantes dans l'ARNr de *Sulfolobus solfataricus*, spécialement pour la méthylation du ribose. Bien que le taux de modifications dans l'ARNr soit élevé chez *S. solfataricus*, son ARNt contient quatre ou cinq fois plus de nucléosides modifiés.

*In vitro*, Les polyamines linéaires des hyperthermophiles sont très efficaces pour la thermostabilisation de l'ADN double brin, alors que les polyamines branchées sont plus efficaces sur l'ADN simple brin et l'ARNt. Comme pour l'ARNr, les ribomethylations de l'ARNt semblent conférer une augmentation dans la stabilité à la molécule. Il a été rapporté que le plus grand nombre de ribomethylation des nucléosides a été observé chez l'organisme le plus hyperthermophile (*Pyrodictium occultum*,  $T_{opt} = 105$  °C) (Charlier et Droogmans, 2005).

## II. Les amylases thermostables

### 1. Généralité sur les enzymes amylolytiques

Les enzymes capables d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -glycosidiques de l'amidon et, par conséquent, impliquées dans sa dégradation peuvent être groupées sous le terme générique d'enzymes amylolytiques ou amylases, ou encore d'  $\alpha$ -glucanases (Lévêque *et al.*, 2000).

La plupart des enzymes hydrolysant l'amidon appartiennent à la famille des  $\alpha$ -amylases ou la famille 13 des glycosides hydrolases selon la classification mise au point par Henrissat (1991). Le système de classification des glycosides hydrolases basé sur la similitude de leurs séquences en acides aminés a permis de déterminer 85 familles différentes (Henrissat, 1998).

La famille des  $\alpha$ -amylase (clan GH-H) des glycosides hydrolases est une grande famille de glycosides hydrolases, transférases et isomérases incluant environ 30 spécificités enzymatiques différentes (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006)

En raison des structures complexes de l'amidon, les cellules exigent une combinaison d'enzymes hydrolytiques pour la dépolymérisation de l'amidon en oligosaccharides et sucres simples (*endoamylases*, *exoamylases*), ou pour transformer l'amidon par transfert de résidus et d'oligoglycosides par la création de nouvelles liaisons (enzymes débranchantes et glycosyl-transférases) (Bertoldo et Antranikian, 2001). Ces enzymes peuvent être divisées en quatre principaux groupes (figure 8) :

- **Les endoamylases**

Elles sont appelées les  $\alpha$ -amylases et sont également connues sous le nom d'enzymes de liquéfaction comme l' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1), elles hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -(1,4) à l'intérieur du polymère de l'amidon d'une façon aléatoire, ce qui permet la formation d'oligosaccharides linéaires, ramifiés, ou des dextrines. Les produits d'hydrolyse, ont la configuration  $\alpha$  au carbone C1 de l'unité glucose réductrice, d'où le nom  $\alpha$ -amylase.

Ces enzymes se trouvent chez une grande variété de microorganismes, appartenant aux deux domaines *Bacteria* et *Archaea* (Muralikrishna et Nirmala, 2005).

**• Les exoamylases**

Elles sont appelées également, les enzymes de saccharification dont les  $\beta$ -amylases, les glucoamylases et les  $\alpha$ -glucosidases, elles coupent soit les liaisons  $\alpha$ -(1,4) seulement, comme les  $\beta$ -amylases (EC 3.2.1.2) ou les deux liaisons  $\alpha$ -(1,4) et  $\alpha$ -(1,6) comme les glucoamylases (EC 3.2.1.3) et les  $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20).

Les exoamylases agissent sur les résidus glucose de l'amylose ou de l'amylopectine, à partir de l'extrémité réductrice. Elles produisent des oligosaccharides bien définis: le glucose par les glucoamylases et les  $\alpha$ -glucosidases, et le maltose ou des dextrines  $\beta$ -limit par les  $\beta$ -amylases. Les  $\beta$ -amylases et les glucoamylases favorisent la conversion de la conformation  $\alpha$  en  $\beta$ , contrairement aux  $\alpha$ -glucosidases (van der Maarel *et al.*, 2002).

**• Les enzymes débranchantes**

Elles hydrolysent exclusivement, les liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1,6) et comprennent les isoamylases (EC 3.2.1.68) et les pullulanases type I (EC 3.2.1.41).

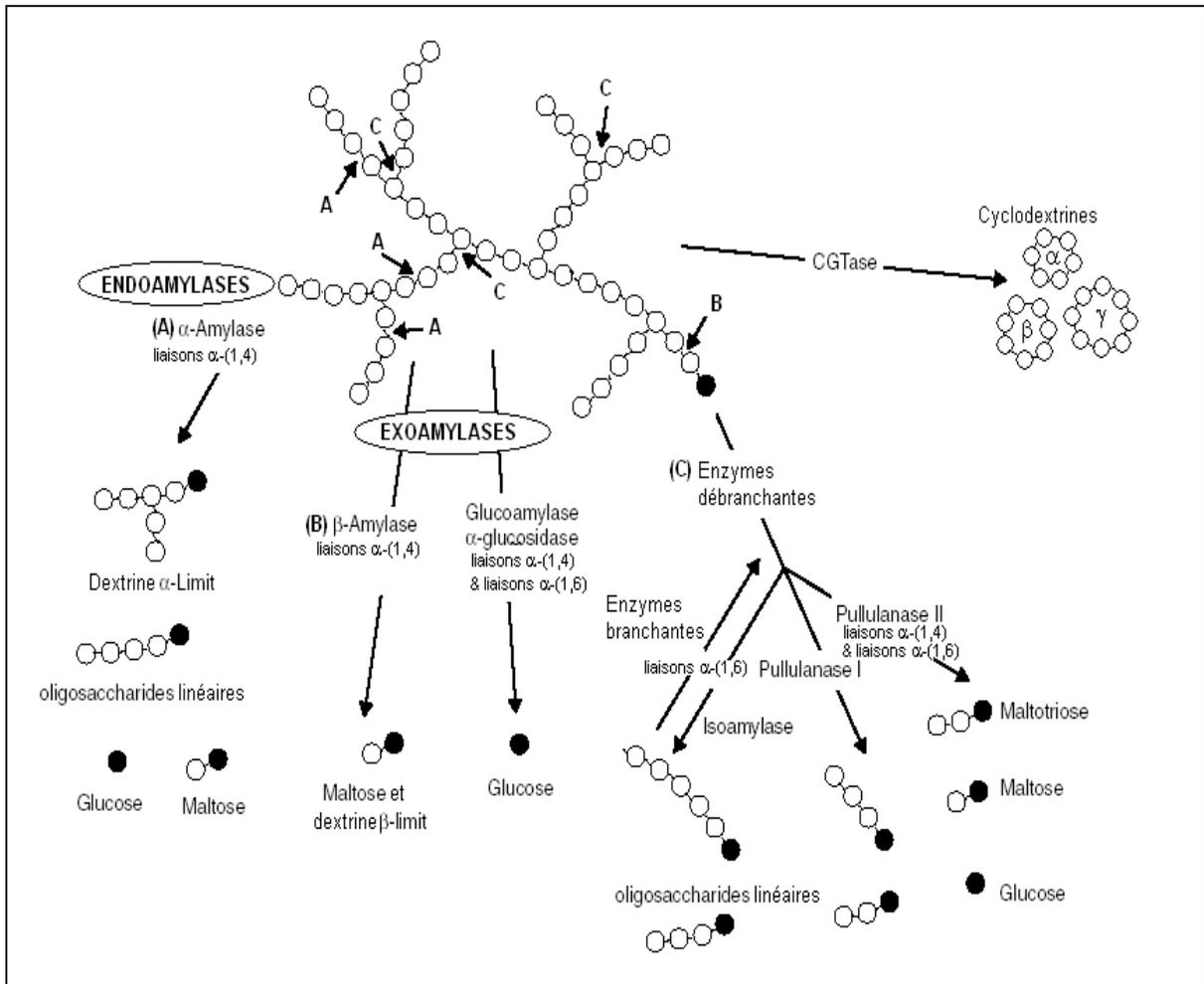
Les isoamylases et les pullulanases dégradent exclusivement l'amylopectine donnant de longs polysaccharides. Les pullulanases de type I et II ont également la capacité de catalyser l'hydrolyse de la chaîne latérale du pullulane qui est un polysaccharide contenant des unités répétées en  $\alpha$ -(1,6) maltotriose embranchées. En outre les pullulanases de type II, appelées également amylopullulanases, peuvent hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -(1,6) et  $\alpha$ -(1,4). Elles débranchent le pullulane et donnent comme produit final le maltotriose, mais elles attaquent les liaisons  $\alpha$ -(1,4) de l'amylose et de l'amylopectine.

Les amylopullulanases ont également deux sites actifs distincts et catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -(1,4) ou  $\alpha$ -(1,6) (van der Maarel *et al.*, 2002).

**• Les transférases**

Elles ont une faible activité hydrolytique. Les cyclodextrine glycosyltransférases (CGTases) sont uniques dans le sens qu'elles produisent des oligosaccharides circulaires liés en  $\alpha$ -(1,4) (les cyclodextrines) à partir de l'amidon. Les principaux produits sont des  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ -cyclodextrines avec 6, 7 ou 8 résidus, respectivement (van der Maarel *et al.*, 2002). Les amyломaltases ou 4- $\alpha$ -glucanotransférases, sont très similaires au CGTases, elles contribuent au transfert des résidus glycosidiques par la formation des liaisons  $\alpha$ -(1,4), mais elles forment des produits linéaires et non pas circulaires.

Les néopullulanases (EC3.2.1.135), les amylases maltogéniques (3.2.1.133) et les cyclodextrinases (EC 3.2.1.-) sont des enzymes qui dégradent complètement le pullulane, l'amidon et les cyclodextrines en maltose par hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1,4) et  $\alpha$ -(1,6) (Bertoldo et Antranikian, 2002).



**Figure 8** : Représentation schématique de l'action des enzymes amylolytiques sur l'amidon (Bertoldo et Antranikian, 2002).

## 2. Les $\alpha$ -amylases thermostables et leurs applications dans la transformation de l'amidon.

La découverte des enzymes extrêmement thermostables hydrolysant l'amidon ( $\alpha$ -amylases, pullulanases...) a sensiblement amélioré la bioconversion industrielle de l'amidon, c-à-d, la liquéfaction, la saccharification et l'isomérisation (figure9). Dû au manque de nouvelles enzymes thermostables qui sont actives et thermostables au dessus de 100°C et à des valeurs de pH acide, la bioconversion de l'amidon en glucose est réalisée par plusieurs étapes dans des conditions de températures et de pH différentes. Ce

procédé à multiples étapes (étape1: pH 6-6.5, 95 à105°C; étape 2: pH 4.5, 60°C) est accompagné par la formation de forte concentrations en sels indésirables, qui sont éliminées par des échangeurs d'ions très coûteux (Niehaus *et al.*, 1999).

En principe, une  $\alpha$ -amylase active à un bas pH peut réduire sensiblement le coût des ajustements du pH, en particulier durant la liquéfaction. En plus elle simplifie le procédé et réduit la formation des sous-produits à un pH élevé (Crabb *et Mitchinson*, 1997).

Les  $\alpha$ -amylases qui n'exigent pas l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  et qui sont actives à plus de 100°C et à des valeurs de pH acide sont très recherchées pour améliorer le processus de transformation de l'amidon.

Les pullulanases, les isoamylases, les  $\beta$ -amylases et les glucoamylases utilisées dans le traitement industriel de l'amidon proviennent des organismes mésophiles. Il y'a aussi un besoin à leurs équivalents enzymatiques thermostables à cause de l'augmentation de la température qui est nécessaire pour le processus de la saccharification. Cela inclut : une concentration élevée en substrat, diminution de la viscosité et l'abaissement du coût de pompage, les risques de contaminations bactériennes ou fongiques limités, l'augmentation dans la vitesse de la réaction et la diminution dans le temps opérationnel, la purification des enzymes moins coûteuses, un temps de demi vie plus long à cause de la thermostabilité des enzymes (Crabb *et Shetty*, 1999).

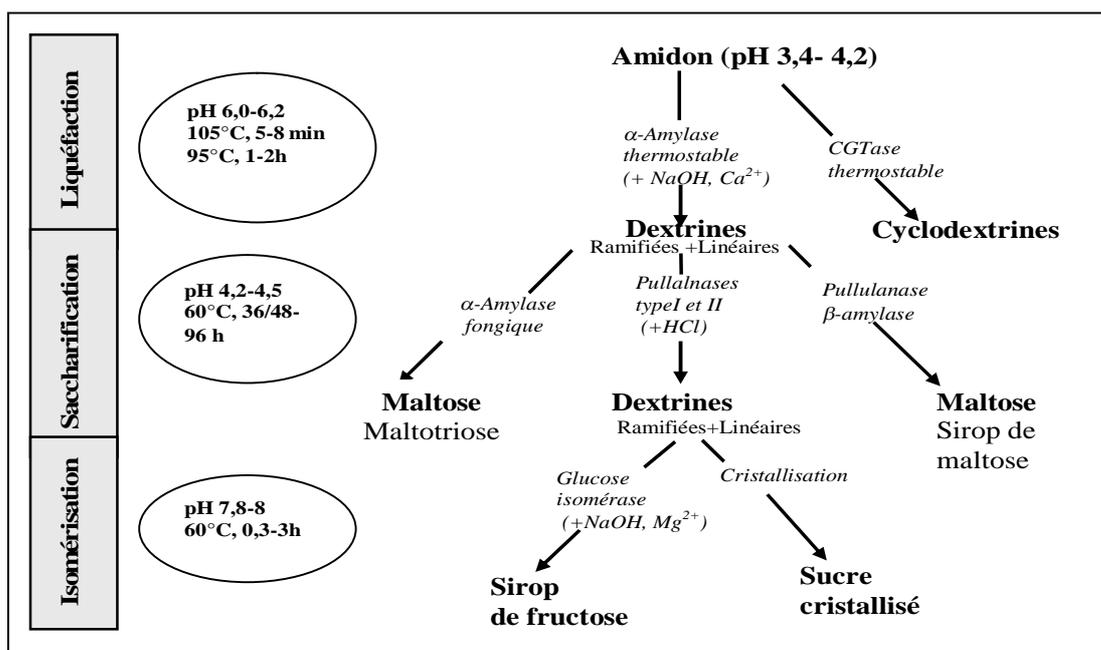


Figure 9: Processus de conversion de l'amidon (Crabb *et Shetty*, 1999)

Les enzymes des organismes thermophiles et hyperthermophiles sont considérées comme des candidats très intéressants pour les industries amidonnères et des recherches intensives ont été réalisées dans le but d'isoler des amylases thermostables et thermoactives de ces microorganismes. Un grand nombre d'enzymes sont présentes dans une large diversité de microorganismes appartenant aux deux domaines *Bacteria* et *Archaea*. Le clonage moléculaire des gènes correspondants et leur expression dans des hôtes hétérologues, par exemple, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, ont permis de résoudre les problèmes de l'expression insuffisante de l'hôte original (le plus souvent, les *Archaea*). Des  $\alpha$ -amylases fortement thermostables ont été mises en évidence, certaines, n'exigent même pas l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  pour leurs activité et stabilité bien qu'aucune ne dispose de la propriété d'être active à un bas pH (Vieille et Zeikus., 2001).

Les  $\alpha$ -amylases les plus thermoactives ont été caractérisées chez les *archaea* hyperthermophiles *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus profundus* et *Thermococcus hydrothermalis*. Les températures optimales d'activité de ces enzymes est comprise entre 80°C et 100°C. Le gène codant pour l' $\alpha$ -amylase extracellulaire de *P. furiosus* a été cloné et exprimé dans *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*. En plus, le gène de l' $\alpha$ -amylase intracellulaire de *P. furiosus* a été cloné et séquencé. L' $\alpha$ -amylase de *P. woesei* est une enzyme dimérique avec une sous unité de masse moléculaire de 50 kDa. L'enzyme (80% d'activité à 120°C) est inhibée par le  $\text{Zn}^{2+}$  et n'exige pas l'addition des ions calcium pour son activité et sa stabilité.

Des  $\alpha$ -amylases moins thermostables ont été isolées à partir des *archaea* *Thermococcus profundus*, *Pyrococcus* sp. KOD1 et des bactéries *Thermotoga maritima* et *Dictyoglomus thermophilum*. Les gènes codants de ces enzymes ont été exprimés dans *E. coli*. L'amylase de *T. maritima* exige la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  pour son activité comme celle de *Bacillus licheniformis* généralement utilisée pour la liquéfaction de l'amidon (Bertoldo et Antranikian, 2002).

Des données ont été recueillies sur les exoamylases des thermophile et des hyperthermophiles ( $\beta$  - amylases, glucoamylases, et  $\alpha$ -glucosidases) et certaines enzymes montrent un très bon potentiel pour l'étape de la saccharification.

Les pullulanases thermoactives et thermostables des *archaea* hyperthermophiles ont été détectées chez *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus mucosus*, *Staphylothermus marinus* et *Thermococcus aggregans* et leur température optimale est comprise entre 90°C et 105°C. Les pullulanases les plus thermoactives ont été purifiées à partir de *P. furiosus*,

*Thermococcus litoralis*, *T. hydrothermalis* et *Pyrococcus* souche ES4 (Brown et Kelly, 1993). Une CGTase avec une température optimale à 100°C, a été purifiée à partir d'une archaea *Thermococcus* sp. Cela est le premier rapport sur la présence d'une CGTase chez les archaea hyperthermophiles. L'enzyme de cette souche a été séquencée et clonée (Tachibana *et al.*, 1999)

**Tableau II:** Enzymes hydrolysant l'amidon des archaea et bactéries thermophiles et hyperthermophiles (Bertoldo et Antranikian, 2002).

Enzymes	Organismes	Propriétés des enzymes		
		Température optimale (°C)	pH optimal	PM (kDa)
α-Amylase	<i>Desulfurococcus mucosus</i> (85)	100	5.5	–
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (100)	100	6.5–7.5	129
		100	7.0	68
	<i>Pyrococcus</i> sp. KOD1	90	6.5	49.5
	<i>Pyrococcus woesei</i> (100)	100	5.5	68
	<i>Pyrodictium abyssi</i> (98)	100	5.0	–
	<i>Staphylothermus marinus</i> (90)	100	5.0	–
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> (88)	–	–	240
	<i>Thermococcus celer</i> (85)	90	5.5	–
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i> (80)	75–85	5.0–5.5	49
	<i>Thermococcus profundus</i> DT5432 (80)	80	5.5	42
	<i>Thermococcus profundus</i> (80)	80	4.0–5.0	42
	<i>Thermococcus aggregans</i> (85)	95	6.5	–
	<i>Dyctyoglossus thermophilum</i> Rt46B.1(73)	90	5.5	75
	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8 (90)	85–90	7.0	61
Pullulanase typeI	<i>Fervidobacterium pennavorans</i> Ven5 (75)	80	6	190 (93)
	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8(90)	90	6.0	93 (s/unité)
	<i>Thermus caldophilus</i> GK24 (75)	75	5.5	65
	<i>Bacillus flavocaldarius</i> (76)	75–85	6.3	65
Pullulanase typeII	<i>Desulfurococcus mucosus</i> (88)	85	5.0	74
	<i>Pyrococcus woesei</i> (100)	100	6.0	90
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (100)	100	6.0	90
	<i>Pyrodictium abyssi</i> (98)	100	9.0	–
	<i>Thermococcus celer</i> (85)	90	5.5	–
	<i>Thermococcus litoralis</i> (90)	98	5.5	119
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i> (80)	95	5.5	128
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> (85)	90	5.5	?
	<i>Thermotoga maritima</i> (80)	90	7.5	58
Pullulan hydrolase type III	<i>Thermococcus aggregans</i> (85)	100	6.5	83
Enzyme branchante	<i>Rodothermus obamensis</i> (80)	65	6.0	72
	<i>Thermoplasma acidophilum</i> (60)	90	6.5	141
Glucoamylase	<i>Picrophilus oshimae</i> (60)	90	2.0	140
	<i>Picrophilus torridus</i> (60)	90	2.0	133
	<i>Thermococcus</i> sp. (75)	100	7.0	83
CGTase	<i>Anaerobranca gottschalkii</i> (60)	65	8.0	67
	<i>Thermococcus souche</i> AN1 (80)	130	–	63
α-Glucosidase	<i>Thermococcus hydrothermalis</i> (80)	120	5.5	57
	<i>Pyrococcus furiosus</i> (100)	–	5.0–6.0	125
	<i>Pyrococcus woesei</i> (100)	100	5.0–5.5	90
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> (88)	>120	4.5	80
	<i>Sulfolobus shibatae</i> (88)	–	5.5	313
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> (85)	75	5.0–5.5	?

