

République Algérienne Démocratique et Populaire

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID
TLEMCEM

Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THESE

Présentée par

Klouche Nihel épouse Khelil

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Caractérisation de deux nouvelles souches bactériennes isolées d'un
aquifère profond**

Devant le jury :

Président	M^r AMRANI	<i>Maître de conférence, Directeur de laboratoire à l'université de Tlemcen</i>
Directeur de thèse	M^r HACENE HOCINE	<i>Professeur à l'USTHB Alger</i>
Co-directrice	M^{me} MARIE-LAURE FARDEAU	<i>Maître de conférence, Chargée de recherche IRD à Marseille</i>
Examinatrice	M^{me} FORTAZ F.	<i>Professeur à l'université Sénia Oran</i>
Examineur	M^r KARAM N.E.	<i>Professeur à l'université Sénia Oran</i>
Examineur	M^r BENYOUCEF M.	<i>Professeur à l'hôpital de Tlemcen</i>

« Quel que soit le critère auquel on se réfère, les bactéries furent dès le début, sont aujourd'hui et resteront les organismes les plus réussis de la Terre »

S.J. Gould (1977), « L'éventail du vivant », Ed. du Seuil, ISBN 2-02-04093, p55.

*A feu mon père
Pr Klouche Abdelhamid*

*A ma mère Salima
A mes frères et soeurs
en particulier Lamia*

*en témoignage de mon
affection et de
ma reconnaissance*

*A Hami
en témoignage de
mon amour*

*A Moulka et Hassan
mes enfants chéris.*

Remerciements

Ce travail a été réalisé à Marseille dans le laboratoire IRD de microbiologie des anaérobies de l'Université de Provence.

Les recherches qui font l'objet de cette thèse ont été effectuées grâce à la générosité scientifique de Mr Bernard Ollivier et Mme Marie-Laure Fardeau.

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mes plus sincères remerciements pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de leur laboratoire.

Je tiens également à remercier chaleureusement Mme Marie-Laure Fardeau maître de conférence, chargée de recherches à l'IRD Marseille université Marseille Provence, Mr Hacene Hocine professeur à l'université Bab El Zouar Alger, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail comme rapporteurs.

Je tiens tout particulièrement à exprimer toute ma reconnaissance à Marie-Laure pour sa compétence, son aide de tous les instants et de son encadrement dans le domaine de l'anaérobiose.

Je remercie également Mr Amrani, Maître de conférence à l'université Aboubekr Belkaid Tlemcen, directeur du laboratoire d'écologie et de gestion des écosystèmes, faculté des sciences, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury.

Je remercie Mme Fortas Z. Professeur à l'université Senia Oran, de me faire l'honneur d'accepter de juger mon travail.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Mr Karam N.E. Professeur à l'université Senia d'Oran, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie également Monsieur Benyoucef Mohamed, Professeur au CHU de Tlemcen pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger.

Enfin je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Bernard Ollivier, directeur des recherches à l'IRD pour sa gentillesse, son hospitalité au sein du laboratoire et de m'avoir fait profiter de sa grande compétence dans le domaine de l'anaérobiose.

Mes sincères remerciements s'adressent également à :

- toutes les personnes du laboratoire IRD (Institut de Recherche et de Développement) de Marseille, qui directement ou indirectement ont participé à l'aboutissement de ce travail par leurs conseils, leur complicité : Bernard, Jean, Jean Luc, Cayol, Frédérique.
- Ainsi que toutes les personnes du laboratoire d'écologie et gestion d'écosystèmes qui m'ont soutenus tout au long de cette thèse notamment mon chef d'équipe Dr Nacera Gaouar, Pr Bouazza l'ex directeur du laboratoire et enfin Dr Amrani pour sa gentillesse et sa bonne humeur.
- Ainsi qu'à tous mes amis : Kheira, Lotfi et Choukri.

Sommaire

Introduction générale

Chapitre I : revue bibliographique

Partie 1 : Ecologie microbienne des environnements souterrains

1- La biosphère souterraine	3
1-1 Généralités : les aquifères	5
2- Les bactéries les plus souvent isolées dans les eaux souterraines	7
2-1 Les bactéries sulfato-réductrices	12
2-2 Les bactéries méthanogènes	25
2-3 Les bactéries acétogènes	27
2-4 Clostridium	28
3- Echantillonnage des eaux souterraines	31

Partie 2 : Les méthodes de dénombrement et d'identification des bactéries

1- Les méthodes classiques de microbiologie	35
1-1 Méthodes de numération	35
1-1-1 numération totale	35
1-1-2 numération des cellules viables	35
1-1-3 Comptage par épifluorescence	36
1-2 Méthodes quantitatives	36
1-2-1 Mesure directe de la masse bactérienne exprimée uniquement en « poids sec »	36
1-2-2 Mesure des activités enzymatiques des bactéries	37
1-2-3 Mesure de la densité optique	37
1-3 Les cultures d'enrichissement et d'isolement des communautés bactériennes	37
1-3-1 L'enrichissement	37
1-3-2 L'isolement et identification	38
2- Les méthodes moléculaires d'analyse des communautés bactériennes	38
2-1 L'ARN ribosomique 16S	38
2-2 Les techniques moléculaires	42
2-2-1 Le clonage et le séquençage des gènes codant pour l'ARN _r 16S	42
2-2-2 RFLP	47
3- La taxonomie des procaryotes	49
3-1 Les différents rangs hiérarchiques	49
3-2 Les différentes approches taxonomiques	50
3-2-1 Taxonomie phénotypique	50
3-2-2 Taxonomie numérique	51
3-2-3 Chimiotaxonomie	52
3-2-4 Taxonomie moléculaire	52
3-3- Définition des groupes taxonomiques	56
3-3-1 Définition d'une espèce bactérienne	56
3-3-2 Définition d'un genre	56
3-3-3 Classification de la deuxième édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology	57

Chapitre II : Matériels et méthodes

1- Echantillonnage et conservation des échantillons	60
1-1 Le site d'étude	60

1-2 Echantillonnage et conservation des échantillons	61
2- Techniques culturales	62
2-1 Les milieux de culture anoxiques	62
2-2 Les roll-tubes	64
2-3 Composition des milieux de culture	65
2-3-1 Milieu de culture pour l'étude de la souche AS68	65
2-3-2 Milieu de culture pour l'étude de la souche AS36	65
2-4 Solutions utilisées pour les milieux de culture	66
2-4-1 Solution d'oligo-éléments de Balch et al (1979)	66
2-4-2 Solution d'oligo-éléments de Widdel	66
2-4-3 Solutions mères de sucres	66
2-4-4 Solutions mères d'acide organique	67
2-4-5 Solutions mères de protéines, peptides et dérivés peptidiques	67
3- Isolement des souches AS68 et AS36	67
3-1 Enrichissement et isolement des deux souches	67
3-2 Manipulation des souches de conservation	68
3-2-1 Manipulation des souches	68
3-2-2 Conservation des souches	69
4- Caractérisation phénotypique des souches AS68, AS36	70
4-1 Morphologie	70
4-1-1 Coloration de Gram	70
4-1-2 Microscope électronique à balayage	70
4-1-3 Coloration des flagelles par la méthode Rhodes	71
4-2 Physiologie	71
4-2-1 Température optimale de croissance	71
4-2-2 Influence de la concentration de NaCl	72
4-2-3 Effet du pH	72
4-2-4 Les accepteurs d'électrons	72
4-2-4-1 Etude de l'activité soufre-réductrice	73
4-2-4-1-1 Protocole	73
4-2-4-1-2 Dosage de Sulfures	74
4-2-4-2 Etude de l'activité Nitrato-réductrice	74
4-2-5 Dégradation des substrats	74
4-2-5-1 Dosage des produits du métabolisme	75
4-2-5-1-1 Chromatographie haute pression en phase liquide	75
4-2-6 Cytochrome et désulfovirdine	76
4-2-7 Recherche de formes sporulées	76
4-2-8 Test d'anaérobiose (Tolérance à l'oxygène)	77
4-2-9 Recherche de la résistance aux ATB	77
5- Techniques de biologie moléculaire	78
5-1 Détermination du G+C% de l'ADN génomique des souches AS38, AS36	78
5-2 Etude phylogénétique des souches AS68 et AS36	79
5-2-1 Extraction et purification de l'ADN génomique	79
5-2-2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et purification du fragment amplifié	79
5-2-3 Séquençage et analyse	80

Chapitre III : Résultats et discussion

1- Etude taxonomique de la souche AS68	83
1-1 Morphologie de la souche AS68	83
1-2 Conditions optimales de croissance	85

1-3 Les accepteurs d'électrons potentiellement utilisables	86
1-4 Caractéristiques métaboliques	86
1-4-1 Les substrats fermentescibles	86
1-4-2 Les exigences nutritionnelles	87
1-4-3 Résistance aux antibiotiques	87
1-5 Caractéristiques génétiques de AS68	88
1-5-1 Contenu en G+C% de l'ADN génomique	88
1-5-2 Phylogénie de la souche	88
1-6 Discussion	90
1-7 Description de <i>Geosporobacter subterraneus</i> , gen.nov, sp.nov.	92
2- Etude morphologique de la souche AS36	93
2-1 Morphologie de la souche	93
2-2 Conditions optimales de croissance	95
2-3 Les accepteurs d'électrons potentiellement utilisables	96
2-4 Caractéristiques métaboliques	97
2-4-1 Les substrats fermentescibles	97
2-4-2 Les exigences nutritionnelles	97
2-4-3 Cytochromes et désulfovirdine	98
2-5 Caractéristiques génétiques	98
2-5-1 Contenu en G+C% de l'ADN génomique	98
2-5-2 Phylogénie de la souche	98
2-6 Discussion	100
3- Discussion générale	102
Conclusion générale	105
Références bibliographiques	108

Résumé

L'étude des communautés de microorganismes des eaux souterraines et des aquifères profonds a longtemps été limitée par l'utilisation exclusive de méthodes culturales ne permettant d'accéder qu'à une partie restreinte de la diversité microbienne et la difficulté de la procédure d'échantillonnage pour l'obtention d'échantillons représentatifs.

Afin de dépasser ces deux restrictions, nous avons utilisé les approches culturales en combinaison avec des approches moléculaires pour étudier deux souches bactériennes issues d'un aquifère du bassin Parisien d'une part, d'autre part, la collecte des échantillons a été faite par l'équipe du Professeur Magot, faculté de Pau. Les approches ont consisté en une analyse phylogénétique des gènes codant pour l'ARNr16S et donc de déterminer le positionnement phylogénétique des deux souches isolées. L'étude réalisée à partir d'échantillons d'eau provenant d'un aquifère parisien a conduit à la description d'une nouvelle souche bactérienne appartenant à l'ordre des Clostridiales, à bas G+C % que nous avons nommé *Geosporobacter subterraneus* et l'identification d'une nouvelle espèce appartenant au genre *Desulfovibrio*. Ces deux genres sont retrouvés dans tels biotopes où ils sont impliqués dans les processus de sulfato-réduction. L'utilisation combinée de méthodes moléculaires et de méthodes culturales nous a permis de découvrir de nouvelles espèces bactériennes.

Introduction générale

Le concept de biosphère profonde est reconnu depuis peu de temps et les connaissances concernant les communautés microbiennes qui se développent dans les habitats profonds sont limitées. Le présent travail est dédié à la caractérisation de deux bactéries anaérobies isolées d'un aquifère profond à l'ouest de Paris, écosystème extrême considéré comme l'écologie microbienne des environnements profonds tels que les aquifères est un sujet d'étude peu commun notamment à cause de la complexité de l'échantillonnage et de l'obtention de prélèvements représentatifs qui nécessitent des technologies aseptiques et souvent très coûteuses.

En effet, ils constituent des écosystèmes complexes soumis à des contraintes physicochimiques extrêmes telles que l'absence d'oxygène ou des fluctuations de sources de nutriments, conditions particulièrement difficiles à simuler au laboratoire. Ainsi dans ces écosystèmes, un grand nombre de micro-organismes ont échappé à toute méthode de culture.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de mieux connaître les populations bactériennes et de mettre en évidence de nouvelles souches bactériennes. Les technologies mises en œuvre, dans notre étude pour définir le positionnement phylogénétique des deux isolats.

Nous soulignons que ce travail a été fait avec la collaboration de l'Institut de recherches et développement l'IRD de Marseille (ancien ORSTROM) avec l'équipe de Bernard Ollivier sous la codirection du Docteur Marie-Laure Fardeau.

Le manuscrit comprend trois chapitres :

- Le premier chapitre : la revue bibliographique comprend deux parties. La première décrit l'environnement souterrain et la biodiversité bactérienne de ce milieu. La seconde partie est consacrée à la description des méthodes couramment utilisées pour les études d'écologie microbienne des techniques classiques culturelles de microbiologie aux techniques moléculaires et la procédure d'échantillonnage des eaux souterraines, en particulier celle de **Basso et al, (2004)** qui a travaillé sur le même site d'étude, validée par une publication de son efficacité.
- Le second chapitre : Matériels et méthodes, décrit toutes les techniques réalisées au laboratoire en particulier les techniques de culture anoxique qui constitue une nouveauté en Algérie car quasi inexistantes ainsi que le matériel utilisé et enfin le troisième chapitre présente les résultats obtenus à savoir :
 - découverte d'une nouvelle bactérie nouveau genre nouvelle espèce (Article, IJSEM)
 -
 - Seconde bactérie appartenant au genre *Desulfovibrio* constitue une nouvelle espèce de ce genre.

Partie bibliographique

La biosphère profonde constitue donc un habitat pour les micro-organismes ; l'intérêt pour l'étude de cette communauté microbienne souterraine est récent, une vingtaine d'années environ.

Il s'est accru dès lors que l'homme a dû trouver de nouveaux espaces pour enterrer ses déchets notamment les déchets radioactifs des centrales nucléaires.

Cet enfouissement était réalisé dans des zones granitiques ou argileuses où les déchets pouvaient accélérer la corrosion des contenants à déchets et favoriser la dispersion des radionucléides (**Pedersen, 1996 ; Santo Domingo et al., 1998 ; White et al., 1998**).

L'étude de la flore souterraine permettait également de suivre la dégradation de polluants tels que les hydrocarbures ou les solvants chlorés (**Dojka et al., 1998 ; Klier et al., 1993**).

L'intérêt s'est traduit par la mise en place d'axes de recherches permettant de réaliser des collections de souches isolées d'environnements souterrains.

Beaucoup de travaux ont été réalisés dans les gisements pétroliers et ont mis en évidence l'existence de communautés bactériennes anaérobies et hyperthermophiles et également l'identification de nouveaux genres, nouvelles espèces bactériennes (**Adkins et al., 1992 ; Bernard et al., 1992 ; Magot et al., 1994 ; C.Tardy-Jacquenod, 1996 ; Ravot G, 1996 ; Reeves et al., 1996 ; Balck will et al., 1997**).

Nous nous sommes intéressés aux eaux souterraines en particulier les aquifères qui constituent une source essentielle et vitale pour la planète.

Les populations qu'ils sont susceptibles d'héberger sont peu connues que ce soit par leur composition, leur structure ou leur fonctionnement. Néanmoins, des travaux importants ont été réalisés sur des forages d'aquifères profonds par Pedersen, ils ont mis en évidence des séquences très diverses pouvant correspondre aussi bien à des bactéries aérobies qu'anaérobies. Elles se répartissent dans 11 branches du domaine bactérien et 5 nouvelles branches (Ekendahl et Pedersen., 1994 ; Pedersen et al., 1996 a, b, 1997). D'autre part des représentants des Protéobactéria α , β , γ , δ et ϵ et des Firmicutes à haut et bas G + C %.

Ces différentes séquences collectées sur le site Oklo (Gabon) par l'équipe de Pedersen ont été étudiées par Crozier et al. (1999). Plus récemment une étude détaillée de la biodiversité des communautés bactériennes au sein d'un bassin au sud ouest de Paris par Basso (2005) a permis de mettre en évidence de nouvelles séquences.

La majeure partie des études réalisées dans de tels environnements a porté sur l'analyse de la diversité à l'aide du gène de l'ADN_r 16S.

Notre travail s'inscrit dans cette optique, nous avons choisi un aquifère du bassin Parisien pour nos investigations.

1 – 1 Généralités sur les aquifères

Qu'est ce qu'un aquifère ? Un aquifère est une formation souterraine de roche perméable ou de matériau meuble qui peut produire des quantités utiles

d'eau lorsqu'elles sont captées par un puits. Il existe plusieurs types d'aquifères (Voir figure I-1).

- Aquifère à nappe captive
- Aquifère à nappe semi captive
- Aquifère à nappe libre

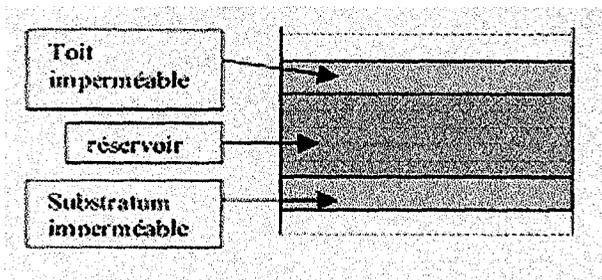


Figure a : Nappe captive

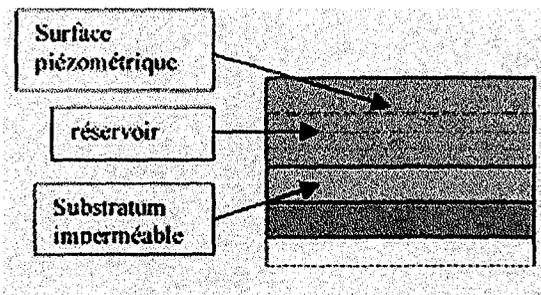


Figure b : Les aquifères à nappe libre

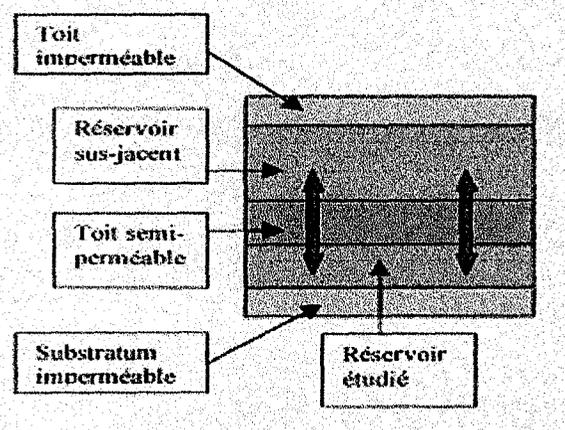


Figure c : Les aquifères à nappe semi-captive

Figure I-1 : différents types d'aquifères

L'aquifère étudié au cours de ma thèse correspond à une nappe captive (figure I-1)

- Les aquifères à nappe captive

Les eaux souterraines sont emprisonnées entre deux formations imperméables fixes : le substratum et le toit. L'aquifère subit une pression, dirigée de haut en bas, due au poids de la colonne de terrain. Cette pression est équilibrée par la pression de couche à l'intérieur de l'aquifère.

- Les aquifères à nappe libre

La base de l'aquifère, le substratum, est imperméable. La limite supérieure est hydrodynamique : la surface piézométrique peut s'élever ou s'abaisser librement dans la formation hydrogéologique perméable formant le réservoir.

- Les aquifères à nappe semi-captive

Le toit, le substratum ou les deux sont constitués par une formation hydrogéologique semi-perméable. Celle-ci permet dans certaines conditions des échanges d'eau avec un aquifère superposé ou sous-jacent. On parle alors d'aquifère multicouche.

2- Communautés bactériennes les plus souvent isolées dans les eaux souterraines

Comme dit précédemment, les aquifères représentent d'importantes ressources en eau ce qui explique l'intérêt des travaux de recherches quant à la biodiversité bactérienne.

Ces différentes études microbiologiques réalisées à partir d'aquifères et de sédiments marins sont illustrées dans le tableau I-1.

<p>Aquifère granitique, site Äspö, Suède.</p>	<p>Quantification de la population bactérienne totale (acridine orange), et cultivable (NPP ou MNP). Enrichissement pour bactéries méthanogènes et homoacétogènes. Mesure de la production de méthane (transformation du $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ en $^{14}\text{CH}_4$; [1,2-^{14}C] acétate), et d'acétate ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$)</p>	<p>Présence d'une communauté microbienne chimioautolithotrophie active. Les bactéries méthanogènes acétotrophes et homoacétogènes sont majoritaires à une profondeur de 112 mètres, et les méthanogènes autotrophes majoritaires à une profondeur de 446 mètres. Les populations de bactéries méthanogènes autotrophes et d'homoacétogènes sont les producteurs primaires de la matière organique.</p>	<p>Kotelnikova & Pedersen (1998)</p>
<p>Sédiments prélevés à 2000m de profondeur en Virginie et 2700m au Colorado, USA.</p>	<p>Ferriréduction par la formation de magnétite (incubation des roches à 45-75°C). Amplification, RFLP et séquençage des ADNr 16S, analyse phylogénétique.</p>	<p>Active thermophile et de réduction du fer dans les cultures d'enrichissement. Présence de 8 clones non identifiables.</p>	<p>Liu et al. (1997)</p>
<p>Eau profonde de 2 aquifères basaltiques, prélevée à 1270m (Grand Rond) et 316m (Priest Rapid) de profondeur dans l'état de Washington, USA.</p>	<p>Dénombrement de la population bactérienne totale, culture d'enrichissement et détermination des substrats utilisés.</p>	<p>Les substrats utilisés par les microflore des 2 aquifères différent. La plus grande activité métabolique est trouvée pour les enrichissements en condition de ferri-réduction, pour les 2 aquifères. Cependant l'un présente une croissance bactérienne plus importante en sulfato-réduction, et l'autre pour la méthanogénèse.</p>	<p>Stevens et al. (1993)</p>
<p>Eau profonde prélevée à partir de 2 puits de 1270m (Grand Rond) et 316m (Priest Rapid) de profondeur dans l'état de Washington, USA.</p>	<p>Extraction des ARN, hybridation avec des sondes, amplification et séquençage des ADNr 16S des clones.</p>	<p>Présence de bactéries des domaines <i>Bacteria</i>, et <i>Archaea</i> en moindre quantité. Identification de BSR, avec la présence du genre <i>Desulfovibrio</i>.</p>	<p>Fry et al. (1997)</p>
<p>Aquifère basaltique prélevé à 1270m de profondeur dans l'état de Washington, USA. Eau profonde (bassin Witwatersrand, 3,2km/sol) prélevée à partir d'un puit de 121m</p>	<p>Extraction des ADN génomiques, amplification, clonage et séquençage des ADNr 16S. Amplification et clonage des gènes codant pour les Dsr, et</p>	<p>Caractérisation de la population de BSR. Les séquences d'ADNr 16S isolées sont apparentées aux espèces <i>Desulfotomaculum thermosapovorans</i> et <i>Desulfotomaculum</i></p>	<p>Baker et al. (2003)</p>

de profondeur, dans le sud de l'Afrique, près de Johannesburg.	RFLP (à partir des clones). Enrichissements pour les BSR (NPP)	<i>geothermicum</i> . La croissance bactérienne est plus importante avec les enrichissements contenant du lactate + H ₂	
Eau profonde (bassin Witwatersrand, à 3,2km/sol) prélevée par un puits de 121m de profondeur, dans mine d'or, dans le sud de l'Afrique.	Enrichissements, détermination des accepteurs et donneurs d'électrons, pH et température optimum.	Isolément d'une souche thermophile anaérobie facultative ferriréductrice, du genre <i>thermus</i> .	Kieft et al. (1999)
Eau profonde prélevée à partir d'une mine d'or (bassin Witwatersrand) dans le sud de l'Afrique près de Johannesburg.	Extraction des acides nucléiques, PCR quantitative, T-RFLP, clonage et séquençage des ADNr 16S <i>Archaea</i> .	La communauté microbienne <i>Archaea</i> se compose de nouvelles bactéries non identifiées et éloignées d'espèces décrites.	Takai et al. (2002)
Eau profonde d'un aquifère, prélevée à partir d'un puits de 240m de profondeur, Canada.	Microscopie électronique à balayage, détermination de la population totale, et active par cultures. Identification d'isolats, analyse des acides gras des phospholipides.	Obtention d'un nombre important de bactéries de différentes tailles et formes (sphériques, bâtonnets, incurvées). Des bactéries dénitrifiantes, fixatrices de N ₂ , sulfato-réductrices et capables de précipiter le fer sont détectées. Identification de trois espèces de <i>Pseudomonas</i> dominantes, <i>P. fluorescens</i> , <i>P. marginalis</i> et <i>P. corrugata</i>	Jain et al. (1997)
Sédiments prélevés à 260m de profondeur, Savannah river plant, en Caroline du sud, USA.	Détermination de la population bactérienne totale par comptage direct (acridine orange), de la population cultivable par enrichissements et métabolismes bactériens détectés	90 % de la population bactérienne est cultivable. La flore bactérienne métabolise le glucose, l'indole, le benzoate, le lactate, et le formate, en condition oxygène et anoxique. Sur 1500 isolats, 33% utilisent l'arginine, la lysine, l'ornithine, le citrate de sodium, l'urée, le tryptophane, le glucose, l'inositol, le sorbitol, la rhamnose, le sucrose, le melibiose, l'amygdaline et l'arabinose comme source de carbone.	Fliermans & Balkwill (1989)

Aquifère, Bocholt, Allemagne.	Caractérisation morphologique et physiologique de la flore hétérotrophe et oligotrophe. Quantification (UFC), isolement et caractérisation des isolats (155 caractères analysés)	246 souches présentant un métabolisme hétérotrophe et oligotrophe ont été isolés.	Kölbel-Boelk <i>et al.</i> , (1988)
Eau profonde, Iwate, Japon.	Extraction des ADN génomiques <i>Archaea</i> , amplification, clonage et séquençage des ADNr 16S. PCR quantitative.	Les 324 clones analysés ont montré la présence de 23 séquences types, affiliées au phylum <i>Eucyarchaeota</i> . Dont 2 séquences apparentées aux espèces <i>Methanosaeta concilii</i> et <i>Methanomethylovorans hollandica</i> . La séquence majoritaire de la banque de clones (50%) est affiliée à la famille des <i>Methanomicrobiaceae</i> .	Watanabe <i>et al.</i> , (2002)
Source hydrothermale « vent cap »	Amplification et séquençage des ADN 16s après enrichissement	Bactérie méthanogène nouvelle espèce hyperthermophile méthanogène	Jeanthon C. et al (1999)
Source hydrothermale « vent cap »	Dénombrement de la flore totale par des analyses microbiologiques et clonage et séquençage des ADN, 16s	Bactéries méthanococcales Archaeoglobales sulfato-réductrices Desulfurobactériales soufre-réductrices Thermococcales	Corre E (2000)
Aquifère Bassin Parisien	Dénombrement de la flore totale par des analyses microbiol. Et clonage, séquençage des ADN, 16s	B ⁺ sulfato réductrices B ⁺ hétérotrophe anaérobies : Firmicutes et proteobactéries	Basso. O 2005

UFC : Unité Formatrice de Colonie.

