

Acides organiques produits par une archaébactérie anaérobie hyperthermophile soufre-dépendante

Archaea
Acides organiques
Acides aminés
Isotopes stables

Archaea
Organic acids
Amino acids
Labelled isotopes

Jean GUEZENNEC ^a, Alain RIMBAULT ^b, Anne GODFROY ^a, Muriel FROMAGE ^b, Françoise MAREC ^a et Francis ROCCHIOLI ^c

^a Direction de la Recherche Océanique, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France.

^b Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris.

^c INSERM, U342, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, 75013 Paris.

Reçu le 24/08/93, révisé le 18/11/93, accepté le 23/11/93.

RÉSUMÉ

La présence de micro-organismes «extrémophiles» près des sources marines hydrothermales profondes soulève la question du métabolisme de ces bactéries et des produits de ce métabolisme. De plus leur utilisation potentielle dans le domaine des biotechnologies pose également le problème de l'impact de ces micro-organismes et de leurs métabolites sur le comportement des matériaux destinés à la production de biomasses. Les acides organiques produits par une archaébactérie anaérobie soufre-dépendante ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les voies de synthèse de quelques acides mis en évidence lors de cette étude ont été étudiées à partir d'acides aminés marqués. Les analyses démontrent la présence en quantités non négligeables d'acides propanoïque, 2-méthyl propanoïque, 3-(méthylthio) propanoïque, phénylacétique et 4-hydroxyphénylacétique. L'utilisation d'acides aminés marqués a permis de montrer que l'acide 3-(méthylthio) propanoïque dérivait de la L-méthionine tandis que la L-phénylalanine conduisait à la synthèse de l'acide phénylacétique.

Oceanologica Acta, 1994. 17, 1, 55-61.

ABSTRACT

Organic acids formed by an anaerobic thermophilic sulphur-dependent archaeobacterium

The existence of deep-sea hydrothermal thermophilic archaeobacteria raises interesting questions about their metabolism and metabolic products both in a natural environment and in a culture medium. Moreover, the use of these microorganisms as a potential source of molecules of biotechnological interest must be considered, in the light of the fact that metabolic products can enhance the risk of microbially-induced corrosion. Organic acids formed by an anaerobic thermophilic sulphur-dependent archaeobacterium were analysed as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives by GC and GC/MS. Data indicated the presence in significant amounts of propanoic, 2-methyl propanoic, 3-(methylthio) propanoic, phenylacetic and 4-hydroxyphenylacetic acids. In addition, the use of stable-isotope labelled amino acids demonstrated specific pathways for 3-(methylthio) propanoic and phenylacetic acids.

Oceanologica Acta, 1994. 17, 1, 55-61.

INTRODUCTION

Le milieu hydrothermal profond se caractérise par des paramètres physico-chimiques particuliers tels des pressions élevées, des gradients de température importants et des teneurs en éléments toxiques conséquentes (métaux lourds et sulfures). Dans ces environnements où la production de matière organique est essentiellement basée sur la chimiosynthèse, cohabitent eubactéries et archaébactéries dont certaines sont soufre-dépendantes.

L'existence de micro-organismes «extrémophiles» soulève aussi la question de leurs applications potentielles en biotechnologie, que ce soit pour la production d'enzymes thermostables ou celle de polymères nouveaux. L'utilisation de fermenteurs, nécessaires à la production de biomasses conséquentes, doit être alors envisagée en tenant compte du rôle que peuvent jouer les métabolites de ces micro-organismes sur le comportement des matériaux. La corrosion induite par les micro-organismes est en effet la conséquence de leur présence physique et de leur activité au niveau des surfaces, selon des mécanismes faisant appel soit à une action directe (production de métabolites agressifs) ou indirecte [participation à des réactions d'oxydo-réduction se produisant à l'interface métal-milieu (Guézennec, 1991)].

Actuellement, peu de données sont disponibles quant aux métabolites produits par les archaébactéries hyperthermophiles soufre-dépendantes provenant des événements hydrothermaux profonds. Cependant, dans le domaine des eubactéries anaérobies, la détection et le dosage par chromatographie en phase gazeuse (CG) des acides volatils et non volatils présents dans les cultures sont utilisés en routine à des fins d'identification (Holdeman *et al.*, 1977), et présentent un grand intérêt pour la compréhension de leur métabolisme. Une alternative aux techniques classiques utilisant des colonnes remplies pour le dosage de ces acides, consiste à former leurs dérivés *tert*-butyldiméthylsilylés [TBDMS (Kim *et al.*, 1989)]. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet l'analyse d'une grande variété d'acides organiques (aliphatiques, aromatiques), y compris les acides à bas carbone (Kim *et al.*, 1989).