### 3. Architecture des domaines des $\alpha$ -amylases

Les enzymes amylolytiques sont des protéines à multidomaines possédant dans leur grande majorité trois grands domaines, mais elles partagent un domaine catalytique commun ayant une structure de type  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel (appelée également Tim-barrel), elle est composée de huit feuillets  $\beta$  parallèles entourés par huit hélices parallèles, c'est le domaine A (MacGregor *et al.*, 2001).

Le domaine catalytique A est le domaine le plus conservé dans la famille des  $\alpha$ -amylases (Reddy *et al.*, 2003).

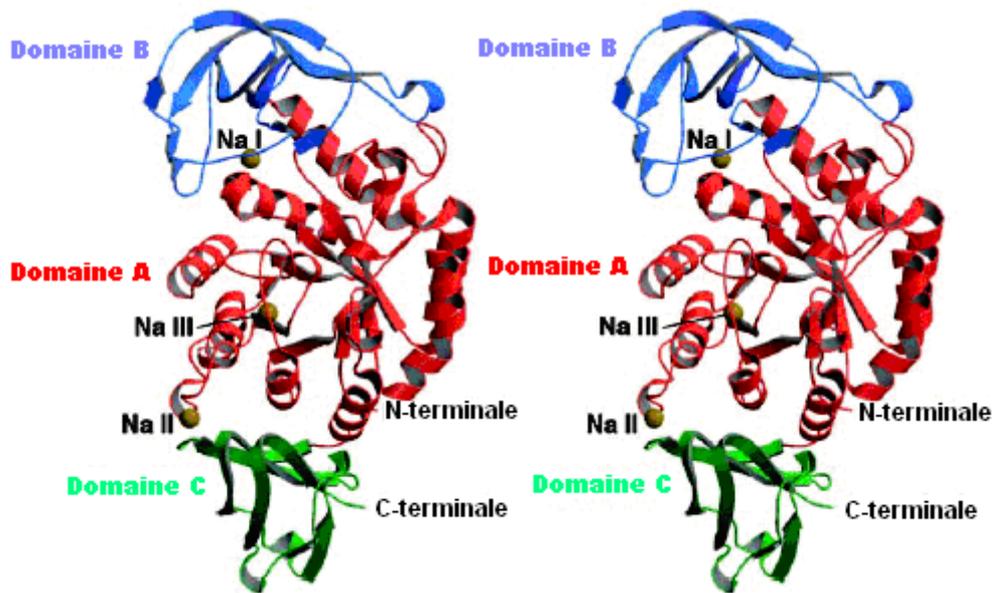
Une large boucle entre le troisième feuillet et la troisième hélice forme un domaine séparé appelé le domaine B. Cette boucle a une structure irrégulière et varie d'une enzyme à une autre. Ce domaine assure l'intégrité structurale du site actif.

Dans la plupart des  $\alpha$ -amylases, le domaine A se trouve à l'extrémité N-terminale de la protéine. Cependant, certains enzymes de cette famille ont un domaine distinct, le domaine N, qui précède le domaine catalytique. Le rôle de ce domaine est incertain. (Katsuya *et al.*, 1998).

La majorité des enzymes de cette famille ont un autre domaine, le domaine C, qui suit la structure  $(\beta/\alpha)$ -barrel catalytique. Ce domaine se compose de feuillets  $\beta$  et on pense qu'il stabilise le domaine catalytique en protégeant les résidus hydrophobes du domaine A des solvants. Il a été également, suggéré que le domaine C pourrait faciliter la fixation du substrat. Cependant certaines amylomaltsases semblent être dépourvues de ce domaine (MacGregor *et al.*, 2001).

Les cyclodextrine glucanotransférases de *Bacillus stearothermophilus* ont des domaines supplémentaires après le domaine C: les domaines D et E.

Le domaine E semble être important pour fixer les grains d'amidon et fournir une extension pour le site actif dans les cyclodextrine-glucanotransférases. Cependant aucun rôle n'a été attribué au domaine D (Lawson *et al.*, 1994).



**Figure 10** : Vue stéréo de la structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus* sp. Souche KSM-K38 (AmyK38) (Nonaka *et al.*, 2003)

#### 4. Mécanisme d'action des $\alpha$ -amylases

##### 4.1. Mécanisme catalytique et fixation du substrat au site actif

Dans la famille des  $\alpha$ -amylases, les enzymes sont supposées avoir un mécanisme d'action identique, ainsi les résidus des acides aminés catalytiques sont considérés communs à toutes ces enzymes (MacGregor *et al.*, 2001).

Le modèle moléculaire servant de référence pour la numérotation des acides aminés impliqués dans le mécanisme général de la catalyse est celui de l'amylase d'*Aspergillus oryzae* ("Taka-amylases A" ou TAA) élaboré par Matsuura *et al.* (1984). Cette enzyme possède un mécanisme catalytique de type acide-base.

Lorsque le substrat est transformé en produit (figure 11), la configuration anomérique est retenue, c-à-d., les enzymes agissent sur les liaisons  $\alpha$  des glucanes et fournissent des produits avec la configuration  $\alpha$ . La réaction est réalisée par un mécanisme en double déplacement (Reddy *et al.*, 2003):

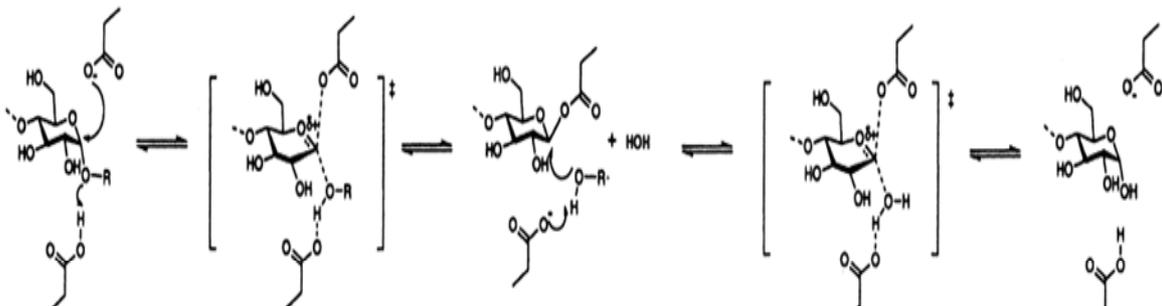
- Pendant le premier déplacement, un groupe acide de l'enzyme agit en protonant l'oxygène de la liaison glycosidique, provoquant la coupure de la liaison C1-O et la formation d'un ion (oxocarbenium) à l'état de transition.

Un groupe acide nucléophile de la protéine attaque le centre anomérique du sucre et donne un intermédiaire le  $\beta$ -glycosyl enzyme, tandis que l'aglycone du substrat quitte le site actif (MacGregor *et al.*, 2001).

• Lors du second déplacement de l'hydrolyse, le processus décrit est essentiellement inversé. une molécule d'eau (activée par la forme carboxylate du donneur de proton précédent) attaque le centre anomérique. Cette deuxième étape de la réaction engendre un état de transition comme auparavant, pour donner un produit avec la configuration anomérique  $\alpha$  et reprotonation du groupe acide original.

La transglycosylation peut se produire si le groupe activateur dans le second déplacement de la réaction est un hydroxyle libre du sucre au lieu d'une molécule d'eau.

Le résidu d'acide glutamique est supposé être le donneur de protons, tandis que le premier des deux acides aspartique conservés pourrait agir comme un nucléophile. Le rôle du second acide aspartique est incertain, mais on pense qu'il est impliqué dans la stabilisation de l'ion oxocarbenium à l'état de transition et il maintient également l'acide glutamique dans un état idéal pour la protonation (MacGregor *et al.*, 2001).



**Figure 11:** Les étapes catalytiques de l'hydrolyse de la liaison glycosidique par les enzymes de la famille des  $\alpha$ -amylases (MacGregor *et al.*, 2001).

#### 4.2. Structure du site actif

Le site actif des  $\alpha$ -amylases est situé entre l'extrémité carboxylique du domaine A et le domaine B.

Le site actif des  $\alpha$ -amylases est localisé dans la structure du  $(\beta/\alpha)_8$ barrel, où les résidus Asp 206, Glu 230, Asp 297 jouent un rôle catalytique tandis que His 122 et His 296 interviendraient dans la fixation du substrat (Muralikrishna et Nirmala, 2005)

Le site actif comprend deux parties:

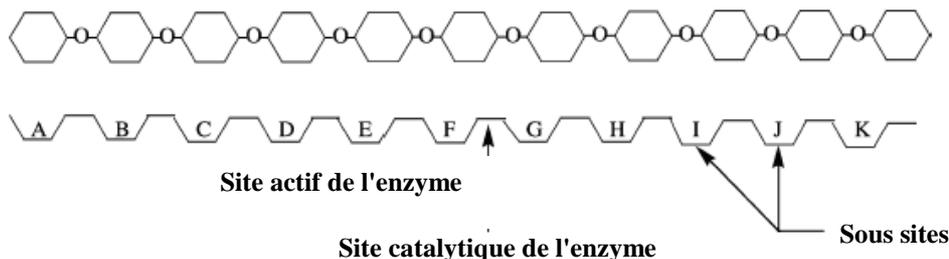
a- le site de fixation du substrat, composé d'un nombre de sous sites, chaque sous site est capable d'interagir avec une unité glucose du substrat.

b- le site catalytique formé de 2-3 groupes qui sont des donneurs de protons (électrophiles) et accepteurs de protons (nucléophiles) (MacGregor *et al.*, 2001; Muralikrishna et Nirmala, 2005)

La figure 12 montre un modèle d'organisation du site actif et des sous sites capables de fixer le glucose.

Le site actif des  $\alpha$ -amylases est composé de 5 à 11 sous sites (A-K). Le site catalytique est situé entre les sous sites F et G. L'extrémité réductrice de la chaîne  $\alpha$ -glucoses est situé dans le sous site K. Chaque sous site interagit avec une unité glucose du substrat. Le site catalytique de l'enzyme est localisé entre le sous sites F et G. Les sous sites F et G seront occupés par Asp-206 ou Glu-230 ou Asp-297 (Figure 12).

Les spécificités des enzymes amylolytiques pourraient s'expliquer par le nombre de leurs sous sites, par la nature des acides aminés formant ces sous sites et par la localisation des acides aminés catalytique au niveau de ces sous sites (Muralikrishna et Nirmala, 2005).



**Figure 12:** Schéma représentatif du site actif et des sous sites des amylases (Muralikrishna et Nirmala, 2005).

## 5. Mécanismes de la thermostabilité

### 5.1. Composition en acides aminés

Bien que beaucoup de formules sur la composition des protéines thermostables ont été proposées, elles fournissent peu de réponses sur la thermoadaptation des acides aminés. Les protéines thermostables se composent des mêmes 20 acides aminés qui existent chez les mésophiles. Les résultats expérimentaux ont montré que les propriétés des chaînes latérales des acides aminés sont déterminantes pour la thermostabilité des protéines (Sadeghi *et al.*, 2006).

- **Les acides aminés apolaires**

La teneur en acides aminés hydrophobes est plus élevée dans les protéines des hyperthermophiles que les protéines des mésophiles et ces résidus peuvent augmenter la rigidité et l'hydrophobicité des protéines (Chakravarty et Varadarajan, 2000).

Les protéines des hyperthermophiles se caractérisent par une teneur élevée en alanine, cela reflète le fait que l'alanine est le meilleur résidu favorisant la formation des hélices (Vieille *et al.*, 2001).

Bien que les hélices des protéines des hyperthermophiles contiennent moins de résidus  $\beta$ -branchés (Valine : Val, Isoleucine : Ile, et Thréonine : Thr) que les protéines des mésophiles (ces résidus sont connus pour déstabiliser les hélices  $\alpha$ ), la plupart des analyses systématiques montrent que les protéines thermophiles ont la plus grande fréquence d'isoleucine et valine en comparaison avec les mésophiles (Chakravarty et Varadarajan, 2000; Kumar *et al.*, 2000). Les résidus Alanine, Valine, Leucine, et Isoleucine contribueraient aux interactions hydrophobes qui sont une force importante pour maintenir la stabilité conformationnelle à l'intérieure de la protéine (Vieille *et al.*, 2001).

La proline, avec son noyau pyrrolidine, possède la plus basse entropie, il est connu pour sa contribution à la conformation rigide de la protéine. Des études ont montré que les protéines thermostables possèdent la fréquence la plus élevée en proline (Sadeghi *et al.*, 2006).

La méthionine (Met) est un acide aminé thermolabile dû à sa tendance de subir l'oxydation à une température élevée. Certaines analyses systématiques ont rapporté que les protéines thermostables ont une plus basse fréquence en Met comparées aux protéines mésophiles (Kumar *et al.*, 2000)

- **Les acides aminés polaires non chargés**

Plusieurs études rapportent que la teneur en résidus polaires non chargés particulièrement sérine, thréonine et glutamine est beaucoup plus faible dans les protéines des thermophiles que leurs homologues mésophiles.

Asparagine et glutamine sont des acides aminés thermolabiles, ils ont tendance à subir une désamination à des hautes températures. Des études ont révélé une résistance des protéines des hyperthermophiles à la désamination par la méthylation de ces résidus.

La cystéine (Cys) est également connue comme un acide aminé thermolabile dû à sa tendance de subir une oxydation à une température élevée par conséquent, la Cys a une faible fréquence dans les protéines des hyperthermophiles (Zhou *et al.*, 2007).

- **Les acides aminés polaires chargés**

Les résidus chargés sont plus présents dans les protéines des hyperthermophiles que dans les protéines des mésophiles, à l'exception de l'histidine qui a une plus faible fréquence dans les protéines des hyperthermophiles.

Les résidus chargés peuvent être impliqués dans un grand nombre de paires ioniques qui sont importantes pour la stabilité de la protéine (Chakravarty et Varadarajan, 2000)

La caractéristique la plus étonnante des protéines thermostables, en comparaison avec les protéines des mésophiles, est la diminution dans le nombre de résidus lysine qui sont principalement remplacés par des résidus d'arginine (Arg) et d'acide glutamique (Glu). La fréquence élevée en Arg est une propriété des protéines des hyperthermophiles. L'Arg a une grande tendance à participer dans les interactions des paires ioniques, ainsi l'Arg est mieux adaptée à des hautes température que la lysine (Chakravarty et Varadarajan, 2000 ; Kumar *et al.*, 2000).

Les protéines des hyperthermophiles montrent une fréquence élevée en Glu cela peut être expliqué par le fait que le Glu forme des ponts salins dans les protéines thermostables. Par conséquent, les rapports élevés des acides aminés chargés, en particulier à la surface des protéines, augmentent les interactions ioniques et augmentent en l'occurrence les ponts salins et les paires ioniques qui renforcent la stabilité thermique des protéines (Zhou *et al.*, 2007).

- **Les acides aminés aromatiques**

Les protéines des hyperthermophiles montrent un grand nombre d'interactions aromatiques comparées à leurs homologues mésophiles. Elles forment des régions très rigides à la surface des protéines et elles se trouvent aussi près du site actif des enzymes des hyperthermophiles.

Les protéines des hyperthermophiles contiennent plus de résidus aromatiques que les protéines mésophiles, en particulier la tyrosine, alors que le tryptophane se trouve avec une proportion semblable dans les deux types de protéines (Kumar *et al.*, 2000).

## 5.2. Interactions contribuant à la stabilité des thermozyms

### 5.2.1. Les liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogènes (H) s'effectuent non seulement à l'intérieur et entre les chaînes polypeptidiques mais également avec le milieu aqueux environnant. Le gain d'énergie par la formation d'une seule liaison H dans la molécule, pour la stabilisation est approximativement de 1,3 kcal/mol (Vieille et Zeikus, 2001 ; Suvd *et al.* 2001 ; Eijsink *et al.*, 1992).

Vogt *et al.* (1997) ont montré que la thermostabilité des protéines est corrélée avec le nombre de liaisons hydrogène et la surface partielle polaire qui résulte de l'augmentation de la densité des liaisons hydrogène avec l'eau environnant.

### 5.2.2. Les interactions électrostatiques

Les interactions typiques charge-charge entre les résidus chargés forment des ponts salins. L'augmentation des résidus chargés suggère qu'il y a plus de ponts salins dans les protéines des hyperthermophiles que leurs homologues des mésophiles. Les interactions électrostatiques optimisées par l'augmentation du nombre des ponts salins sont des contributeurs nets pour augmenter la thermotolérance des protéines dans les microorganismes hyperthermophiles (Li *et al.*, 2005 ; Alsop *et al.*, 2003 ; Hakamada *et al.*, 2001)

### 5.2.3. Les liaisons hydrophobes

L'hydrophobicité d'une molécule protéique est exprimée par le rapport entre la surface apolaire cachée et la surface totale apolaire de la molécule.

Les forces hydrophobes sont parmi les principaux contributeurs au repliement moléculaire et la thermostabilité.

Il y'a une corrélation directe entre l'hydrophobicité totale de la protéine et sa thermostabilité. Une augmentation moyenne de la stabilité a été estimée à  $1,3 \pm 0,5$  et elle est atteinte par chaque groupe méthylique additionnel caché dans la molécule, durant le repliement de la protéine (Pace, 1992).

### 5.2.4. Les ponts disulfures

Les ponts disulfures stabilisent la plupart des protéines par l'effet entropique, par la diminution de l'entropie de l'état du dépliement de la protéine. L'effet stabilisateur des

ponts disulfures est confirmé par de nombreuses études de mutagenèse impliquant l'introduction des ponts disulfures dans les enzymes (Vieille et Zeikus, 2001 ; Li *et al.*, 2005).

### 5.2.5. Les liaisons métalliques

Les ions métalliques ont été pour longtemps, connus pour stabiliser et activer des enzymes. Une étude sur la stabilité de la xylose isomérase de *B.licheniformis* (BLXI) en présence et en absence des ions métalliques a montré que la majorité des forces stabilisantes sont associées à la présence des métaux dans l'holoenzyme (Vieille *et al.*, 2001 ; Radfar *et al.*, 2000).

### 5.3. Propriétés conformationnelles

- **Plus rigide, moins flexible**

Les thermozymes sont généralement plus rigides que les mésoenzymes. Cette rigidité est très importante pour préserver leur structure catalytiquement active à une température élevée et protéger la protéine contre le dépliement (Li *et al.*, 2005).

- **Plus compactes, peu de cavités**

Une augmentation dans la compacité moléculaire peut augmenter la stabilité thermique. La compacité est le résultat du raccourcissement d'une ou plusieurs boucles; augmentation du nombre d'atomes cachés à l'intérieur de la molécule; renforcement par les chaînes latérales à l'intérieur; élimination des cavités inutiles (Li *et al.*, 2005).

- **Réduction de l'entropie du dépliement**

Le dépliement thermique des protéines à des températures élevées est provoqué par une forte augmentation de l'entropie. Les protéines à structure tridimensionnelle connue peuvent être stabilisées par la diminution de leur entropie du dépliement.

Ainsi, les mutations Gly  $\rightarrow$  Xaa ou Xaa  $\rightarrow$  Pro (Xaa = un acide aminé) devraient diminuer l'entropie de l'état du dépliement et stabilise la protéine (Vieille *et al.*, 2001).