NPP ou MNP : Nombre le Plus Probable

Dans les sédiments marins, la sulfato-réduction semble constituer le processus métabolique anaérobie majeur (Wellsbury et al, 1997).

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont aussi retrouvées dans les eaux douces. Les recherches des groupes trophiques bactériens et les activités métaboliques retrouvées dans les eaux profondes du site Aspo en Suède révèlent la présence, en plus des BSR, des bactéries hétérotrophes non fermentaires, de bactéries méthanogènes et de bactéries Gram négatifs anaérobies facultatives (Pedersen et Ekendahl, 1990). L'hétérotrophie apparaît également comme le processus majeur de croissance et de la transformation du carbone en comparaison avec l'autotrophie de la population bactérienne issue de l'eau profonde (Ekendahl et Pedersen, 1994 ; Ekendahl et al., 1994). Des études supplémentaires ont permis de compléter l'analyse des communautés microbiennes de cet écosystème, par la mise en évidence de bactéries autotrophes méthanogènes et acétogènes (Kotelnikova et Pedersen, 1998).

2 – 1 Les bactéries sulfato-réductrices

D'un point de vue morphologique et physiologique, les bactéries sulfato-réductrices représentent un groupe de bactéries anaérobies complexe et varié (Kno blauch et al. 1999).

Elles appartiennent au domaine des Bacteria, sauf trois espèces du genre *Archeoglobus* qui appartiennent au domaine des Archea.

Au sein du domaine des Bacteria, les genres les mieux représentés sont : *Desulfovibrio* avec quarante et une espèces et *Desulfotomaculum* avec vingt espèces.

La plupart des espèces peuvent remplacer l'hydrogène comme donneur d'électrons par des substrats organiques, tels que l'acétate ou l'éthanol, le fumarate, le lactate ou les acides gras.

Elles se développent alors en hétérotrophie en utilisant le sulfate comme accepteur d'électron. La capacité d'oxydation de ces substrats a amené **Widdel (1988)** à classer les bactéries sulfato-réductrices en deux groupes :

- Les bactéries sulfato-réductrices du groupe I : chez lesquelles l'oxydation à partir du lactate et de l'éthanol est incomplète et s'arrête au stade acétate. C'est le cas de *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfomonas* ou *Desulfotomaculum nigrificans*.
- Les bactéries sulfato-réductrices du groupe II : chez lesquelles l'oxydation complète du substrat conduit au CO₂. C'est le cas des *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfonema* ou *Desulfobacter* (in **Pelmont, 1993**).

De plus certaines bactéries sulfato-réductrices seraient aussi le siège de réactions relevant d'une fermentation. À cela s'ajoute la capacité de remplacer le sulfate par d'autres accepteurs d'électrons comme le sulfite, le thiosulfate ou le soufre élémentaire.

❖ **Rôle des bactéries sulfato-réductrices dans divers écosystèmes**

- Dans un écosystème appauvri en oxygène et où la présence de sulfate est suffisante, la population de bactéries sulfato-réductrices utilise la matière organique partiellement dégradée comme substrat énergétique et rejette de l'H₂S qui contribue à la mise en place de l'anaérobiose.

- Dans les écosystèmes marins où les sulfates abondent, la sulfato-réduction assure une part importante de la minéralisation de la matière organique. Mais les bactéries sulfato-réductrices ne se trouvent pas seulement en milieu marin. Elles sont en effet retrouvées dans les sédiments et dans la colonne d'eau de certains lacs d'eau douce. Elles sont également retrouvées au sein de lacs acides, de sources hydrothermales terrestres ou océaniques ou encore de geysers. Enfin, les activités humaines génèrent des biotopes propices à la prolifération de bactéries dissimulatrices de composés soufrés notamment dans l'industrie pétrolière.

❖ **Adaptations aux facteurs environnementaux :**

Les bactéries sulfato-réductrices ont une souplesse métabolique remarquable qui leur permet de coloniser une grande variété de biotopes.

La plupart des bactéries sulfato-réductrices sont mésophiles ou modérément thermophiles. Mais il existe des micro-organismes hyperthermophiles et thermophiles extrêmes tels que l'espèce *Archeaoglobus fulgidus*.

De plus, certaines espèces d'eau douce sont inhibées par une forte concentration en NaCl. C'est le cas de *Desulfotomaculum acetoxidans* qui ne supporte pas des concentrations supérieures à 7g.L^{-1} (Widdel et Pfennig 1982).

Au contraire de nombreuses souches d'origine marine supportent des concentrations de 100g/l (Widdel 1988).

De plus certaines souches peuvent croître dans une large gamme de salinité. *Desulfovibrio desulfuricans* peut vivre en eau douce comme dans des milieux à 60g/l de NaCl.

Cependant la seule BSR halophile connue se développant en présence de 250g/l de NaCl est : *Desulfohalobium retbaense* (Ollivier et al. , 1994).

Ensuite, la plupart des souches de bactéries sulfato-réductrices ont leur optimum de pH autour de 7. Cependant, elles sont connues dans des milieux très acides ou des sources thermales chaudes où le pH est voisin de 3 ou 4 (Fliermans & Balkwill, 1989 ; Jeanthon C. et al., 1999 ; Corre E, 2000).

Cependant aucune BSR acidophile n'a été isolée à ce jour (Fauque et al 2004). On trouve par contre des bactéries alcalophiles ; isolées de lacs alcalins africains, américains ou russes, qui appartiennent aux genres *Desulfonatovibrio* et *Desulfonatum*.

L'espèce *Desulfonatovibrio hydrogenovorans* (Zhilina et al., 1997) et l'espèce *Dusulfonatum lacustre* (Pikuta et al., 1998) sont capables de croître de manière optimale à des pH proches de 10.

La première espèce utilise essentiellement l'hydrogène et le formate comme source d'énergie, alors que la seconde utilise également l'éthanol. Enfin les bactéries sulfato-réductrices peuvent survivre dans des environnements toxiques grâce à leur aptitude à créer des micro-niches anoxiques par leur rejet d'H₂S.

Cependant, il existe quelques espèces capables d'une respiration aérobie dans des milieux sans sulfure, ni sulfate avec l'hydrogène comme donneur d'électrons. C'est le cas de *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris* ou *Desulfobacterium autotrophicum*.

Pour finir quant à la grande diversité physiologique et métabolique des BSR. Les BSR thermophiles et mésophiles occupent les environnements profonds océaniques et sont donc soumises à des pressions hydrostatiques importantes. Il n'existe que quelques études sur une BSR mésophile, *Desulfovibrio hydrothermalis* (Alazard et al., 2003) et une bactérie thermophile *Desulfovibrio profundus* (Bale et al., 1997), qui indiquent que ces deux bactéries poussent mieux à la pression hydrostatique correspondant à leur lieu de prélèvement (2600m pour *D.hydrothermalis* et 500m pour *D.profundus*)

❖ **Compétition avec les méthanogènes :**

Selon le milieu, trois types de relations peuvent s'établir. Quand les donneurs d'électrons métabolisables par les deux types de bactéries principalement l'acétate et l'hydrogène, se trouvent en quantité limitée dans le milieu, il y a compétition entre les deux groupes.

En milieu marin où les sulfates sont en grande quantité, la majeure partie de la minéralisation anaérobie est attribuée aux bactéries sulfato-réductrices. Par contre ce sont les méthanogènes qui sont prépondérantes en eau douce. En présence de forte concentration en matière organique, il peut y avoir coexistence entre les bactéries sulfato-réductrices et le méthanogènes. Il peut enfin exister entre ces deux groupes une relation de syntrophie.

Plusieurs souches de *Desulfovibrio* peuvent en absence de sulfate, fermenter le lactate inutilisable par les méthanogènes, en acétate et hydrogène. Pour que ce processus puisse avoir lieu, il faut que l'hydrogène soit consommé par les méthanogènes.

❖ **Action dépolluante :**

L'action dépolluante des bactéries sulfato-réductrices est étudiée depuis quelques années. Les bactéries sulfato-réductrices contribuent efficacement à la destruction des matières organiques dans les milieux anaérobies où le sulfate est abondant. Parmi les polluants susceptibles d'être éliminés sont l'aniline, le résorcinol, les mono- et dichlorophénol (S.Schnell et al. 1989), mais aussi certains hydrocarbures (F. Aecksberg et al., 1991), mais aussi l'action de dépollution des métaux lourds, polluants environnementaux tels que Cr (VI), Mo (VI), Se (VI), Te (VII), Fe (III), Mn (IV), As (V), Pd (II) et U (VI) (Lovley, 1993).

Cette capacité fait des BSR des candidats utiles pour la décontamination des environnements pollués par des métaux lourds (« Bioremédiation »).

Depuis quelques années, il a été montré que certaines bactéries sulfato-réductrices étaient capables d'attaquer les hydrocarbures polyaromatiques, c'est le cas de bactéries du genre *Desulfobacterium*.

❖ **La réduction du soufre élémentaire**

Le soufre est un des éléments majeurs, car il entre dans la composition des molécules telles que les acides aminés ou les protéines.

Le soufre est présent dans la nature sous différentes formes, comme le sulfure (S^{2-}) qui est la forme la plus réduite, le soufre élémentaire (S) et le sulfate (SO_4^{2-}) qui est la forme la plus oxydée.

Ces différentes formes peuvent subir des transformations biotiques et abiotiques (figure 1-2)

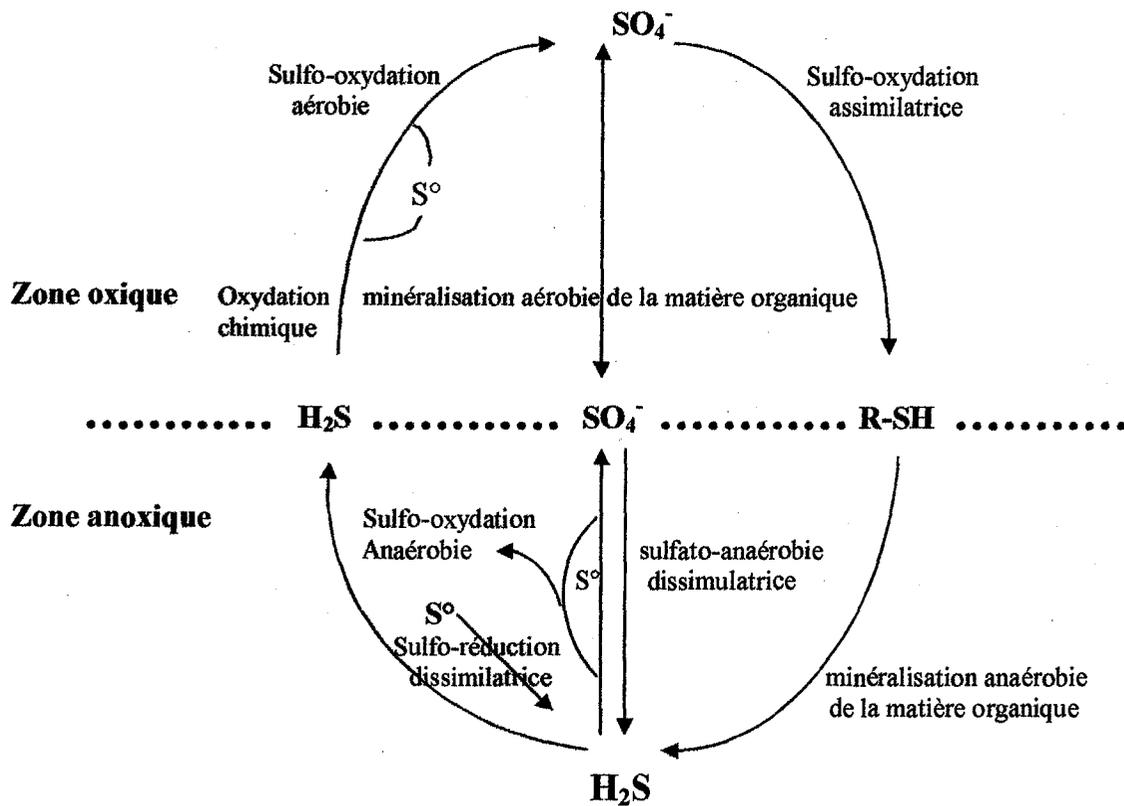


Figure I-2: Le cycle du soufre (d'après Caumette, 1987)

Le cycle du soufre comprend quatre étapes : La réduction assimilatrice des composés soufrés, la minéralisation du soufre organique, l'oxydation des composés réduits du soufre (en condition anoxique).

Le soufre peut être réduit en sulfure d'hydrogène par réduction assimilatrice ou dissimilatrice. Dans ces processus, le soufre est utilisé comme accepteur d'électrons dans l'oxydation d'hydrogène ou de composés organiques.

Les bactéries impliquées dans la réduction du soufre élémentaire sont capables de le réduire de façon obligée ou facultative.

Certaines bactéries utilisent le soufre comme accepteur d'électrons, c'est le cas des bactéries sulfato-réductrices capables de réduire le soufre élémentaire. Elles appartiennent principalement au genre *Desulfovibrio*.

De nombreuses bactéries thermophiles ou hyperthermophiles, réduisent également le soufre élémentaire de manière facultative.

Parmi celles-ci se trouvent les espèces du genre *Thermotoga* (*T.neapolitana* et *T.maritima*).

Il existe aussi des bactéries soufre - dépendantes comme les trois espèces du genre *Desulforomonas acetoxidans*, *D.acetoexigens* et *D.succinoxidans* (Le Faou et al., 1990).

La sulfo-réduction est aussi connue chez certaines *Archaea* thermoacidophiles de l'ordre des *Sulfolobales* comme *Acidianus brierleyi* et *Acidianus infernus*.

❖ La réduction de thiosulfate :

La réduction de thiosulfate est connue chez les entérobactéries et chez les bactéries sulfato-réductrices. Récemment de nombreux micro-organismes fermentaires anaérobies stricts mésophiles et thermophiles appartenant aux genres *Thermotoga*, *Thermosipho* et *Fervidobacterium* (Magot et al. 1997) (Ravot et al., 1995) se sont montrés capables de réduire les thiosulfates.

La réduction du thiosulfate est considérée dans certains cas comme une respiration (Fardeau et al. 1994).

Dans ce groupe, deux espèces sont décrites isolées de gisements pétroliers chauds de la mer du nord *Archeoglobus fulgidus* (Stetter, 1998) et *Archeoglobus profundus* (Burggraf et al., 1990).

Le genre *Archaeoglobus* appartient au phylum Euryarchaeota, dans lequel se trouvent les bactéries méthanogènes et les archaea bactéries halophiles (*Halobacteria*).

Taxonomie des bactéries sulfato-réductrices (BSR) :

Comme nous l'avons précisé précédemment, les bactéries sulfato-réductrices constituent un groupe de bactérie complexe. Des propriétés diverses sont utilisées pour la classification traditionnelle (Voir tableau I-2).

Les plus importantes sont : la forme des cellules, la mobilité, le pourcentage de G + C % dans l'ADN, présence de désulfovirdine et cytochromes, optimum de température, oxydation incomplète et complète de l'acétate. Pour arriver aux différents genres, différents donneurs d'électrons sont testés.

Tableau I-2 Principaux caractères pour la classification des bactéries sulfato-réductrices (D'après Castro et al. , 2000)

BSR	Morphologie	Mobilité	G+C %	Désulfo viridine	Cytochrome	Oxydation acétate	Temps (°C) de croissance
Mésophiles Gram - négatif :							
<i>δ</i> - proteobacteria							
Desulfobulbus	Bâtonnet	-/+	59-69	-	b, c, c ₃	II	25-40
Desulfimicrobium	Bâtonnet	+/-	52-67	-	b, c	I	25-40
Desulfomonas	Bâtonnet	-	66	+	c	I	30-40
Desulfovibrio	Vibrio	+	49-66	+/-	c ₃ , b, c	I	25-40
Desulfobacter	Bâtonnet	+/-	44-46	-		C2	20-33
Desulfobacterium	Bâtonnet	+/-	41-52	-	b, c	C	20-35
Desulfococcus	Sphère	-/+	46-57	+/-	b, c	C	28-35
Desulfomonile	Bâtonnet	-	49	+	C ₃	C	37
Desulfonema	Filament	glissement	35-42	+/-	b, c	C	28-32
Desulfosarcina	Oval	nt	51	-	b, c	C	33
Sporulées Gram-positif							
Desulfotomaculum	Bâtonnet	+	48-52	-	b, c	I/C	25-40/40-65
Thermophiles							
Thermo-desulfobacterium	Bâtonnet/ Vibrio	-/+	30-38	-	c ₃ , c	I	65-70
Archaea thermophiles							
Archaeoglobus	Coques	+/-	41-46	-	n, r	I	64-92

L'analyse de l'ARNr a permis de classer les BSR en quatre groupes (Castro et al., 2000)

- Les BSR mésophiles Gram-négatif
- Les bactéries Gram positif sporulées
- Les thermophiles
- Les archéobactéries thermophiles (tableau 2)

Le premier groupe les BSR mesophiles Gram-négatif, appartient à la sous division des protéobactéries.

Deux familles sont représentatives :

Les *Desulfovibrionaceae* et les *Desulfobacteriaceae* (Devreux et al., 1990 ; Widdel et al., 1992)

La famille des *Desulfovibrionaceae* inclut les genres *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium*.

L'espèce *pigra* a été reclassée sur la base de l'ARN 16S et nommée *Desulfovibrio piger* (Holt J.G, 1993).

Cette espèce est différente des autres *Desulfovibrio* par son absence de mobilité et la forme des cellules en « bâtonnets ».

La deuxième famille : Les *Desulfobacteriaceae* est constituée des genres *Desulfobullus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosurciea*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfobotulus* et *Desulfoarculus*.

Des analyses de l'ARN 16S effectuées par l'équipe de Castro (2000) a permis de rajouter de nouveaux genres : *Desulfobacula*, *Desulfospira*, *Desulfocella*, *Desulfobacca*, *Desulfocinum*, *Thermodesulforhabolus*, *Desulforhabolus*, *Desulfocapsa*, *Desulforhopalus* et *Desulfofustis*.

Et de reclasser certaines par exemple les genres *Desulfobotulus* et *Desulfoarculus* en *Desulfovibrio sapovoraus* et *Desulfovibrioboarssi* (Stakebrandt et al., 1995 ; Holt J.G, 1993).

Le deuxième groupe des bactéries Gram-positives sporulées est constitué par le genre le plus représentatif *Desulfotomaculum* qui possède un G + C % faible, phylogénétiquement proche des genres *Bacillus* et *Clostridium*.

En effet les BSR Gram positifs sont proches des *Clostridia*, et peuvent comme les espèces de la classe, réaliser la fermentation du pyruvate comme *Desulfovibrio guttodeus* (Stackebrandt et al. , 1997) et *Desulfovibrio spamaudeus* (Cord – Ruwisch et Garcia, 1985).

Le troisième groupe des BSR thermophiles sont représentées par les deux espèces les plus connues *Thermodesulfovibrio yellowstonii* isolées d'une source hydrothermale du parc national Yellowstone (Henry et al., 1994) les deux espèces font partie de branches profondes de l'arbre phylogénétique du domaine Bacteria et proche des Archeae (figure I-3)

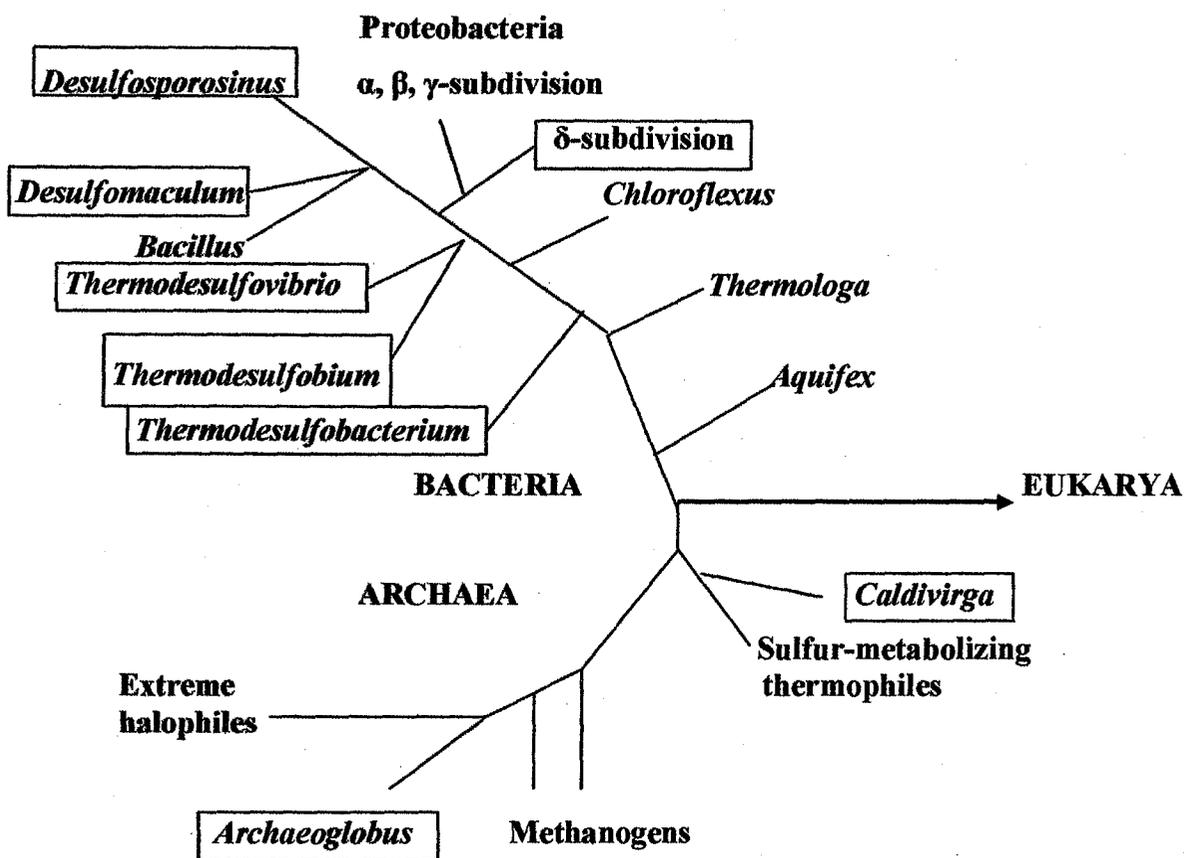


Figure I-3 : Arbre phylogénétique montrant la position des genres sulfato-réducteurs (noms encadrés, d'après Birkeland, 2005).

Ces bactéries présentent des températures optimales de croissance de 65°C à 70°C qui sont inférieures à celles des *Archea* thermophiles dernier groupe des BSR qui elles peuvent survivre à des températures égales ou supérieures à 80°C.

2 – 2 Les bactéries méthanogènes

Les bactéries méthanogènes appartiennent exclusivement au domaine des Archaea (voir figure I-4).

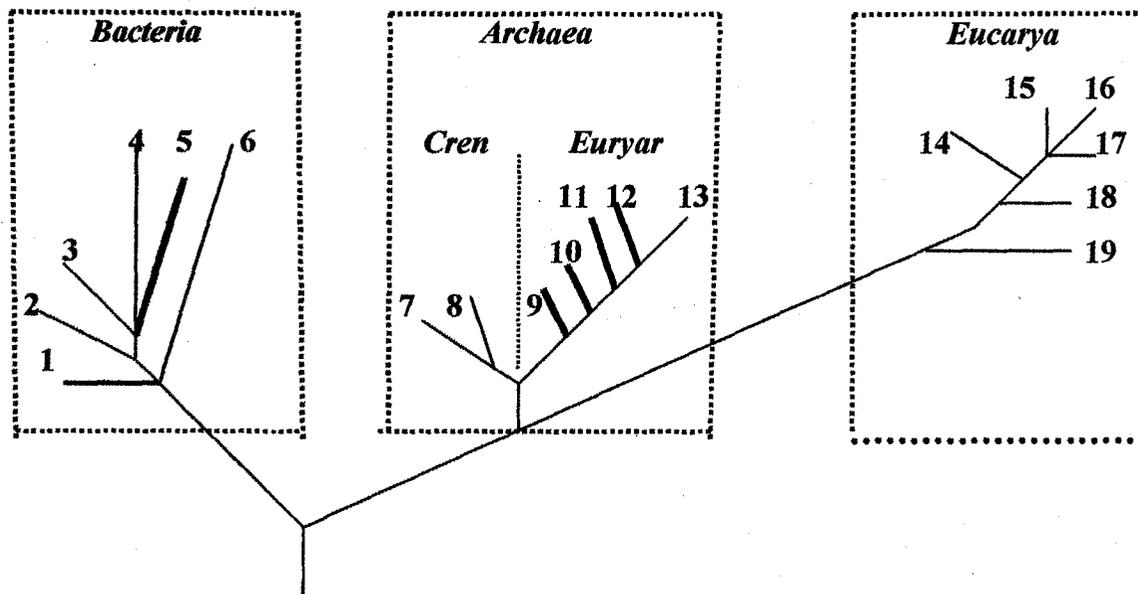


Figure I -4 : Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant établi sur la base des séquences codantes pour l'ARNr 16S.

Les traits en gras montrent les branches contenant des organismes anaérobies identifiés dans les eaux de gisements pétroliers. *Bacteria* :

1, *Thermotogales* ; 2, Flavobactéries et espèces affiliées ; 3, cyanobactéries ; 4, bactéries pourpres ; 5, bactéries Gram-positives et 6, bactéries vertes non sulfureuses. *Archaea* : règne des *Crenarchaeota* : 7, genre *Pyrodictium* et 8, genre *Thermoproteus* ; règne des *Euryarchaeota* : 9, *Thermococcales* ; 10, *Methanococcales* ; 11, *Methanobacteriales* ; 12,

Methanomicrobiales et 13, les halophiles extrêmes. *Eucarya* : 14, les animaux ; 15, les ciliés ; 16, les plantes vertes ; 17, les champignons ; 18, les flagellés et 19, *microsporidia*.

Les bactéries méthanogènes se développent dans les environnements anoxiques (Oremland, 1988).

C'est un groupe bactérien connu pour sa capacité d'adaptation à différentes températures et concentration de sel.

Les espèces thermophiles constituent 20 % des méthanogènes connues et appartiennent uniquement à six genres (JL. Garcia, 1990).

La majorité des méthanogènes croissent à des pH compris entre (6.0 – 8.0), et deux espèces appartenant au genre *Methanobacterium*, poussent à des pH alcalins compris entre 8 et 9 (Worakit et al, 1986, Blotervogel et al., 1985) et l'espèce *Methanohalophilus zhilinae* souche halophile avec un optimum de croissance à un pH de 9.2 (Mathrani et al., 1988).

Bryant et al., (1967) ont isolé la souche *Methanobacillus omelianskii*, première souche réduisant le CO₂ en méthane décrite.

La compréhension des mécanismes de la respiration anaérobie est due en grande partie aux travaux réalisés par Söhngen en 1910 et en particulier les réactions de méthanogénèse.

En effet, il a montré qu'en présence d'hydrogène et de dioxyde de carbone, quatre moles d'hydrogène sont nécessaires pour réduire une mole de CO₂ en méthane.

Zeikus (1972), a isolé pour la première fois une bactérie méthanogène thermophile *Methanobacterium thermoautotrophicum* .

Puis **John Leigh et al. (1983)** ont isolé également pour la première fois une bactérie thermophile extrême *Methanococcus janashii* retrouvée dans des sédiments marins.

D'autres souches mésophiles ou thermophiles, ont été répertoriées, retrouvées également dans les environnements salés terrestres (**Borzenkov et al., 1997**) ou d'autres types d'écosystèmes (**Davidora et al., 1997 ; Ollivier et al., 1994 ; Obratzsora et al., 1988**) tels que les eaux de gisements pétroliers salés (**Adkins et al., 1992 ; Bernard et al., 1992 ; Magot et al., 1994**).

2 – 3 Les bactéries acétogènes

En condition d'anaérobiose, les bactéries productrices d'acétate, réalisent l'acétogénèse (**Doefing 1988**).

L'acétogénèse se définit comme l'oxydation de substrats couplée à la réduction de protons, avec pour résultat la formation d'acétate et d'hydrogène comme produits finaux. La production d'acétate peut être réalisée soit à partir du CO₂ et de l'hydrogène H₂ (Homoacétogénèse), soit à partir des sucres, des alcools, des composés en C₁ (Formate, méthanol), des aminoacides, des acides gras ou encore des composés aromatiques.

Les bactéries homoacétogènes sont des bactéries fermentaires qui se caractérisent par la production exclusive d'acétate.

Les genres les plus représentatifs sont :

Acetobacterium et *Clostridium* en particulier l'espèce *Acetobacterium woodii* (Balch et al., 1977) ou *Clostridium aceticum* (Braun et al., 1987).

Concernant les environnements profonds, une nouvelle espèce isolée des eaux de gisements pétroliers a été décrite : *Acetobacterium romashkorii* (Davydova – Charakhchyan et al., 1993).

2 – 4 Clostridium

Le genre *Clostridium* est un genre bactérien regroupant des bacilles gram positifs anaérobies souvent sporulés, anaérobie strict pour la plupart, mobile en général par l'intermédiaire de flagelles péritriches.

Phylogénie : *Clostridium* appartient à la famille des Clostridiaceae, ordre des Clostridiales, classe des Clostridia, phylum des Firmicutes.

La classe des Clostridia contient une grande variété des bactéries réparties entre trois ordres et onze familles. Le genre *Clostridium* étant le plus représentatif et le plus important de la classe.

Le genre *Clostridium* comporte plus d'une centaine d'espèces réparties en trois groupes (Mainil.J et al, 2004)

- 1) Espèces non pathogènes (la majorité)
- 2) Les pathogènes mineurs (\pm 30 espèces)
- 3) Les pathogènes majeurs (\pm 13 espèces) hautement pathogènes pour l'homme

Les plus « célèbres » espèces :

- *Clostridium tetani* – l'agent du tétanos
- *Clostridium botulinum* I, II et III l'agent du botulisme (V. Tableaux)
- *Clostridium perfringens* – retrouvé dans certaines plaies gangréneuses (gangrène gazeuse) ou dans les intoxications alimentaires.
- *Clostridium difficile* – retrouvé dans du colite
- *Clostridium chauvoei*
- *Clostridium haemolyticum*
- *Clostridium piliforme*
- *Clostridium septicum*
- *Clostridium histolyticum*

Historique de quelques Clostridia pathogènes

Le genre *Clostridium* a été proposé pour la première fois par **Prazmowski** en **1880** quand il a décrit *C. butyricum*, les clostridia sont Gram positive, formant des spores en forme de bâtonnets ce qui explique leur classification dans un premier temps comme *Bacillus*, leur caractère anaérobie n'a été reconnu que plus tard et à ce moment là, on les a classé dans le genre *Clostridium*, à l'inverse, des espèces décrites appartenant au genre *Clostridium*, ont été classées dans de nouveaux genres comme *Eubacterium*, *Filifactor*, *Moorella*, *Finegoldia*, *Calormaton* et autres.

Certains noms ont été modifiés (**Euzeby, 2003**)

- L'espèce *Cl. botulinum* a été décrite pour la première fois par **Van Ermengen** en **1896** comme étant *Bacillus botulinum*. Dans la première édition du **Bergey (1923)**, elle est nommée *Cl. botulinum*.

- L'espèce *Cl. Chauvoei* a été décrite pour la première fois par **Arloing et al., en 1887** comme *Bacterium chauvoei*, plus tard nommée différemment : *Bacillus chauvaei*, *Bacillus carbonis* et *Bacillus anthracis symptomatici*. Elle fut nommée *Cl. fœteri* par **Trevisan en 1885**. Ce nom apparaît uniquement dans la 6^e édition du **Bergey (1948)**.
- *C. difficile* décrite pour la première fois en **1935** par **Hall et O.Toole** comme *Bacillus difficilis* et apparaît dans la 5^e édition du **Bergey's Manual (1939)**.

D'autres espèces comme *Cl. acetobutylicum* ou *Cl. butyricum* sans danger pour l'homme, sont utilisées pour des fermentations dans l'industrie.

Beaucoup d'espèces sont présentes dans le sol, eau, air, poussières.

Ce genre est très important dans l'environnement notamment dans les cycles géochimiques en particulier le cycle de l'azote.

L'azote est fixé à l'état naturel de deux façons :

- Par les phénomènes physico-chimiques au niveau de l'atmosphère
- Par certaines bactéries (*Azotobacter*, *Clostridium Nostoc*, *Rhizobium*) etc.

Et également le cycle de carbone, en effet $7,5 \times 10^{10}$ tonnes de cellulose sont produits dans l'environnement par photo synthèse chaque année 5 à 10 % sont dégradés dans des conditions anaérobies par diverses bactéries, la nature, la cellulose se trouve sous plusieurs formes : xylane, hemicelluloses, et lignine : beaucoup des bactéries anaérobies cellulolytiques du sol et des sédiments sécrètent des cellulases et xylanases (**Gal et al., 1997**).

Une espèce nouvelle *Clostridium hungatei* a été isolée du sol par Esteban Monserrate et al. (2001).

Une autre espèce *Clostridium scatologene* isolée de sédiments acides en Allemagne, bactérie anaérobie autogène réduit le CO₂ en acetate (Drake, 1994 ; Schink, 1994).

3 - Echantillonnage des eaux souterraines

Le but de l'échantillonnage d'une eau est fourni pour l'analyse d'un échantillon représentatif de son milieu.

L'échantillonnage des eaux souterraines réunit des précautions à prendre pour maîtriser chaque phase de l'échantillonnage :

❖ Le prélèvement :

Lors de l'échantillonnage d'une eau souterraine, les prélèvements dans les forages non équipés de pompes sont ceux qui peuvent le plus modifier la composition de l'eau à cause de la difficulté d'obtenir un échantillon représentatif du milieu, de la contamination de l'eau par les instruments de prélèvement et du contact de l'eau avec l'atmosphère.

Il existe différentes techniques de prélèvement d'eau dans les forages. Les principales sont :

1 – Les tubes échantillonneurs :

Ces tubes ne permettent de remonter à la surface que des volumes d'eau restreints ($1 \pm 0,5l$).

2 – Systèmes de prélèvements par seringues :

Le système permet de descendre une seringue dans le forage jusqu'à la profondeur voulue pour le prélèvement.

Ce système d'échantillonnage ne modifie que très peu la composition de l'eau.

3 – Pompes :

L'utilisation de pompes pour le prélèvement d'eau dans un forage constitue la technique la plus communément admise. Il permet également, grâce aux mesures en continu lors du pompage de déterminer le moment où l'eau devient représentative du milieu aquifère. Il existe plusieurs types de pompes.

4 – Tuyaux des pompes et autres accessoires servant au prélèvement :

Le tuyau d'aspiration ou de refoulement d'une pompe, la pompe elle-même, de même que tout autre récipient dans lequel l'eau transite au cours de l'échantillonnage peut être assimilé à un flacon dans lequel l'eau séjourne que temporairement. Les considérations émises sur la propreté et la nature des flacons s'appliquent donc aussi aux tubages des pompes.

5 - Cellules d'échantillonnage à dialyse et à diffusion :

◆ Cellules à dialyse ou « peeper »

Une cellule à dialyse consiste en un flacon en verre contenant de l'eau ultrapure et dont le bouchon est remplacé par une membrane perméable (filtre 0,1 mm ou plus fin). Cette technique présente l'avantage de fournir un échantillon exempt de turbidité et de germes (Rouen et al., 1986 ; Davis et al., 1992 ; Steinmann et Shotyk, 1996).

Ce type de cellules donne de très bons résultats pour l'analyse des substances minérales.

◆ **Cellule à diffusion**

Méthode très pratique pour la mesure des composés organiques volatiles (Barber et Briegel, 1987).

6 – Echantillonneurs automatiques de nombreux types existent sur le marché des plus simples au plus élaborés :

◆ **Filtration**

En règle générale le matériel nécessaire à la filtration des échantillons est fourni par le laboratoire qui exécute les analyses.

Plusieurs options de filtration :

- La filtration sous vide
- La filtration granitaire
- La filtration sous pression
- La filtration tangentielle
- La filtration in situ

◆ **Flacons**

En règle générale, les flacons sont fournis par le laboratoire qui exécute les analyses car leur type et leur contenance dépendent non seulement des composants à analyser mais aussi de la méthode d'analyse.

◆ **Etiquetage**

Les flacons doivent être clairement identifiés à l'aide d'étiquettes adhésives indiquant :

- Le numéro de l'échantillon

- Le nom / le numéro du point du prélèvement
- La date (et heure) du prélèvement
- L'organisme de prélèvement

◆ **Préparation et exécution de l'échantillonnage**

L'échantillonnage d'une eau selon OFEFP (2001) comprend la préparation du prélèvement, le prélèvement proprement dit, le conditionnement de l'échantillon, aussi que son stockage jusqu'au moment où l'eau est analysée. Chacune de ces étapes est importante pour assurer la fiabilité des résultats d'analyse.

◆ **Nettoyage de l'équipement**

Dans la plupart des cas, un simple rinçage du matériel d'échantillonnage avec l'eau à prélever suffit.

Il arrive cependant que ce matériel soit souillé au cours de la campagne d'échantillonnage par une eau polluée. La surface du matériel doit être lavée à l'aide d'un détergent et d'une brosse puis rincée à l'aide d'un appareil à projection de vapeur. Le lavage des parties inférieures (pompes, tuyaux) se fera par circulation des produits de nettoyage et de rinçage.

Pour les prélèvements d'eau dans notre aquifère, nous nous sommes inspirés des travaux de **Basso (2004)**, elle a mis au point une technique qui consiste à réaliser des injections chlorées trois fois successivement pour désinfecter le conduit avant de prélever les échantillons, le nombre total des bactéries décroît de $2,5 \times 10^5$ à $1,0 \times 10^4$ / ml durant la procédure de désinfection.

Les cultures bactériennes des premiers échantillons, sont dominées par les sulfato-réducteurs et les hétérotrophes. Cette méthode permet d'obtenir les phylums représentatifs de cet aquifère.

Partie 2 – Les méthodes de dénombrement et d'identification des bactéries en écologie microbienne

1 – Les méthodes classiques de microbiologie

La croissance bactérienne peut être appréciée en estimant en fonction du temps les variations de la masse bactérienne ou du nombre de cellules.

Cette estimation peut être faite par des mesures quantitatives.

1 – 1 Méthodes de numération

1 – 1 – 1 Numérotation totale

La totalité des cellules viables ou non est dénombrée au microscope dans des compartiments volumétriques (chambres de comptage de petroff-hausser). Cette technique ne donne des résultats acceptables que dans des conditions expérimentales où l'on est sûr que la quasi-totalité des cellules sont vivantes.

1 – 1 – 2 Numérotation des cellules viables

On compte les colonies bactériennes apparues sur ou dans ce milieu de culture gélosé ou liquide, inoculé par un aliquot d'une suspension bactérienne homogène et suffisamment diluée.

A l'aide de dilutions successives, on détermine la dilution maximale à laquelle il est possible d'obtenir une croissance de microorganismes

Dans ces conditions, si l'isolement des colonies est correct, chacune de ces colonies est supposée dériver d'une seule bactérie appelée unité formant colonie (UFC) sur milieu solide ou le nombre le plus probable sur milieu liquide (technique de NPP). Inversement et quelle que soit son activité métabolique ou génétique, toute bactérie incapable de former une colonie est dite non viable (Kisaud et al., 2002).

1 – 1 – 3 Comptage par épifluorescence

Pour ce type de comptage, on utilise la propriété qu'ont certains chromophores lorsqu'ils sont excités à une longueur d'onde (λ_1), de réémettre l'énergie fournie sous forme lumineuse à une longueur d'onde supérieure (λ_2) (Zimmermann et Meyer-Reil, 1974).

Selon les colorations, c'est le chromophore qui va se fixer directement sur la cible (DAPI, SYBR Green) alors que dans d'autres cas, il sera relié à une molécule non fluorescente qui jouera le rôle d'agent de spécificité (anticorps, sondes nucléiques). La coloration va être réalisée directement sur les cellules. Pour des environnements pauvres en microorganismes, il est nécessaire de concentrer les échantillons par filtration. On utilise couramment un filtre noirci (Hobbie et al., 1977) sur lequel il est possible de colorer les cellules avec des marqueurs fluorescents tels que :

- Le DAPI (diamino-phenylindole) colorant l'ADN
- L'acridine orange qui colore l'ADN et l'ARN
- Le Sypro qui colore les protéines et qui a été utilisé pour quantifier la biomasse planctonique (Zubkov et al, 1999)

1 – 2 Méthodes quantitatives

1 – 2 – 1 Mesure directe de la masse bactérienne exprimée usuellement en « poids sec »

Les bactéries sont lavées, séchées et pesées. C'est donc une méthode longue qui nécessite une grande quantité de cellules. C'est la méthode de référence.

1 – 2 – 2 Mesure de l'activité enzymatique des bactéries

Mesure du poids, mesure de la consommation d'oxygène (appareil de Warburg). Ces méthodes sont peu précises et rarement utilisées.

1 – 2 – 3 Mesure de la densité optique

On mesure la lumière absorbée par la suspension bactérienne, dans ces conditions de spectre lumineux soigneusement défini.

Cette méthode est de loin, la plus employée : elle est rapide et précise, mais sa susceptibilité est modérée car il faut une teneur d'au moins 10^7 b⁺/ml pour obtenir une densité optique mesurable.

1 – 3 Les cultures d'enrichissements et d'isolement des communautés bactériennes

1-3-1 L'enrichissement

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives ce qui implique :

- Couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie, la source d'azote;
- Présenter un pH voisin du pH optimal.

Il existe une grande variété de milieux de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes.

On distingue généralement :

- Les milieux synthétiques de composition connue, qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe.

- Milieux usuels :

On regroupe sous ce vocable un ensemble de milieux de composition et de préparation assez simple, permettant le développement d'une grande variété de microorganismes

- Milieux enrichis :

Ils sont obtenus en incorporant à un milieu de base adéquat des liquides ou suspensions riches en molécules organiques diverses, du sang frais, du sérum, des suppléments polyvitaminiques.

- Milieux sélectifs :

Les milieux sélectifs sont adaptés aux conditions de culture d'un microorganisme donné.

1-3-2 Isolement et identification

- Milieux d'orientation et d'identification :

La plupart des milieux d'isolement sont conçus pour mettre en évidence des caractères biochimiques permettant une orientation du diagnostic grâce à des constituants ajoutés au milieu.

Après l'isolement d'une souche pure sur ces milieux, sa caractérisation consiste à déterminer ses caractères phénotypiques et génotypiques, et donc en déduire sa position taxonomique.

2 – Les méthodes moléculaires d'analyse des communautés bactériennes

2 – L'ARN ribosomique 16S

Pour comparer des organismes phylogénétiquement très éloignés, il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert

l'étude des séquences où des mutations se seront accumulées en quelques millions d'années.

La classification phylogénétique retenue par l'actuelle édition du « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* » repose essentiellement sur les séquences des ADN 16s.

En 1983, **Kimura** a émis le concept d'horloge « évolutionnaire » : La vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Comme le souligne **Woese** : l'évolution a un rythme quasi-indépendant des changements des phénotypes (théorie neutraliste de l'évolution).

Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre phylogénétique en utilisant des méthodes mathématiques.

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est-à-dire descendant d'un ancêtre connu et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Les ARN_r (ARN ribosomiques) ont été choisis comme marqueurs phylogéniques.

Ce sont les travaux de **Carl Woese** qui ont permis par des études de phylogénie moléculaire appliquée à l'étude des séquences d'ARN ribosomique de :

- Décrire les espèces bactériennes en terme de phylogénie
- De reconnaître la multitude des espèces bactériennes présentes
- De découvrir le domaine des Archéobacteries

Les ARN_r (16s pour les procaryotes) ont été choisis en taxonomie pour trois raisons principales :

- ✓ Ils sont présents dans toutes les cellules, ce qui permet des comparaisons entre procaryotes et eucaryotes.
- ✓ Ils ont une structure bien conservée car toutes modifications importantes pourraient avoir des conséquences importantes sur les synthèses protéiques. Il existe d'ailleurs des portions d'ARN_r dont la séquence est identique chez les êtres vivants.
- ✓ Ils sont abondants dans la cellule, et faciles à purifier.

Les ARN_r s'associent à des protéines pour former les ribosomes, chez les procaryotes, ils sont constitués d'une sous unité 30s d'un ribosome qui contient de l'ARN_r 16s et la sous unité 50s contient de l'ARN_r 5s et de ARN_r 23s.

L'ARN_r 5s est formé d'environ 120 nucléotides, l'ARN_r 16s d'environ 1540 nucléotides et l'ARN_r 23s comprends environ 2900 nucléotides. Tous les ARN_r sont monocaténares, sauf dans quelques régions où se forment des boucles par appariement de bases complémentaires situées sur la même chaîne.

Chez une bactérie, les gènes qui codent pour les ARN_r sont organisés en opérons dont la structure est semblable : trois gènes, séparés par un espace, codent pour les ARN_r 16s (gène rrs), les ARN_r 23s (gène rrl) et pour les ARN_r 5s (gène rrf). L'ARN_r 16s est le plus utilisé car il est plus facile à analyser que l'ARN_r 23s et plus riche en information que l'ARN_r 5s.

L'établissement de dictionnaires d'oligonucléotides initialisé par Fox et Woese a été riche d'applications. L'ARN_r 16s est digéré par la ribonucléase T₁ pour donner naissance à des oligonucléotides pouvant contenir jusqu'à 20 bases et se terminant toujours par un résidu guanyl.

Ces oligonucléotides sont suffisamment courts pour pouvoir être séquencés, seuls sont retenus les oligonucléotides formés de plus de 6 nucléotides car il y a peu de chance pour que la séquence qui les caractérise soit représentée plus d'une fois dans la molécule d'ARN_r 16s.

Lorsque les ARN_r 16s de deux bactéries contiennent un ou plusieurs oligonucléotides semblables, ces deux bactéries sont apparentées. Plus le nombre d'oligonucléotides semblables est élevé, plus l'homologie est grande.

En ne retenant que les oligonucléotides comprenant au moins 6 nucléotides, il est possible de constituer un dictionnaire des oligonucléotides. La majorité des dictionnaires comprend entre 60 et 70 oligonucléotides. Pour comparer entre elles, deux bactéries A et B, on calcule un coefficient de similarité (ou coefficient d'association) : $SAB = 2 NAB / NA + NB$ où NAB est le nombre de nucléotides dans les oligonucléotides communs aux deux bactéries.

NA est le nombre total des nucléotides dans le dictionnaire de la souche A et NB est le nombre total des nucléotides dans le dictionnaire de la souche B.

A l'aide de méthodes statistiques et informatiques, il est possible de construire un arbre phylogénétique montrant les parentés et filiations.

Actuellement, ces dictionnaires sont supplantés par le séquençage de l'ARN_r 16s. la séquence du gène correspondant est connue pour près de 4000 souches et est accessible par interrogation de bases de données (Gen Bank, EMBL) consultables sur Internet.

Ainsi il suffit de déterminer la séquence du gène codant l'ARN_r 16s et de la confronter à une banque de données pour positionner l'espèce correspondante dans l'arbre phylogénétique des bactéries.

La construction d'un arbre phylogénétique est réalisée selon différentes méthodes (distance, parcimonie, maximum de vraisemblance).

La confrontation de différentes techniques et l'évaluation de la robustesse de la topologie (nœuds ou embranchements) par la méthode de « bootstrap » permettent d'apprécier la qualité de l'arbre obtenu. Il réunit les séquences homologues en groupes monophylétiques.

Le positionnement d'une séquence dans un groupe monophylétique réunissant des organismes partageant des caractères phénotypiques aboutit au diagnostic du genre. L'utilité du séquençage des ARN_r 16s est reconnue par tous les taxonomistes.

2 – 2 Les techniques moléculaires

2 – 2 – 1 Clonage et séquençage de l'ARN_r 16s

Le clonage et le séquençage des gènes d'ARN_r 16s sont très utilisés en écologie microbienne. Le principe général de la méthode est détaillé dans la figure I-5.

La méthode comprend quatre étapes clés :

- L'extraction de l'ADN génomique total de l'échantillon ;
- L'amplification spécifique des gènes codants pour l'ARN ribosomique 16s ;
- Le clonage des produits d'amplification ;

- Le séquençage des ADN_r 16s séparés et individualisés dans la banque de clones entre procaryotes et eucaryotes.

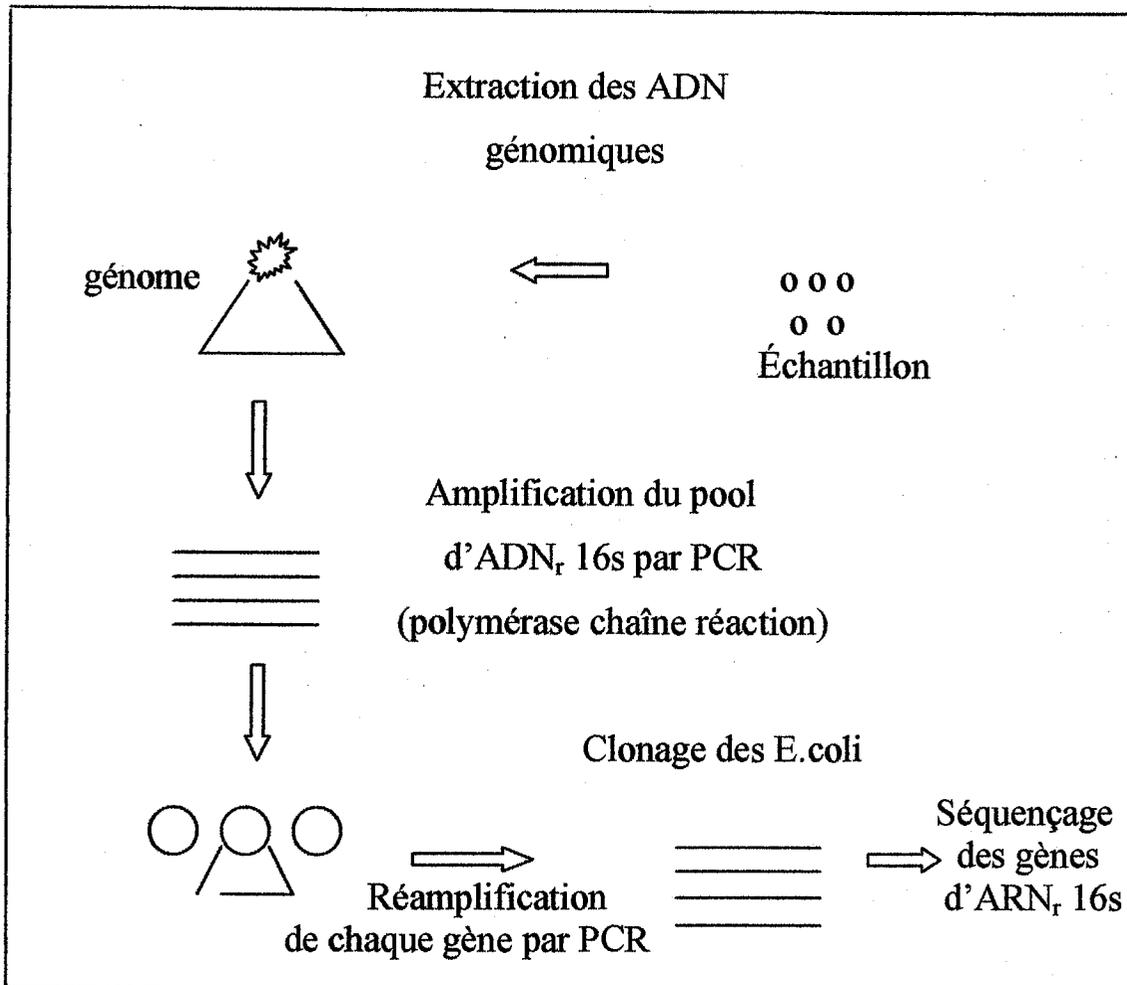


Figure I- 5 : Principe général du clonage – séquençage.

Dans la pratique, le procédé classique pour extraire l'ADN est l'extraction par le couple phénol-chloroforme.

Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et les acides nucléiques : il est ensuite éliminé par l'extraction avec du chloroforme (non nuisible avec l'eau).

De nombreux kits sont proposés actuellement pour faire cette extraction (par exemple Promega).

La quantité d'ADN est mesurée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260nm et à 280nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines.

➤ **Migration électrophorétique des fragments d'ADN**

Les fragments d'ADN après digestion par les enzymes de restriction peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser. La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée par exposition aux rayons UV après réaction avec un réactif spécifique (bromure d'éthidium par exemple).

➤ **La technique d'amplification génique ou technique PCR (« polymerase chain reaction »)**

Principe :

Cette technique décrite en 1985 (K.MULLIS et coll.) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement.

Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires. Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces.

Réalisation pratique :

La technique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession des trois phases :

- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92 – 95°C) (30 secondes – 1 minute).
- Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55 – 60°C.
- Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70 – 72°C (1 – 2 minutes).

La première amorce, se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 sec – 1 minute).

Cette technique a pris un essor considérable avec l'introduction d'une ADN polymérase résistante à la chaleur Taq.

- La RT – PCR

La RT – PCR se déroule en deux phases :

Une première phase correspond à la copie d'ARN messenger en ADN complémentaire (cADN) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur le cADN synthétisé.

Dans la première phase, l'ARN messenger à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul mARN auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de cADN simple brin).

Une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique. (voir figure I- 6).