- **Stabilité des hélices  $\alpha$**

La stabilité de l'hélice  $\alpha$  est due à la substitution des résidus déstabilisant les hélice  $\alpha$  comme les acides aminés  $\beta$ -branchés (Val, Ile, Thr). Facchiano *et al.* (1998) ont comparé les structures de 13 protéines thermophiles avec leurs homologues mésophiles et ils ont constaté que le seul facteur significatif qui caractérise les protéines thermostables est le manque d'acides aminés  $\beta$ -branchés (Val, Ile, Thr) dans les hélices.

#### **5.4. Facteurs extrinsèques**

Plusieurs facteurs extrinsèques interviennent dans la thermostabilité des enzymes hyperthermophiles :

- **Stabilisation par des sels:** Les sels inorganiques stabilisent des protéines par deux voies différentes :

- par un effet spécifique où l'ion métallique interagit avec la protéine
- par un effet général des sels, qui affecte principalement l'activité de l'eau.

- **Effets de la pression:** Puisque la plupart des environnements à haute température sont également des environnements à haute pression, les composants macromoléculaires des cellules hyperthermophiles doivent s'adapter à la pression élevée. Ainsi les protéines stabilisées essentiellement par des interactions hydrophobes sont stables à haute pression.

- **Stabilisation par le substrat:** Les substrats sont connus pour stabiliser des enzymes et plus particulièrement par la stabilisation de leur site actif. Cette observation est également valide pour les hyperthermophiles (Vieille et Zeikus, 2001).

*Matériel  
et Méthodes*

## **1. Prélèvements**

Des échantillons d'eau ont été prélevés à partir de trois sites hydrothermaux à des profondeurs variables: Hammam El-Bibane (commune El-Mhir) dans la wilaya de Bordj Bouarreridj, Hammam Sillal (commune Tifra) et Hammam Kiria (commune Assif El-Hammam) dans la wilaya de Bejaia.

Le transport des échantillons au laboratoire a été effectué dans des flacons en verre stériles à température ambiante.

La température de l'eau a été mesurée sur place à l'aide d'un thermomètre et la valeur du pH a été déterminée au laboratoire.

## **2. Isolement et caractérisation des souches**

### **2.1. Isolement**

#### **2.1.1. Préparation des milieux d'enrichissement**

Le milieu d'enrichissement utilisé est un milieu minéral employé pour l'isolement de *Thermococcus guaymasensis sp. nov.* et *Thermococcus aggregans sp. nov.*, (Canganella et Jones, 1994). Sa composition est citée dans l'annexe 1.

Dans le but d'isoler des *Archaea* hyperthermophiles, des flacons de (125ml) fermés par des bouchons en bakélite sont remplis à 40% de leur volume. Le milieu est stérilisé par tyndallisation à 100°C pendant 3h, trois fois successives à un intervalle de temps de 12h.

L'anaérobiose du milieu est assurée par un barbotage de CO<sub>2</sub> à l'aide d'aiguilles stériles dont l'une est reliée à un filtre de 0,22µm qui permet la stérilisation du gaz.

(Balch *et al.*, 1979).

#### **2.1.2. Ensemencement**

L'ensemencement du milieu d'enrichissement est effectué par inoculation avec les échantillons d'eau à raison de 10%(v/v) du volume total.

Après l'ensemencement, les flacons sont incubés à une température de 80°C pendant 12h (Godfroy *et al.*, 1997).

### **2.1.3. Isolement**

Les cultures positives obtenues sur le milieu d'enrichissement liquides sont transférées sur un milieu d'isolement solide.

Pour la préparation du milieu d'isolement, 8 g de Gelrite (Sigma-Aldrich) a été dissoute dans 1 litre du milieu d'enrichissement.

Après la dissolution complète de la Gelrite, le milieu est chauffé jusqu'à ébullition et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Le milieu est ensuite réparti rapidement sur des boîtes de Petri, après solidification à température ambiante, on a effectué des ensemencements en double couche et en masse.

Les boîtes sont incubées à une température de 80°C pendant 24 à 48h.

(Lepage *et al.*, 2004)

La présence des colonies est contrôlée par observation sous une loupe binoculaire. Les colonies isolées sont transférées sur le milieu d'enrichissement liquide. Cette étape de purification est répétée trois fois de suite pour avoir des isolats purs. Les isolats purifiés sont conservés à 4°C.

## **2.2. Caractérisation des souches isolées**

### **2.2.1. Propriétés culturelles et morphologiques**

Les colonies sont observées sous une loupe binoculaire pour déterminer leurs propriétés culturelles.

Les propriétés morphologiques sont déterminées après observation sous le microscope optique des cellules à l'état frais et après coloration de Gram.

### **2.2.2. Propriétés biochimiques**

#### **a) Utilisation des substrats carbonés**

##### **\*Utilisation des sucres**

La capacité d'utilisation de diverses sources de carbone a été examinée. Des flacons de 20 ml sont remplis avec le milieu de culture dépourvu de toute source de carbone à raison de 5 ml. Après tyndallisation et barbotage au CO<sub>2</sub>, chaque flacon est additionné d'un sucre à une concentration de 5g/L.

Les sucres testés sont des oses simples : glucose, sorbitol, mannitol, galactose, arabinose lévulose, xylose, mannitol ; des disaccharides : lactose, mélibiose, tréhalose, des trisaccharides : raffinose et des polysaccharides: dextrine, amidon (Grote *et al.*, 1999).

L'ensemencement du milieu est réalisé avec 10% (V/V) d'inoculum de  $10^6$  cellules/ml et l'incubation à 80°C pendant 12 heures. L'utilisation des sucres entraîne une acidification du milieu qui est révélée par un virage au jaune du rouge de chlorophénol.

#### **\*/Utilisation des acides aminés**

De la même façon que pour la fermentation des sucres, le milieu d'enrichissement exempt de toute source de carbone est additionné d'un seul acide aminé comme seule source de carbone et d'azote à une concentration de 5 g /l.

Après ensemencement avec 10% de l'inoculum ( $10^6$  cellules/ml) les milieux sont incubés à 80°C pendant 12 heures (Grote *et al.*, 1999).

Les acides aminés testés sont : phénylalanine, acide aspartique, asparagine, alanine et l'arginine. L'utilisation des acides aminés se manifeste par l'apparition d'un trouble de la culture.

#### **\*/Autres substrats**

D'autres substrats carbonés sont testés dans les mêmes conditions comme le tryptone, la peptone l'extrait de levure et la gélatine (Grote *et al.*, 1999).

#### **b) Utilisation des substances minérales**

Le milieu d'enrichissement est reparti dans des flacons à raison de 5 ml. Après tyndallisation, Chaque flacon est additionné des substances minérales suivantes :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_8$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ .  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à raison de 0,1% (m/v), (Erauso *et al.*, 1993).

Un flacon du milieu d'enrichissement sans soufre est testé pour son influence sur la croissance (Godfroy *et al.*, 1996).

La croissance des souches est vérifiée par dénombrement sur cellule de Malassez après incubation à 80°C pendant 12heures.

### **2.2.3. Propriétés physiologiques :**

#### **a) Température**

Afin de déterminer la température optimale de croissance des souches isolées, le milieu d'enrichissement est réparti dans des flacons à raison de 5 ml et ensemencé à 10% (V/V) d'inoculum et incubé à des températures respectives de 60°C jusqu'à 105°C pendant 12 heures. Le dénombrement des cellules est effectué sur une lame de Malssez sous microscope optique (Cambon-Bonavita *et al.*, 2003).

#### **b) pH**

Le milieu est préparé dans les mêmes conditions, mais cette fois ci, on fait varier le pH de 6 à 9.

Le pH optimum est déterminé par dénombrement sur lame de Malassez, après incubation à 80°C pendant 12 heures (Cambon-Bonavita *et al.*, 2003).

#### **c) Sensibilité à l'oxygène**

Les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions mais en présence de l'oxygène c'est-à-dire sans barbotage au CO<sub>2</sub> et sans ajouter la cystéine-HCl et le Na<sub>2</sub>S, puis elles sont incubées à 80°C pendant 12 heures.

La sensibilité à l'oxygène se traduit par absence de croissance et qui est vérifiée par observation microscopique (Erauso *et al.*, 1993).

#### **d) Sensibilité aux antibiotiques**

Le milieu d'enrichissement est réparti dans des flacons à raison de 5 ml, dans chaque flacon on introduit un antibiotique à une concentration de 150 µg/ml puis on incube à 80°C pendant 12 heures. Les antibiotiques utilisés sont : la colistine, la cefalexime, l'amoxicilline, l'oxacilline, l'amikacine, la clindamycine, la tétracycline, l'ampicilline et la rifampicine. La sensibilité aux antibiotiques se traduit par absence de croissance et qui est vérifiée par observation sous microscope (González *et al.*, 1999).

### **3. Cinétique de croissance et activité enzymatique**

#### **3.1. Préparation des milieux de cultures**

Le milieu d'enrichissement est réparti dans des flacons de 125ml à raison de 40% (V/V), l'anaérobiose est assurée par barbotage au CO<sub>2</sub>, le milieu est tyndallisé à 100°C pendant 3heures, 3 fois successives à un intervalle de temps de 12heures.

Dans chaque flacon contenant le milieu on ensemence la souche isolée et purifiée à raison de 10% d'inoculum (10<sup>6</sup> cellules/ml) en ajoutant de l'amidon à raison de 0,2%, et l'incubation est faite à 80°C. Le dénombrement des cellules est effectué sur cellule de Malassez, chaque deux heures d'incubation, dans un intervalle de temps de 0 à 24heures.

#### **3.2. Extraction de l'enzyme**

Les milieux de cultures sont filtrés sur papier Whatman pour éliminer le soufre puis centrifugés à 8000g/30min, le surnageant obtenu est récupéré pour subir une deuxième centrifugation à 12000g/30min. Les tests d'activités enzymatiques sont effectués sur le surnageant.

### **4. Essais d'extraction et de purification d'une amylase thermostable**

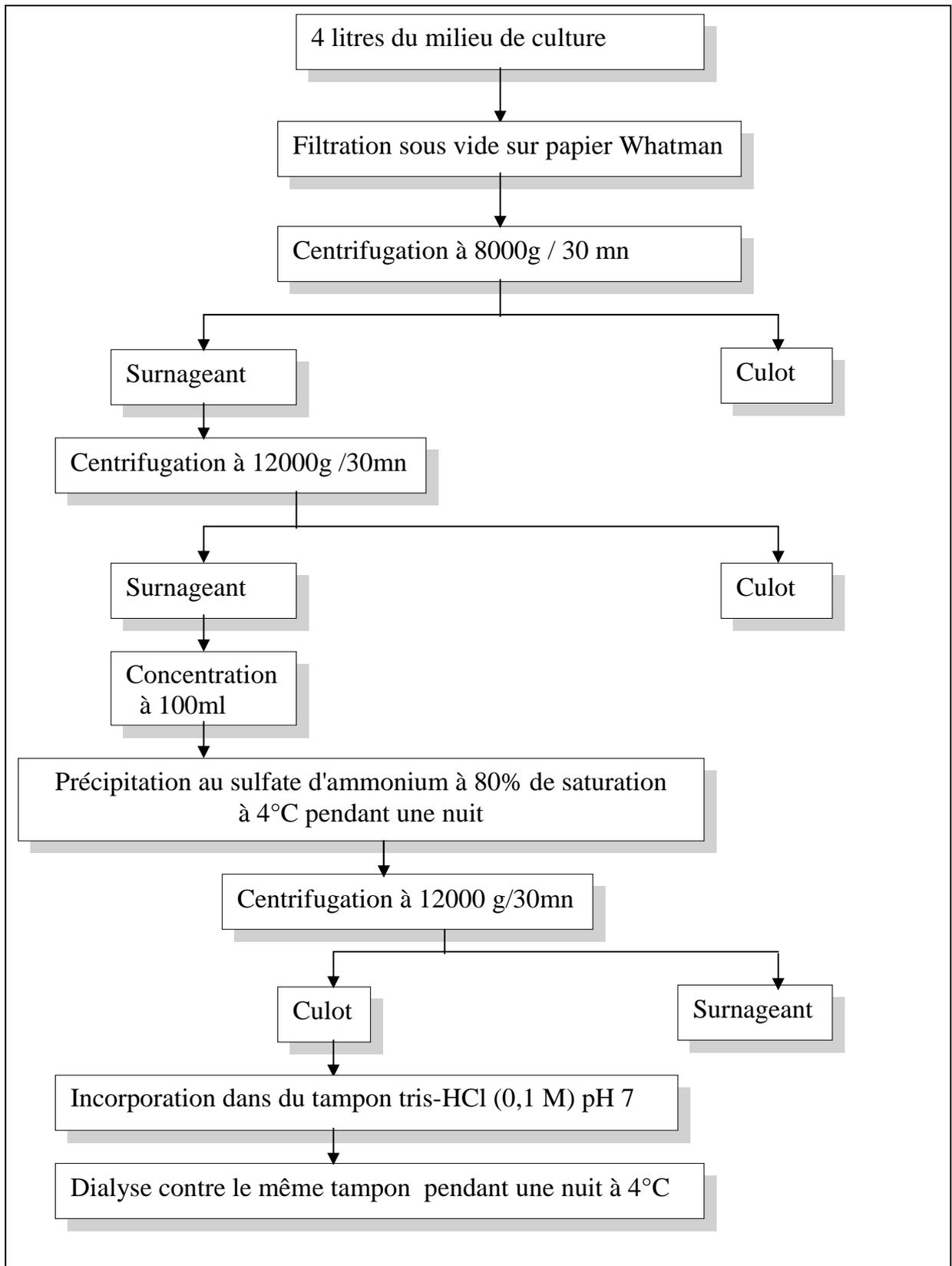
#### **4.1. Production de l'enzyme**

La production d'enzymes est réalisée avec 4 litres de milieu de culture répartis dans des flacons de 500ml à raison de 40% (200 ml dans chaque flacon). Ce milieu est additionné de 0,2% d'amidon soluble pour induire et augmenter la production des amylases.

- A partir d'une culture ayant une charge microbienne de 10<sup>6</sup> cellules/ml, des flacons (contenance C:100ml, volume utile VU:40ml) sontensemencés à raison de 10%(V/V)
- Après incubation, ces flacons sont utilisés pour ensemenecer des flacons (C:250ml, VU:100ml).
- A partir de ces derniers, des flacons (C:500ml, VU:200ml) sontensemencés à raison de 10% (V/V) de manière à avoir un volume total de 4litres. Ces flacons sont incubés à une température de 85°C jusqu'à l'apparition d'un trouble soit à un temps supérieur à 12 heures.

## 4.2. Extraction de l'amylase

Nous avons adopté le protocole réalisé par (Kwak *et al.*, 1998) au quel nous avons apporté quelques modifications.



**Figure13:** Etapes d'extraction d'une amylase thermostable selon le protocole modifié de Kwak *et al.* , 1998

#### **4.2.1. Méthodes de séparation**

Les 4 litres du milieu de culture sont filtrés sur papier Whatman et sur un filtre de verre fritté relié à une pompe (Phywe vakum pompe DS 2/1). Cette filtration a pour but d'éliminer le soufre. Le filtrat obtenu est centrifugé à 8000g/30minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type Sigma2-16K.L Afin d'éliminer le soufre résiduel. Le surnageant obtenu subit une deuxième centrifugation à 12000g/30min pour sédimenter le culot cellulaire ainsi que certains substances protéiques associées aux cellules.

Le surnageant obtenu est concentré à une température de 45°C à l'aide d'un Rotavapor de type BUCHI Waterbath B-480 jusqu'à avoir un volume de 100ml du surnageant.

#### **4.2.2 Précipitation au sulfate d'ammonium**

La précipitation des protéines comme première étape d'une purification est obtenue par addition de sels minéraux sous forme de sulfate d'ammonium.

L'addition du sulfate d'ammonium à une solution protéique provoque l'insolubilisation des protéines. Chaque protéine pourra ainsi précipiter dans un certain intervalle de concentration en sels (Kamoun, 1987).

A des volumes du surnageant concentré (10 ml) on ajoute 3,13g ; 3,9g ; 4,72g ; 5,61g ; 6,10g de sulfate d'ammonium pour atteindre des pourcentages de saturation allant de 50 à 90 %.

Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit à 4°C, après centrifugation à 12000g/30min le précipité est remis dans 10ml du tampon Tris-HCl (0,1 M) à pH 7.

#### **4.2.3. Dialyse**

La dialyse est une technique qui permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective de franchir les pores d'une membrane (Kamoun, 1987).

Les protéines peuvent être séparées des petites molécules par dialyse à travers une membrane semi-perméable. Les molécules ayant des dimensions significativement plus grandes que le diamètre des pores seront retenues à l'intérieur du sac de dialyse, tandis que les molécules plus petites et les ions traversent les pores de la membrane et apparaissent à l'extérieur du sac (Stryer, 1995).

L'extrait enzymatique a subit une dialyse en utilisant un sac à dialyse avec un seuil de coupure de 10000 daltons, la solution de contre dialyse est le tampon tris-HCl (0,1M) à pH 7.

La préparation des membranes de dialyse selon la méthode de Lemoine *et al.* (1968) est décrite dans l'annexe1.

#### 4.2.4. Méthodes analytiques

##### a) Détermination de l'activité amylolytique

Afin de déterminer l'activité amylolytique, l'extrait enzymatique (0,5ml) est mélangé avec de l'amidon (0,5ml) à 1% comme substrat, dissout dans du tampon phosphate (pH 7,5) à 0,1 M et autoclavé auparavant pendant 10 minutes. Le mélange réactionnel est incubé à 80°C pendant 30 minutes (Legin *et al.*, 1997).

L'activité enzymatique est déterminée par la méthode à l'acide dinitrosalicilique (DNS) (Bernfeld, 1955) utilisant le glucose comme standard.

Une unité (U) amyliasique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la formation d'une  $\mu\text{mol}$  du sucre réducteur par minute.

La préparation du réactif (DNS) est décrite dans l'annexe1.

##### \*/ Protocole du dosage

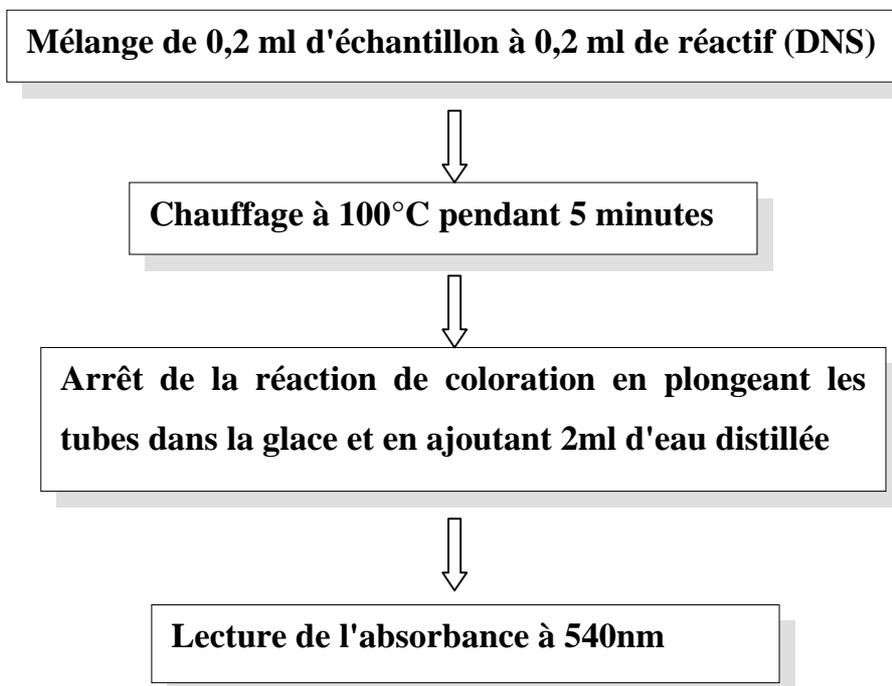


Figure 14 : Protocole du dosage au DNS

**\*/ Calcul de l'activité amylolytique**

L'activité est exprimée en  $\mu\text{mol}$  d'extrémités réductrices produites par minute et par unité de volume d'enzyme est calculée par la formule suivante:

$$A = \frac{P \times 10^3 \times V}{180 \times V_e}$$

A: l'activité en  $\text{Uml}^{-1}$

V: volume réactionnel de la cinétique enzymatique en ml

P: la vitesse de production

$V_e$ : volume enzymatique utilisé en ml.