LEI

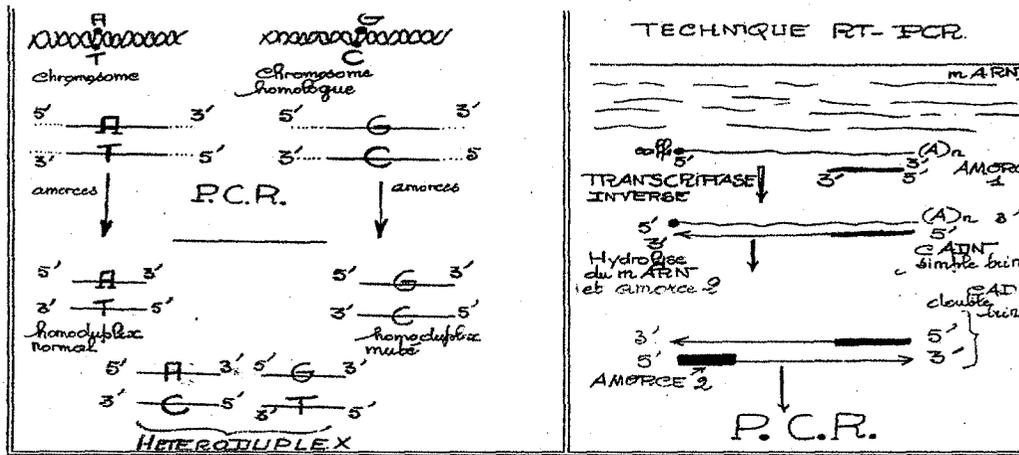


Figure I-6 : technique de PCR et de RT-PCR

Le séquençage de l'ADN

Technique de Sanger

Principe

Cette technique enzymatique est basée sur la copie d'un fragment d'ADN monocaténaire que l'on désire séquencer par une ADN polymérase.

On utilise des didésoxynucléosides triphosphates. Ces dérivés ne possèdent pas d'OH en position 3' du désoxyribose. L'incorporation de ce dédisoxyribonucléotide par l'ADN polymérase bloque l'allongement de la molécule d'ADN en cours de copie.

La technique de Sanger s'est considérablement automatisée avec l'apparition des appareils de séquençage automatique.

On utilise des amorces ou des didésoxynucléosides triphosphates marqués à des fluorochromes.

Après les réactions de séquençage, on sépare les produits sur des pistes électrophorétiques. La lecture se fait par un balayage automatique qui permet de discriminer grâce à des fluorochromes différents les quatre bases A, T, C ou G.

L'utilisation de logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire.

Technique chimique de MAXAM et de GILBERT

La méthode chimique de MAXAM et de GILBERT

La méthode chimique de Maxam et de Gilbert est moins utilisée actuellement que la méthode enzymatique de SANGER.

L'ADN à séquencer est tout d'abord marqué en 5' avec phosphore 32 (d'ATP) puis clivé après A, G, C ou T par divers réactifs chimiques.

Après clivage par ces réactifs, les fragments produits sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. L'examen de l'autoradiographie correspondante permet de connaître la séquence du brin analysé.

2 - 2 - 2 RFLP

Parmi les très nombreux sites de restriction qui jalonnent l'ADN génomique, il en est qui sont quasiment constants, c'est à dire toujours présents au même locus sur toutes les molécules homologues de l'espèce.

Cette technique a été développée dans le but d'une analyse rapide de la diversité microbienne de différents échantillons sur la base de discrimination des fragments de restriction d'ADN_r 16s terminaux marqués. (Clément et al., 1998 ; Liu et al., 1997).

Le principe de la méthode est représenté dans la figure I- 7.

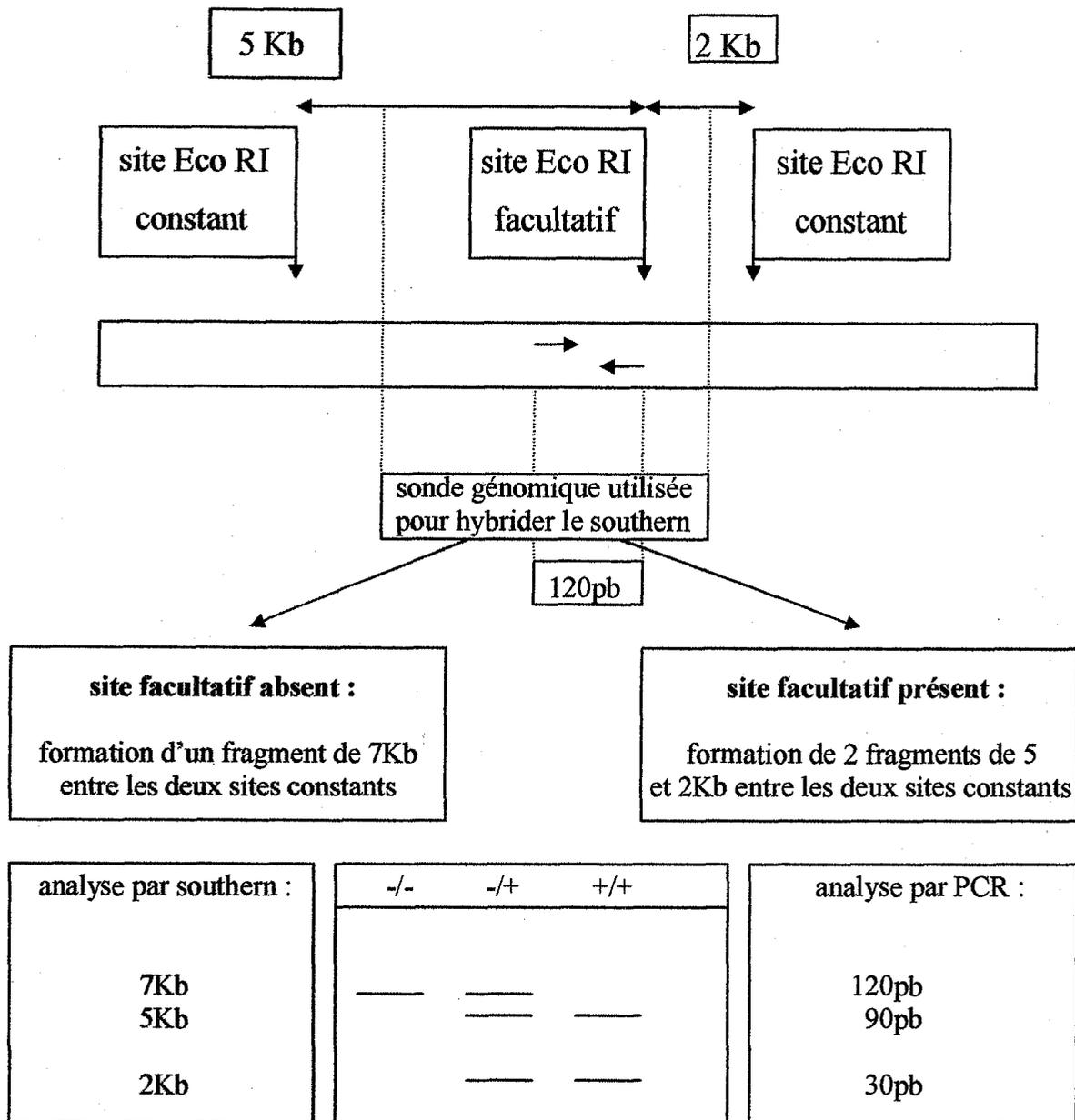


Figure I-7 : Définition, conséquences et visualisation d'une RFLP

- un site facultatif EcoRI est situé entre deux sites constants à des distances respectives de 5 et 2 Kb. Son absence ou sa présence conduit à un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction à ce niveau du génome, après digestion totale de l'ADN.
- La taille de ces fragments est visualisable sur un Southern blot : après digestion totale de l'ADN génomique, électrophorèse en agarose, transfert sur membrane et hybridation avec une sonde marquée ayant une homologie partielle avec les trois types de fragments (voir les pointillés sur le schéma en haut). L'analyse du nombre et de la taille des fragments permet de génotyper les individus étudiés, ici de gauche à droite, -/-, +/-, et +/+
- Si le segment génomique contenant le RFLP étudié a été séquencé, au moins dans ses extrémités, il est possible de l'amplifier par PCR (flèches correspondant aux amorces dans le schéma sous le site facultatif). La PCR dispense de la digestion totale de l'ADN génomique, de l'électrophorèse et du Southern. Après PCR, on réalise la digestion des fragments amplifiés et on les visualise sur un gel de contrôle (polycamide ou agarose). Dans l'exemple présent on a amplifié un fragment de 120 pb avec

des amorces situées à 90 et 30 pb du site facultatif, ce qui aboutit en cas d'absence et/ou de présence à la visualisation de fragments de 120 pb et/ou de 90 et 30 pb.

3 – Taxonomie des procaryotes

La taxonomie est la science qui permet de classer rationnellement les organismes vivants en groupes d'affinité ou taxons.

La taxonomie et la nomenclature sont les deux disciplines de la systématique dont la principale application est l'identification.

3 – 1 – Les différents rangs hiérarchiques

Le monde des procaryotes est divisé en deux domaines :

Les Archaea (ou Archaeobacteria) et les Bacteria (ou Eubacteria). V. Figure n°5 En théorie, au sein de chacune de ces domaines, on reconnaît les groupes hiérarchiques suivants :

Phylumus (ou divisions), classes, ou sous- classes, ordre, sous-ordres, familles, sous-familles, tribus, sous-tribus, genres, sous-genres, espèces, et sous-espèces.

- La tribu

Est un rang hiérarchique qui tombe en désuétude. Vingt- quatre tribus ont un statut dans la nomenclature bactérienne mais les dernières tribus (Eubacterieae et Miccococceae) ont été proposées par Prévot en 1961.

Les tribus ne sont plus prises en compte dans la classification du « Bergey's Manual of systematic Bacteriology ».

- Le sous-genre

Est un rang hiérarchique très peu utilisé. Pour chacun des rangs hiérarchiques, une nomenclature type doit être désignée :

- **Ordre type** pour les phylums, classes et sous-classes,
- **Genre type** pour les ordres, sous-ordres, familles, sous-familles, tribus, et sous-tribus.
- **Espèce type** pour les espèces et sous-espèces
- **Souche type** pour les espèces et sous-espèces.

3 – 2 Les différentes approches taxonomiques

3 – 2 – 1 Taxonomie phénotypique

Depuis la classification proposée par **Cohn** en 1872 et jusqu'au début des années 1960, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénotypique.

La classification phénotypique utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la présence d'une spore, la mise en évidence d'un caractère biochimique jugé essentiel (voir tableau 3)

Tableau I-3 : quelques caractères phénotypiques pour identification

Caractères morphologiques	Caractères Physiologiques et Métaboliques
Forme cellulaire	Source de carbone et d'azote
Taille cellulaire	Constituants de la paroi cellulaire
Morphologie des colonies	Sources d'énergie
Caractéristique ultra structurale	Produits de fermentation
Coloration de Gram	Mode général de nutrition
Mobilité	Optimum et gamme de températures et de croissance.
Flagelles	Luminescence
Forme et localisation de l'endospore	Mécanismes de conversion de l'énergie
Morphologie et localisation des spores	Tolérance osmotique
Inclusion cellulaire	Relation avec l'oxygène
couleur	Optimum et gamme de pH de croissance
	Pigments photosynthétiques
	Besoin et tolérance en sels
	Sensibilité aux antibiotiques

3 – 2 – 2 – Taxonomie numérique

En 1763, le botaniste Français **Adanson** proposait une méthode de classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme.

En 1957, **Sneath** applique une similaire aux bactéries et développe une taxonomie qualifiée de numérique ou d'adansonienne.

De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, présence ou absence d'un constituant cellulaire particulier (un acide gras membranaire, une protéine, une quinone...) et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du

caractère). Même en multipliant le nombre de caractères étudiés, la taxonomie numérique n'évalue que 5 à 20 % du potentiel génétique d'une bactérie.

3 – 2– 3 Chimiotaxonomie

La Chimiotaxonomie se base sur l'étude de constituants cellulaires.

Les plus utilisés sont le peptidoglycane, les quinones (présence de ménaquinones ou d'ubiquinones) ; les lipides polaires (utilisés pour la taxonomie du phylum des Actinobactéria) et les acides mycoliques (taxonomie des gènes *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*).

Les méthodes chimiotaxonomiques qui sont complexes sont réservées à des laboratoires spécialisés.

3 – 2 – 4 Taxonomie moléculaire

❖ Détermination du G + C %

En 1949, **Chargaff et al.** montrent que le contenu en bases puriques (G : guanine, A : adenine) et en bases pyrimidiques (C : cytosine, T : thymine) de l'Adn pourrait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce.

Le contenu en base d'un ADN est exprimé par :

$$G + C \% = (G + C) \times 100 / (A + T + G + C).$$

Chez les procaryotes, les valeurs du G + C % sont très dispersées et elles varient de 25% à 75%.

Actuellement, on admet que des bactéries dont les G + C diffèrent de plus de 5 % ne devraient pas appartenir à une même espèce et que des bactéries dont le G + C diffèrent de plus de 10% ne devraient pas appartenir à un même genre.

❖ **Les hybridations d'acides nucléiques**

Les hybridations ADN – ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne.

Leurs réalisations n'ont été possibles qu'après la découverte par **Marmur et al. (1961)** du phénomène de renaturation de l'ADN.

Le chauffage progressif d'une solution d'ADN conduit à une dénaturation de la molécule, c'est-à-dire la séparation des deux brins de la double hélice.

La dénaturation est liée à la rupture des liaisons hydrogène reliant chaque paire de bases.

Si on refroidit brutalement la solution d'ADN dénaturée, la structure monocaténaire est conservée. Par contre si le refroidissement est lent, il se produit une renaturation de l'ADN : les deux brins de l'ADN monocaténaire se réassocient pour reformer une double hélice.

Les hybridations ADN – ADN, utilisées en Bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes.

Dans ces conditions, on obtient d'autant plus de duplex hétérologues que les séquences d'ADN des micro-organismes sont proches. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former :

- Si les ADN des deux bactéries présentent des homologies importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche comme dans le cas d'une fermeture à glissière.

- Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogènes.

Dans les conditions optimales d'hybridation, deux ADN doivent posséder au moins 80 % de séquences complémentaires pour pouvoir se réassocier. Ce fait explique que les hybridations ADN – ADN ne peuvent être utilisées pour comparer des bactéries très différentes. Elles sont utilisées pour définir les espèces et dans une moindre mesure les gènes.

En revanche, elles n'ont que peu d'utilité pour classer des bactéries dans un rang hiérarchique supérieur au genre.

Les techniques d'hybridation ont également été appliquées à l'hybridation ADN – ARN_r. L'hybridation ADN - ARN_r a été employée pour placer des procaryotes dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Elles ont permis de dégager le concept de super famille, terme proposé par DE LEY.

Les hybridations ADN - ARN_r ont été remplacées par l'établissement de dictionnaires d'oligonucléotides puis par le séquençage des ADN_r 16s.

Aussi, seuls des résultats présentés dans des publications antérieures à 1995 ont été obtenus à l'aide de cette technique.

❖ **Etude de diverses séquences génétiques**

Pour comparer des organismes phylogéniquement très éloignés, il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années.

La classification phylogénétique retenue par l'actuelle édition du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology » repose essentiellement sur les séquences des ADN_r 16s.

❖ **Les arbres phylogénétiques**

Les méthodes de reconstruction

Les arbres phylogénétiques sont élaborés par comparaison des séquences d'ADNr 16S selon les méthodes de distances et de parcimonie. Dans chaque cas la robustesse des arbres dépend des alignements corrects et justes des séquences. Je cite qu'une seule, la plus couramment utilisée

▪ Les méthodes de distance :

Ces méthodes rapides déterminent le nombre de nucléotides qui varient entre deux séquences, Je cite qu'une seule, la plus couramment utilisée.

▪ La méthode de Neighbor- joining (Saitou et Nei, 1987) :

C'est une méthode agglomérative qui utilise un algorithme de clusterisation, les séquences sont rassemblées d'après leur similarité. Son algorithme prend en compte les phénomènes d'homoplasie.

▪ La méthode de parcimonie :

Cette approche détermine l'arbre le plus parcimonieux possible, présentant le moins de mutations pour passer d'une séquence à une autre (Reeves, 1997 ; Edgell et al., 1996 ; Fitch, 1971).

3 – 3 Définition des groupes taxonomiques

3 – 3 – 1 Définition d'une espèce bactérienne

L'espèce constitue l'unité de base ou le maillon essentiel de la classification bactérienne.

La définition classique d'une espèce biologique n'est pas applicable aux procaryotes et les bactériologistes ont dû élaborer une définition originale de l'espèce !

En bactériologie, une espèce est constituée par sa souche type et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluse au sein de la même espèce. Il convient de remarquer qu'il n'existe aucune définition universellement admise de l'espèce bactérienne. **(Euzéby, 2006).**

Deux comités, désignées par « l'International Comitee ou systematic Bacteriology » et « International commitee ou systematics of prokarriotes » se sont efforcés d'établir une définition de l'espèce bactérienne.

Un premier comité, présidé par Wayne, a émis des conclusions et le rapport d'un deuxième comité, présidé par Stackebrandt, a été publié en 2002. Pour ces deux comités, la définition de l'espèce se base sur les homologies ADN – ADN.

3 – 3 – 2 Définition d'un genre

Toutes les espèces sont classées dans des genres ce qui permet d'appliquer à la systématique bactérienne la nomenclature « binomale » préconisée par Carl von Linné.

Avec l'espèce, le genre est donc le rang hiérarchique le plus important.

La définition d'un genre donné par Cowan en 1968 est la suivante :

“ ... One of the basic ranks in the hierarchical systems used in biology, and probably the highest rank with any significance in microbiology ”

Depuis 1968, aucune définition satisfaisante d'un genre n'a été formulée et comme le soulignent **Brenner, Staley et Kineg (2001)** une telle définition n'existera peut être jamais.

De manière idéale, un genre devrait rassembler des espèces génétiquement et phénotypiquement apparentes et il devrait pouvoir être identifié sur la base de ses caractères phénotypiques.

Les critères génétiques varient selon les auteurs mais un genre pourrait regrouper des souches présentant entre 30 et 60% d'homologie ADN – ADN et/ou des espèces formant un groupe distinct sur la base des séquences des ADN_r 16s (homologies de séquences supérieures à 90 ou 94%).

On admet également que des procaryotes dont les G + C % diffèrent de plus de 10 % ne devraient pas appartenir à un même genre.

3 – 3 – 3 Classification de la deuxième édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

La classification utilisée par la majorité des bactériologistes est celle du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology » cette classification a pour but de refléter la phylogénie des procaryotes et pour les taxons d'un rang hiérarchique supérieur au genre, elle est basée principalement, voire exclusivement, sur les séquences des ADN_r 16s.

La classification du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology » reconnaît deux domaines ou empires « Archaea » et « Bacteria ». chaque domaine est divisé en phylums qui sont à leur tour subdivisés en classes, ordres, familles, genres, espèces et éventuellement, sous-espèces.

Les tribus et les sous-genres sont des rangs hiérarchiques non retenus dans cette classification. Le domaine des « Archaea » est constitué du phylum des « Cremarchaeota » et du phylum des « Euryarchaeota ».

Le domaine des « Bacteria » rassemble 24 phylums : « Aquificae » ; « Thermotogae » ; « Thermodesulfobacteria » ; « Deinococcus – Thermus » ; « Nitrospira » ; « Deferribacteres » ; « Cyanobacteria » ; « Chlorobi » ; « Proteobacteria » ; « Firmicutes » ; « Actinobacteria » ; « Planctomycetes » ; « Chlamydiae » ; « Spirochaetes » ; « Fibrobacteres » ; « Acidobacteria » ; « Bacteroidetes » ; « Fusobacteria » « Verrucomicrobia » ; « Dictyoglomi » et « Gemmatimonadetes ».

Matériels et méthodes

1 – Echantillonnage et conservation des échantillons

1 – 1 Le site d'étude

Le site d'étude se situe dans le bassin parisien à environs 100 km à l'ouest de Paris. C'est un puits éruptif artésien de 820 mètres de profondeur. L'eau extraite provient d'une formation calcaire du rauracien.

L'aquifère présente une température in situ de 38°C, un pH de 7,7 et une salinité de 6g/l en NaCl, dont 2,4 g/l de sulfates. La composition minérale de l'eau de l'aquifère est résumée dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Mesures de la composition de l'eau prélevée de l'aquifère

Puits	
Mesures au laboratoire	mg/l
Carbone inorganique	33,8
Total organic carbon	3,54
Ca ²⁺	228
Mg ²⁺	123
Na ⁺	3180
K ⁺	46,6
NH ₄ ⁺	9,24
Mn ²⁺	0,2
Fe ²⁺	8,1
HCO ₃ ⁻	453
Cl ⁻	3720
SO ₄ ²⁻	2370
F ⁻	4,33
NO ₂ ⁻	0,1
NO ₃ ⁻	1
Mesures in situ	
Température (C°)	38
pH	7,7

1 – 2 Echantillonnage et conservation des échantillons

L'échantillonnage des milieux profonds est une opération difficile pour l'obtention des prélèvements représentatifs.

De plus le forage d'un puits reste une opération onéreuse ce qui de ce fait limite la quantité d'échantillons prélevés en terme de volume et de nombre (Ghiorse et Wilson, 1988). Il est donc important d'optimiser le procédé.

La procédure d'échantillonnage a été décrite par Basso (2005) qui a travaillé sur le même site d'étude.

La procédure d'échantillonnage :

L'échantillonnage s'effectue après une procédure de nettoyage qui comprend cinq étapes :

- ◆ Une première purge importante du puits à son ouverture
- ◆ Un brossage des parois du puits à l'aide d'un outil spécialement conçu à cet effet
- ◆ Une seconde purge, dans le but d'éliminer les matières en suspension pouvant provenir du biofilm bactérien localisé sur les parois du tubing.
- ◆ Une chloration en trois étapes, dans un but de stérilisation avant le prélèvement final. Le chlore est injecté au fond du puits afin d'éliminer tout matériel biologique résiduel.
- ◆ Une dernière étape de purge du puits afin d'éliminer tout le chlore injecté.

Ensuite, la collecte est réalisée en tête de puits. Cela comprend le piquage d'un flexible stérile, par des aiguilles de type Neolus 21G (0,8 m) Terumo®

Le remplissage des échantillons s'effectue dans des flacons stériles et pré-conditionnés en anaérobiose contenant un mélange gazeux (N₂: 95, CO₂: 5,

H₂: 5) ceci d'une part, d'autre part, la flore bactérienne présente dans l'aquifère est concentrée par filtration (Sommerville et al., 1989).

La filtration s'effectue sur des filtres 0,20 µm en polycarbonate (Millipore Sterivex GT 2ml) équipés de pré-filtres de 0,45 µm et montés sur des aiguilles stériles (Admix Needle 1861 ½TW, NokorTM).

Le piquage est réalisé sur un tuyau de caoutchouc stérile de 0,5 cm de diamètre interne, connecté à la tête de puits.

La collecte des échantillons a été faite par l'équipe du Pr Magot (Université de Pau, France).

◆ Conservation de l'échantillon

Les échantillons d'eaux sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière.

2 – Techniques culturelles

2 – 1 Les milieux de culture anoxiques

Pour la préparation des milieux de culture anoxiques, nous avons utilisé les techniques mises au point par **Hungate (1969)** et développées par **Miller et Wolin (1974)**. (photos : II-1, II-2)

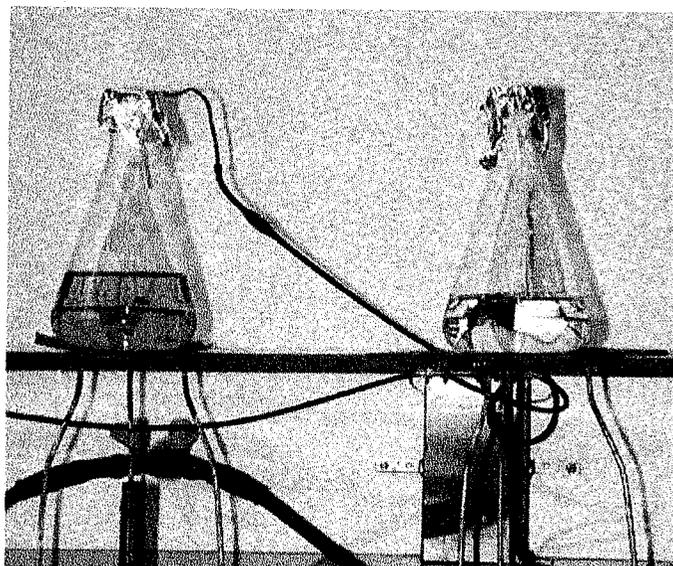


Photo II.1 : Préparation des milieux en anaérobiose.

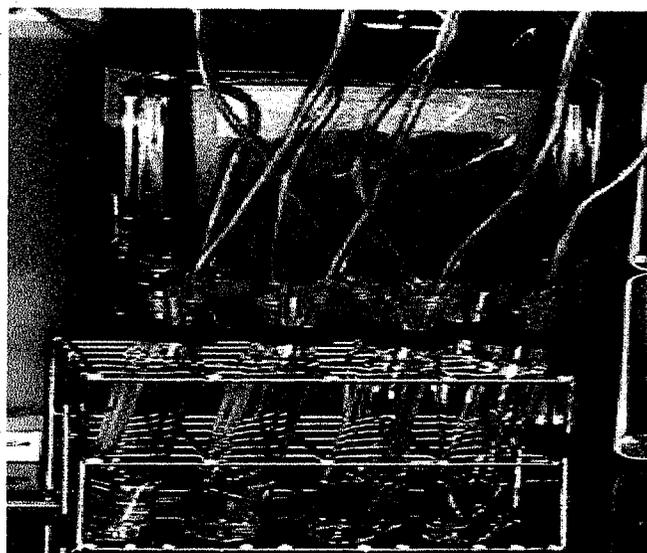


Photo II.2 : Dégazage des milieux

Dans un premier temps, les milieux sont portés à ébullition pour être dégazés puis refroidis sous un flux d'azote exempt d'oxygène.

Ils sont alors répartis dans des tubes de Hungate, puis les tubes ou flacons sont dégazés une seconde fois sous un flux d'un mélange azote/dioxyde de carbone (80/20) et enfin stérilisés à l'autoclave pendant 45 min à 110°C.

Avant inoculation, on ajoutera stérilement pour 5ml de milieu :

- 0,1ml de $\text{Na}_2\text{S}, 9 \text{H}_2\text{O}$ à 2% (p/v)
- 0,1ml de NaHCO_3 à 10% (p/v)

Les solutions de $\text{Na}_2\text{S}, 9\text{H}_2\text{O}$ et NaHCO_3 préparées en anaérobiose, sont stérilisées séparément à l'autoclave pendant 45 min à 110°C.

2 – 2 Les roll-tubes

Pour l'isolement des bactéries anaérobies, nous avons utilisé la technique des roll-tubes mises au point par **Hungate (1969)**.

Cette méthode consiste à faire bouillir sous flux d'azote un milieu de culture contenant de l'agar noble (environ 2%), puis le répartir à chaud dans des tubes de Hungate à raison de 5,0 ml par tube. Ces tubes sont stérilisés à l'autoclave pendant 45 min à 110°C après que l'atmosphère ait été renouvelée par un flux d'un mélange azote/dioxyde de carbone (80/20).

Avant inoculation, les tubes sont chauffés pour faire fondre l'agar puis refroidis à environ 50°C. Après avoir ajouté 0,1 ml de $\text{Na}_2\text{S}, 9\text{H}_2\text{O}$ à 2% et 0,1 ml de NaHCO_3 à 10% dans chaque tube. Ceux-ci sont inoculés avec 0,5 ml de culture. Ils sont alors placés horizontalement sur leur tour (« tube Spinner », Bellco Glass Inc, Vineland, USA) afin de répartir d'une manière homogène le milieu gélosé sur toute la surface du tube tout en étant refroidis avec de la glace. (Voir photo II-3).

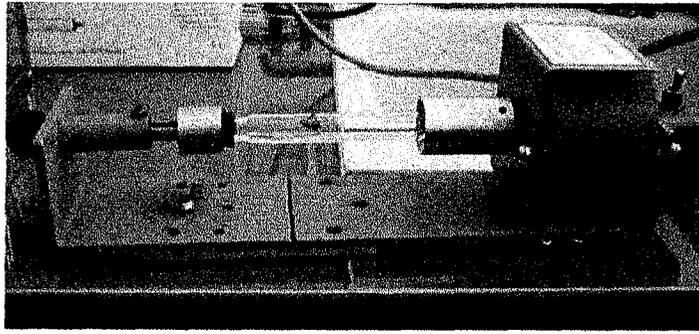


Photo II.3 : Tube Spinner (Roll tube)

2 – 3 Composition des milieux de culture

2 – 3 – 1 Milieu de culture pour l'étude de la souche AS68

La composition du milieu MB68 est la suivante :

(Pour 1 litre) : NH_4Cl , 1g ; K_2HPO_4 , 0,3g ; KH_2PO_4 0,3g ; MgCl_2 , 0,5g ; CaCl_2 , 0,1g ; KCl , 0,1g ; Cystéine HCl, 0,5g ; NaCl , 5g ; extrait de levure, 1g ; solution d'oligo-élément de **Balch et al (1979)**, 1ml ; Résazurine 0,1%, 1ml.

Le pH est ajusté à 7 - 7,4 avec une solution de KOH 10N. Après stérilisation, le milieu est additionné des solutions stériles tampon et réducteur et sucre (NaHCO_3 , Na_2S et glucose à 20Mm).

2 – 3 – 2 Milieu de culture pour l'étude de la souche AS36

La composition du milieu de culture pour l'étude de la souche AS36 est comme suit (Pour 1 litre) :

NH_4Cl , 1g ; K_2HPO_4 , 0,3g ; KH_2PO_4 , 0,3g ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1g ; Na_2SO_4 , 4g ; KCl , 0,1g ; Cystéine HCl, 0,5g ; NaCl , 5g ; extrait de levure, 0,1g ; Solution d'oligo-éléments de Widdel, 1ml.

Après stérilisation, le milieu est additionné de solutions stériles de tampon et réducteur et lactate (NaHCO_3 , Na_2S et lactate à 20mM).

2 – 4 Solutions utilisées pour les milieux de culture

2 – 4 – 1 Solution d'oligo-éléments de Balch et al (1979)

La composition de cette solution est comme suit :

Acide nitriloacétique, 1,5g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3g ; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,5g ; NaCl, 1g ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1g ; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,1g ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,1g ; $ZnCl_2$, 0,1g ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,01g ; $AlK(SO_4)_2$, 0,01g ; H_3BO_3 , 0,01g.

Le pH de la solution est ajusté à 7. Cette solution est conservée à 4°C.

2 – 4 – 2 Solution d'oligo-éléments de Widdel

La composition de cette solution est la suivante :

HCL à 25% (6.75N) : 10 ML

Acidifier le fer avant de dissoudre les éléments suivants :

$FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 1,5g ; H_3Bo_3 , 60mg ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 100mg ; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 120mg ; $ZnCl_2$, 70mg ; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 25mg ; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 15mg ; $AlCl_3$, 50mg ; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 25mg ; Na_2SeO_3 , 3mg ; H_2O pour 1000ml . Le pH est ajusté à 7. Cette solution est conservée à 4°C.

2 – 4 – 3 Solutions mères de sucres

Les sucres sont préparés en anaérobiose puis sont stérilisés par filtration (filtre Millipore, porosité : 0,22 μm) et conservés en flacon pénicilline à température ambiante.

D-Glucose, 1M ; D-Fructose, 1M ; Lactose, 0,5M ; Mannose, 1M ; D-Xylose, 1M ; Mannitol, 1M ; Cellobiose, 1M. L'amidon est directement pesé dans les tubes, à raison de 5g/l

2 – 4 – 4 Solutions mères d'acide organique

Les solutions suivantes sont préparées en anaérobiose et stérilisées à l'autoclave pendant 45 min à 110°C :

Formate, 4M ; acétate, 1M ; propionate, 1M ; lactate, 1M ; succinate, 1M ; pyruvate, 1M ; fumarate, 1M.

2 – 4 – 5 Solutions mères de protéines, peptides et dérivés peptidiques

Les solutions peptidiques sont préparées en anaérobiose et stérilisées à l'autoclave pendant 45 mn à 110°C :

Biotrypcase (hydrolysate trypsine de caséine, BioMerieux) ; 10% (p/v) ;
Casa aminoacides (Hydrolyse acide de caséine, sigma), 20% (p/v) ;
Extrait de levure (Difco), 10% (p/v).

3 – Isolement des souches AS68 et AS36

3 – 1 Enrichissement et Isolement des deux souches

Le milieu d'isolement est le suivant :

Pour 1 litre d'eau de formation reconstituée : Biotrypcase, (Mérieux), 15g ; extrait de levure, 10g ; Glucose, 2,5g ; Cystéine HCl, 1g ; Résazurine, 1ml d'une solution à 0,1%. Ajuster le pH à 7,7.

Tableau II-2 : Eau de formation reconstituée (concentration en g/l)

NaF	0,010
MgCl ₂ , 6H ₂ O	1,025
Na ₂ SO ₄	3,506
KCl	0,085
NH ₄ Cl	0,027
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,838
NaCl	4,754
NaHCO ₃	0,865
Na ₂ S	0,001
FeCl ₂ , 2H ₂ O	0,024

L'isolement des souches est réalisé grâce à la technique des roll-tubes (paragraphe 2-2) dans le milieu cité précédemment.

Après croissance des cultures, nous avons inoculé par dilution successive une série de roll-tubes qui a été inoculée à 37°C pendant 5 jours. Une colonie est prélevée dans la dernière dilution positive et mise en suspension dans 5 ml de milieu avant d'être rediluée en milieu gélosé.

Après avoir répété ce protocole deux fois, la colonie qui apparaît dans la dernière dilution positive en milieu solide est prélevée pour inoculer une série de tubes en milieu liquide. Le dernier tube positif, qui sera contrôlé en microscopie optique, correspond à la souche clonée.

3 – 2 Manipulation des souches et conservation

3 – 2 – 1 Manipulation des souches

La manipulation des souches est effectuée en chambre anaérobie (boîte à gants) (voir photo II.4) pour les cultures en milieu solide (roll-tubes) et à l'aide

d'une seringue stérile préalablement purgée à l'azote (gaz stérilisé par filtration) pour les cultures en milieu liquide.

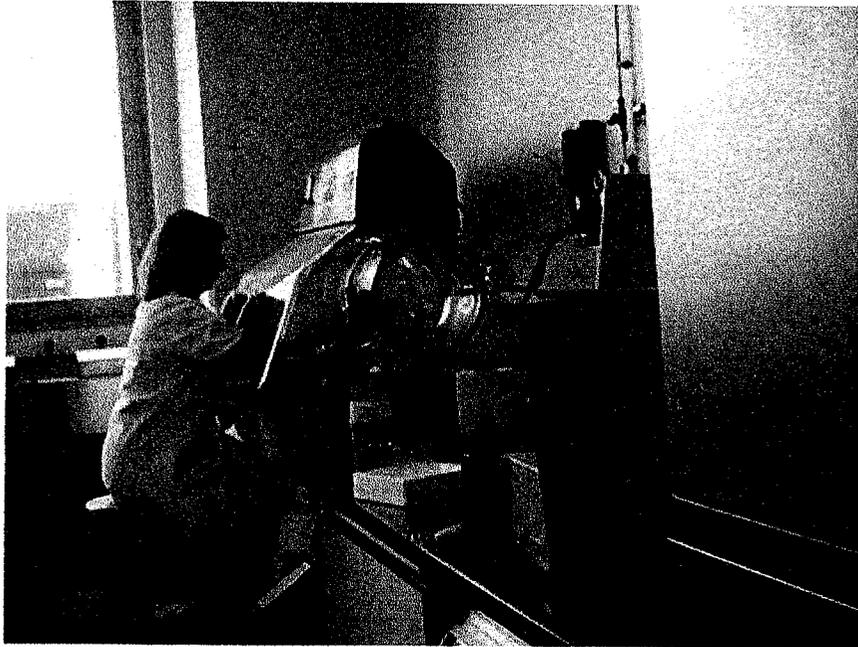


Photo II.4 Boite à gants

3 – 2 – 2 Conservation des souches

Les souches ont été conservées par congélation à -80°C . En outre, elles sont conservées en collection dans la souchothèque du laboratoire IRD de Marseille.

Ces souches ayant fait l'objet de deux publications, (l'une acceptée et la seconde en cours) sont déposées en collection à la DSM (Deutsche Sammlung Von Microorganismen und Zellkulturen Gumbh, Braunschweig, Allemagne) et la JCM (Japan Collection of Microorganisms).

4 - Caractérisation phénotypique des souches AS68, AS36

4 – 1 Morphologie

4 – 1 – 1 Coloration de Gram

On utilise des cellules bactériennes d'une culture en phase exponentielle, lesquelles ont été colorées à l'aide du KITGRAM (SIGMA DIAGNOSTICS), en suivant les instructions du fabricant.

Les lames sont lavées pour enlever l'excès de colorant, séchées à température ambiante et observées au microscope optique de contraste de phase (NIKON OPTIPHOT) à l'objectif d'immersion 100X et les prises de vues sont effectuées avec un appareil NIKON FX 35.

4 – 1 – 2 Microscope électronique à balayage

Les cellules d'une culture bactérienne en phase exponentielle sont collectées par centrifugation à 13 000 tours pendant 15 minutes. Le culot est couvert avec glutaraldéhyde 2,5% et réfrigéré à -4°C pendant 24 heures. Le glutaraldéhyde est décanté et le culot lavé de 3 à 5 fois avec un tampon phosphate. Le culot libre de tampon est couvert avec du tétraoxyde d'osmium à 2% pendant deux heures.

L'osmium est décanté et le culot est déshydraté dans l'alcool dilué (30, 50 et 70%) deux fois, 15 mn chacun. Le culot est laissé au repos toute la nuit dans la dernière dilution. L'échantillon est traité et placé dans une capsule microporeuse et immergé dans l'éthanol absolu afin de le déshydrater.

L'échantillon est séché complètement avec du CO_2 liquide et mis sous forme de poudre sur un ruban de charbon fixé sur une lame d'aluminium.

Pour finir, l'échantillon est couvert d'un mélange charbon – or pendant 250 secondes (Bozzola et Russell, 1991).

Les bactéries sont observées à l'aide d'un microscope électronique (TEOL 5500). Cette technique a été réalisée avec la collaboration du Pr. Pierre Thomas.

4 – 1 – 3 Coloration des flagelles par la méthode de Rhodes

La coloration est réalisée à l'aide des solutions suivantes :

Mordant : Cette solution est préparée en ajoutant 10ml d'acide tannique (10%), 5ml d'une solution aqueuse saturée d'aluminium de potassium et 1ml de chlorure ferrique à 5%.

Nitrate d'argent ammoniacal : Cette solution est préparée en ajoutant goutte à goutte de l'ammoniaque dans une solution de nitrate à 5%, qui est mélangée avec une baguette de verre jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité.

Coloration : Sur la face d'une lame parfaitement propre, quelques gouttes d'une culture jeune (en phase exponentielle) sont déposées et laissées sécher à l'étuve à 30°C. Le mordant est alors ajouté. Après 8 min, la lame est lavée à l'eau distillée avec précaution et couverte de nitrate d'argent ammoniacal (chauffé presque à ébullition dans un tube).

Après 5 minutes, la lame est lavée à l'eau distillée et après le séchage, l'observation des flagelles est réalisée au microscope, en immersion directe sous contraste de phase.

4 – 2 Physiologie

4 – 2 – 1 Température optimale de croissance

La température optimale de croissance des deux souches étudiées a été déterminée en mesurant la vitesse maximale de croissance à différentes températures.

Pour chaque température, deux tubes de Hungate sont inoculés avec une culture en phase exponentielle de croissance et incubés dans des bains – marie (Polystat I, Bioblock, France).

La mesure de la croissance est effectuée par lecture de la densité optique à 580 nm dans le spectrophotomètre (uv– visible Varian 50 SCAN).

4 – 2 – 2 Influence de la concentration de NaCl

L'influence de la salinité sur la croissance des souches a été étudiée en ajoutant différentes quantités de NaCl dans les tubes de Hungate avant la répartition du milieu, pour obtenir des concentrations de 0 à 200 g/l. Deux répétitions pour chacune des salinités testées, sont réalisées et tous les tubes sont incubés à la température optimale de croissance.

4 – 2 – 3 Effet du pH

Pour mesurer la vitesse maximale de croissance des souches à plusieurs pH (4,5 – 9), on a ajouté différentes quantités de NaHCO_3 (10%), de NaCO_3 (8%) ou de HCl (1M) à des tubes inoculés. Le pH initial a été mesuré à l'aide d'un pHmètre (Tacusel Electronique PHN 81).

Le milieu est préparé à la concentration optimale de NaCl et les souches sont incubées à la température optimale de croissance.

4 – 2 – 4 Les accepteurs d'électrons

Pour tester la capacité d'une souche à réduire différents composés, on les ajoute au milieu de culture à différentes concentrations (Tableau II-3).

Pour le soufre élémentaire, il est pesé directement dans les tubes avant la répartition du milieu, tandis que pour les autres accepteurs, ils ont été ajoutés à partir de solutions mères stériles.

Pour chaque accepteur, les cultures sont doublées en prenant les résultats du deuxième repiquage. La réduction des composés est contrôlée par le dosage des produits du tableau correspondant à leur réduction, ainsi que la culture cellulaire mesurée à 580 nm.

Tableau II-3 : Les accepteurs soufrés et azotés testés

Nom	Formule	[C]	Pendant la réaction de réduction
Sulfate de sodium	Na_2SO_4	20 mM	H_2S
Sulfite de sodium	Na_2SO_3	2 mM	H_2S
Thiosulfate de sodium	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	20 mM	$\text{H}_2\text{S}/ \text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^*$
Nitrate de potassium	KNO_3	20 mM	$\text{NO}_2, \text{NO}, \text{N}_2$ ou NH_4^+
Nitrite de potassium	KNO_2	5 mM	NO, N_2 ou NH_4^+
Soufre élémentaire	S	1%	H_2S

4-2-4-1 Etude de l'activité soufre – réductrice

4-2-4-1-1 Protocole

On prépare le milieu de base mais sans thiosulfate. On ajoute les solutions stériles [NaHCO_3 , Na_2S , glucose(AS68) lactate(AS36)] et les accepteurs d'électrons soufrés à tester à 20mmol.L^{-1} pour le sulfate et le thiosulfate et à 2mmol.L^{-1} pour le sulfite. Le soufre est introduit dans les tubes avant la répartition du milieu à une concentration de 10g.L^{-1} . On réalise aussi un tube témoin sans accepteurs inoculé.

La croissance est suivie par la mesure de la densité optique (DO).

La disparition du substrat corrélée à l'apparition de produits de fermentation (HPLC) atteste de l'utilisation d'un substrat.

Tableau II-4 : Substrats utilisés par la détermination des demandes nutritives des souches isolées

Acides organiques	Alcools	Protéiques	
Acétate	Ethanol	Biotrypcase	Fructose
Benzoate	Butanol	Casaaminoacides	Sorbose
Butyrate	Glycérol	Cysteine-Hcl	Cellobiose
Citrate	Mannitol	Peptone	
Formate	Méthanol	Extrait de levure	
Fumarate	Isopropanol	Sucres	
Lactate	Propanol	Glucose	
Malate	Ga ₃	Saccharose	
Pyruvate	H ₂	Mannose	
Propionate	H ₂ CO ₂	D-Xylose	
Succinate		Ribose	
Amidon			

4-2-5-1 Dosage des produits du métabolisme

4-2-5-1-1 Chromatographie haute pression en phase liquide

Le dosage des produits de fermentation (acides organiques, sucres et alcools) est réalisé par chromatographie haute pression en phase liquide (HPLC).

L'appareil est équipé d'une pompe (Spectra série P100, Thermo separation Products) et d'un dégazeur, d'un appareil d'échantillonnage automatique (Spectra Series AS 100), d'une colonne Aminex HPX 87H (300 x 7,8 nm) (Bio-Rad), d'un détecteur à réfractomètre et d'un logiciel (Azur Microsoft).

Les échantillons sont centrifugés à 13 000 tpm pendant 8 mn, ensuite 600 µl de surnageant sont placés dans des flacons et 20 µl sont injectés automatiquement.

La température de la colonne est à 35°C ; la solution d'éluant de H₂SO₄ (0,005N) est filtrée et le débit est de 0,6 ml·min⁻¹.

L'étalonnage de l'appareil est réalisé à partir de solutions standard qui permettent de définir pour chaque produit à doser le temps de rétention et la corrélation entre la surface d'intégration et la concentration.

4 – 2 – 6 Cytochrome et désulfovirdine

Pour déterminer la présence de cytochromes et de désulfovirdine, on a besoin de 2 à 3g (poids humides) de cellules récoltées par centrifugation. Les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 10 µM pH 7,6, ensuite elles sont cassées aux ultrasons (4 fois pendant 2 minutes). Le surnageant est prélevé soigneusement, puis dilué 2 à 3 fois dans le même tampon avant de faire le spectre.

Le spectre d'absorption est déterminé en balayant les longueurs d'onde de 300 à 700 nm. Si l'extrait contient de la désulfovirdine, il apparaît sur le spectre un pic symétrique centré à 628 nm. Dans cette région du spectre (au dessus de 600 nm) rien d'autre n'absorbe et il n'y a pas d'interférence avec d'autres protéines et le cytochrome c à 410 nm.

4 – 2 – 7 Recherche de formes sporulées

L'observation de formes sporulées résistantes à la chaleur est réalisée en incubant deux tubes repiqués d'une culture dans des conditions suivantes : 10 et 20 mn à 90°C et pour finir 10 et 20 mn à 100°C.

Une éventuelle croissance après incubation à haute température ainsi que des observations au microscope, témoignent de la présence de spores ou autre forme de résistance à la chaleur.

4 – 2 – 8 Test d'anaérobiose (Tolérance à l'oxygène)

Pour déterminer la tolérance à l'oxygène, les souches sont inoculées dans un milieu avec 5, 10 et 20 ml d'air prélevé stérilement et ajouté à des tubes qui sont alors incubés sous agitation pour faciliter la diffusion de l'oxygène dans le milieu de culture.

Pour finir et afin de vérifier que les souches étudiées sont bien anaérobies, celles-ci sont inoculées dans du milieu aérobie, exempt de réducteurs et préparé sans flux d'azote. La capacité des souches à croître en aérobie est vérifiée par observation au microscope optique et par analyse de produits finaux du métabolisme.

4 – 2 – 9 Recherche de la résistance aux antibiotiques

On prépare le milieu de base. Après stérilisation, on ajoute les solutions stériles (NaHCO_3 , Na_2S et glucose). Les antibiotiques sont injectés juste avant l'inoculation.

L'effet des ATB est testé à des concentrations croissantes de 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ et 300 $\mu\text{g/ml}$ en fonction des résultats des premiers tests.

On teste les antibiotiques suivants : chloramphénicol pénicilline G et ampicilline. L'étude est réalisée en double et un deuxième repiquage est réalisé. On prépare un tube témoin contenant que de l'éthanol car le chloramphénicol était insoluble, on le dissout dans de l'éthanol ; ce tube permet de vérifier que l'éthanol n'inhibe pas la croissance.

Tableau II. 5 : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques employés dans cette étude

Ampicilline , Pénicilline G : inhibe la synthèse de la paroi cellulaire par inactivité de la transpeptidase à la surface interne de la membrane cellulaire, agit sur les bactéries Gram (+) et Gram (-)

Chloramphénicol : inhibe la traduction de la subunité 50S ribosomale de la peptidyl-transférase (inhibition de l'élongation)

5- Techniques de Biologie Moléculaire

5 - 1 Détermination du G + C% de l'ADN génomique des souches AS68, AS36

L'analyse est effectuée par la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gubh, Braunschweig, Allemagne).

La méthode utilisée pour extraire et doser les acides nucléiques est la suivante :

- Les cellules sont cassées à l'aide d'une presse de French et l'ADN est ensuite extrait et purifié sur une résine d'hydroxyapatite selon la méthode de **Cashion et al., (1977)**.
- L'ADN est hydrolysé avec la nucléase P1 et déphosphorylé avec une phosphatase alcaline selon la méthode de **Mesbah et al., (1989)**.
- Les acides nucléiques sont dosés par HPLC. L'étalonnage de l'appareil est réalisé selon la méthode de **Mesbah et al., (1989)** qui permet de définir pour chacun des 4 acides nucléiques (dAMP, dTMP, dGMP, dCMP), le temps de rétention de la corrélation entre la surface d'intégration et la concentration de la base considérée.
- L'étalonnage est vérifié avec un hydrolysate de l'ADN du phage λ dont le G+C% est de 49,9%.

5- 2 Etude phylogénétique des souches AS68 et AS36

L'analyse phylogénétique, réalisée par comparaison des séquences d'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARN_r-16S) a été réalisée avec les méthodes suivantes.

5 - 2 - 1 Extraction et purification de l'ADN génomique

On réalise l'extraction d'ADN pendant la phase exponentielle de croissance avec le kit de purification d'ADN génomique Wizard (Promega) à partir de 5 ml de culture d'après le protocole fourni avec le kit (voir. annexe).

5- 2 - 2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et purification du fragment amplifié

Appareillage :

- Temp. Tronic series 669 (Thermolyse, Dubuque, USA)
- Matériel d'électrophorèse avec générateur électrique E734 (Bioblock, Strasbourg, France)
- Table UV (Bioblock, Strasbourg, France).

Conditions opératoires :

Le principe de cette technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant en grand nombre de fois grâce à une polymérase. L'amplification est réalisée par cycles successifs comprenant les étapes suivantes :

- Dissociation de l'ADN double-brin par élévation de la température du milieu réactionnel à 95°C
- Hybridation des amorces spécifiques des bornes du fragment d'ADN génomique à amplifier (ADN_r-16S) par abaissement de la température

- Elongation des amorces par la Taq polymérase, après élévation de la température à 72°C.

Afin de vérifier l'amplification, deux contrôles sont réalisés. Le contrôle positif est réalisé avec l'ADN génomique d'*Escherichia coli* et le contrôle négatif sans ADN.

La purification de l'ADN_r-16S amplifié est réalisée après électrophorèse, par découpage du gel d'agarose. Après élimination de l'agarose, le fragment d'ADN est directement séquencé.

5-2-3 Séquençage et analyse

Appareillage :

- Séquenceur automatique ABI

Conditions opératoires :

Les amorces utilisées pour le séquençage ont été décrites par **Redburn et Patel (1993)**.

Les séquences obtenues sont alignées à l'aide d'éditeur de séquence a, avec celles des bactéries phylogénétiquement proches dont la séquence est déposée dans Genbank ou à l'EMBL. Après suppression des nucléotides et des alignements incertains, la matrice des similitudes est construite en utilisant les paramètres de correction d'**Olsen (1988)**, selon la méthode de **Jukes et Cantor (1969)**.

A partir de cette matrice, l'algorithme de **De Soete (1983)** et une analyse transversale avec le programme DMAPARS du logiciel PHILIP de **Felsenstein (1993)**, permettent de construire le deudrogramme.

Enfin la topologie de l'arbre phylogénétique est affinée à l'aide des programmes SEE QBOOT, FITCH et COMSEMBE du logiciel TREECON de **Van de Peer et De Wachter (1994)**.

La construction des deux arbres phylogénétique des deux souches a été faite avec la collaboration Jean Luc Cayol au sein du laboratoire IRD de Marseille.

Résultats et discussion

1 – Etude taxonomique de la souche AS68

1 – 1 Morphologie de la souche AS68

Les colonies apparaissent après cinq jours d'incubation à 37°C en roll tubes sur milieu MB68 (peptone – glucose) milieu décrit par des travaux précédents (Fardeau et al., 2000).

En phase exponentielle, la souche AS68, bactérie anaérobie stricte, se présente sous la forme bâtonnets (Fig. III.1). Les cellules, le plus souvent isolées, immobiles ont une longueur de 3 à 5 µm et un diamètre d'environ 0.5 µm. (Milieu glucose + extrait de levure).

Les observations en microscopie électronique montrent que la souche AS68 ne possède pas de flagelles (donc est immobile) (Fig. III.2) et que la paroi cellulaire est typique des bactéries Gram positives (Fig. III.3) très bien décrites par Fardeau et al., (1997).

Tableau III-1 : Recherche des formes de résistance à la chaleur chez la souche AS68

Jours d'incubation à 37°C	Traitement pré-inoculation		
	Aucun	10 min à 80°C	20 mn à 80°C
1	-		
3	+	+	+
7	+	+	+
10	+	+	+
15	+	+	+

Les cultures anaérobies sont réalisées en tube de **Hungate** sur milieu MB68 (Glucose – peptone).

+ : croissance ; - : pas de croissance.