**b) Dosage des protéines totales****\*/ Méthode au bleu de Coomassie**

Bradford *et al.* (1976) ont développé une méthode colorimétrique basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250 (annexe1), se manifestant par un changement de la couleur. Ce colorant existe sous trois formes, cationique (rouge), neutre (vert), anionique (bleue). Quand le colorant est adsorbé sur les protéines, il est sous forme anionique (bleue) et possède un spectre d'absorption maximal estimé à 595 nm.

**\*/ Technique de dosage**

On prépare une série de dilution d'une solution de BSA (Bovin Serum Albumin), allant de 10 à 100  $\mu\text{g/ml}$  à partir d'une solution mère de BSA à 0,2%. Pour chaque 0,1ml de la solution de BSA, on ajoute 1 ml de réactif de bleu de Coomassie. On agite et on laisse reposer 10 minutes. Une lecture d'absorbance est effectuée à 595nm et une courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration de la BSA est établie (Bradford *et al.*, 1976).

On procède de même pour l'extrait enzymatique à doser, afin de déterminer la quantité de protéines totales et de pouvoir calculer l'activité spécifique de l'enzyme.

$$\text{Activité spécifique} = \frac{A \text{ (U/ml)}}{P \text{ (mg/ml)}}$$

A: activité enzymatique

P: quantité de protéines

### **4.3. Purification de l'amylase**

#### **4.3.1. Désionisation sur gel séphadex G25**

Le gel utilisé au cours de cette première étape est le *Sephadex G-25* (limite d'exclusion 5000).

La filtration sur un tel gel, permet de séparer l'enzyme des petites molécules qui la contaminent et qui proviennent essentiellement du milieu de culture et des traitements subis (sels minéraux tel que le sulfate d'ammonium) (Kamoun, 1987).

#### **\*/Préparation de la colonne**

Le gel est sous forme de poudre sèche, pour le transformer en gel, la poudre du gel *Sephadex G25* est suspendue dans du tampon phosphate à 0,1M à pH7 à raison de 4,5g /100ml pendant au moins 3 heures à température ambiante.

Après avoir laissé le gel gonfler le temps nécessaire, on le place dans une fiole à vide pour chasser les bulles d'air pendant une demi-heure, avec une faible agitation manuelle. Pour éviter les contaminations bactériennes, l'ajout d'un inhibiteur comme l'azide de sodium est nécessaire à raison de 0,02%

Le gel est déversé dans la colonne (25x 1,5cm), et laissé sédimenter en permettant au surplus du tampon phosphate s'écouler jusqu' à atteindre un niveau de 0,5cm au dessus du gel.

#### **\*/Elution sur colonne**

Le dialysat (1ml) est introduit dans la colonne avec une seringue sans bulle d'air et l'élution est assurée par le tampon phosphate 0,1M à pH 7, avec un débit de 0,63ml/mn.

Nous avons recueilli 60 fractions qui font objet d'une analyse spectrophotométrique à 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Vis min 1240 Shimadzu) et d'un test de confirmation de l'activité enzymatique.

Les fractions actives sont concentrées jusqu'à 10ml à l'aide d'un Rotavapor Wterbath B 480.

#### **4.3.2. Chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-cellulose**

Dans une colonne à échange d'ions, les protéines collent par affinité électrostatique à des groupements chargés de la résine. Une résine portant des groupements positifs est dite "échangeuse d'anions", parce que des ions négatifs ou les groupements acides d'une protéine peuvent interagir avec la résine. Une résine portant des groupements négatifs est dite "échangeuse de cations" parce que ce sont des cations ou les groupements basiques d'une protéine qui interagissent avec elle (Wilson et Walker, 1994).

Cette méthode permet de décrocher les protéines d'une telle résine en augmentant progressivement la force ionique du tampon d'élution, un gradient salin permet de séparer les protéines selon leur degré de charge positive ou négative à un certain pH. (Stryer, 1995)

#### **\*/ Détermination du pH d'élution**

Dans une série de tubes contenant le DEAE cellulose équilibré avec du tampon phosphate 0,1 M à des pH allant de 5 à 8 en lavant 10 fois avec ce tampon.

100 µl du dialysat désionisé sont ajoutés à chaque tube sous agitation douce pendant 5 minutes. On laisse sédimenter le gel, on récupère le surnageant pour tester l'activité amylolytique.

Dans le cas d'une résine anionique, quand le pH est supérieur au pI de la protéine cible, cette dernière va se fixer et son activité disparaît du surnageant (Sine, 2000).

#### **\*/ Détermination de la concentration du sel d'élution**

De la même façon que la méthode décrite précédemment, mais ici le DEAE cellulose est équilibré avec du tampon phosphate 0,1 M à un pH d'élution fixe est remis dans des tubes avec des forces ioniques croissantes suite à l'addition de différentes concentrations en NaCl allant de 0,05 à 0,5 M.

On ajoute 100 µl du dialysat désionisé dans chaque tube et on laisse sédimenter. Enfin, on teste l'activité amylolytique du surnageant (Sine, 2000).

#### **\*/Elution sur colonne**

Le DEAE cellulose (1g) est mis à gonfler dans 100ml du tampon phosphate au pH d'élution à température ambiante. Après dégazage, le gel est coulé dans une colonne de type pharmacia (1x 15cm) avec addition de 0,02% d'azide de sodium.

L'élution du dialysât désionisé et concentré est assurée par un tampon phosphate 0,1M à pH d'élution avec un débit de 0,5ml/mn à température ambiante.

L'élution de l'enzyme se fait avec un gradient de concentration de NaCl (augmentation de la force ionique) par palier, à chaque concentration de NaCl on récupère 10 fractions (Kwak *et al.*, 1998).

Ces fractions font objet d'un test d'activité enzymatique, celles qui sont actives, sont dessalées sur gel séphadex G25 et concentrées jusqu'à 10ml.

#### **4.3.3. Chromatographie d'exclusion sur gel séphadex G75**

Le terme d'exclusion moléculaire qui est aussi synonyme de gel de filtration, gel perméation ou de tamisage moléculaire est utilisé pour désigner la séparation des molécules de tailles différentes grâce à une phase stationnaire qui constitue une matrice poreuse appelée gel.

Dans ce type de chromatographie, les particules les plus larges sont complètement exclues, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas pénétrer dans la phase stationnaire, elles passent entre les grains du gel (le coefficient de distribution  $K_d = 0$ ). Les petites molécules sont distribuées entre la phase mobile et la phase stationnaire puisqu'elles peuvent diffuser dans les pores du gel et seront éluées plus tardivement ( $K_d = 0$ ) (Sine, 2000)

Les applications de l'exclusion moléculaire sont diverses, dans ce cas notre but est de déterminer le poids moléculaire puisque le volume d'élution est approximativement une fonction linéaire du log (poids moléculaire).

**\*/ Elution sur colonne**

La colonne (25 x 1,5cm) est remplie avec le gel séphadex G75 (6 g) qui est auparavant gonflé dans 100 ml du tampon phosphate à 0,1 M à pH7. Le gel est dégazé sous vide sous agitation pendant une demi heure et équilibré avec le même tampon. (Kamoun, 1987)

L'extrait enzymatique (1ml) obtenu après élution sur colonne échangeuse d'anion, est injecté dans la colonne réglée à un débit de 0,5 ml/mn à température ambiante. 100 fractions sont collectées, une lecture d'absorbance à 280nm et un test d'activité enzymatique sont effectués pour chaque fraction, celles qui sont actives sont concentrées. (Kwak *et al.*, 1998)

**\*/ Détermination du poids moléculaire**

La chromatographie d'exclusion est utilisée dans les mêmes conditions citées précédemment pour évaluer le poids moléculaire, en utilisant une gamme d'étalonnage de protéines dont le poids moléculaire est connu. Ces protéines sont la BSA (67kDa), la trypsine (23,3kDa) la pepsine (34,7kDa) et la papaïne (23kDa).

Le volume mort de la colonne est déterminé en utilisant un composé de très haut poids moléculaire (le bleu dextran), qui est totalement exclu de la colonne. L'élution de ces marqueurs se fait à 4°C. Après récupération du volume mort, les fractions collectées sont destinées à une analyse spectrophotométrique à 280nm. Puis on trace la courbe d'étalonnage :  $\log PM = f(V_e/V_0)$

PM: poids moléculaire des étalons;

V<sub>e</sub>: le volume d'élution de chaque étalon ;

V<sub>0</sub>: volume mort du gel.

#### **4.4. Caractérisation de l'amylase**

##### **4.4.1. Effet de la température**

L'activité amylasique est mesurée à différentes températures pour déterminer la température optimale de l'enzyme.

Le mélange réactionnel contenant 0,5ml d'enzyme et 0,5ml de la solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate 0,1M à pH 7 est incubé pendant 30 minutes à des températures allant de 50 à 100°C (Laderman *et al.*, 1993).

##### **4.4.2. Effet du pH**

Pour étudier l'effet du pH sur l'activité enzymatique, on prépare des mélanges réactionnels composés de 0,5ml d'enzyme et 0,5ml de la solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate à des pH allant de 5 à 9. Après incubation à la température optimale pendant 30 minutes on mesure l'activité enzymatique (Laderman *et al.*, 1993)

##### **4.4.3. La thermostabilité**

L'effet de la température sur la stabilité de l'amylase est déterminé en mesurant l'activité résiduelle après une préincubation de l'enzyme dans du tampon phosphate 0,1M (pH 7), à des températures allant de 70 à 100°C dans un intervalle de temps allant de 0 à 4heures (Chung *et al.*, 1995).

##### **4.4.4. Effet de l'EDTA**

Pour tester l'effet de l'EDTA sur l'enzyme, on ajoute au mélange réactionnel contenant l'enzyme et la solution d'amidon, 0,1 ml de l'EDTA avec des concentrations allant de 1 à 5 mM et on incube à 80°C pendant 30 minutes (Brown, 1990).

##### **4.4.5. Effets des ions métalliques**

L'activité de l'amylase est mesurée en présence de différents ions métalliques à 1mM Ces ions métalliques sont ajoutés sous forme de sels: MgCl<sub>2</sub>, NaCl, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> et NiCl<sub>2</sub>.

Les mélanges réactionnels sont incubés à 80°C pendant 30 minutes et l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée (Chung *et al.*, 1995).

## **5. Etude statistique**

Une étude statistique des données est réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5 Fr. Afin de mettre en évidence les différences significatives entre les trois souches isolées concernant l'activité amylolytique, une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur a été appliquée.

# *Résultats et discussion*

## **1. Isolement et caractérisation des souches**

### **1.1. Température et pH des sites hydrothermaux:**

Les sites hydrothermaux qui ont servi à l'échantillonnage sont des biotopes terrestres (geysers) et des sources chaudes alcalines.

Les températures de l'eau des trois sites (Hammam Elbibane, Hammam Sillal, Hammam Kiria) ont été déterminées sur place et leurs pH ont été mesurés au laboratoire. Les résultats sont donnés dans le tableau III.

**Tableau III:** Température et pH des sites de prélèvement

<b>Site</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>pH</b>
Hamam Elbibane	80	7,65
Hamam Sillal	47	7,23
Hamam Kiria	45	7,40

### **1.2. Enrichissement et purification**

Les milieux de culture présentent un trouble après incubation à 80°C pendant 12 heures. L'observation à l'état frais des cocci mobiles dans toutes les cultures, confirme la présence de microorganismes vivants.

Le milieu solide estensemencé à partir des cultures d'enrichissements. Après incubation à 80°C pendant 48 jours, on a effectué une observation des cultures sous une loupe binoculaire et on a révélé la présence de colonies isolées. L'observation microscopique des colonies confirme la présence de cellules microbiennes de même aspect que celles observées dans le milieu liquide.

### 1.3. Propriétés morphologiques

L'observation des colonies et des cellules révèle la présence de trois souches. Les noms attribués aux souches isolées à partir des trois sites hydrothermaux cités précédemment sont donnés dans le tableau IV

**Tableau IV:** Souches et sites de prélèvement

Souches	Sites de prélèvement
HB	Bordj Bouarreridj (Hammam Elbibane)
HT	Tifra (Hammam Sillal)
HA	Acif Elhammam (Hammam Kiria)

Pour les trois souches, les cellules apparaissent au microscope (grossissement x 400), sous forme de cocci isolées et en paires dans la phase exponentielle. La coloration de Gram a révélé des cocci à Gram négatif.

### 3. Propriétés biochimiques

#### 3.1. Utilisation des sucres

Le tableau V montre les résultats obtenus pour la fermentation des sucres.

**Tableau V:** Profil d'utilisation des sucres par les souches isolées

Sucres	HB	HT	HA
<b>Xylose</b>	+	+	+
<b>Mélibiose</b>	+	+	-
<b>Glucose</b>	+	+	-
<b>Lévuiose</b>	+	+	+
<b>Arabinose</b>	+	-	-
<b>Dextrine</b>	+	+	+
<b>Lactose</b>	-	+	+
<b>Galactose</b>	+	-	+
<b>Raffinose</b>	-	-	+
<b>Mannitol</b>	-	-	-
<b>Amidon</b>	+	+	+
<b>Tréhalose</b>	-	-	-
<b>Sorbitol</b>	-	-	-
<b>Maltose</b>	+	+	+

- + : dégradation - : pas de dégradation

### 3.2. Assimilation des acides aminés

L'assimilation des acides aminés comme seule source de carbone et d'azote est vérifiée par dénombrement au microscope sur cellule de Malassez. Les résultats de l'utilisation des acides aminés sont indiqués dans le tableau VI.

**Tableau VI:** Assimilation des acides aminés

Acide aminé	HB	HT	HA
Asparagine	++	++	+
Phénylalanine	-	+	-
Acide aspartique	++	++	-
Alanine	+	-	++
Arginine	++	++	++

▪ +: croissance    ++: bonne croissance    -:pas de croissance

### 3.3. Autres substrats carbonés:

Les résultats de l'utilisation des autres substrats carbonés (tryptone, peptone, extrait de levure, gélatine) sont illustrés dans le tableau VII.

**Tableau VII:** Résultats de la dégradation des autres substrats carbonés

Substrats	HB	HT	HA
Tryptone	+	+	+
Peptone	+	+	+
Extrait de levure	+	+	+
Gélatine	+	-	-

### 3.4. Croissance en présence de différents sels minéraux

Le tableau VIII indique les résultats obtenus pour l'utilisation de certains sels minéraux par les souches isolées.

**Tableau VIII:** Résultats de l'utilisation des sels minéraux

Sels minéraux	HB	HT	HA
FeSO <sub>4</sub>	+	+	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	+	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	+	+	+
NH <sub>4</sub> Cl	+	+	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>8</sub>	-	+	+
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )	+	+	+
MnSO <sub>4</sub>	+	+	+
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ). (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+	-	-
Milieu sans soufre	-	-	-

▪ - : pas de croissance      +: Croissance

Les souches isolées ne se développent pas en absence du soufre, il est donc indispensable pour la croissance des isolats.

La réduction du soufre est une caractéristique commune aux archaea hyperthermophiles, cependant il existe des espèces comme *P. furiosus* (température optimale, 98 à 100°C) et *Thermococcus litoralis* (température optimale 88°C) qui peuvent pousser en absence du soufre en produisant des quantités élevées de H<sub>2</sub>.

Le H<sub>2</sub> est exigé pour certains hyperthermophiles, cependant, le H<sub>2</sub> est un inhibiteur pour beaucoup d'autres, et sa production mène à une faible croissance que celle obtenue en présence du soufre. La réduction du soufre compense cette inhibition par la formation du H<sub>2</sub>S au lieu de H<sub>2</sub> (Rinker et Kelly, 1996).

#### 4. Propriétés Physiologiques

##### 4.1. Effet de la température sur la croissance

###### 4.1.1. La souche HT

La souche HT isolée à partir de Hammam Sillal, se développe dans une gamme de température allant de 60°C à 90°C et avec une température optimale de croissance à 80°C (figure 15).

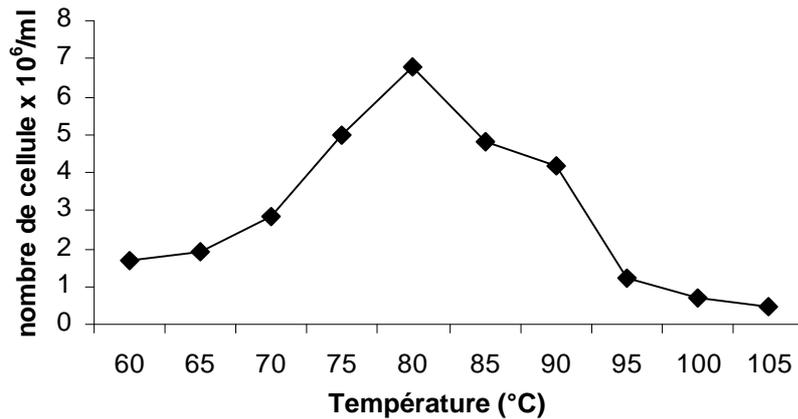


Figure 15: Effet de la température sur la croissance de la souche HT

###### 3.1.2. Souche HB

La souche HB isolée à partir de Hammam Elbibane se développe dans une large gamme de température de 60 à 95°C et présente une température optimale de croissance de 85°C (figure 16).

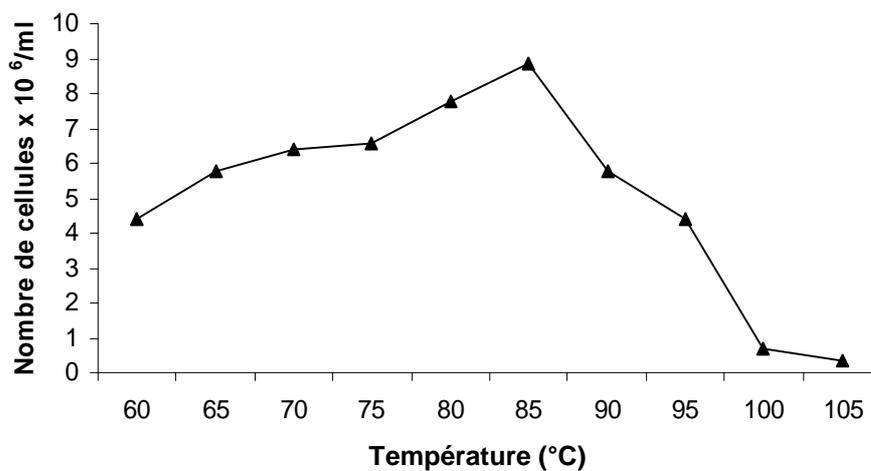


Figure 16: Effet de la température sur la croissance de la souche HB

### 4.1.3. Souche HA

La souche HA isolée à partir de Hammam Kiria se développe entre 60 et 90°C et présente une température optimale de croissance de 80°C (figure 17).

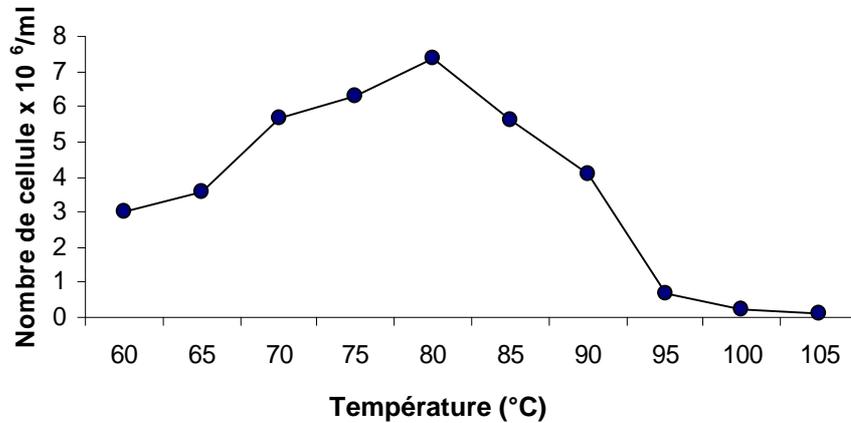


Figure 17: Effet de la température sur la croissance de la souche HA

## 4.2. Effet du pH sur la croissance

### 4.2.1. Souche HT

La souche HT présente une croissance dans une gamme de pH allant de 6 à 9 et un pH optimum de croissance de 7 (figure 18).