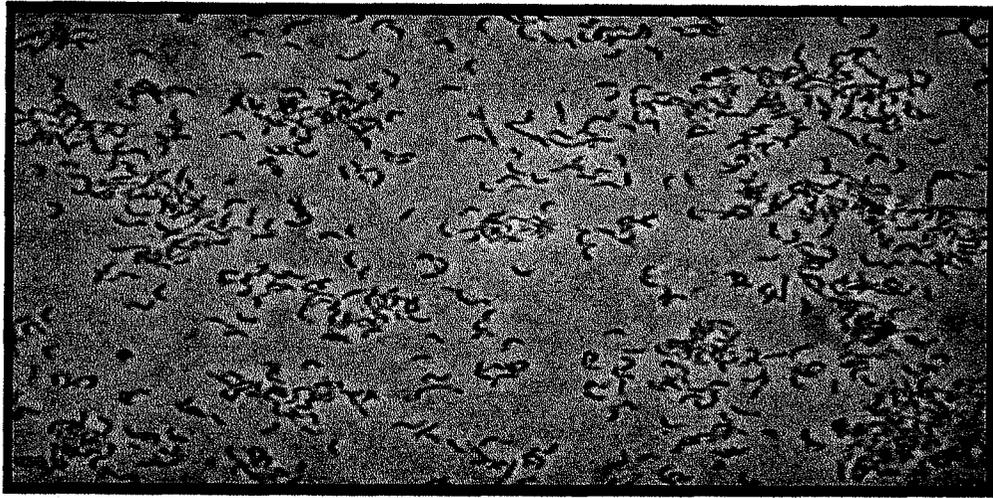


Fig. III.1 : Photographie de la souche AS68 réalisée au microscope optique

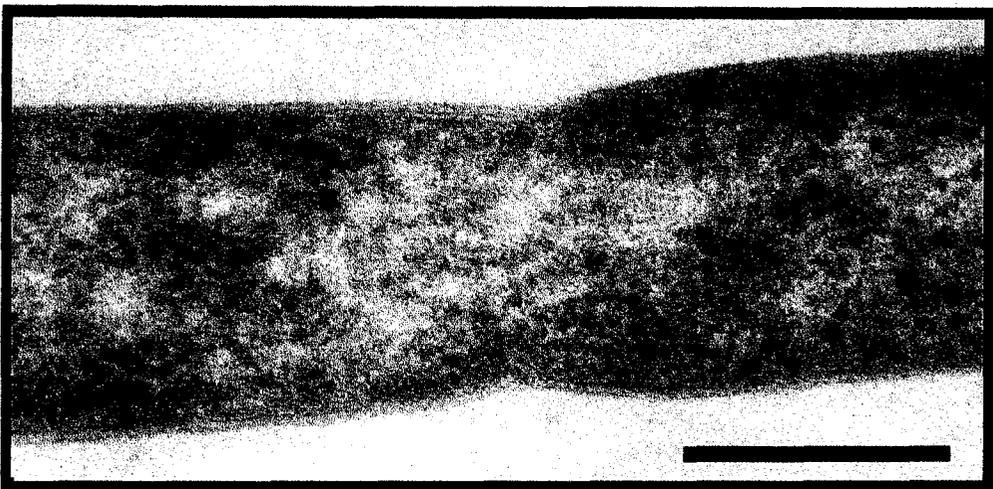


Fig. III.2a : coupe longitudinale ultra fine de la souche AS68 montrant la paroi typique des bactéries Gram positives réalisée au microscope électronique.

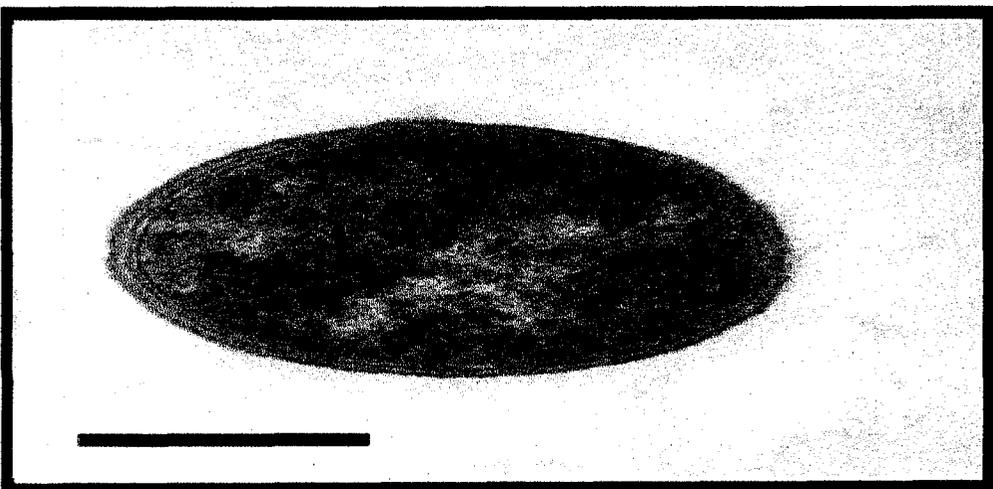


Fig. III.2b : coupe transversale ultra fine de la souche AS68 montrant la paroi typique des bactéries Gram positives réalisée au microscope électronique.

1 – 2 Conditions optimales de croissance

La souche AS68 croît entre 30°C et 55°C avec un optimum de 42°C (Fig. III.4a). La souche AS68 croît dans une gamme de pH variant entre 5,6 et 8,4 avec un optimum de 7,3 (Fig. III.4b) quant à la salinité, cette souche ne nécessite pas de sel pour croître mais tolère une concentration de NaCl allant jusqu'à 40g.l⁻¹ (Fig. III.4c).

Dans ces conditions optimales de croissance (Incubation à 42°C, dans un milieu contenant du glucose exempt de NaCl à pH 7,3) comme accepteur d'électrons, le taux de croissance maximal mesuré est de 0,14 h⁻¹, et un temps de génération de 4,9 h⁻¹.

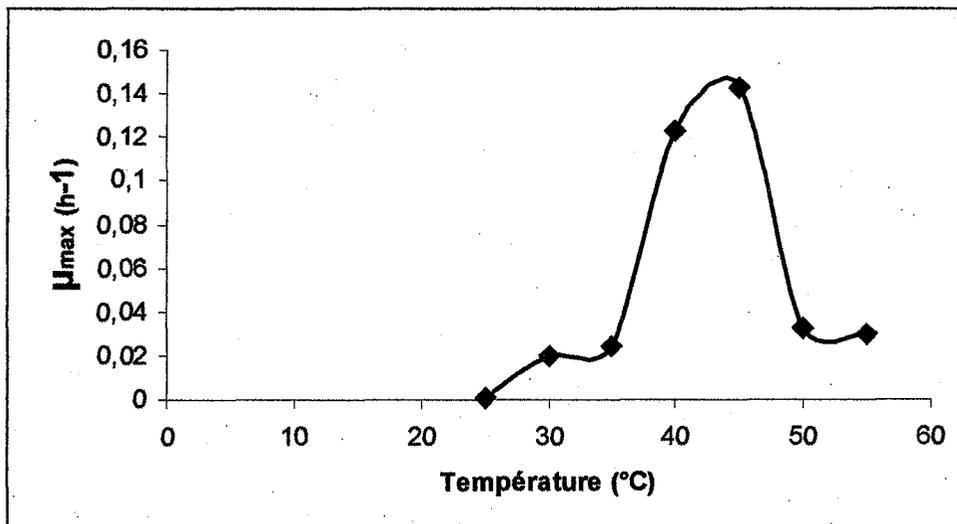


Fig. III.4a

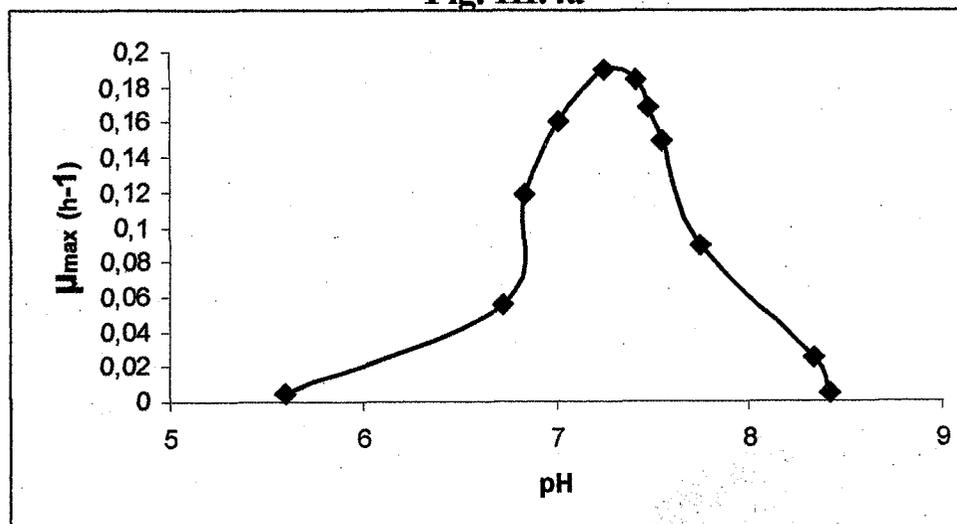


Fig. III.4b

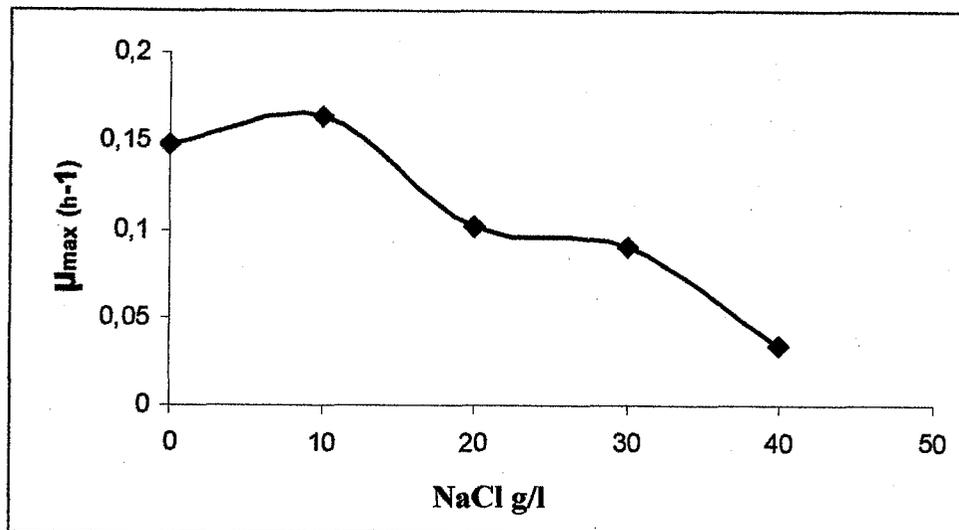


Fig. III.4c

Figure III.4 : Influence de la température (a), du pH (b) et de la concentration en NaCl (c) sur la vitesse de croissance de la souche AS68.

μ_{\max} représente la vitesse de croissance mesurée pendant la phase exponentielle de croissance. Les études ont été effectuées en bain-marie dans un milieu MB68 contenant du glucose (20mM) et extrait de levure (1g/l).

1 – 3 Les accepteurs d'électrons potentiellement utilisables

La capacité à utiliser différents composés soufrés : soufre élémentaire (1%), thiosulfate (20 mM) sulfate (20 mM), sulfite (2mM) et différents composés azotés : nitrate (20mM) et nitrite (5mM), a été testée pour la souche AS68. Il s'avère que la souche n'utilise aucun de ces composés soufrés et azotés comme accepteurs d'électrons.

A l'HPLC, l'analyse montre que quelque soit les accepteurs, le glucose a été consommé et dégradé en acétate avec H₂ et CO₂.

1 – 4 Caractéristiques métaboliques

1 – 4 – 1 Les substrats fermentescibles

La souche AS68 est capable de fermenter un grand nombre de sucres parmi lesquels : mannose, xylose, cellobiose, ribose, fructose, glucose ainsi que les

casaamino-acides et plusieurs acides aminés tels que l'arginine, sérine, lysine, glutamine, alanine, glutamate, isoleucine, aspartate, asparagine et histidine. Le produit final du catabolisme du glucose est l'acétate.

A l'inverse, la souche AS68 n'utilise pas : méthanol, éthanol, propanol, butanol, glycerol, sorbose, formate, acétate, propionate, succinate, fumarate, lactate, pyruvate, amidon et certains acides aminés : cystéine, proline, thréonine, glycine, phénylalanine et valine.

1 – 4 – 2 Les exigences nutritionnelles

Pour étudier les besoins nutritionnels de la souche AS68, nous avons utilisé le glucose comme source d'énergie. Pour cela, nous avons utilisé l'extrait de levure (1 g.l⁻¹, 2 g.l⁻¹) et la Biotrypcase (1 g.l⁻¹, 2 g.l⁻¹) ainsi que les vitamines. Il s'avère que l'extrait de levure est nécessaire pour la croissance et qu'avec la combinaison extrait de levure et Biotrypcase à raison de 2 g.l⁻¹, nous obtenons une bonne croissance.

Une meilleure croissance est obtenue avec l'extrait de levure uniquement à raison de 2 g.l⁻¹. De plus le rajout de vitamines n'est pas nécessaire pour la croissance de AS68.

1 – 4 – 3 Résistance aux antibiotiques

Comme nous le montre le tableau III-2, la culture de la souche AS68 est inhibée par une concentration en chloramphénicol de 200 µg/ml et en pénicilline G et ampicilline de 300 µg.ml⁻¹.

Tableau III-2 : Résultats de la résistance aux antibiotiques de AS68

	Concentration en antibiotiques ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)					
	50	100	150	200	250	300
Témoin éthanol	Culture	Culture	Culture	Culture	Culture	Culture
ohloramphenicol	+	+	+	⊖	⊖	⊖
pénicilline G	+	+	+	+	+	⊖
ampicilline	+	+	+	+	⊕	⊖

1 – 5 Caractéristiques génétiques de AS68

1 – 5 – 1 Contenu en G +C % de l'ADN génomique

L'analyse de la composition en bases du génome montre que la teneur en guanine et en cytosine (ou G+C%) représente 42,2% (exprimé en mol-mol⁻¹) de l'ensemble des bases.

1 – 5 – 2 Phylogénie de la souche

Une séquence de bases du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal (ARN_r 16S), a été alignée avec les séquences représentatives des différents phylums du domaine des Bacteria, indiquant l'appartenance de la souche AS68 dans la subdivision des Gram positives dont le G+C% est inférieur à 55%.

L'analyse phylogénétique révèle que cette souche appartient au domaine des Bacteria, Cluster XI de l'ordre des Clostridiales.

Au seuil de cet ordre, la souche AS68 est proche de *Camnicella sporogenes* (91,5% de similitude) (Alain et al. , 2002) et de deux espèces appartenant au genre *Alkaliphilus* : *A.transvaalensis* (91,2% de similitude) et *A.crotanoxidans* (90,8% de similitude) (Cao et al. , 2003) (Voir Figure III.5).

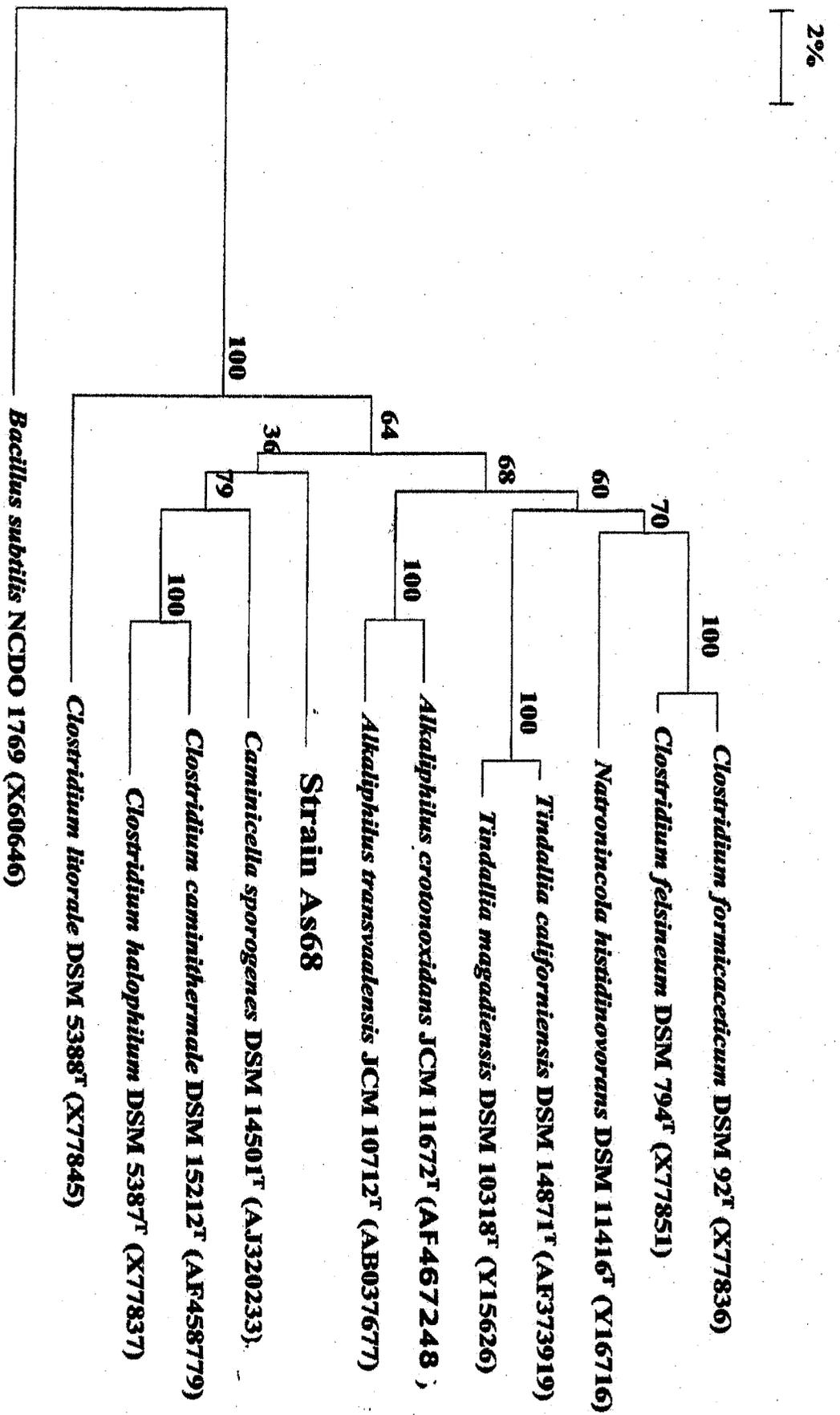


Figure III.5 : position phylogénétique de la souche AS68 au sein de l'ordre des Clostridiales.

1 – 6 Discussion

La souche AS68 est un fin et long bacille (3.0 – 5.0 μm / 0,5 μm) immobile, Gram positive formant des endospores terminales sur milieu contenant du glucose et de l'extrait de levure. Les coupes ultrafines obtenues en microscopie électronique confirment la structure pariétale propre aux bactéries Gram positives (avec absence de membrane externe) très bien décrites par Fardeau et al., (1997). Selon l'analyse phylogénétique, elle appartient au domaine des Bacteria, ordre des Clostridiales, groupe XI. Au sein de ce groupe, beaucoup d'espèces sont non cultivables et non encore décrites. Néanmoins la plupart des microorganismes caractérisés proviennent comme la souche AS68 d'aquifères profonds.

Ce fut le cas pour la souche « uncultured bacterium clone 47 mm 70'' » isolée en Afrique du sud dans un puits d'une mine d'or (AY7960 47.1) avec 96,6% de similitude avec AS68 et une autre souche « uncultured bacterium clone R82 » isolée d'un puits artésien en Australie (AF407695.1, 95,2% de similitude). Comme nous le montre la (figure III-4), la souche AS68 est proche d'espèces répertoriées décrites telles que *Caminiella sporogenes* (91,5% de similitude) (Alain et al. , 2002) et deux espèces appartenant au genre *Alkaphilus* : *A.transvaalensis* (91,2% de similitude) et *A.crotonoxidans* (90,8% de similitude) (Cao et al. , 2003).

Nous rappelons la technique utilisée pour déterminer le rang taxonomique de AS68 : la séquence de nucléotides de la sous unité 16S a été alignée avec des séquences références des bactéries appartenant au groupe XI de l'ordre des Clostridiales en utilisant la séquence d'alignement de BioEdit (Hall, 1999) ; les séquences références_ont été obtenues à partir du projet II ribosomal Database (Maidak et al. , 2001) et Genbank database (Benson et al. , 1999).

Sur la base de ces études moléculaires, la souche AS68 représente une nouvelle espèce au sein du groupe XI des Clostridiales. De plus, vu le pourcentage de similitude avec les genres *Caminiella* et *Alkaliphilus* (91,5% de similitude ou moins) suggère que cet isolat représente un nouveau genre au sein de ce groupe ceci est fortement prouvé par les différences importantes physiologiques et génétiques illustrées dans le tableau III – 3.

Tableau III-3 : Caractéristiques différentielles entre la souche AS68 et les autres espèces appartenant au groupe XI.

Caractéristiques	AS68	<i>Caminiella sporogenes</i> B11-2 ^T	<i>Alkaliphilus crotonotoxidans</i> AM114 ^T	<i>Alkaliphilus transvaalensis</i> SAGM1 ^T
Pourcentage ADN G+C (mol%)	42.2	24.2	30.6	36.4
Intervalle de température de croissance (Optimum) (°C)	25-55 (42)	45-65 (60)	15-45 (37)	20-50 (40)
Intervalle de pH de croissance (Optimum)	5.6-8.4(7.3)	4.5-8.0 (7.5)	5.5-9.0 (7.5)	8.5-12.5(10.0)
Mobilité	-	-	-	+
Accepteurs d'électrons :	-	-	-	+
S ⁰				
Thiosulfate				
Fumarate	+	-	+	-
Substrats utilisés :	+	-	+	-
Fructose	+		+	-
Cellobiose	+	+	-	-
Xylose				
Ribose				
Glucose				

La composition en bases du génome de AS68 montre que la teneur en guanine et en cytosine ou G+C% de 42%, est très élevée par rapport aux espèces citées. G+C% n'excède pas 36,6% (*A.transvaalensis*) ; la souche AS68 diffère de *Caminiella sporogenes* de par sa structure pariétale qui est caractéristique

des bactéries Gram positives : une épaisse couche de peptidoglycans avec une membrane cytoplasmique.

Quant à *C.sporogenes*, elle possède une paroi caractéristique des bactéries Gram négatives malgré sa position taxonomique au sein de ce groupe à bas G+C% propre aux bactéries Gram positives.

La souche AS68 diffère également de *A.transvaalensis* par des caractères phénotypiques tels que l'utilisation des sources de carbone, les accepteurs d'électrons ; les pH de croissance (Tableau III-2). D'autre part, elle est quasi identique phénotypiquement à *A.Crotonatoxydans* sauf par sa capacité à utiliser le glucose et sa capacité à croître à des températures supérieures à 45°C, son pH de croissance plus réduit et son absence de mobilité.

Sur la base des résultats phénotypiques et moléculaires, la souche AS68 est une nouvelle espèce, nouveau genre inclus dans le groupe XI de l'ordre des Clostridiales dont deux genres dont elle est proche *Camnicella* et *Alkaliphicus*. Cet isolat est nommé : *Geosporobacter subterraneus*.

1 – 7 Description de *Geosporobacter subterraneus*, gen.nov, sp.nov.

Geosporobacter (Ge.o.spo.ro.bacter N.Gr.ge « the earth » ; N.L.sporus, spore ; bacter N.L. équivalent de N.Gr.bacterion, petit bacille. *Geosporobacter* un bacille qui sporule) *subterraneus* (sub.ter.rénus N.L.adj. Souterrain, décrivant le site d'origine) Bactérie Gram positive et anaérobie stricte, les cellules se présentent sous forme bacilles formant des spores immobiles de 3 à 5 µm de long pour 0,5 µm de diamètre.

La croissance peut être observée dans une gamme de température comprise entre 30°C et 55 °C (avec un optimum de 42°C) et dans une gamme de pH allant

de 5,6 à 8,4 (avec un optimum à pH = 7,3). La croissance de cette espèce ne nécessite pas la présence de NaCl néanmoins elle tolère jusqu'à 40 g/l.

Différents carbohydrates sont utilisés par la souche en présence d'extrait de levure (1 g.l⁻¹) :

Le mannose, xylose, cellobiose, ribose, fructose, glucose, casaamino-acides ainsi que des acides aminés (arginine, serine, lysine, glutamine, alanine, glutamate, isoleucine, aspartate, asparagine, histidine).

Le produit final du catabolisme du glucose est l'acétate. Par ailleurs le méthanol, mannitol, éthanol, propanol, butanol, glycérol, sorbose, mannose, formate acétate, propionate, succinate, fumarate lactate, pyruvate et amidon et quelques acides aminés (cystéine, proline, thréonine, glycérine, phénylalanine, valine) ne sont pas consommés.

Le sulfate, sulfite, thiosulfate ou le soufre élémentaire ne sont pas utilisés comme accepteurs d'électrons. Le G+C% de l'ADN génomique est de 42,2%.

La souche type isolée d'un puits artésien français est VMs68^T (DSMZ, 17957, JCM).

2 – Etude morphologique de la souche AS36

2 – 1 Morphologie de la souche AS36

Les colonies apparaissent au bout de 5 à 6 jours d'incubation à 37°C sur milieu M36. La souche AS36 se présente sous la forme d'un vibron mobile mesurant 3 à 5 µm de long et 0.5 µm de diamètre (Figure III.5a).

Elle est anaérobie stricte. Les coupes cellulaires révèlent une paroi de type Gram négatif avec une membrane externe (Figure III.5b). Les nombreuses observations en microscopie optique sur la souche AS36 à différents stades de croissance n'ont jamais permis l'observation de spore.

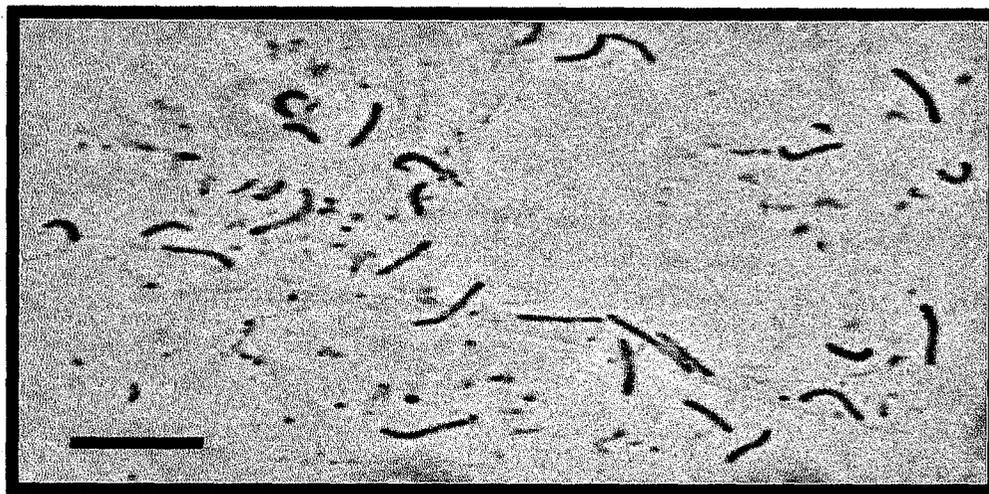


Fig. III.5a Photographie de la souche AS36 réalisée au microscope optique

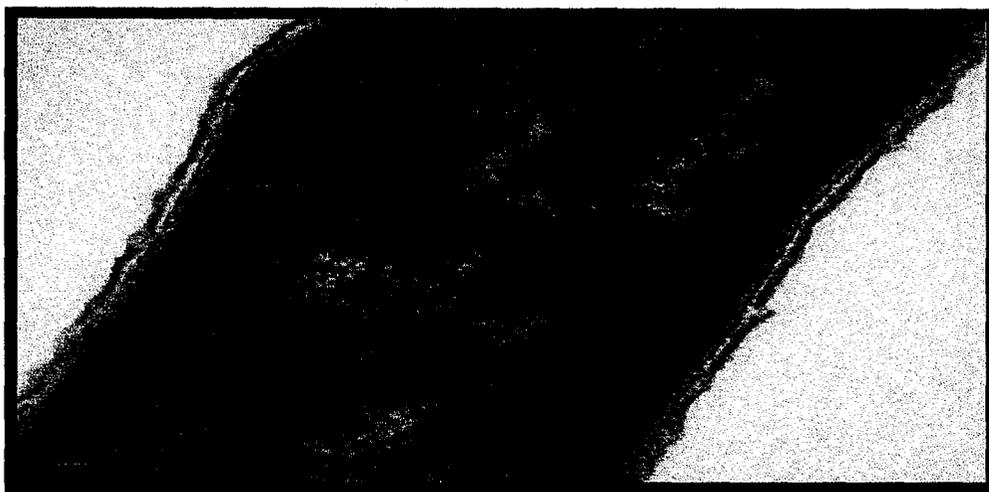


Fig. III.5b coupe ultra fine de la souche AS36 montrant la paroi typique des bactéries Gram négatives réalisée au microscope électronique.

2 – 2 Conditions optimales de croissance

La souche AS36 croît entre 20°C et 50°C avec un optimum aux environs de 37°C. Aucune croissance n'a pu être observée à 45°C (Fig. III.5a). Quant au pH, la souche croît entre 5 et 9 avec un optimum de 6,9 (Fig. III.5b). Enfin, c'est une bactérie qui ne nécessite pas la présence de sel pour sa croissance, néanmoins nous avons noté une meilleure croissance à 2g/l qu'à 0 g/l et elle tolère jusqu'à 20 g/l de NaCl (Figure III.5c).

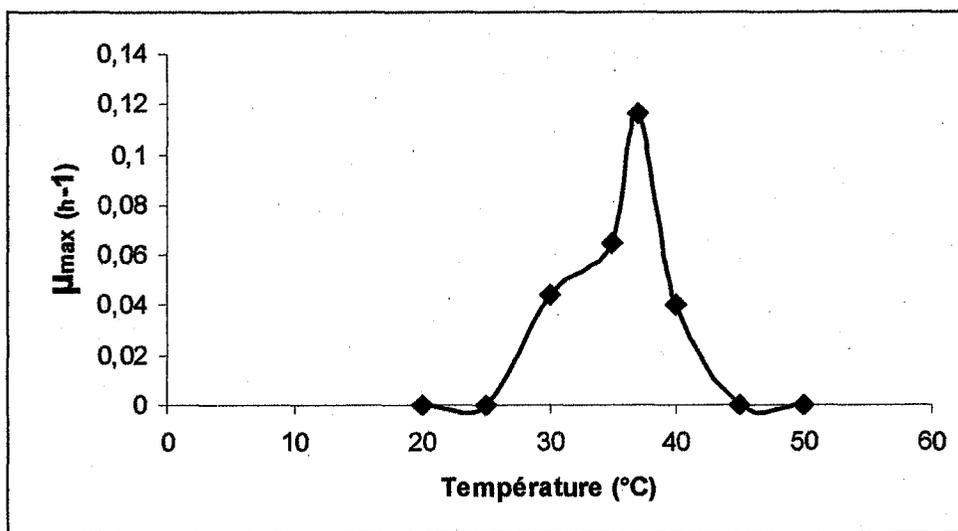


Fig. III.6a

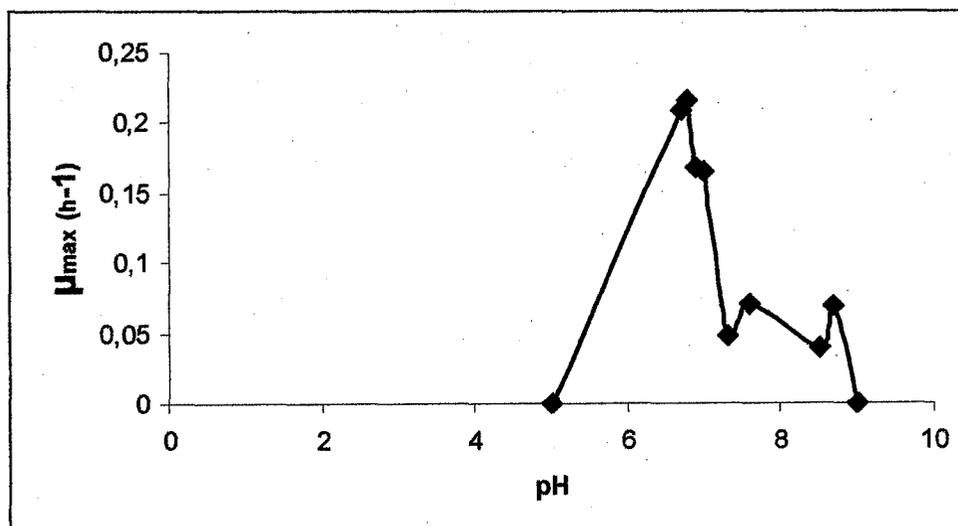


Fig. III.6-b-

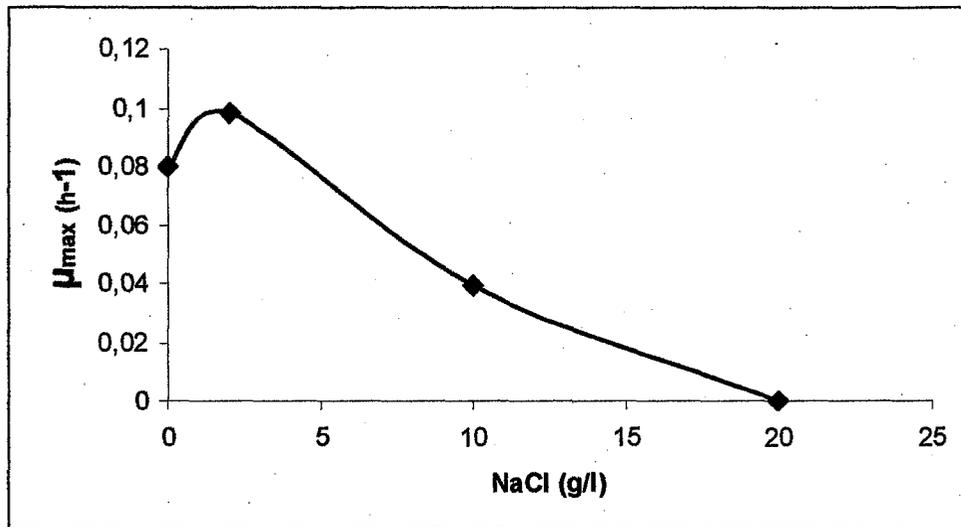


Fig. III.6-c-

Figure III.6 : Influence de la température (a), du pH (b), de la concentration en NaCl (c) sur la vitesse de croissance de la souche AS36.

μ_{\max} représente la vitesse de croissance mesurée pendant la phase exponentielle de croissance. Les études ont été effectuées sur milieu MBAS36 additionné de Lactate 20mM.

2 – 3 Les accepteurs d'électrons potentiellement utilisables

La souche AS36 est capable d'utiliser le sulfate 20mM et le thiosulfate 20mM comme accepteur d'électrons (V. tableau III.4)

Tableau III.4 : Résultats des accepteurs d'électrons soufrés

Accepteurs	Absorbances		Dosage de H ₂ S (mmol.l ⁻¹)
	Initiales	Finales	
Témoin	0,0905	0,1091	1,6
	0,3856	0,2944	
Thiosulfate	0,0821	0,1362	3,1
	0,1800	0,2429	
Sulfate	0,0833	0,1444	4,6
	0,0914	0,2639	
Soufre	0,0918	0,1517	1,5
	0,1088	0,1270	
Sulfite	0,1383	0,2291	1,5
	0,0913	0,1428	

Ceci confirme bien que la souche est sulfato-réductrice. Quant aux accepteurs azotés, nitrate et nitrite, à l'HPLC l'analyse montre qu'il y'a aucune croissance c'est donc des inhibiteurs pour la souche.

2 – 4 Caractéristiques métaboliques

2 – 4 – 1 Les substrats fermentescibles

Les sucres (D-glucose, D-fructose, maltose, lactose) et les acides organiques (propionate, butyrate, citrate) ainsi que le méthanol, éthanol et glycérol ne sont pas utilisés par la souche AS36, il en est de même pour les acides aminés (sous forme de casaamino-acides). Elle utilise le fumarate, le formate et le lactate. Ce dernier est réduit entièrement en acétate et CO₂.

2 – 4 – 2 Les exigences nutritionnelles

Par spectrophotométrie, on peut voir que la souche AS36 se développe en absence d'extrait de levure, mais (2 g/l) d'extrait de levure stimule fortement la croissance. L'ajout de vitamines ou de biotrypticase n'améliore pas la croissance.

Ceci signifie que la souche AS36 ne nécessite pas la présence d'un facteur de croissance et que sa croissance est fortement stimulée en présence d'extrait de levure (2 g/l).

2 – 4 – 3 Cytochromes et désulfovirdine

La recherche des cytochromes et de la désulfovirdine a montré la présence du cytochrome c_3 et l'absence de la désulfovirdine sur milieu MB36 additionné de lactate 20mM.

2 – 5 Caractéristiques génétiques

2 – 5 – 1 Contenu en G+C% de l'ADN génomique

Le G+C% de la souche AS36 est de 67,2%.

2 – 5 – 2 Phylogénie de la souche

Pour l'analyse phylogénétique, la séquence de nucléotides du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal a été utilisée. L'alignement de cette séquence avec les espèces représentatives des différents phylums du domaine des Bacteria a permis de montrer que la souche AS36 appartient au groupe des γ Proteobacteria du genre *Desulfovibrio*.

Les résultats de cette analyse suggèrent que cette souche constitue une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio*. Les pourcentages de similitude avec les espèces les plus proches sont représentés dans la figure III.7.

Nous voyons qu'elle représente 90,7 % de similitude avec l'espèce *Desulfovibrio senezii*.

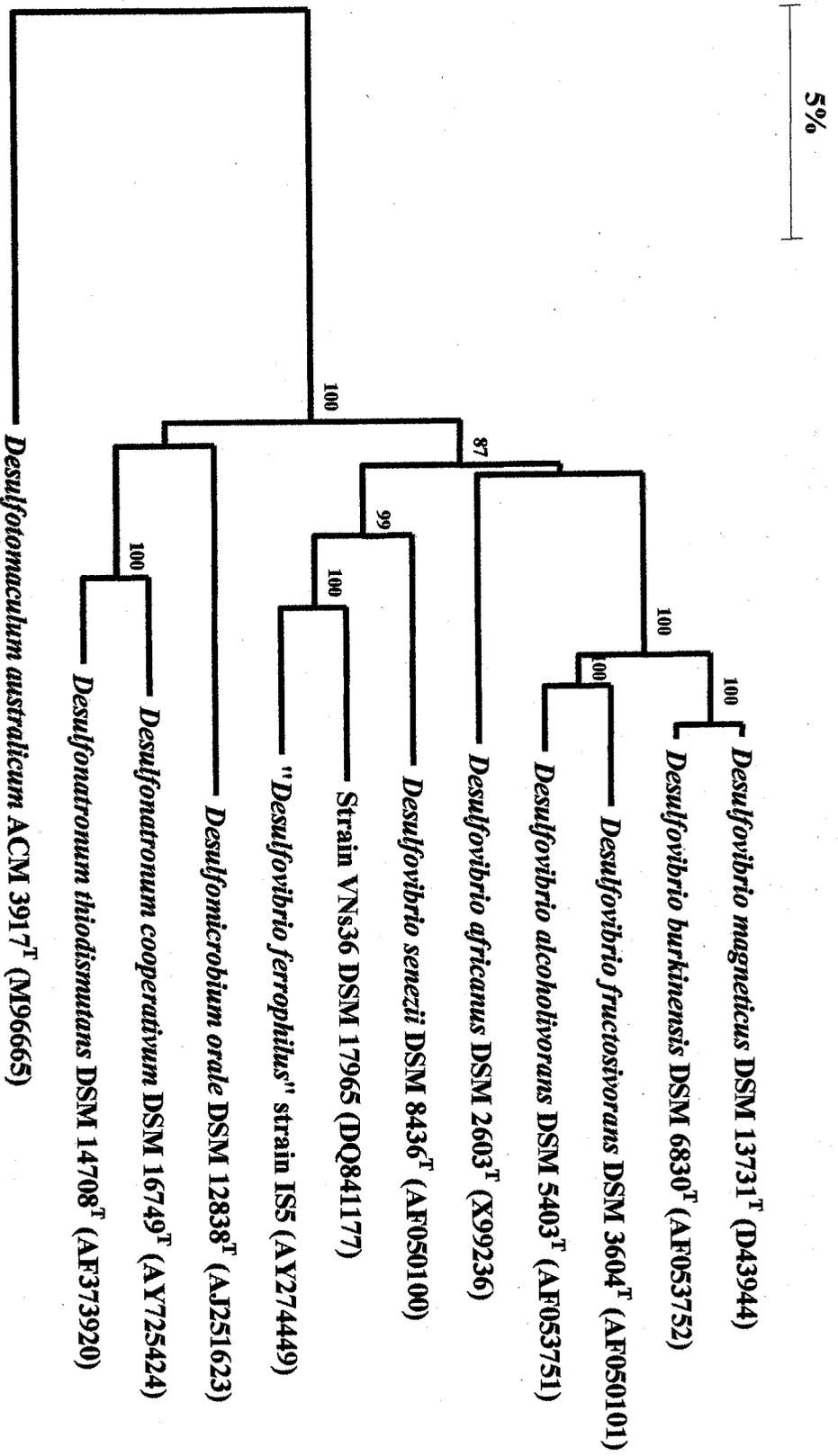


Figure III.7 : Arbre phylogénétique indiquant la position phylogénétique de la souche AS36.

2 – 6 Discussion

La souche S36 appartient au genre *Desulfovibrio* c'est donc une bactérie sulfato-réductrice (BSR) appartenant au premier groupe des BSR : les mésophiles Gram négatif (Classification de Castro et al. , 2000) à la sous division γ des Proteobactéries. Les caractéristiques phénotypiques confirmant cette position taxonomique à savoir la forme de la souche en vibrion, sa mobilité, son GC% élevé, ainsi que la présence du cytochrome c_3 , sa température optimale de 37°C mésophile, correspondent aux caractères établis par Castro et al. (2000) à l'exception de l'absence de la désulfovirdine.

De plus nous avons démontré que cette souche utilise le sulfate et thiosulfate comme accepteurs d'électrons et pas le soufre comme c'est le cas des bactéries appartenant à ce genre *Desulfovibrio* ainsi que sa capacité à utiliser uniquement des acides organiques tels que le lactate, formate et pour finir H_2CO_2 et H_2CO_2 additionné d'acétate. Il est donc bien établi que la souche AS36 appartient au genre *Desulfovibrio*.

Si nous nous référons à l'arbre phylogénétique (Fig III.7) la souche AS36 est proche de l'espèce *Desulfovibrio senezii* (90,7% de similitude). Cette dernière a été isolée d'un « solar salterm » en Californie (I, Hsien Tsu et al. , 1998) c'est un vibrion Gram négatif ne formant pas de spores de 1 à 1,3 μm de longueur avec un diamètre de 0,3 μm , mobile par un flagelle polaire tolère jusqu'à 12,5% NaCl avec un temps de génération de 60 mn dans des conditions optimales (37°C, pH : 7,6, 2,5 % NaCl) sur milieu lactate-extrait de levure. Elle utilise le lactate, pyruvate, cystéine et H_2/CO_2 + acétate comme donneurs d'électrons et sulfate et sulfite et thiosulfate et fumarate comme accepteurs d'électrons. Le soufre élémentaire et nitrate et oxygène ne sont pas utilisés. Elle possède un GC% égal à 62 mol% il est clair qu'il existe quelques similitudes avec la souche AS36 comme la température optimale de croissance qui est

identique, les pH sont légèrement différents puisque la AS36 pousse à un pH optimal de 6,9. Les concentrations en NaCl sont différentes. (voir tableau III.4)

Tableau III.4 : Caractéristiques de la souche AS36 et de la souche *D.senezii*

Espèces		<i>Desulfovibrio senezii</i> *	AS36
Morphologie		Vibrien Gram ⁻ non sporulant (0,3 x 1,0-1,3 µm)	Vibrien Gram ⁻ non sporulant (0,5 x 3,0-5,0 µm)
Mobilité		+	+
Conditions optimales de croissance	pH	7,6	6,9
	Température (°C)	37	37
	NaCl (g/l)	25	2
Source		Solar Salterm	Aquifère profond (Bassin parisien)
Donneurs d'électrons			
Lactate		+	+
Pyruvate		+	-
Cysteine		+	-
H ₂ /CO ₂		-	+
H ₂ /CO ₂ + Acétate		+	+
Accepteurs d'électrons			
Nitrate		-	-
Sulfate		+	+
Sulfite		+	-
Thiosulfate		+	+
Fumarate		+	-
Soufre élémentaire		-	-
Oxygène		-	-
G+C% DNA		62%	67,2%

phylogénétiquement proche 90%

* I-Hsien Tsu et al. (1998).

La souche AS36 tolère jusqu'à 2,5% alors que *D.senezii* tolère jusqu'à 12,5%. Quant aux substrats fermentescibles la souche AS36 utilise le lactate et le formate alors que l'espèce *D.senezii* utilise le lactate, le pyruvate et la cystéine et H₂/CO₂ + acétate. En ce qui concerne les accepteurs d'électrons, *D.senezii* utilise le sulfate, sulfite et thiosulfate et fumarate comme accepteurs d'électrons alors que AS36 utilise uniquement sulfate et thiosulfate.

Sur la base de ces caractères, la souche AS36 constitue une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio*.

3- Discussion générale

Les eaux souterraines et en particulier les aquifères profonds constituent des habitats aquatiques extrêmes de par leur profondeur ainsi que l'absence d'oxygène.

L'analyse des communautés bactériennes au sein de cet écosystème, est confrontée au délicat problème de l'échantillonnage qui doit être représentatif et à l'utilisation de techniques de culture pour la caractérisation de ces populations bactériennes. La procédure d'échantillonnage au niveau de notre site d'étude est celle réalisée par **Basso et al. , (2004)** qui a fait un travail remarquable à ce sujet. De plus l'utilisation de méthodes moléculaires ainsi que l'introduction de techniques plus fines d'observation (microscopie ou par cytométrie de flux) ont permis de révéler à quel point les milieux aquatiques pourraient être plus riches et diversifiés que ce que les premières études culturelles classiques pouvaient laisser présager.

Ce sont en particulier les travaux de **Carl Woese (1988)** qui ont permis des études de phylogénie moléculaire appliquées à l'étude des séquences ribosomiques. Plus tard, les biologistes moléculaires ont introduit des méthodes qui permettaient de caractériser des microorganismes sans qu'il soit besoin de les cultiver. Ceci a pu se faire essentiellement par le clonage et séquençage des gènes des ARN ribosomiques extraits de la totalité d'un échantillon. Cette approche a montré une diversité extraordinaire dans tous les environnements et la présence de nombreux phylums bactériens inconnus (**P.Huge holtz, B et al. , 1998 ; S.M.Barns et al. ,1994 ; J.T.Staley et A.Konopka, 1985**).

Ceci souligne bien l'importance de l'impact des techniques moléculaires quant à la diversité microbienne ainsi que l'importance de ces microorganismes dans l'équilibre de notre planète.

Notre étude au sein du puits artésien parisien nous a permis de caractériser deux nouvelles souches bactériennes, l'une constituant un nouveau genre nouvelle espèce du groupe XI des Clostridiales que nous avons nommé *Geosprobacters subterraneus*, les bactéries de cet ordre sont effectivement retrouvées dans les habitats aquatiques, nous pouvons citer l'espèce *acétogène* *Clostridium scatologenes* souche SL1 isolée de sédiments acides en Allemagne, ou une nouvelle espèce, nouveau genre appartenant au groupe XI des Clostridiales *Caldanaerocella colombiensis* gen.nov. , sp.nov. isolée d'une source thermale chaude de Colombie (**Diaz et al. , 2006**) et enfin les travaux de Basso (2005) qui a travaillé sur le même site d'étude que le notre mais sur trois aquifères, elle a également caractérisé des bactéries appartenant aux Firmicutes.

Tandis que la seconde souche que nous avons caractérisée est une BSR appartenant au genre *Desulfovibrio*. Nous avons établi sur la base de critères phénotypiques et moléculaires que c'est une nouvelle espèce de ce genre.

Ce genre est largement retrouvé dans les habitats aquatiques notamment dans les sédiments marins où il joue un rôle très important dans les cycles géochimiques tels que ceux du soufre et du carbone et il minéralise plus de 50% de la matière organique (**Barton et al. , 1995 ; Jorgensen, 1982**). Une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio* a été isolée de la côte indonésienne (**Mariaj.Feio et al. , 1998**).

D'autres nouvelles espèces telles que *Desulfovibrio halophilus* sp.nov. ,BSR halophile isolée d'un lac solaire (Sinai) (**Caumette et al. , 1990**) ainsi que

Desulfovibrio mexicanus sp.nov. BSR isolée d'eaux ménagères d'une usine de fromage au Mexique et pour finir deux autres espèces nouvelles du genre *Desulfovibrio* ont été découvertes dans un gisement pétrolier au Congo *Desulfovobrio bastinii* sp.nov et *Desulfovobrio gracilis* sp.nov. (Magot et al. , 2004).

Notre étude rentre dans l'analyse de la diversité des communautés microbiennes d'environnements extrêmes, en particulier les eaux souterraines. Elle a un intérêt fondamental, mais aussi un intérêt économique puisque on peut y voir une valeur pécuniaire au travers des processus métaboliques exotiques utilisés par ces bactéries de l'extrême que l'on peut détecter, cloner et exprimer à une échelle industrielle.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le but de ce travail de thèse était d'étudier deux souches bactériennes isolées d'un aquifère profond parisien, à l'aide de techniques de microbiologie classique de culture anoxique et de technique de phylogénie moléculaire.

La difficulté dans ce genre d'investigation en l'occurrence les eaux souterraines est tout d'abord la procédure d'échantillonnage qui est très difficile de part l'accès et l'obtention d'échantillons représentatifs de l'écosystème.

De plus le forage à l'ouverture d'un puits reste une opération coûteuse, ce qui de ce fait limite la quantité d'échantillons prélevés en terme de volume et de nombre (**Ghiorse & Wilson, 1988**).

Ainsi il est important d'optimiser le procédé et plusieurs aspects doivent être pris en compte. L'évaluation géologique du sous-sol permet la détermination du matériel approprié pour le prélèvement.

Dans notre étude, l'aquifère choisi (à l'ouest de Paris) est déjà équipé d'un puits artésien. La précaution majeure était d'éviter la contamination des échantillons. Pour réduire les risques de contamination le nettoyage des équipements et du puits s'impose, notamment par des chlorations (**Griffin et al., 1997 ; Pedersen, 1993**).

La procédure d'échantillonnage réalisée dans cette étude est celle mise au point par Basso et son équipe (2004) sous la direction du Pr Magot qui nous ont fourni les échantillons.

La seconde difficulté (qui n'en est pas une en réalité est l'acquisition des techniques microbiologiques de culture anoxiques, inexistantes en Algérie) et la mise en pratique pour l'identification taxonomique de nos deux isolats.

Ceci marque l'importance et l'originalité de ce travail qui ne pouvait se faire sans l'aide précieuse de l'IRD de Marseille en particulier l'équipe de Bernard Ollivier spécialisée dans l'étude des bactéries anaérobies provenant de milieux extrêmes (gisements pétroliers, sources hydrothermales ou autres).

Enfin l'utilisation de techniques moléculaires dans la taxonomie bactérienne a permis de mettre en évidence de nouvelles bactéries et d'avoir une meilleure connaissance de la diversité naturelle microbienne.

Les techniques de culture anoxique couplées à des techniques moléculaires fondées sur le séquençage et le positionnement phylogénétique nous ont permis de mettre en évidence :

- Un nouvel isolat appartenant au phylum des Firmicutes, classe des Clostridia, ordre des Clostridiales Famille des Clostridiaceae que nous avons nommé *Geosporobacter subterraneus* nov.gen.nov.sp.
- Le second isolat appartenant au genre *Desulfovibrio* et constituant une nouvelle espèce de ce genre et ceci sur la base de critères phénotypiques et phylogénétiques.

Ces deux bactéries font partie des communautés bactériennes des habitats aquatiques.

En particulier la seconde est une BSR, bactérie largement retrouvée dans les eaux marines et eaux douces tandis que la première appartient au phylum des Firmicutes **Basso (2005)** a mis en évidence beaucoup de bactéries appartenant à

Références bibliographiques

A

Adanson, M. (1763). Famille des plantes. *Plant Life* **19**:12-17.

Adkins, J. D., L. A. Cornell, & R. S. Tanner. (1992). Microbial composition of carbonate petroleum reservoir fluids. *Geomicrobiol.J.* **10**:87.

Aeckersberg, F., F. Bak, & F. Widdel. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulphate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**:5-14.

Alain, K., P. Pignet, M. Zbinden, M. Quillevère, F. Duchiron, J. P. Douval, F. Lesongeu, G. Raguènes, P. Craddons, J. Querellon, & M. A. Cambon Bonavita. (2002). *Caminiella sporagenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spor-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1621-1628.

✕ **Alazard, D., S. Duka, A. Unos, F. Verhé, N. Bouabida, F. Morel, P. Thomas, J-L. Garcia, & B. Olliver.** (2003). *Desulfovibrio hydrothermalis* sp.nov., a novel sulphate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:173-178.

B

Baker, B. J., D. P. Moser, B. J. MacGregor, S. S. Fishbain, M. Wagner, N. K. Fry, B. Jackson, N. Speolstra, S. Loos, K. Takai, B. Sherwod Lollar, J. Frederikson, D. Balkwill, T. C. Onstott, C. F. Wimpee, & D. A. Stahl. (2003). Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of south Africa and deep basalt aquifers of Washington state. *Environ Microbiol* **5**:267-277.

Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, L. R. Woese, & R. S. Wolfe. (1979). Methanogens : reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**:260-296.

✕ **Bale S. J., K. Goodman, P. A. Rochelle, J. R. Marchesi, J. C. Fry, A. J. Weightman, & R. J. Parkes.** (1997). *Desulfovibrio profundus* sp.nov, a novel barophilic sulfate reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:515-521.

Balkwil, D. L., R. H. Reeves, G. R. Drake, J. V. Reeves, F. H. Crocker, M. B. King, & D. R. Boone. (1997). Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 201-216.

Barber, C., & D. Briegel. (1987). A method for the in-situ determination of dissolved methane in groundwater in shallow aquifers. *Journal of Contaminant hydrology.* **2**:51-60.