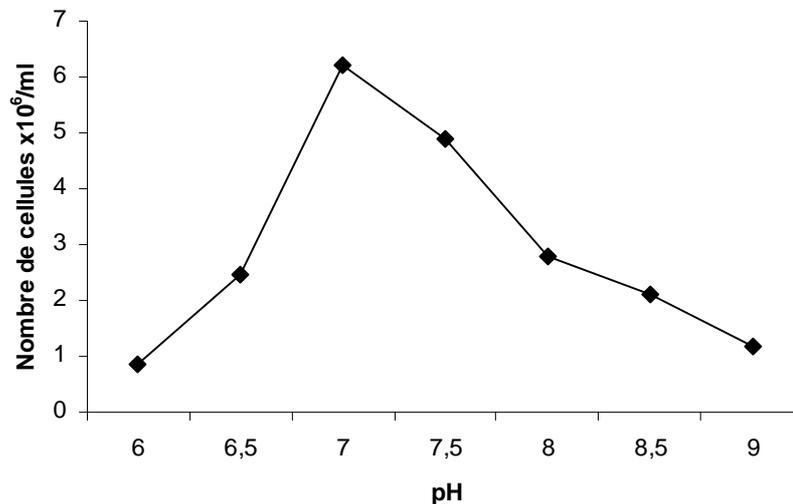


Figure 18: Effet du pH sur la croissance de la souche HT

#### 4.2.2. Souche HB

Cette souche montre une croissance dans une gamme de pH allant de 6 à 9 avec un pH optimum de croissance de 7,5.

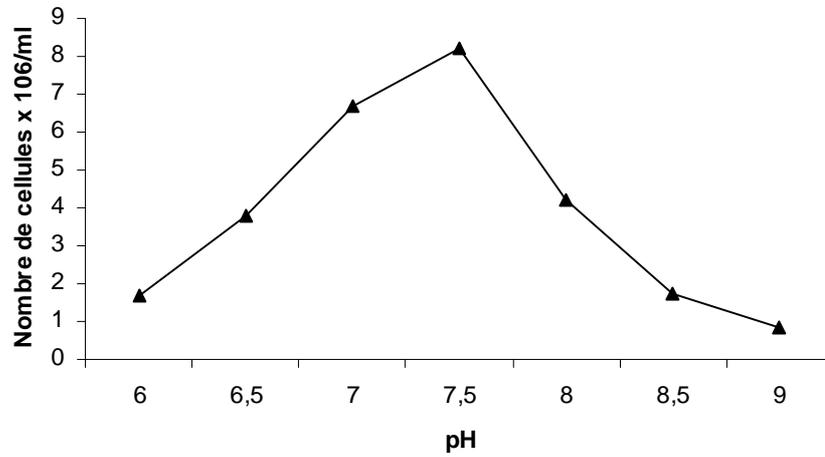


Figure 19: Effet du pH sur la croissance de la souche HB

#### 4.2.3. Souche HA

La souche HT se développe dans une gamme de pH allant de 6 à 8 et son pH optimum de croissance est de 7.

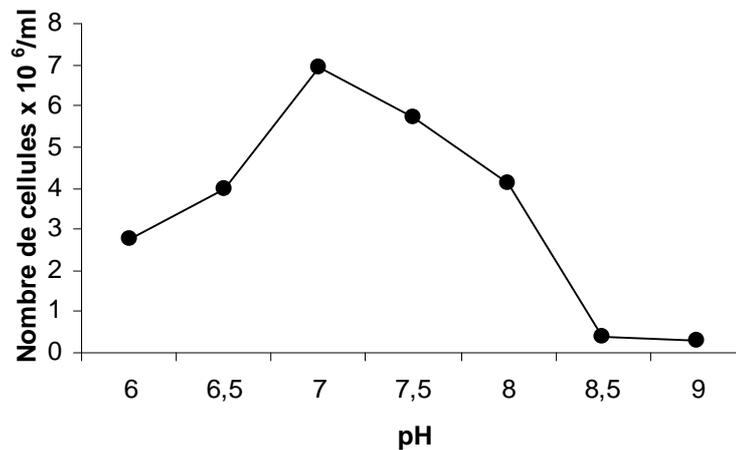


Figure 20: Effet du pH sur la croissance de la souche HA

La température optimale de croissance des souches HT et HA (80°C) est similaire à celle de *Thermococcus peptonophilus* (González *et al.*, 1995), *Sulfolobus solfataricus*, *Thermococcus hydrothermalis* (Godfroy *et al.*, 1997) et *Thermococcus profundus* (Kobayashi *et al.*, 1994).

La souche HB a une température optimale de croissance (85°C) similaire à celle de *Pyrococcus* HT3 (Kecha *et al.*, 2006), *Thermococcus waiotapuensis* sp. nov., (González *et al.*, 1999), *Thermococcus fumicolans* (Godfroy *et al.*, 1996), *Archaeoglobus profundus*, *Archaeoglobus fulgidus* et *Thermoproteus tenax* (Oliver et Thomm, 2000). Cependant, il existe des espèces appartenant au genre *Pyrococcus* qui peuvent croître à des températures supérieures à 110°C

Les souches HT, HB, HA présentent des pH optimum de croissance neutres (7- 7,5- 7 respectivement) comme la plupart des Thermococcales, tandis qu'il existe des exceptions tel que *Thermococcus alcaliphilus* (pH optimum 9) (Keller *et al.*, 1995), *Thermococcus fumicolans* (pH optimum 8) ( Godfroy *et al.*, 1996) et *Thermococcus zilligii* peut même croître à un pH supérieur à 9,2 (Klages et Morgan 1994; Rominus *et al.*, 1997).

### **4.3. Sensibilité aux antibiotiques**

Les trois souches sont toutes résistantes aux antibiotiques testés à la concentration 150µg/L. Comme la biochimie des *Archaea* est très différente de celle des autres êtres vivants on s'attendait à ce que leur sensibilité aux antibiotiques soit très différente. Ainsi en raison de l'absence de muréine chez les *Archaea*, celles-ci ne sont pas sensibles à la plupart des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire. Dans la présente étude nous avons utilisé des β-Lactamine (Amoxicilline, Oxacilline, Ampicilline, Colistine, Amikacine, Clindamycine et Cefalexime) qui sont des inhibiteurs de la paroi cellulaire mais ils n'ont aucun effet sur la croissance des trois souches. De même, l'ARN polymérase ADN dépendante des *Archaea* est insensible à l'inhibition par la rifampicine qui inhibe cette enzyme bactérienne à de faibles concentrations.

La tétracycline est aussi un inhibiteur peu efficace bien qu'il inhibe la synthèse protéique des bactéries et des eucaryotes. Cela est dû à la structure des ribosomes des *Archaea* qui est très différente de celle des bactéries et des eucaryotes.

### **4.4. Sensibilité à l'oxygène**

L'observation microscopique révèle que toutes les souches ne montrent aucune croissance après incubation à 80°C pendant 12 heures en présence de l'oxygène, ce qui signifie que les isolats sont sensibles à l'oxygène, ils sont donc des anaérobies stricts.

**Tableau IX:** Tableau comparatif des caractéristiques des souches HB, HT, HA avec d'autres espèces hyperthermpiles du genre *Pyrococcus* et *Thermococcus*.

	HT	HB	HA	<i>P. HT3</i> <sup>a</sup>	<i>P. furiosus</i> <sup>b</sup>	<i>T. zilligii</i> <sup>c</sup>	<i>T. waiotapuensis</i> <sup>d</sup>
<b>Morphologie cellulaire</b>	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
<b>Aérobic/anaérobic</b>	anaérobic	anaérobic	anaérobic	anaérobic	anaérobic	anaérobic	anaérobic
<b>Température optimale de croissance (°C)</b>	80	85	80	85	100	75–80	85
<b>pH optimum de croissance</b>	7	7,5	7	7,5	7	7,4	7
<b>Sources de carbone</b>	Peptone, tryptone, extrait de levure, xylose, melibiose, glucose, lévulose, dextrine, lactose, maltose, amidon, certains acides aminés	Peptone, tryptone, extrait de levure, gélatine, xylose, mélibiose, glucose, lévulose, arabinose, dextrine, galactose, maltose, amidon, certains acides aminés	Peptone, tryptone, extrait de levure, xylose, lévulose, dextrine, lactose, galactose, raffinose, amidon, maltose, certains acides aminés	BHI, extrait de levure, extrait de viande, peptone, tryptone, caseine, pyruvate, amidon, maltose, cellobiose, glucose divers acides aminés	Peptone, tryptone, extrait de levure, extrait de viande, caseine, maltose, amidon, casamino acides, pullulan, cellobiose	Peptides, certains acides aminés, glucose, pyruvate	thioglycollate Peptides, acides aminés, amidon, maltose, pyruvate
<b>G + C (mol %)</b>	ND	ND	ND	43	38	46,2	50,4
<b>Résistance à la rifampicine</b>	Résistante	Résistante	Résistante	Résistante	ND	Résistante	Sensible
<b>Origine de la souche</b>	Site hydrothermal (Hammam Sillal, Bejaia) Algérie	Site hydrothermal (Hammam El-Bibane, Bordj Bouarreridj) Algérie	Site hydrothermal (Hammam Kiria, Bejaia) Algérie	Site hydrothermal (Hammam El-Bibane, Bordj Bouarreridj) Algérie	Profondeurs sous-marines de l'île de Volcano en Italie.	Eau douce du parc de Kuirau de la Nouvelle Zélande	Eau douce du site hydrothermal (Waiotapu) de la Nouvelle Zélande

ND: non déterminé

Sources des données: <sup>a</sup>: Kecha *et al.* (2006), <sup>b</sup>: Fiala et Stetter (1986), <sup>c</sup>:Rominus *et al.*, (1997) et <sup>d</sup>:González *et al.*, (1999)

En comparant les données concernant les caractéristiques culturelles, morphologiques, biochimiques et physiologiques des souches isolées au laboratoire à d'autres souches appartenant à l'ordre des Thermococcales et aux de deux genres : *Pyrococcus* et *Thermococcus*, on pourrait donner une hypothèse sur l'affiliation des trois souches HB, HT, HA.

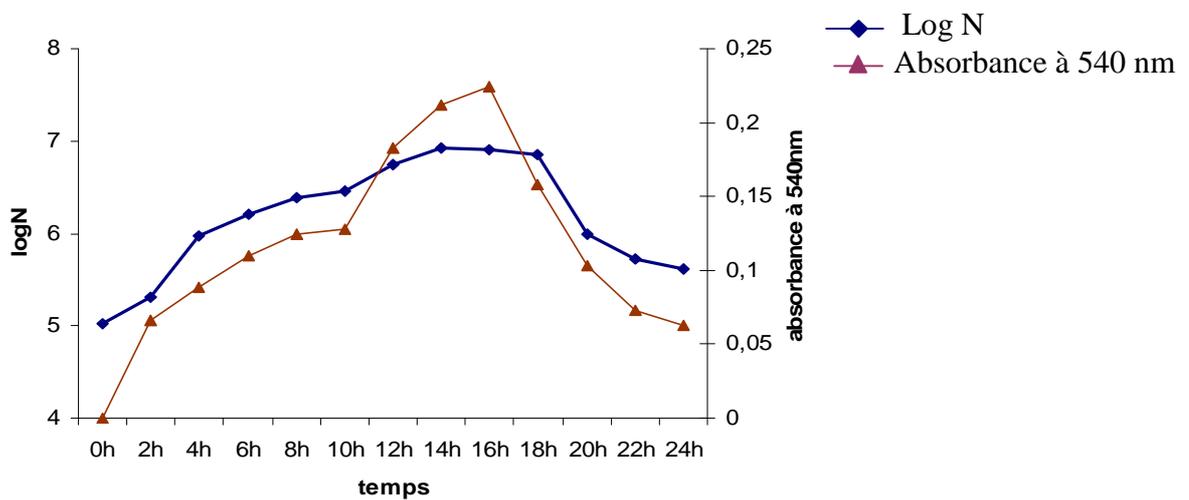
Le tableau IX, nous montre clairement des similitudes entre les souches et l'ordre dont lequel pourrait appartenir les souches est celui des Thermococcales. Cependant en absence de données complémentaires en particulier les tests moléculaires sur le GC%, l'analyse phélogénétique basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S et l'hybridation ADN/ADN, nous ne pourrions pas déterminer le genre et l'espèce des souches.

## 5. Cinétique de croissance et production d'enzymes amylytiques

Les cinétiques de la production des enzymes amylytiques et de la croissance des souches indiquent que ces enzymes sont synthétisées au cours de la phase exponentielle.

Le maximum des activités spécifiques a été déterminé pendant la phase exponentielle de chaque souche. Après 14 heures d'incubation à la température ambiante, les activités spécifiques étaient de : 3,86 U/mg, 0,68 U/mg et 0,43 U/mg pour les souches HB, HA et HT respectivement.

### 5.1. Souche HB



**Figure 21** : Cinétique de croissance et production d'enzymes amylytiques de la souche HB

### 5.2. Souche HT

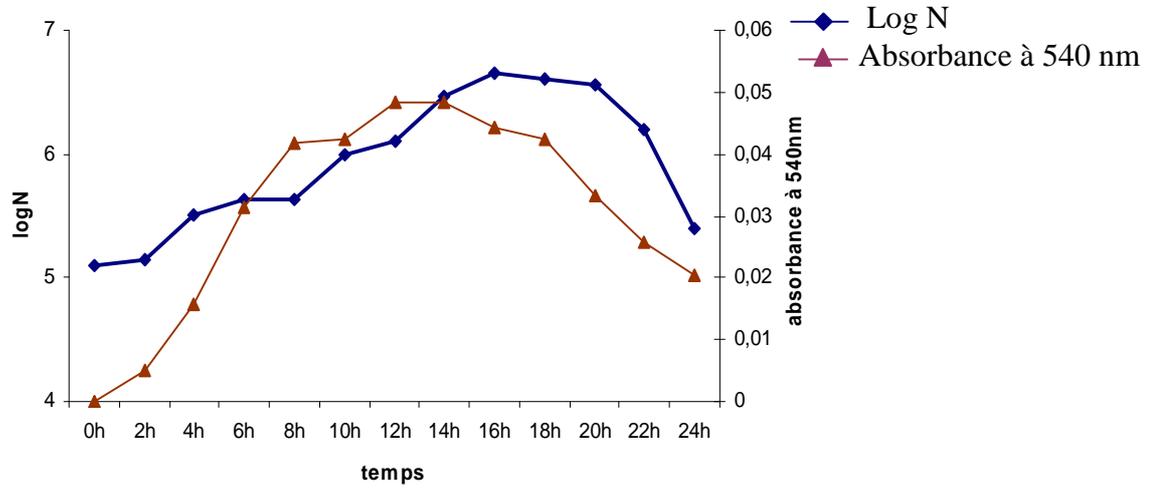


Figure 22 : Cinétique de croissance et production d'enzymes amylolytiques de la souche HT

### 5.3. Souche HA

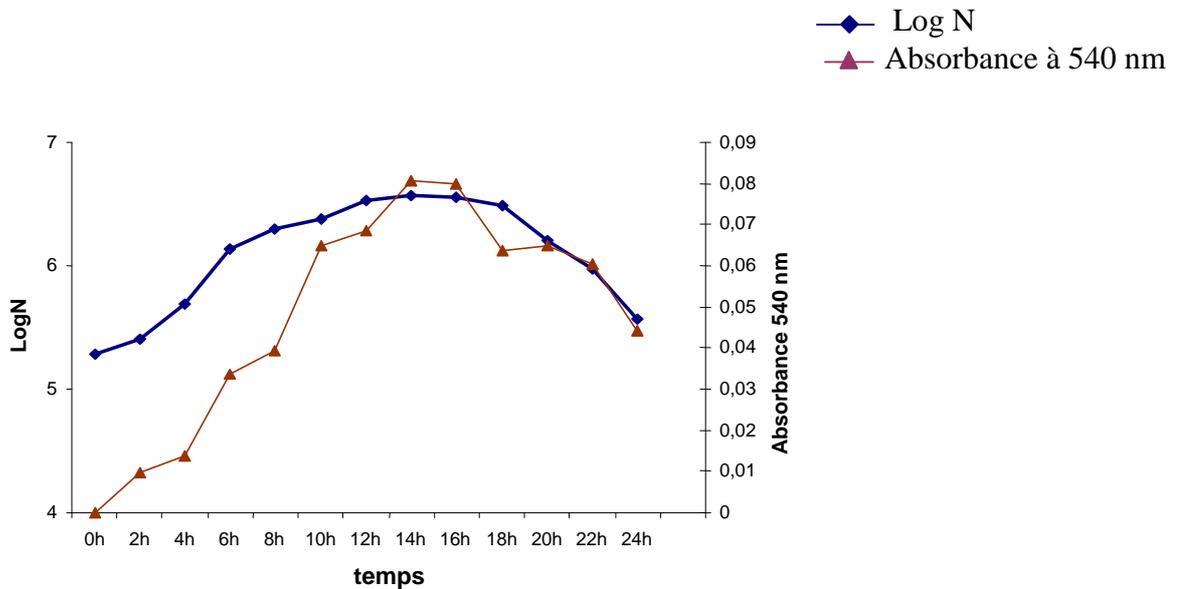
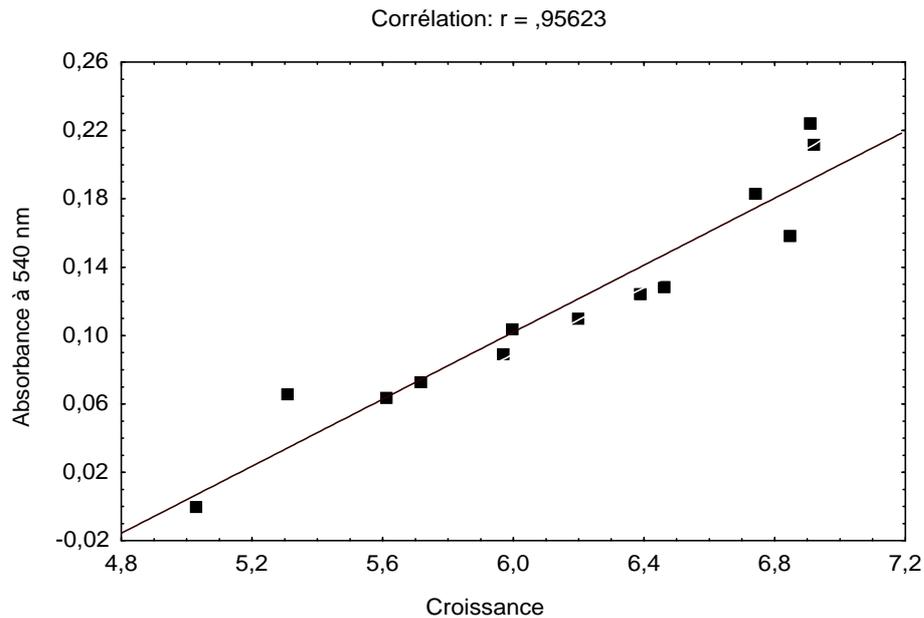


Figure 23 : Cinétique de croissance et production d'enzymes amylolytiques de la souche HA

L'activité amylolytique des souches montre des différences très hautement significatives ( $p < 0,001$ ). La souche HB possède une activité amylolytique plus importante et une meilleure production d'amylases par rapport aux deux autres souches. La figure 24 montre l'existence d'une très bonne corrélation ( $r = 0,95$ ) entre la croissance et la production d'amylases, pour les souches HB. Ainsi, on a sélectionné la souche HB pour la production et la purification d'une amylase thermostable.



**Figure 24:** Corrélation entre la production d'amylase et la croissance de la souche HB

## 6. Culture et purification

On a pris une culture qui avait une charge microbienne de  $5,6 \times 10^6$  cellules /ml pour inoculer (à raison de 10%) des flacons de 100ml contenant 40ml du milieu de culture. Après 12 heures d'incubation à  $85^\circ\text{C}$ , les cultures sont révélées positives. Dans cette étape la moyenne de la charge microbienne a légèrement augmenté et atteint  $7,3 \times 10^6$  cellules /ml.

Ces derniers flacons ont servi pour inoculer des flacons de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture, la moyenne de la charge microbienne a diminué et atteint  $4,7 \times 10^6$  cellules /ml. Après l'ensemencement des flacons de 500ml la charge microbienne était de  $4,2 \times 10^6$  cellules /ml.

### **7. Extraction du surnageant**

Les quatre litres du milieu de culture ont été rassemblés pour subir une filtration sous vide sur papier Whatman pour éliminer le soufre. Le soufre résiduel a été éliminé par centrifugation à 8000 g/30mn. Les débris cellulaires ont été séparés par une deuxième centrifugation à 12000 g/30mn. Après avoir séparé le surnageant du culot, le volume obtenu est concentré à 100ml, et fait l'objet d'un test de l'activité amylolytique en utilisant l'amidon comme substrat. L'activité spécifique du surnageant est estimée à 4,5 U/mg

### **8. Précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse**

Des volumes de 20 ml du surnageant sont précipités au sulfate d'ammonium à des pourcentages allant de 50 à 90%, après centrifugation et récupération des précipités, chaque précipité est repris dans 10 ml du tampon Tris-HCl à pH 7. Les précipités sont soumis à une dialyse contre le même tampon. Les pores de la membrane à dialyse ne laissent passer que les petites molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 10 K d a (le sulfate d'ammonium...) et les autres molécules sont retenues.

Les valeurs de l'activité amylolytique des précipités dialysés sont illustrées dans le tableau X.

**Tableau X:** Résultats de l'activité enzymatique après précipitation au sulfate d'ammonium

<b>% en sulfate d'ammonium</b>	50	60	70	80	90
<b>Unité enzymatique</b>	-	0,026	0,063	0,186	-

## 9. Purification de l'amylase

### 9.1. Désionisation sur gel séphadex G25

Cette étape de purification permet le dessalage de l'extrait enzymatique, en éliminant le sulfate d'ammonium résiduel et les petites molécules.

Les 60 fractions collectées après élution du dialysat sur colonne de séphadex G25 font objet de tests de l'activité enzymatique comme décrit précédemment.

Les résultats obtenus montrent que l'activité amylolytique est détectée entre les fractions 5 et 36 (figure 25).

L'activité spécifique de l'enzyme est de 7,36U/mg, à ce niveau on remarque que l'activité spécifique de l'enzyme est supérieure à celle du surnageant et augmente de 2,14 U/mg par rapport à celle du dialysat.

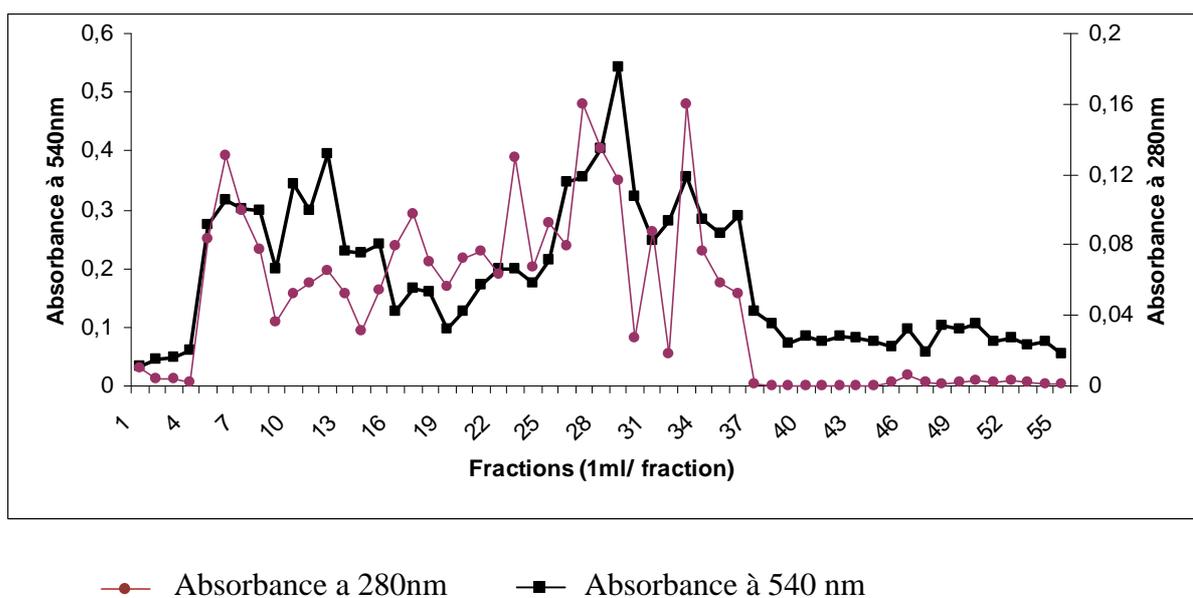


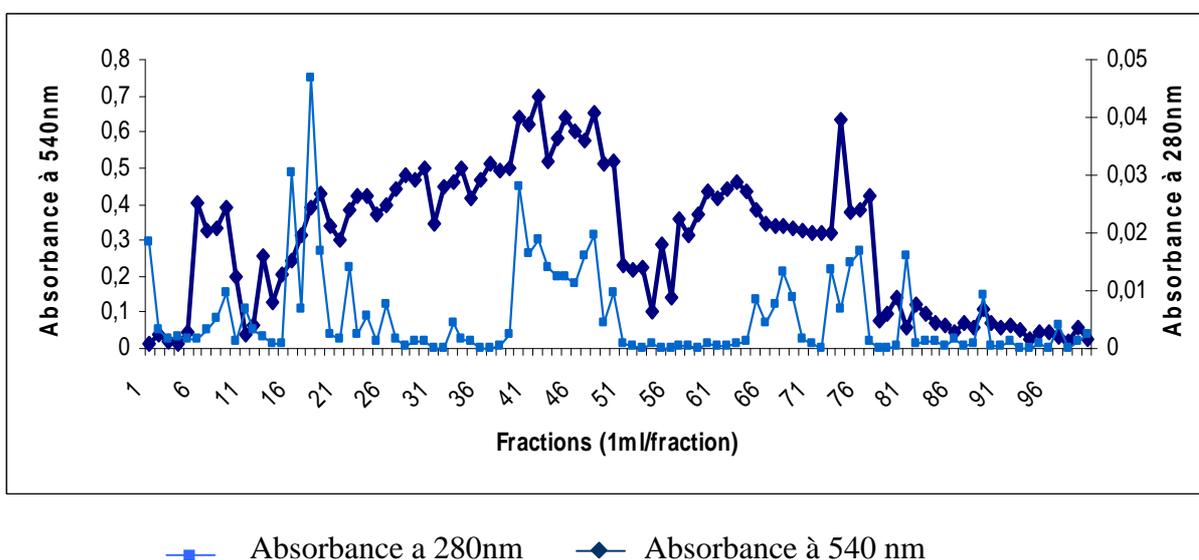
Figure 25 : profil d'élution de l'amylase après chromatographie sur séphadex G25

## 9.2. Chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE cellulose

L'élution de l'enzyme a été réalisée sur colonne de DEAE-cellulose équilibrée avec du tampon phosphate 0,1M à pH 7 et avec un gradient par palier de NaCl allant de 0 à 0,2M.

L'enzyme s'élue dans 77 ml (figure 26), les fractions actives sont groupées et concentrées à 1 ml pour être éluées sur une colonne de séphadex G75.

L'activité spécifique de l'enzyme, est de 36,5 U/mg, elle multiplie l'activité de l'extrait enzymatique brut par un facteur de 8,1 et celui du dialysat par 5,5

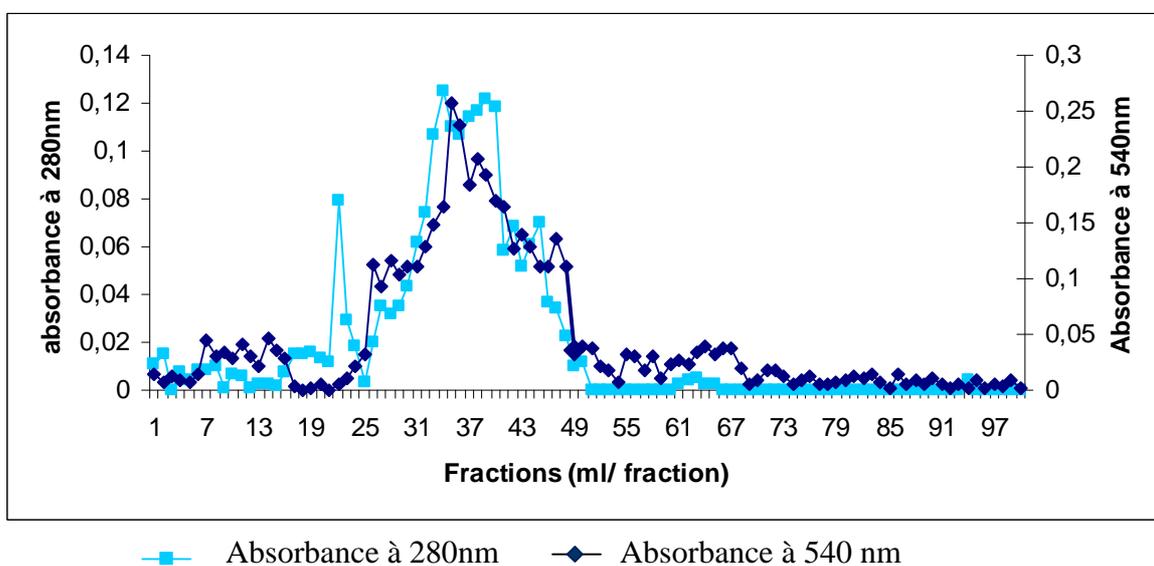


**Figure 26:** Profil d'élution de l'amylase après chromatographie sur DEAE-cellulose

### 9.3. Chromatographie d'exclusion sur gel séphadex G75

Le profil de l'élution montre que l'enzyme s'élue entre les fractions 26 et 51 (ml) et donne un seul pic.

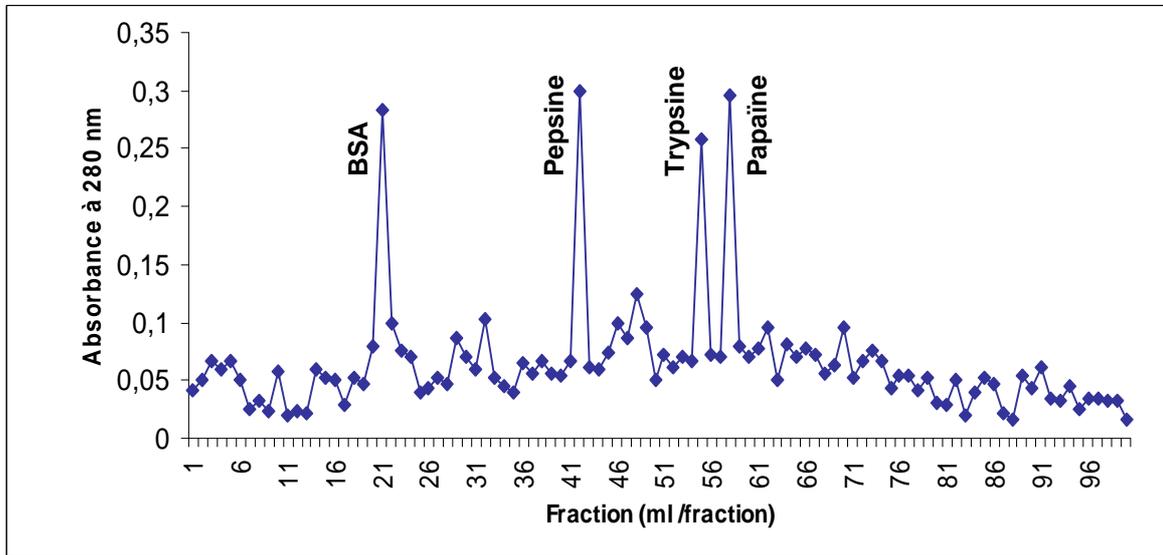
L'activité spécifique a augmenté d'un facteur de 21,16 et elle est estimée à 95,23 U/mg ce qui montre que la chromatographie sur gel séphadex G75 amplifie la pureté de l'enzyme. La fraction 37 montre une activité amylolytique maximale (figure 27).



**Figure 27:** Profil d'élution de l'amylase après chromatographie sur gel séphadex G75

### 9.4. Etalonnage de la colonne et détermination du poids moléculaire

Pour l'étalonnage de la colonne de séphadex G75 on a utilisé des protéines standard (sérum albumine bovine, pepsine, trypsine et papaine). Une lecture d'absorbance à 280 nm est effectuée sur les fractions recueillies.



**Figure 28:** Absorbances des fractions protéiques à 280nm après chromatographie sur séphadex G 75

Les calculs du poids moléculaire et du rapport du volume d'éluion sur le volume mort sont donnés dans le tableau XI.

$$V_e \text{ (volume d'éluion total)} = V_{ef} + V_0$$

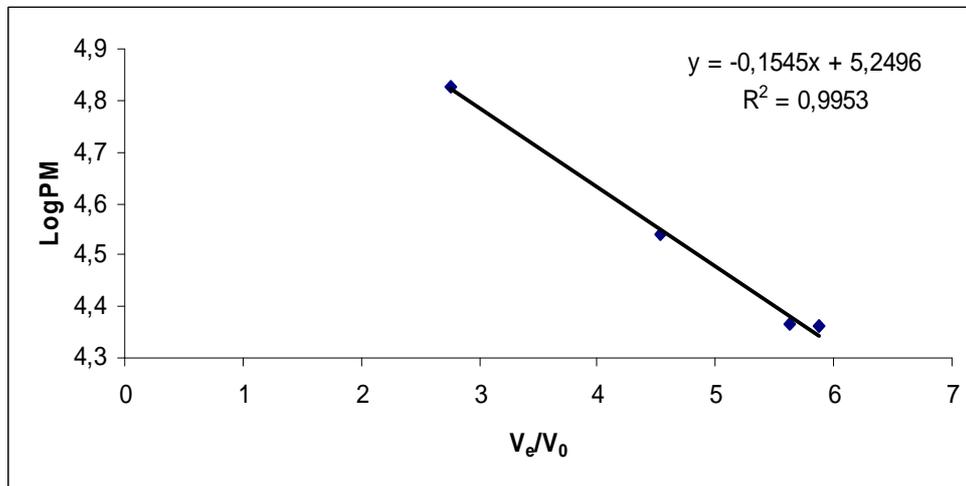
$$V_0 \text{ (volume mort)} = 11,9$$

$V_{ef}$ : volume d'éluion de la fraction

**Tableau XI :** Calcul du log PM et du rapport  $V_e/V_0$

Protéine standard	$V_{ef}$ (ml)	$V_e$ (ml)	$V_e/V_0$	PM (Da)	log PM
BSA	21	32,9	2,76	67000	4,83
pepsine	42	53,9	4,52	34700	4,54
trypsine	55	66,9	5,62	23300	4,37
papaine	58	69,9	5,87	23000	4,36
Amylase	35	46,9	3,94	43723,55	4,64

La courbe d'étalonnage de log PM en fonction de  $V_e/V_0$  nous a permis d'estimer la masse moléculaire de l'enzyme à 43,72 Kda (figure 29).



**Figure 29** : Courbe d'étalonnage des marqueurs

Le taux de protéines a considérablement, diminué après les différentes étapes de purification par l'élimination des protéines contaminantes qui existent dans le surnageant de culture et récupération des fractions actives à chaque étape de purification.

La diminution de l'activité totale (le rendement final était de 32,33%) et de la quantité des protéines totales et l'augmentation de l'activité spécifique montre que les étapes de la purification ont permis d'augmenter la pureté de l'enzyme en éliminant des protéines contaminantes (Tableau XII).

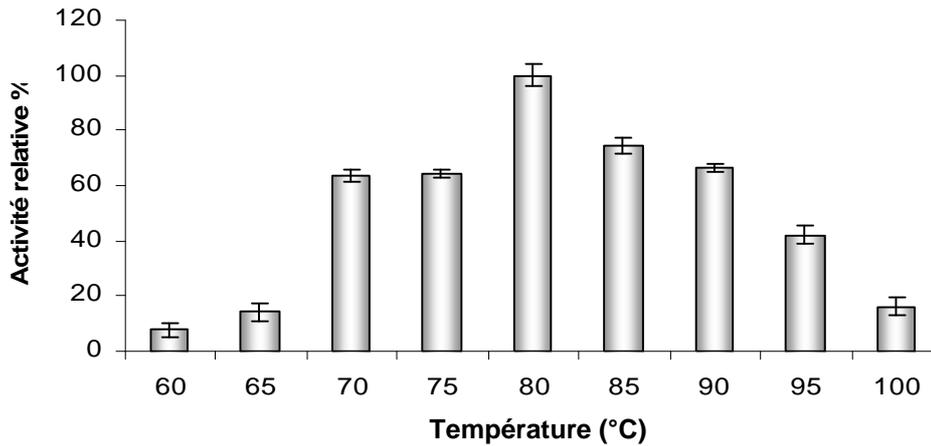
**Tableau XII:** Les étapes de purification de l'amylase.

<i>Etape de purification</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>activité (U/ml)</i>	<i>activité totale (U/ml)</i>	<i>protéines totales (mg)</i>	<i>activité spécifique (U/mg)</i>	<i>facteur de purification</i>	<i>Rendement (%)</i>
<i>Extrait brut</i>	100	0,167	16,7	0,037	4,5	1	100
<i>Dialysat</i>	10	0,186	1,86	0,028	6,64	1,47	11,13
<i>G25</i>	31	0,141	4,371	0,019	7,36	1,63	26,17
<i>DEAE cellulose</i>	10	0,145	1,45	0,004	36,5	8,11	8,68
<i>G75</i>	27	0,2	5,4	0,0021	95,23	21,16	32,33

## 9.5. Caractérisation de l'amylase

### 9.5.1 Effet de la température sur l'activité amylolytique

Les résultats des tests d'activité après incubation à des températures allant de 60°C à 100°C, indiquent que la température optimale de l'activité amylolytique est de 80°C. Cette température est voisine de la température optimale de croissance de la souche isolée qui est de 85°C (figure 30).



**Figure 30 :** Effet de la température sur l'activité relative de l'amylase.

La plupart des amylases archéennes thermoactives ont été caractérisées à partir des Archaea hyperthermophiles *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus profundus* et *Thermococcus hydrothermalis*. La température optimale de l'activité de ces enzymes est entre 80°C et 100°C (Bertoldo et Antranikian, 2002).

Le résultat obtenu dans cette étude est en accord avec une amylase (la L.  $\alpha$ -Amylase) produite par *Thermococcus profundus* qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$  (1-4) de l'amidon et les liaisons  $\alpha$  (1-6) du pullulane. Elle exhibe des températures optimales d'activité amylolytique et pullulytique de 80° et 90° C respectivement (Kwak *et al.*, 1998). Une autre amylase (amylase S) a été purifiée à partir de *Thermococcus profundus* DT5432 se caractérise par une température optimale de 80°C (Chung *et al.*, 1995).

Les  $\alpha$ -amylases de *Pyrococcus woesei* et *Pyrococcus furiosus* sont les versions protéiques les plus thermostables connues, possédant une température optimale de 100°C (Brown *et al.*, 1990; Koch *et al.*, 1991). L'  $\alpha$  glucosidase de *Pyrococcus furiosus* exhibe une température optimale d'activité de 105°C et peut atteindre 115°C (Costantino *et al.*, 1990).