Basso, O. (2005). Caractérisation des communautés bactériennes des aquifères profonds. Thèse de doctorat. Université de Pau et des pays de l'Adour.

Basso, O., J. F. Lasourrèges, Marc Jarry, & Michel Magot. (2004). The effect of cleaning and disinfecting the sampling well on the microbial communities of deep subsurface water samples. *Environ. Microbiol.*

Benson, D. A. , M. S. Boguski, D. J. Lipman, J. Ostell, B. F. F. Ouellette, B. A. Rapp, & D. L. Wheeler. (1999). GenBank. *Nucleic Acids Res.* **27**:12-17.

Bergey's manual of determinative bacteriology. (1948) 6th edition, Williams and Wilkins, Baltimore.

Bergey's manual of systematic of bacteriology. (1939). 5th edition, Williams et Wilkins, Baltimore.

Bernard, F. P., J. Connan, & M. Magot. (1992) Indigenous microorganisms in Connaute Water of many oild fields : a new tool in exploration and production techniques. Proc. 67th Annual Technical Conf. And Exhib. Soc. Petroleum Engineers. Paper SPE 24811, Richardson, Tx.

Birkeland, N. K. (2005). Sulfate-reducing bacteria and archaea. In *Petroleum Microbiology* (Magot, M.& Olliver, B., Eds). ASM Press, Washington D.C, In press.

Blotvogel, K. H., U. Fischer, M. Mocha & S. Jannsen. (1985). *Methanobacterium thermoalcaliphilum* spec. nov., a new moderately alkaliphilic and thermophilic autotrophic methanogen. *Arch. Microbiol.* **142**:211-217.

Borzenkov, I. A., S. S. Belyaev, Y. M. Miller, I. A. Davidova, & M. V. Ivanov. (1997). Methanogenesis in the highly mineralized stratal waters of the Bondyzhskoe oil field. *Microbiology (Engl. Tr.)*. **66**:104-110.

Bozzola, J. J. & L. D. Russel. (1991). *Electron microscopy. Principles and Techniques for Biologists.* Jones and Barlett Publishers, Boston.

Brenner, D. J., N. R. Krieg, & J. T. Staley. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology,* Springer Science, Nex York, **2B**:14-15.

Bryant, M. P., E. A. Wolin, M. J. Wolin, & R. S. Wolfe. (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.* **59**:20-31.

Burggraf, S., H. W. Jannash, B. Nicolaus & K. O. Stetter, (1990). *Archaeoglobus profundus* sp.nov. , represent a new species within the sulphate-reducing Archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**:24-28.

C

Cao, X., X. Liu, & X. Doug. (2003). *Alkaliphilus crotonatoridaus* sp. nov., a stickly anaerobic, crotonate – dismutating bacterium isolated from a methanogenic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:971-975.

Cashion, P., A. Holdei – Franklin, J. McCully, & M. Franklin. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.* **81**:61-466.

Castro, H. F., W. H. Williams, & A. Ogram. (2000). Phylogeny of sulphate-reducing bacteria (1). *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:1-9.

Caumette, P. (1987). Développement des bactéries phototrophes et des bactéries sulfato-réductrices dans des lagunes peu profondes et des lagunes stratifiées. Etude de leur rôle dans le cycle du soufre et dans la production de biomasse. Thèse de doctorat es Sciences, Université d'Aix Marseille III. P32.

Chargaff, E., & J. N. Davidson. (1949). Predicted PCR products. Structure of the expected ligation product. *J.N. (Academic, New York), Vol 1,* pp 409-445.

Clement, B. G., L. E. Kehl, K. L. DeBord, & C. L. Kitts. (1998). Terminal restriction fragment patterns (TRFLP_s), a rapid, PCR-based methods for the comparison of complex bacterial communities. *J Microbiol Methods* **31**:135-142.

Cohn. (1872) in **E. Stackebrandt, C. Koch, O. Gvozoviak, & P. Schumann.** (1995). Taxonomie dissection of the genus *Micrococcus* : *Kocuria* gen. nov. , *Nesterenkonia* gen.nov. , and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emed. *Int J Syst. Bacteriol.* Vol 45 N°4, 682-692.

Cord – Ruwisch, R., & J. L. Garcia. (1985). Isolation and characterization of an anaerobic benzoate-degrading spore-forming sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum spomandes* sp. nov. *FEMS. Microbiol. Lett* **29**:325-330.

Corre, E. (2000). Approche moléculaire de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes : les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse de doctorat. (IUEM) Institut Universitaire Européen de la Mer.

Cowan. (1968) in **Euzeby** (2006), abrégé de bactériologie générale et médicale.

Crozier, R. H., P. M. Agapow, & K. Pedersen. (1999). Towards complete biodiversity assesment : an evaluation of the subterranean, bacterial communities in the Oklo region of the sole surviving natural nuclear reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**:325-334.

D

Davis, G. B., C. Barber, D. Briegel, T.R. Power, & B. M. Patterson. (1992). Sampling groundwater quality for miorganics and organics – some old and new ideas. *Proc. International Drill'92 Conf., Perth W.A.* , oct. 1992, **24**:1-24.9.

Davydova – Charakhch'yan, I. A., A. N. Milleva, L. L. Mityushina, & S. S. Belayev. (1992). Acetogenic bacteria from oil fields of Tataria and Western Siberia. *Microbiology (Engl. Tr.)* **61**:306-315.

De Ley in Euzeby. (2006). Le latin dans la nomenclature bactérienne. *DMJ* janvier 2007. www.bacterio.cict.fr/bacdico/systematique/annexeum.html.

De Soete, G. (1983). A least square algorithm for fitting additive trees to proximaty data. *Psychometrika* 48:621-626.

Devereux, R., S. H. Doyle, C. L. Orkland, S. Stall, D. A. LeGall, & W. B. Whitman. (1990). Diversity and origin of *Desulfovibrio* species : phylogenetic definition of a family. *J. Bacteriol.* 172:3609-3619.

Diaz, C., M-L. Fardeau, C. Jouliou, F. Theveniean, B. Ollivier, P. Thomas, & Baena. Sandra. (2006). *Caldanaerocella Colobiensis* gen. nov. , sp. nov. , a novel thermophilic bacterium isolated from a Colombian hot spring. Article soumis à *Int J Syst Bacteriol.*

Dojka M. A., P. Hugenholtz, S. K. Haack, & N. R. Pace. (1998). Microbiol diversity in a hydrocarbon and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Envir. Microbiol.* 64:3869-3877.

Drake, H. L., S. L. Daniel, C. Matthies, & K. Küsel. (1994). Acetogenesis : reality in the laboratory, uncertainly elsewhere. In *Acetogenesis*, Pp. 273-302. Edited H.L. Drake. New York : Chapmanet Hall.

E

Edgell, D. R., N. M. Fast, & W. F. Doolittle. (1996). Selfish DNA : the best defense is a good offense. *Curr. Biol.* 6:385-388.

Ekendahl, S., & K. Pedersen. (1994). Carbon transformations by attached bacterial populations in granitic groundwater from deep crystalline bed-rock of the stripa research mine. *Microbial* 140, 1565-1573.

Ekendahl, S., J. Arlinger, F. Stahl, & K. Pedersen. (1994). Characterization of attached bacterial populations in deep granitic ground water from the stripa research mine by 16S_rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. *Microbiology* 140:1575-1583.

Esteban Monserrate, B. T. Susan, Leschine, & Ercole Canale-Parola. (2001). *Clostridium hungate* sp. Nov., N₂ fixing cellulotyc bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. And Evol. Microb.* 51:123-132.

Euzeby, J. P. (2006). Society of Systematic and Veterinary Bacteriology
<http://www.bacterio.cict.fr>.

F

Fardeau, M. L., J. L. Cayol, M. Magot, & B. Ollivier. (1994). Hydrogen oxidation abilities in the presence of thiosulfate as electron acceptor within the genes *Thermoanaerobacter*. *Curr. Microbiol.* **29**:265-272.

Fardeau, M. L., B. Ollivier, B. K. Patel, P. Dwivedi, M. Magot, & J. L. Garcia. (1995). Isolation and characterization of a thermophilic sulphate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermosapovorans* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:218-221.

Fardeau, M-L. , M. Magot, B. K. C. Patel, P. Thomas, J-L. Garcia, & B. Ollivier. (2000). *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov. , a novel thermophilic isolated from oilfield water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:2141-2149.

Fauque, G., B. Ollivier. (2004). Anaerobes : the sulphate reducing bacteria as an example of metabolic diversity, In "Microbial Diversity and Bioprospecting" (Bull A.T., ed.), ASM Press, Washington, D.C, pp 165-176.

Feio M. J., I. B. Beech, M. Carepo, J. M. Lopes, C. W. S. Cheung , R. Franco , J. Guezennec, J. R. Smith, J. I. Mitchell, J. J. G Moura, & R. Lino. *Ana.* (1998). Isolation and characterization of a novel sulphate-reducing bacterium of *Desulfovibrio* Genus. *Anaerobe* **4**:117-130.

Felstein, J. (1993). Phylogenetic inference package version 3.5.1. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA

Fitch, W.M. (1971). Toward defining the course of evolution : minimum change for a specific tree technology. *Syst. Zool.* **20**:406-416.

Fliermans, C. B., & D. L. Balkwill. (1989). Microbiol life in deep terrestrial subsurfaces : diverse, abundant communities thrive 500 meters underground. *Bioscience* **39(6)**:370-377.

Fry N. K., J. K. Frederikson, S. Fishbain, M. Wagner, & D. Stahl. (1997). Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Appl Environ Microbiol* **63**:1495-1504.

G

Gal, L., S. Pages, C. Gaudin, A. Belaïch, C. Reverbel-Leroy, C. Tardif, & J-P. Belaïch. (1997). Characterization of the cellulosic complex (cellulosome) produced by *Clostridium cellulotycum*. Appl Environ. Microbiol. **63**:903-909.

Garcia, J.L. (1990). Taxonomy and ecology of methanogens. FEMS. Microbiol. Lett. **87**:297-308.

Ghiorse, W. C., & J. T. Wilson. (1988). Microbial ecology of the terrestrial subsurface. Advance in Appl. Microbiol. **33**:107-171.

H

Hall and O'Toole (1935) in D. H. Bergey, R. S. Breed, E. D. G. Mrray, & A. P. Hichens. (1939) Bergey's manual of determinative bacteriology, 5th Edition, Williams and Wilkins, Baltimore.

Henry, E. A., R. Devereux, J. S. Maki, C. C. Gilmour, C. R. Woese, L. Maudelca, R. Schander, C. C. Remsen, & R. Mitchell. (1994). Characterization of a new thermophilic sulphate-reducing bacterium. *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp.nov. : its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commun* and their origins deep within the bacterial domain. Arch. Microbial. **161**: 62-69.

Hobbie, J. E., R. J. Daley, & S. Jasper. (1977). Use of nucleopore filters dor counting bacteria by epifluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. **33**:1225-1228.

Holt, J. G. (1993) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In : Methods in microbiology, Vol. 3b (Norris, R. and Ribbons, D.W. , eds.) pp 117-132. Academic Press. New York.

I

I-Hsien Tsu, Chi-yu Huang, J. L. Garcia, B. K. C. Patel, J-L. Cayol, L. Baresi, & A. Mah. Robert. (1998). Isolation and characterization of

Desulfovibrio senezii sp. nov. , a halotolerant sulphate reducer from a solar saltern and phylogenetic confirmation of *Desulfovibrio fructosavorans* as a new species. *Aich. Microbiol.* **170**:313-317.

J

Jain, D. K., S. Stroes-Gascoyne, M. Providenci, C. Tanner, & I. Cord. (1997). Characterization of microbial communities in deep groundwater from granitic rock. *Can J Microbiol* **43**:272-283.

Jeanthon C., S. L'Haridon, N. Pradel, & D.Prieur. (1999). Rapid identification of hyperthermophilic methanococci isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:591-594.

Jones, W. J., J. A. Leigh, F. Mayer, C. R. Woese, & R. S. Wolfe. (1983). *Methanococcus jannaschii* sp.nov. , an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **136**:254-261.

Jorgensen, B. B. (1982). Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Philos Trans R Soc London Biol.* **298**:543-561.

Jukes, T. H., & C. R. Cantor. (1969). Evolution of protein molecules, p 21-132. In H.N. Munzo (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press. New York.

K

Kieft, T. L., J. K. Frederickson, T. C. Onstott, Y. A. Gorby, H. M. Kostandarites, I. J. Bailey, D. W. Kennedy, S. W. Li, A. E. Plymale, C. M. Spandoni, & M. S. Gray. (1999). Dissimilatory reduction of Fe (III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Appl Environ Microbiol* **65**:1214-1221.

Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. Kingman, J.F.C. 1982a.

Kisaud, V., R. Cuardos, & J. Wiken. (2002). Phylogeny of culturable estuarine bacteria catabolizing riverine organic matter in the northern Baltic sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:379-388.

slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from canading offshore oil wells. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:818-824.

Magot, M., J. Connan, & J. L. Crolet. (1994). Les bactéries des gisements pétroliers. *La recherche* **25**:936-937.

Magot, M., O. Basso, C. Tardy – Jacquenod, & Pierre Caumette. (2004), *Desulfovibrio bastinii* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov. , moderately halophilic, sulphate-reducing bacteria isolated from deep subsurface oil field water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**.

Maidak, B. L., J. R. Cole, T. G. Lilburn, & 7 others authors. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **29**:173-174.

Mathrani L. M., D. R. Boone, R. A. Mah, G. E. Fox, & Lan, P. P. (1988). *Methanohalophilus zhilinae* sp.nov., an alkaliphilic halophilic, methylophilic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:139-142.

Mesbah, M., Premachandran, U., & Whitman, W. (1989). Precise measurement of G+C content of desoxiribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:159-167.

Microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and others metals. *Arch. Microbiol.* **159**:336-344.

Miller, T. L., & M. J. Wolin. (1974). A serum bottle modification of Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *App. Microbiol.* **27**:985-987.

Mullis K. B., & F. Faloana. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Method Enzymol.* **155**:335-350.

O

OFEFP : office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage, section protection des eaux et pêches. Guide pratique de l'échantillonnage des eaux souterraines.



Ollivier, B., P. Caumette, J. L. Garcia, & R. A. Mah. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* **58**:27-38.

Olsen, G. J. (1988). Phylogenetic analysis using ribosomal RNA, p. 793-812. In W.A. Wood (ed.) , Methods in enzymology, Vol 164. Academic Press, New York and London.

Oremland, R. S. (1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In Biology of anaerobic microorganisms, pp. 641-705. Zehnder A.J.B. (ed.), USA : John Willey & Sons.

P

Pedersen, K., (1996). Investigations of subterranean bacteria in deep crystalline bedrock and their importance for the disposal of nuclear waste. Can.J.Microbial. **42**:382-398.

Pedersen, K., J. Arlinger, L. Hallbeck, & C. Petterson. (1996 a). Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa ,as determined by 16S_rRNA gene sequencing.Mol.Ecol. **3**:427-436.

Pedersen, K., J. Arlinger, S. Ekendahl, & L. Hallbeck. (1996 b). 16S_rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the acces tunnel to the Aspöhard rock laboratory. Sweden. FEMSMicrobiol.Ecol. **19**:249-262.

Pedersen, K., L. Hallbeck, J. Arlinger, A. C. Erlandson, & N. Jahromi . (1997). Investigation of the potentiel for microbial contamination of deep granitic aquifers during drilling using 16S_rRNA gene sequencing and culturing methods. J.Microbiol. Meth. **30**:179-192.

X **Pedersen, K., & S. Ekendahl,** (1990). Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of Southeastern Sweden. Microb Ecol **20**:37-5

Pelmont, J. (1993). Soufre et hydrogène, pp 633-668. In Bacteries et Environnement. Presse universitaire de Grenoble, Collection Grenoble Sciences.

Pikuta, E. V., T. N. Zhilina, G. A. Zavrzin, N. A. Kostrikina, G. A. Osipov, & F. A. Raynet. (1998). *Desulfonatronum lacustre* gen.nov, sp.nov., a new alkaliphilic sulphate-reducing bacterium utilising ethanol Microbiology (Engl. Tr. Microbiologya), **67**:123-131.

Prévot, A. R. (1961). *Traité de systématique bactérienne*. Tome II. Dunod, Paris. 777 pages.

Ravot, G., B. Ollivier, M. Magot, B. K. C. Patel, J-L. Crolet, M-L Fardeau, & J-L Garcia. (1995). Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2053-2055.

Prazmowski. (1880) in *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Editions 1 to 8 from 1923 to 1974).

R

Ravot, G. (1996). *Nouvelles approches microbiologiques de la thiosulfato-réduction en milieu pétrolier*. Thèse de doctorat, Université de Provence Aix-Marseille I.

Ravot, G., M. Magot, M. L. Fardeau, B. K. C. Patel, G. Prensien, A. Egar, J. L. Garcia, & B. Ollivier. (1995). *Thermotoga elfii* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:308-314.

Redburn, A. C., & B. K. C. Patel. (1993). Phylogenetic analysis of *Desulfomaculum thermobenzoicum* using polymerase chain reaction – amplified 16SrRNA – Specific DNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* **113**:81-86.

Reeves R. H., J. Y. Reeves, & D. L. Balkwill. (1996). Strategies for phylogenetic characterization of subsurface bacteria. *J. Microbiol. Methods* **21**:235-251.

Rouen, D., M. Magaritz, & I. Ley. (1986). A multi-layer sampler for the study of detailed hydrochemical profiles in groundwater. *Wat. Res.* **20** (3):311-315.

S

Santo Domingo J. W., C. J. Berry, M. Summer, & C.B. Fliermans. (1998). Microbiology of spent nuclear fuel storage bassins. *Curr. Microbiol.* **37**:387-394.

Schink, B. (1994). Diversity, ecology, and isolation of acetogenic bacteria. In *Acetogenesis*, pp 273-302. Edited by H.L. Drake. New York : Chapman et Hall.

Schnell, S., F. Bak, & N. Pfennig. (1989). Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulphate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* **152**:556-563.

Schnell, S., F. Bak, & N. Pfennig. (1989). Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulphate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium aniline*. *Arch. Microbiol.* **152**:556-563.

Sneath, P. H. A. (1957). The application of computers to taxonomy. *Jour. Gen. Microbiol.* **17**:201-226.

Söhngen, N. L. (1910). Sur le rôle du méthane dans la vie organique. *Recl. Trav. Chim. Pays Bos.* **29**:238-250.

Stackebrandt, E., C. Spoer, F. A. Rainey, J. Burghardt, O. Panker, & H. Hippe. (1997). Phylogenetic analysis of the genes *Desulfotomaculum* : evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen.nov., Comb.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1134-1139.

Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, PAD. Grimont, P. Kampfer, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H.G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward, & W. B. Whitman. (2002). Report of ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1043-1047.

Stackebrandt, E., D. A. Stahl, & R. Devereux. (1995). Taxonomic relationships. In *Biotechnology Handbooks*, Vol 8, pp. 49-88. Barton L.L. (ed.), New York : Plenum Press.

Staley, J. T., & A. Konopka. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:321-346.

Steinmann, P., & W. Shotyk. (1996). Sampling anoxic spore water in peatlands using «peepers» for in-situ filtration. *Fresenius JA. Chem.* **354**:709-713.

Whitman, W. B., D. C. Coleman, & W. J. Woebe. (1998). Prokaryotes : the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:6578-6583.

Widdel F., & N. Pfennig, (1983). Studies bacteria that decompose fatty acids.II.Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen.nov, sp. Nov. *Arch Microbiol* **131**:360-365.

Widdel, F., & T. A. Hansen. (1992). The dissimilatory sulphate-reducing bacteria. In the Procaryotes Vol 47, pp 3353-3378. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M, Harder, W. & Schleifer, K.H.(ed.), New York : Springer.

Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulphate and sulfur-reducing bacteria, p. 569-585. In A.J.B. Zehnder (ed.), *Biology of Anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.

Woese, C. R. (1998). Default taxonomy Emst Mayr's View of the microbial world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 11043-11046.

Worakit, S., D. R. Boone, R. A. Mah, M. E. Abdel-Samie, & M. M. El-Halwagi. (1986). *Methanobacterium alcaliphilum* sp. nov. , anttz-utilizing methanogen that grows at high pH values. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:380-382.

Z

Zeikus, J. G., & R. S. Wolfe. (1972). *Methanobacterium thermoantrophicus* sp.nov. an anaerobic, antotrophic extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **109**:707-713.

Zhilina, T. N., G. A. Zavarzin, F. A. Rayney, E. N. Pikuta, G. A. Osipov, & M. A. Kostrikina. (1997). *Desulfonatovibrio hydrogenovorans* gen.nov., sp.nov., an alkliphilie sulphate-reducing bacterium. *Int. J. Bacteriol.*, **47**:144-149.

Zimmermann, R., & L. A. Meyer-Reil. (1974). A new method for fluorescent staining of bacterial population on membrane filters. *Kile. Meersforsh.* **30**:24-27.

Stetter, K. O. (1988). *Archaeoglobus fulgidus* gen.nov. , sp.nov. , a new taxon of extremely thermophilic Archaeobacteria. Syst. Appl. Microbiol. 10:172-173.

Stevens, T. O., J. P. McKinley, & J. K. Frederisson. (1993). Bacteria associated with deep, alkaline, anaerobic groundwaters in Southeast Washington. Microb Ecol 23:35-50.

T

Takai, K., D. P. Moser, M. DeFlaun, T. C. Ostott, & T. K. Frederickson. (2002). Archaeal diversity in waters from deep South african gold mines. Appl Environ Microbiol 67:5750-5760.

Tardy-Jacquenod, C. (1996). Biodiversité, taxonomie et phylogénie des bactéries sulfato-réductrices isolées de champs pétroliers : exemple de gisements salés et chauds. Thèse doctorat, Université de Bordeaux I.

Trevisan. (1885) in Bergey's manual of determinative bacteriology, 6th edition (1948).

V

Van Ermengen. (1896) in the first edition of the Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore.

W

X **Watanabe, K., Y. Kodama, N. Hamamura, & N. Kaben.** (2002). Diversity, abundance and activity of archaeal population in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of underground crude oil storage cavity. Appl Environ Microbiol 68:3899-3907.

Wellsbury, P., K. Goodman, T. Barth, B. A. Cragg, S. P. Barnes, & J. Parkes. (1997). Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. Nature 388:573-575.

White D. C., T. J. Phelps and T. C. Onstott. (1988). What's up down there. Curr. Opin. Microbiol. 1:286-290.

X **Zubkov, M. V., B. M. Fuchs, H. Eilers, Brkill, & R. Amann. (1999).
Determination od total protein content of bacterial celles by SYPRO staining
and flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 65:3251-3257.**

تشخيص لطيفتين بكتيريتين جديدتين معزلة من أحياف عميق

لقد ظلت دراسة الأصناف الميكروبيولوجية ولوقت طويل محدودة بالاستعمال الحضري لطرق زراعية تسمح لنا بالولوج إلا في جزء محدد من التغذية الميكروبية ، وكذلك صعوبة عملية التعيين (أدن الغينات) للحصول على عينات توضيحية وحتى تتجاوز هذين الحدين ، لقد لجأنا إلى استعمال الدراسة الزراعية بالتوازي مع الجزئية لكي ندرس خليتين بكتيريتين مصدرهما " أكيفير " من حوض باريس هذا من جهة ، و من جهة أخرى قام فريق البروفسور "ماغو" بتجميع العينات تمثلت هذه الدراسات في تحليل فيلوجيني للعينات ARNr16S. أي تحديد الموقع (التوضع) الفيلوجيني للخليتين على حدة . إن الدراسة المنجزة انطلاقا من عينات الماء التي مصدرها " الأكفير " الباريسي قد قادتنا إلى وصف خلية بكتيرية جديدة تنتمي إلى صنف " الكلستريديال " ، متكونة من G+C % التي سميناها " *Geosporobacter subterraneus* " واكتشاف فصيلة جديدة تنتمي إلى النوع " *Desulfovibrio* " نجد هذين النوعين في بعض الكائنات البيولوجية حيث تكون *Desulfovibrio* مسؤولة عن الأكسدة الكبريتية .

إن الاستعمال المزدوج للطرق الزراعية و الطرق الجزئية مكنتنا من اكتشاف فصائل بكتيرية جديدة .

كلمات مفتاحية : خليتين بكتيريتين جديدتين، الكلستريديال، ب.س.ر ، أكيفير عميق.

Caractérisation de deux nouvelles souches bactériennes isolées d'un aquifère profond

L'étude des communautés de microorganismes des eaux souterraines et des aquifères profonds a longtemps été limitée par l'utilisation exclusive de méthodes culturales ne permettant d'accéder qu'à une partie restreinte de la diversité microbienne et la difficulté de la procédure d'échantillonnage pour l'obtention d'échantillons représentatifs.

Afin de dépasser ces deux restrictions, nous avons utilisé les approches culturales en combinaison avec des approches moléculaires pour étudier deux souches bactériennes issues d'un aquifère du bassin Parisien d'une part, d'autre part, la collecte des échantillons a été faite par l'équipe du Professeur Magot, faculté de Pau. Les approches ont consisté en une analyse phylogénétique des gènes codant pour l'ARNr16S et donc de déterminer le positionnement phylogénétique des deux souches isolées. L'étude réalisée à partir d'échantillons d'eau provenant d'un aquifère parisien a conduit à la description d'une nouvelle souche bactérienne appartenant à l'ordre des Clostridiales, à bas G+C % que nous avons nommé *Geosporobacter subterraneus*, et l'identification d'une nouvelle espèce appartenant au genre *Desulfovibrio*. Ces deux genres sont retrouvés dans tels biotopes où ils sont impliqués dans les processus de sulfato-réduction. L'utilisation combinée de méthodes moléculaires et de méthodes culturales nous a permis de découvrir de nouvelles espèces bactériennes.

Mots clés : Nouvelles souches bactériennes, Clostridiales, BSR (Bactéries sulfato-réductrices), aquifère profond.

Characterization of two new bacterial stocks isolated from a deep aquifer

Studies of the microbial communities of deep subsurface waters is currently very limited, mainly because of the methods used to collect representative microbial samples from such environments and the use of cultural techniques which described only a restricted part of the diversity.

To circumvent these limitations, we used cultural techniques in conjunction with molecular methods and the Basso protocol sampling to investigate the two bacteria isolated from deep well in Paris Basin.

Our approach use sequencing total 16SrDNA. The study lead to the description of a novel bacteria affiliated to the Clostridiales and to the low G + C % : Gram positive bacteria *Geosporobacter subterraneus* nov gen, nov sp and a novel species of the genes of *Desulfovibrio*, a sulfato-reducing bacteria.

Combined use of molecular and cultural methods allows to overcome the limitations inherent to each techniques and the use of Basso protocol sampling to the description of novel sequences of Bacteria and then a best knowledge about microbial communities of deep subsurface water.

Keywords : New bacterial stocks, Clostridiales, B.S.R (sulfato-reducing bacteria), deep aquifer.