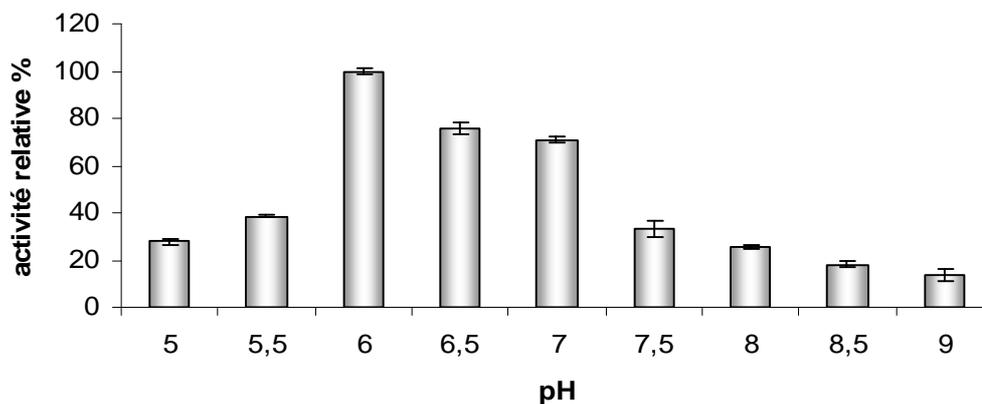
Les  $\alpha$ -amylases issues des *Thermococcus* sont généralement moins thermostables que celles issues de souches *Pyrococcus*. Le maximum d'activité des  $\alpha$ -amylases issues de souches *Thermococcus* est généralement obtenu à des températures voisines de 80°C, alors que, pour les enzymes issues de souches *Pyrococcus*, il est obtenu à des températures voisines de 100°C. Cette caractéristique reflète les températures optimales de croissance de ces Archaea.

Un nombre très important d'amylases bactériennes thermostables a été mis en évidence, à titre d'exemple les amylases de *Bacillus* sp. WN11 (Mamo *et al.*, 1999) et *Bacillus* sp. PN5 (Saxena *et al.*, 2006) qui exhibent une température optimale de 75-80°C et 90°C respectivement

### 9.5.2. Effet du pH sur l'activité amylolytique

La figure 17 montre l'effet du pH sur l'activité spécifique de l'enzyme à 80°C. L'enzyme est active dans une large gamme de pH allant de 5 à 9 et possède une activité optimale à pH 6.

Les  $\alpha$ - amylases issues d'Archaea hyperthermophiles sont généralement actives dans une large gamme de pH, de 3,5 à 9. Leur pH optimal d'activité est généralement situé entre 5 et 6, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans la présente étude.



**Figure 31 :** Effet du pH sur l'activité relative de l'amylase

La saccharification de l'amidon liquéfié est réalisée à des valeurs de pH acide. Les amylases thermostables disponibles ne sont pas stables dans ces conditions de pH. Ce procédé sera plus économique avec l'utilisation des amylases stables dans l'étape de saccharification (Haki et Rakshit, 2003).

### 9.5.3. Effet de l'EDTA

L'effet de l'EDTA est testé en ajoutant aux mélanges réactionnels 0,1 ml avec des concentrations allant de 1 à 5 mM. Les tests d'activité montrent que l'EDTA ne montre aucun effet sur l'activité enzymatique ce qui signifie que l'enzyme n'est pas de nature métalloprotéique.

Chung *et al.* (1995) n'ont obtenu aucune perte d'activité pour l' $\alpha$ -amylase de *Thermococcus profundus*, après dialyse de leur échantillon contre un tampon contenant de l'EDTA (1mM). Il en est de même pour celle de *Pyrococcus sp.* KOD1 et pour l'enzyme extracellulaire de *P. furiosus* après dialyse contre de l'EDTA (10mM).

Cependant, une inhibition très importante a été observée pour l' $\alpha$ -amylase intracellulaire de la bactérie hyperthermophile *Thermotoga maritima* MSB8. Une faible concentration de l'EDTA de 100  $\mu$ M inhibe complètement l'activité enzymatique, mais cette activité peut être restaurée par l'addition des ions métalliques (Ballschmiter, 2006).

### 9.5.4. Effet des ions métalliques

Après l'addition des ions métalliques (1mM) aux mélanges réactionnels, l'enzyme est testée pour son activité et les résultats sont rapportés dans la figure 32.

Les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique. Une faible inhibition est observée pour les ions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Une inhibition importante de l'activité enzymatique est aussi observée pour les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  avec un pourcentage de 51,67% et 34,38% respectivement. Alors que  $\text{Ca}^{2+}$  stimule l'activité enzymatique de 13,53%.

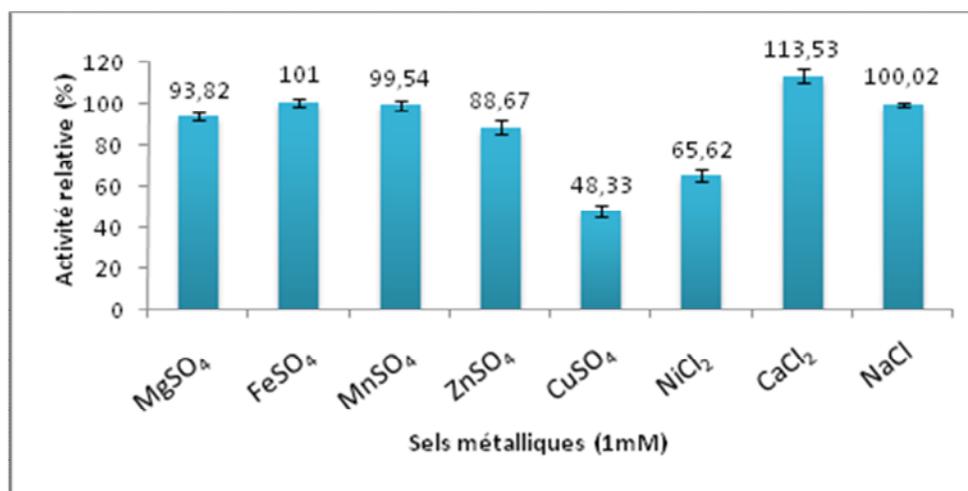


Figure 32 : Effet des ions métalliques sur l'activité relative de l'amylase

Les amylases sont généralement des métalloprotéines qui nécessitent la présence de calcium pour leur activité. Les amylases archéennes semblent, quant à elles, actives même en absence de cet ion, bien que le  $\text{Ca}^{2+}$  présente souvent un effet activateur ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans cette étude.

Une étude sur l' $\alpha$ -amylase de *T. profundus* rapporte que L'ion  $\text{Hg}^{2+}$  inhibe complètement l'activité de l'enzyme et les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (à la concentration de 1mM) réduisent pratiquement, de moitié cette activité. Une faible activation a été obtenue en présence de calcium et de magnésium, tandis que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  n'ont eu aucune répercussion sur l'activité enzymatique.

L' $\alpha$ -amylase de la souche *S. solfataricus* est, quand à elle, inhibée par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  et, à un degré moindre, par les ions  $\text{Mn}^{2+}$ . Aucune activation n'a été obtenue en présence de calcium ou d'autres ions (Ballschmiter, 2006).

L'effet inhibiteur de l'EDTA sur l' $\alpha$ -amylase de *Thermotoga maritima* MSB8 est inversé par l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ . Cependant l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  seuls, provoque une diminution de l'activité enzymatique et une longue incubation en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  avait même un effet déstabilisant de la protéine. Par contre, le  $\text{Ca}^{2+}$  augmente considérablement l'activité de l' $\alpha$ -amylase extracellulaire de *T. maritima* et augmente la thermostabilité de l'autre  $\alpha$ -amylase intracellulaire (Ballschmiter, 2006).

### 9.5.5. Mesure de la thermostabilité

Après incubation de l'amylase à 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, nous avons mesuré l'activité relative de l'enzyme et les temps de demi-vie.

A la température de 70°C l'enzyme garde une activité stable et présente des temps de demi-vie de 57 minutes et 2h et 54 minutes à 90°C et 80°C respectivement (figure 33).

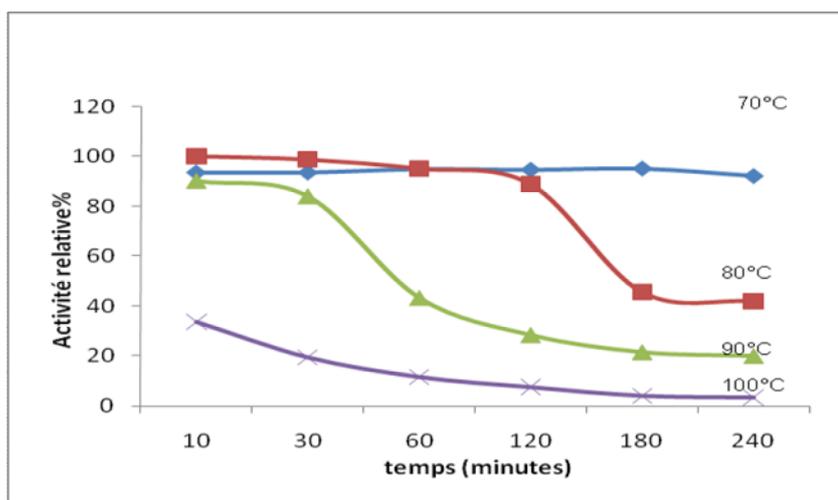


Figure 33 : Thermostabilité de l'enzyme

Ces résultats montrent que cette enzyme est plus thermostable que certaines amylases produites par des bactéries et même par certains Archaea hyperthermophiles.

Cependant, il existe des amylases beaucoup plus thermostables. Les deux amylases extracellulaires purifiées à partir de *T. profundus* et *P. woesei* sont extrêmement thermophiles (avec une activité optimale à 100 et 80°C, respectivement). Les temps de demi vie de ces enzymes sont 4 et 3 heures, respectivement, pour chaque température optimale de l'activité enzymatique.

L'amylase de *Bacillus* sp. PN5 est fortement thermostable elle exhibe 65% de son activité à 105°C et une activité résiduelle de 100% à la température comprise entre 80 et 100°C pendant une heure. Une Thermostabilité pendant 4 h à 100 °C a été rapportée pour l' $\alpha$ -amylase de *B. licheniformis* CUMC 305 (Krishnan et Chandra, 1983). Teodoro et Martins (2000), ont rapporté que l'amylase de *Bacillus* sp. garde 100% d'activité à 90°C pendant 1 heure, alors que, Yang *et al.* (2004) ont observé 100% d'activité à 85°C pendant 2 heures pour *P. furiosus*.

# *Conclusion*

Dans la présente étude, trois souches hyperthermophiles ont été isolées à partir de trois stations hydrothermales algériennes, Hammam El-Bibane dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj, Hammam Sillal et Hammam Kiria dans la wilaya de Bejaia. Les résultats des tests d'identification basés sur les caractères physiologiques et biochimiques indiquent que les souches pourraient appartenir à l'ordre des *Thermococcales*.

Dans le but de mettre en évidence des amylases extracellulaires, ces souches ont fait l'objet de tests d'activités enzymatiques par évaluation de leur pouvoir d'hydrolyser l'amidon suivant la méthode de dosage des sucres réducteurs par le DNS.

La souche HB isolée à partir de Hammam El-Bibane possède une meilleure activité amylolytique avec une activité spécifique de 3,87 U/mg.

L'étude de la cinétique de production des amylases par les trois souches HB, HT et HA indique que ces métabolites sont synthétisés au cours de la phase Exponentielle de croissance.

L'extraction d'une amylase extracellulaire à partir de 4 litres du milieu de culture de la souche HB a été réalisée par récupération du surnageant de culture qui est concentré à 100 ml. L'activité spécifique du surnageant est de 4,5U/mg.

La précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation suivie par une dialyse a permis de multiplier l'activité du surnageant par un facteur de 1,47

La chromatographie sur gel de filtration séphadex G25 permet de dessaler l'extrait enzymatique et augmente l'activité spécifique de l'enzyme de 0,23 U/mg par rapport à celle du dialysat.

La chromatographie sur DEAE cellulose a permis d'amplifier le degré de purification de l'enzyme et multiplie son activité spécifique par un facteur de 8,11.

La chromatographie d'exclusion sur séphadex G75 indique que l'activité amylasique forme un seul pic qui se trouve entre la fraction et 24 et 51.

L'activité spécifique a augmenté d'un facteur de 21,16 et la quantité de protéines a diminué de 0,037mg à 0,002 mg)

A partir de la courbe d'étalonnage des marqueurs, Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé à environ 43,72 kDa.

L'effet de la température et du pH sur l'activité spécifique montre que l'enzyme se caractérise par une température optimale d'activité à 80°C et un pH optimum de 6. L'étude de la thermostabilité de l'enzyme indique qu'elle est thermostable et possède des temps de demi-vie de 57 minutes et 2,54 h à 90°C et 80°C respectivement.

Les ions métalliques  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique. Une faible inhibition est observée pour les ions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  inhibent considérablement l'activité enzymatique. Alors que  $\text{Ca}^{2+}$  stimule légèrement l'activité enzymatique. L'addition de l'EDTA n'a aucun effet sur l'enzyme.

Enfin, il serait souhaitable :

- De caractériser les souches isolées par l'analyse de l'ARN ribosomique 16S afin de les affilier aux espèces correspondantes.
- Compléter la purification de l'enzyme avec d'autres techniques notamment l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS PAGE).
- Pour une application industrielle de l'enzyme, il existe deux stratégies :
  - La production de l'enzyme peut être optimisée par l'amélioration de la production de la biomasse de la souche par l'optimisation de la composition du milieu et les procédés de fermentation.
  - Le gène codant pour l'enzyme peut être cloné et exprimé dans un hôte mésophile comme *E. coli* pour augmenter la production et faciliter la purification de l'enzyme par dénaturation des protéines de l'hôte par un simple traitement thermique.

*Références  
bibliographiques*

- Alsop E., Silver M. et Livesay D.R. (2003).** Optimized electrostatic surfaces parallel increased thermostability: a structural bioinformatic analysis. *Protein Eng*, **16**:871-874.
- Allers T. et Mevarech M. (2005).** Archaeal genetics -the third way. *Genetics*, **6**: 58-73.
- Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R. et Wolfe W.S. (1979).** Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, **43**:260-296
- Ballschmiter M., Fütterer O., et Liebl W. (2006).** Identification and Characterization of a Novel Intracellular Alkaline  $\alpha$ -Amylase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol*, **72**: 2206-2211.
- Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., and Pace N.R. (1996).** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**: 9188-9193.
- Baross J.A. et Holden J.F. (1996).** Overview of hyperthermophiles and their Heat – shock proteins. In advances and in protein chemistry, volume 48. Enzymes and proteins from hyperthermophilic microorganisms. *Ed. Academic press*. pp. 1-27
- Bernfeld P., (1955).** Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ , In: Methods in Enzymology. 1. (Colowick S.P., Kaplan N.O., eds.), Academic Press, New York , 149-150
- Bertoldo C. et Antranikian G. (2001).** Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Method Enzymol*, **330**: 269-289.
- Bertoldo C. et Antranikian G. (2002).** Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**: 151-160
- Boudsocq F., Iwai S., Hanaoka F., et Woodgate R. (2001).** *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic poleta. *Nucleic Acids Res*, **29**: 4607-4616.
- Bradford M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-54.
- Brown S. H., Costantino H. R. et Kelly R. M. (1990).** Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1985-1991

- Brown S. H. et Kelly R.M. (1993).** Characterization of amylolytic enzymes, having both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl Environ Microbiol*, **59**: 2614-2621.
- Burggraf S., Huber H., et Stetter, K.O. (1997).** Reclassification of the crenarchael orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **47**: 657-660.
- Cambon-Bonavita M. A., Lesongeur F., Pignet P., Wery N., Lambert C., Godfroy A., Quérellou J. et Barbier G. (2003).** Extremophiles, Thermophily section, species description *Thermococcus atlanticus* sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles*, **7**:101-109
- Canganella F. et Jones W.J. (1994).** Microbial characterization of thermophilic archaea isolated from the Guaymas basin hydrothermal vent. *Curr Microbiol*, **28**:299-306
- Chakravarty S. et Varadarajan R. (2000).** Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS*, **470**: 65-69
- Charlier D. et Droogmans L. (2005).** Visions & Reflections Microbial Life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**: 2974-2984
- Chung Y.C., Kobayashi T., Kanai H., Akiba T. et Kudo T. (1995).** Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**:1502-1506
- Costantino, H. R., S. H. Brown, and R. M. Kelly. (1990).** Purification and characterization of an alpha-glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C. *J. Bacteriol*, **172**:3654-3660.
- Cowan D.A. (2004).** The upper temperature for life - where do we draw the line. *Trends Microbiol* **12**: 58-60.
- Crabb W.D. et Mitchinson C. (1997).** Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol*, **15**: 349-352.
- Crabb W.D. et Shetty J.K. (1999).** Commodity scale production of sugars from starches. *Curr. Opin. Microbiol*, **2**: 252-256.
- Daniel R. M. et Cowan D. A. (2000).** Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**: 250-264
- Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy C.S. (2001).** Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**:144-151.

- de Long E.F. et Pace N.R. (2001).** Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol*, **50**: 470-478.
- de Vos W.M., Kengen S.W. M., Voorhorst W. G. B. et van der Oost J. (1998).** sugar utilisation and its control in hyperthermophiles. *Extremophiles*, **2**: 201-205.
- Eichler J. (2001).** Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances* **19**: 261-278
- Eijsink V.G., Vriend G., Van der Zee J.R., Van den Burg B. et Venema G. (1992).** Increasing the thermostability of the neutral proteinase of *Bacillus stearotherophilus* by improvement of internal hydrogen-bonding. *Biochem. J.*, **285**: 625-628.
- Erauso M., Raysenbach A.L., Godfroy A., Meunier J.R., Crump B., Partensky F., Baross A., Marteinsson V., Barbier G., Pace N.R., Prieur D. (1993) .** *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **160 (5)**: 338-349
- Facchiano A.M., Colonna G., Ragone R. (1998).** Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study. *Protein Eng*, **11**:753-760.
- Fiala G., Stetter K.O. (1986).** *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C. *Arch. Microbiol* **145**: 56-61
- Forood B, Feliciano EJ, Nambiar KP. (1993).** Stabilization of  $\alpha$ -helical structures in short peptides via end capping. *Proc Natl Acad Sci*, **90**:838-42.
- Godfroy A., Lesongeur F., Raguénès G., Quérellou J., Antoine E., Meunier J.R., Guezennec J. et Barbier G. (1997).** *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47(3)**: 622-627
- Godfroy A., Meunier J.R., Guezennec J., Lesongeur F., Raguénès G., Rimbault A. et Barbier G. (1996).** *Thermococcus fumicolans* sp. nov., a New hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the North Fiji Basin. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **46**:1113-1119
- González J. M., Sheckells D., Krupatkin M.V. D., Borges K. M. et Robb F.T. (1999).** *Thermococcus waiotapuensis* sp. nov., an extremely thermophilic archaeon isolated from a freshwater hot spring. *Arch. Microbiol.* **172**: 95-101
- Grote R., Li L., Tamoka J., Horikoshi K. et Antranikian G. (1999).** *Thermococcus siculi* sp. Nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent and the Mid-Okinawa Trough. *Extremophiles*, **3**: 55-62

- Hakamada Y., Hatada Y., Ozawa T., Ozaki K., Kobayashi T., Ito S. (2001).** Identification of thermostabilizing residues in a *Bacillus* alkaline cellulase by construction of chimeras from mesophilic and thermostable enzymes and sitedirected mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett*, **195**:67-72.
- Haki G.D., Rakshit S.K. (2003).** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, **89**: 17-34.
- Henneke G., Flament D., Hübscher U., Querellou, J., et Raffin J.P. (2005).** The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *J. Mol. Biol*, **350**: 53-64
- Henrissat B. (1991).** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarity. *Biochem. J.* **280**: 309-316
- Henrissat B. (1998).** Glycosidase families. *Biochem. Soc. Trans*, **26**:153-156
- Hickey A. J., Conway de Macario E. et Macario A. J. L. (2002).** Transcription in the Archaea: Basal Factors, Regulation, and Stress-Gene Expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **37(6)**:537-599
- Huber H. et Stetter K. O. (1998).** Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, **64**: 39-52
- Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., et Stetter K.O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**: 63-67.
- Huber H., Hohn M.J., Stetter K.O., et Rachel, R. (2003).** The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res. Microbiol*, **154**: 165-171.
- Huber R., Huber H. et Stetter K.O. (2000).** Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol Rev*, **24**: 615-623.
- Ishino Y., Komori K., Cann I.K., et Koga Y. (1998).** A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J. Bacteriol*, **180**: 2232-2236.
- Kamoun P., (1987).** Méthodes chromatographiques, méthodes électrophorétiques et électrochimiques: appareil et méthodes en biochimie. Ed. médecine-science, Flammarion. pp. 176-217.
- Kashefi K. et Lovley D. R. (2003).** Extending the upper temperature limit for life. *Science*, **301**: 934.

- Katsuya Y., Mezaki Y., Kubota M. et Matsuura Y. (1998).** hreedimensionalstructure of Pseudomonas isoamylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol*, **281**:885-897.
- Kecha M., Benallaoua S., Jean P. T., Bonaly R., Duchiron F. (2006).** Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles*, **11** :65-73
- Klages K.U., Morgan H.W. (1994).** Characterization of an extremely thermophilic sulfur metabolizing archaeobacterium belonging to the Thermococcales. *Arch Microbiol*, **162**: 261-266
- Kobayashi T., Kwak Y.S., Akiba T., Kudo T., Horikoshi K. (1994).** *Thermococcus profundus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeum isolated from a deep-sea hydrohermal vent. *Syst. Appl. Microbiol*, **17**:232–236
- Koch R., Spreinat K., Lemke K. et Antranikian G. (1991).** Purification and properties of a hyperthermoactive  $\alpha$ -amylase from the archaeobaterium *Pyrococcus woesei*. *Arch. Microbiol*, **155**: 572-578.
- Krishnan, T. et Chandra, A. K. (1983).** Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from Bacillus licheniformis CUMC 305. *Appl. Environ. Microbiol*, **46**: 430-437.
- Kumar S., Tsai C.J., Nussinov R. (2000).** Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng*, **13**: 179-191
- Kwak Y.S., Akiba T. et Kudo T. (1998).** Purification and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundhs*, Which Hydrolyzes Both  $\alpha$ -1, 4 and  $\alpha$ -1, 6 Glucosidic Linkages. *Journal of Fermentation And Bioengineering*, **86 (4)**: 363-367.
- Labes A. et Schönheit P. (2001).** Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: starch degradation to acetate and CO<sub>2</sub> via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming). *Arch. Microbiol*, **176**: 329-338.
- Laderman K. A., Davis B. R., Krutzsch H. C., Lewis M. S., Griko Y. V., Privalov P. L. et Anfinen C. B. (1993).** The purification and characterization of an extremely thermostable a-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, **268**:24394-24401.
- Lawson C.L., van Montfort R., Strokopytov B., Rozeboom H.J., Rozeboom,K.H. Kalk, de Vries G.E., Penninga D., Dijkhuizen L. et Dijkstra B.W. (1994).** Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol.Biol*, **236**: 590-600.

- Legin E., Ladrat C., Godfroy A., Barbier G., Duchiron F. (1997).** Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganism from deep-sea hydrothermal vents. *C.R. Acad. Sci. Paris, sciences de la vie / life sciences* **320**: 893-898
- Lemoine G., Lechminger A.L., et Nelson D.L., (1968).** Principe de biochimie. Ed. *médecine sciences, Flammarion*. pp. 160-180
- Lepage E., Marguet E., Geslin C., Matte-Tailliez O., Zillig W., Forterre P. et Tailliez P. (2004).** Molecular Diversity of New *Thermococcales* isolates from a single area of hydrothermal deep-sea vents as revealed by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and 16s rRNA gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **70 (03)**: 1277-1286
- Lévêque E., Haye B. et Belarbi A. (2000).** L'amidon et ses dérivés - Applications Industrielles Ed. *Elsevier*. pp.
- Li W.F., Zhou X.X. et P. Lu. (2005).** Structural features of thermozyms. *Biotechnology Advances*, **23**:271-281
- MacGregor E. A., Janecek S., Svensson B. (2001).** Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1546** : 1-20
- Mamo G., Gashe B.A. et Gessesse A. (1999).** A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. *J. Appl. Microbiol*, **86**:557-560.
- Matsuura Y., Kusunoki M., Harada W., Kakudo M. (1984).** Structure and possible catalytic residues of Taka amylase A. *J. Biochem*, **95**:697-702.
- Muralikrishna G. et Nirmala M. (2005).** Cereal  $\alpha$ -amylases-an overview. *Elsevier*, **60**:163-173.
- Myllykallio H., et Forterre P. (2000).** Mapping of a chromosome replication origin in an archaeon: response. *Trends Microbiol*, **8**: 537-539.
- Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M. et Antranikian G. (1999).** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **51**: 711-729.
- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ito S. et Miki K. (2003).** Crystal Structure of Calcium-free  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus* sp. Strain KSM-K38 (AmyK38) and Its Sodium Ion Binding Sites. *The journal of biological chemistry*, **278**: 24818-24824
- Oliver O., Thomm M. (2000).** A simplified method for the cultivation of extreme anaerobic archaea based on the use of sodium sulfite as reducing agent. *Extremophiles*, **4**:247-252

- Ouhammouch M. (2004).** Transcriptional regulation in Archaea. *Current Opinion in Genetics & Development*, **14**: 133-138
- Pace C. N. (1992).** Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J. Mol. Biol.*, **226**:29-35.
- Radfar R., Leaphart A., Brewer J.M., Minor W., Odom J.D., Dunlap R.B., et al. (2000)** Cation binding and thermostability of FTHFS monovalent cation binding sites and thermostability of N10-formyltetrahydrofolate synthetase from *Moorella thermoacetica*. *Biochemist*, **39**:14481-14486.
- Reddy N. S., Nimmagadda A. et Sambasiva Rao K. R. S. (2003).** An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. *Minireview African Journal of Biotechnology*, **2 (12)**: 645-648.
- Reeve N. J. (2003).** Archaeal chromatin and transcription. *Molecular Microbiology*, **48 (3)**: 587-598
- Rinker K. D. et Kelly R. M. (1996).** Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4478–4485
- Robinson N.P., Dionne I., Lundgren M., Marsh V.L., Bernander R., et Bell S.D. (2004).** Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell*, **116**: 25-38.
- Ronimus R.S., Reysenbach A.L., Musgrave D.R., Morgan H.W. (1997).** The phylogenetic position of the *Thermococcus* isolate AN1 based on 16S rRNA gene sequence analysis: a proposal that AN1 represents a new species, *Thermococcus zilligii* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **168** :245-248
- Sadeghi M., Naderi-Manesh H., Zarrabi M., Ranjbar B. (2006).** Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophys Chem*, **119**: 256-270
- Sakuraba H. et Ohshima T. (2002).** Novel energy metabolism in hyperthermophilic Archaea: a modified Embden-Meyerhof pathway. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93**: 441-448.
- Sakuraba H., Goda S. et Ohshima T. (2004).** Unique Sugar Metabolism and Novel Enzymes of Hyperthermophilic Archaea. *The Japan Chemical Journal Forum and Wiley Periodicals, Inc. The Chemical Record*, **3**: 281-287.
- Saxena R. K., Dutt K, Agarwal L., Nayyar P. (2006).** A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, **98**: 260-265

- Selig M., Xavier K., B. SantosH., Schönheit P. (1997).** Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*, *Arch. Microbiol*, **167**: 217-232.
- Siebers B. et Schönheit P. (2005).** Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, **8**:695-705.
- Sine J.P. (2003).** Séparation et analyse des biomolécules; méthodes physicochimiques Biochimie-Biologie ; cours et exercices. Ed. Ellipses. pp. 70-89
- Sivaramakrishnan S., GangadharanD.,NampoothiriK.M., Soccol C.R. et Pandey A. (2006).**  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources. *Food Technol. Biotechnol*, **44 (2)**: 173-184
- Stetter K. O. (1996).** Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiology*, **18**: 149-158.
- Stetter. K. O. (1999).** Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, **452**: 22-25.
- Stetter. K. O. (2006).** History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles*, **10**: 357-362.
- Stryer L. (1995).** La biochimie de Luber Stryer. Ed. médecine-science, Flammarion. pp. 45-71
- Suvd D., Fujimoto Z., Takase K., Matsumura M. et Mizuno H. (2001).**Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* amylase:possible factors determining the thermostability. *J Biochem*, **129**: 46-468.
- Tachibana Y., Kuramura A., Shirasaka N., Suzuki Y., Yamamoto T., Fujiwara S., Takagi M., Imanaka T. (1999).** Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomalto-dextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp. *Appl Environ Microbiol*, **65**:1991-1997.
- Teodoro, C.E.D., Martins, M.L.L. (2000).** Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol*, **31**:298-302.
- Terui Y., Ohnuma M., Hiraga K., Kawashima F. et Oshima, T. (2005).** Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem. J.*, **388**: 427-433
- Uemori T., Sato Y., Kato I., Doi H., et Ishino Y. (1997).** A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells*, **2**: 499 - 512.

- van der Maarel M.J.E.C., van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L. (2002).** Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol*, **94**: 137-155.
- Vieille C. et Zeikus G.J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**: 1-43.
- Vogt G., Woell S. et Argos P. (1997)** Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol. Biol*, **269**: 631-643.
- Wilson K. et Walker J., (1994).** Principals and techniques of practical biochemistry: Ed. 4. Cambridge, University Oxford. pp. 498-504
- Woese C.R., Kandler O. et Wheelis M. (1990).** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:4576-4579.
- Yang S.J., Lee H.S., Park C.S., Kim Y.R., Moon T.W., et Park K.H. (2004).** Enzymatic analysis of an amylolytic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* reveals its novel catalytic properties as both an  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$  cyclodextrin hydrolyzing enzyme. *Appl. Environ. Microbiol*, **70**: 5988-5995.
- Zhou X.X., Wang Y. B., Pan Y. J. et Li W. F. (2007).** Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids*.

# *Annexes*

## Annexe 1

### ▪ Composition du milieu de culture

KCl.....	0,330g
MgCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O.....	2,700g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O.....	3,400g
NH <sub>4</sub> Cl.....	0,250g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O.....	0,140g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,140g
NaHCO <sub>3</sub> .....	1,000g
NaCl.....	18,000g
Résazurine.....	0,001g
Cysteine-HCl x H <sub>2</sub> O.....	0,500g
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O.....	0,500g
Extrait de levure.....	1,000g
Peptone.....	1,000g
Soufre.....	5,000g
Eau distillée.....	980,000ml

Préparer le milieu de culture sans NaHCO<sub>3</sub>, Cystéine-HCl x H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>S x 9H<sub>2</sub>O.

Mettre le milieu à ébullition ensuite, refroidir. Ajouter le NaHCO<sub>3</sub> au milieu refroidi et ajuster le pH à 7,2

Stériliser le milieu à 100°C pendant 3 heures et 3 jours consécutifs.

Réduire le milieu par addition de 10% Cystéine-HCl x H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>S x 9H<sub>2</sub>O en solutions stériles.

### ▪ Dialyse (Lemoine et *al.*, 1968)

#### Traitement des boudins de dialyse

- plonger le boudin dans une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5%);
- chauffer à 40°C pendant 15mn;
- rincer abondamment à l'eau distillée;
- tromper dans une solution d'EDTA (0,05%) tamponnée à pH5;
- laver abondamment à l'eau distillée;
- conserver dans une solution d'EDTA (0,05%) tamponnée à pH5.



---

- **Dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS**

**Préparation du réactif DNS**

- dissolution de 1g d'acide 3,5-dinitrosalicylique dans 20ml de soude (2M) et 50ml d'eau
- addition de 30g de tartrate double de sodium, potassium avant ajustement du volume à 100ml
- agitation du réactif avec un barreau aimanté, plusieurs heures, à l'obscurité
- conservation du réactif à l'abri de la lumière.

- **Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

0,1ml d'échantillon, ajouter 1ml du réactif de bleu de Coomassie G250, agiter par vortex

Lire l'absorbance à 595nm

**Solution du bleu de Coomassie G250**

Bleu de Coomassie G250..... 10mg  
Ethanol (95%) .....5ml  
Acide phosphorique (85%) ..... 10ml  
Eau distillée..... 100ml

## Annexe 2

## Courbes d'étalonnage

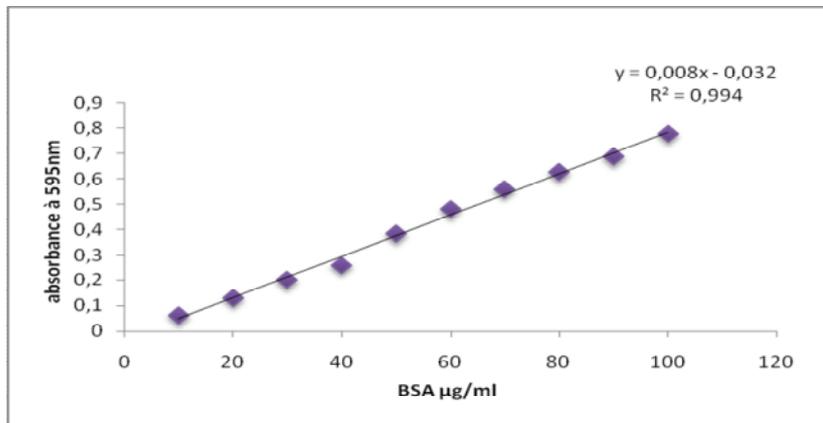


Figure1 : courbe d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéines

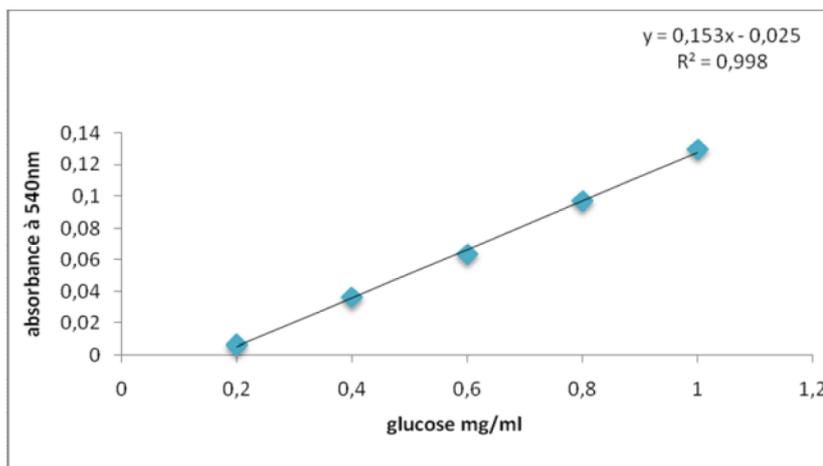


Figure2 : Courbe d'étalonnage du glucose

## Résumé

Des souches hyperthermophiles se développant au delà de 60°C ont été isolées à partir de trois sources hydrothermales algériennes, Hammam El-Bibane dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj, Hammam Sillal et Hammam Kiria dans la wilaya de Bejaia. Les résultats des tests d'identification basés sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques indiquent que les souches semblent appartenir aux archaea hyperthermophiles. Les souches ont été criblées pour leur activité amylolytiques. La souche sélectionnée (HB) a été utilisée pour produire une amylase thermostable.

Une amylase extracellulaire a été extraite à partir de 4 litres du milieu de culture inoculé par la souche (HB). La purification de cette enzyme a été réalisée par une précipitation au sulfate d'ammonium, une désionisation sur séphadex, G-25, une chromatographie échangeuse d'anion sur DEAE-cellulose et une chromatographie sur séphadex G-75. Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé à environ 43,72 kDa sur colonne chromatographique de type gel filtration G-75.

L'effet de la température et du pH sur l'activité spécifique indique que l'enzyme se caractérise par une température optimale d'activité à 80°C et un pH optimum de 6. L'étude de la thermostabilité de l'enzyme indique qu'elle est thermostable et possède des temps de demi-vie de 57 minutes et 2,54 h à 90°C et 80°C, respectivement. Les ions  $Ca^{2+}$  stimulent légèrement l'activité enzymatique et L'addition de l'EDTA n'a aucun effet sur l'enzyme.

**Mots clés:** hyperthermophiles, amylase thermostable, purification, thermostabilité.

## Summary

Hyperthermophilic strains developing with beyond 60°C were isolated from three algerian hydrothermal sources, Hammam El-Bibane in the wilaya of Bordj Bou Arreridj, Hammam Sillal and Hammam Kiria in the wilaya of Bejaia. Test results of identification based on morphological, physiological and biochemical characters indicate that these strains seem to belong to the hyperthermophilic archaea. The strains were screened for their amylolytic activity. The selected strain (HB) was used to produce a thermostable amylase.

An extracellular amylase was extracted starting from 4 liters of the culture medium inoculated by (HB) strain. The purification of this enzyme was carried out by a precipitation with the sulphate of ammonia, a deionization on séphadex G-25, an anion exchange chromatography with DEAE-cellulose and chromatography on séphadex G-75. The molecular weight of the enzyme was estimated at approximately 43.72 kDa on chromatographic column G-75 gel filtration.

The effect of the temperature and the pH on the specific activity indicates that the enzyme is characterized by an optimal temperature of activity at 80°C and an optimum pH of 6. The study of the thermostability of the enzyme indicates that it is thermostable and has times half-life of 57 minutes and 2.54h at 90°C and 80°C, respectively. The  $Ca^{2+}$  ions stimulate slightly enzyme activity and the addition of the EDTA does not have any effect on the enzyme.

**Key words:** hyperthermophiles, thermostable amylase, purification, thermostability

## ملخص:

تم استخلاص سلالات مجهرية محبة للحرارة قادرة على النمو في درجة حرارة تفوق 60°C من ثلاثة منابع للمياه المعدنية، حمام البيان في ولاية برج بوعرريج، حمام سلال و كيريا في ولاية بجاية. نتائج دراسة الخصائص المورفولوجية، الفيزيولوجية والبيوكيميائية تشير إلى أن هذه السلالات يمكن أن تصنف ضمن الكائنات المجهرية المحبة للحرارة *archaea Hyperthermophiles*. وقد تم فحص هذه السلالات لقابليتها لهدم النشاء. السلالة (HB) اختيرت لإنتاج أميلاز مستقرة حراريا.

تم استخلاص أميلاز من خلال 4 لترات من الوسط المعيشي الذي لفق بالسلالة (HB). عملية تنقية هذا الأنزيم تمت بواسطة الترسيب بسلفات الأمونيوم، استخلاص الأملاح بواسطة هلام سيفادكس G-25 كروماتوغرافيا تبادل الشوارد السالبة على DEAE-سيلولوز وكروماتوغرافيا على هلام سيفادكس G-75. الوزن الجزيئي للأنزيم قدرت بـ 43,72 kDa بواسطة كروماتوغرافيا على هلام الترشيح G-75. تأثير درجة الحرارة و pH على الفعالية النوعية يشير إلى أن الأنزيم يتميز بفعالية أعظمية عند درجة الحرارة 80°C و pH 6. دراسة الاستقرار الحراري للأنزيم تبين على أنها مستقرة حراريا وتتميز بأزمنة النصف حياتية 57 د و 2,54 س عند 90°C و 80°C على التوالي. إن إضافة شوارد  $Ca^{2+}$  تنشط قليلا فعالية الأنزيم وإضافة EDTA لم يكن له أي تأثير على الأنزيم.

**كلمات المفتاح:** كائنات محبة للحرارة، أميلاز مستقرة حراريا، التنقية، الاستقرار الحراري.