Le but de cette étude était la détermination d'acides organiques dans les cultures de certaines archaébactéries anaérobies hyperthermophiles soufre-dépendantes d'origine hydrothermale ainsi que celle des précurseurs de certains

acides organiques analysés par l'utilisation d'acides aminés marqués par des isotopes stables. Dans une première approche, ce travail a été plus particulièrement consacré à l'étude d'une seule souche et devrait être complété par la suite par des études complémentaires sur d'autres micro-organismes soufre-dépendants de même origine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Milieux et conditions de culture

La souche ST 546 considérée dans cette étude a été isolée dans le bassin nord fidjien au cours d'une campagne océanographique *Starmar* menée par IFREMER avec l'appui du navire *Nadir* et du submersible *Nautille*. De morphologie coccoïde, cette archaébactérie hyperthermophile soufre-dépendante se développe entre 65° et 105°C avec une croissance optimale à 95°C. Elle est hétérotrophe stricte, sa croissance est optimale en présence de substrats organiques complexes. De plus cette souche réduit le soufre élémentaire en hydrogène sulfuré.

Cette souche ST 546 a été cultivée dans les milieux BHI-S et 20 AA-S à 95°C pendant 15 heures. Les compositions de ces différents milieux sont indiquées dans le tableau 1. Après tyndallisation, les milieux sont transférés dans une enceinte anaérobie contenant un mélange gazeux N₂/H₂/CO₂ (90/5/5). Après addition de sulfure de sodium (à une concentration finale de 0,5 g/l) les milieux sont distribués sous un volume de 20 ml (10 ml dans les expériences de marquage) dans des flacons type Pénicilline. Dans le cas du milieu 20 AA-S, la solution d'acides aminés a été stérilisée par filtration sur membrane 0,22 µm.

Pour les expériences de marquage, la L-(méthyl-²H₃) méthionine (L-Met-d₃; enrichissement en ²H, 99 %) ou la L-(ring U-¹³C₆) phénylalanine (L-Phe-¹³C₆; enrichissement en ¹³C, 90 %) a été substituée (0,2 mM) à l'acide aminé correspondant non marqué dans le milieu 20 AA-S, conduisant, respectivement, au milieu 19 AA-S-L-Met-d₃ ou au milieu 19 AA'-S-L-Phe-¹³C₆.

Préparation de l'échantillon

Les analyses ont été réalisées selon la méthode de Kim *et al.* (1989), modifiée par Rimbault *et al.* (1993). A une

Tableau 1

Composition des milieux de cultures BHI-S et 20 AA-S (pour 1 litre). Solutions minérales traces: voir références Balch *et al.*, 1979.

BHI-S and 20A AA-S media (see references: Balch *et al.*, 1979).

	BHI-S pH 7,5		20 AA-S pH 7,5
Brain heart infusion	9 g	Acides aminés	0,2 mM de chaque
NaCl	23 g	Sea Salt (SIGMA)	30 mg
Tampon PIPES	20 mM (6.05 g)	Tampon PIPES	20 mM (6.05 g)
Soufre	10 g	Soufre	10 g
		Solution de vitamines (Balch <i>et al.</i> , 1979)	10 ml
		Solution de minéraux traces (Balch <i>et al.</i> , 1979)	10 ml

fraction aliquote (3,5 ml) de culture filtrée sur membrane (0,22 µm) ont été ajoutés 0,1 ml d'acide chlorhydrique 12 M (pH final *ca.* 0.7-1.0), 0,1 ml de la solution d'étalon interne (acide 2- méthyl pentanoïque, concentration finale, 0,79 mM) et 0,3 ml d'eau bi-distillée sur quartz. Les acides sont alors extraits par l'acétate d'éthyle (2 x 2 ml).

0,4 ml de triéthylamine sont ajoutés à la phase organique séchée sur sulfate de sodium anhydre (18 heures). La phase organique est alors évaporée sous un courant d'azote sec. La silylation est réalisée à température ambiante par addition au résidu d'évaporation de 50 µl d'acétonitrile puis de 50 µl de butyldiméthyl-silyltrifluoroacétamide (MTBSTFA). Cette silylation conduit alors à la formation de dérivés *tert*-butyldiméthylsilylés (TBDMS) des différents acides aliphatiques et aromatiques.

Chromatographie en phase gazeuse (CG)

Les échantillons (0,4 µl) ont alors été analysés sur un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne «wide bore» CP-Sil 5 CB (25 m x 0,53 mm *i.d.*, épaisseur de film, 2 µm) avec l'hélium comme gaz vecteur. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 290° et 300°C. L'analyse a été faite en programmation de température (80°C pendant 6 minutes, 4°C/mn, 280°C).

Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse(CG/SM)

Les analyses CG-SM ont été effectuées en utilisant le couplage d'un chromatographe en phase gazeuse à un spectromètre de masse quadrupolaire équipé du système d'acquisition de données Incos. L'analyse par CG a été réalisée en programmation de température de 100°C à 320°C à une vitesse de 5°C/mn. L'ionisation est réalisée par impact électronique (EI, 70 eV ; courant d'émission, 0,2 mA) et les masses sont balayées de 45 à 630 uma (0,6 s par balayage).

RÉSULTATS

Les différents acides aliphatiques et aromatiques détectés sous forme de dérivés TBDMS pour la souche ST 546 cultivée, soit dans le milieu BHI-S ou dans le milieu chimiquement défini 20 AA-S sont listés dans le tableau 2.

Dans le milieu BHI-S non ensemencé, les dérivés TBDMS des acides formique, acétique et lactique ont été détectés, de même que les pics correspondant aux réactifs et aux produits de réaction. Un autre pic (référéncé U2) a aussi été mis en évidence. A partir des données quantitatives, seuls les acides propanoïque, 2-méthyl propanoïque, 3-(méthylthio) propanoïque, phénylacétique, 4-hydroxyphénylacétique et indole-3-acétique ainsi que le composé correspondant au pic U1 peuvent être considérés comme associés aux cultures de la souche ST 546 (fig. 1).

Les acides organiques détectés dans les cultures en milieu BHI-S sont présents à des concentrations millimolaires,

Tableau 2

Acides organiques analysés dans les différents milieux en présence et absence de la souche ST 546 * Moyenne ** : déviation standard ; Nd : non déterminé ; + : présence non quantifiée.

Organic acids analysed as their mono TBDMS derivatives in different media with and without strain ST 546.

Acides organiques (mmole. l ⁻¹)	BHI(S)		20 AA-S	
	Inoculé (N = 4)	Stérile (N = 1)	Inoculé (N = 1)	Stérile (N = 1)
Formique	1.11*(0.72)**	0.83	0.28	Nd
Acétique	18.07(1.33)	23.26	13.39	14.24
Propanoïque	1.58(0.31)	Nd	0.11	Nd
2-Méthyl propanoïque	2.87(0.15)	Nd	0.27	"
Inconnu 1(U1)	+	"	+	"
3-(méthylthio) propanoïque	1.10(0.08)	"	0.19	"
2-Hydroxy propanoïque	1.98(0.07)	3.73	0.21	"
Phényl acétique	3.20(0.13)	"	0.18	"
Inconnu 2 (U2)	+	+	+	"
4-hydroxyphényl acétique	+	Nd	+	"
Indole-3-acétique	/	"	+	"

avec un coefficient de variation allant de 3,3 % (acide 2-hydroxy propanoïque) à 7,4 % (acide acétique), à l'exception de l'acide formique (65 %), ceci étant principalement dû à la grande volatilité du sel de triéthylammonium de cet acide (Kim *et al.*, 1989).

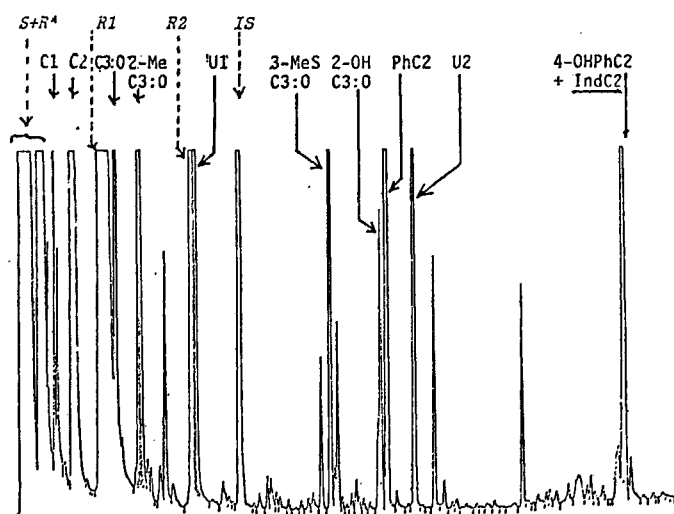


Figure 1

Chromatogramme obtenu en présence de la souche ST 546 inoculée en milieu BHI-S. S : solvant (acétonitrile) ; R* : produits de la silylation ; R1 : agent de silylation ; R2 : 1-3 bis (*tert*-butyl méthyl disiloxane) ; IS : standard interne (acide 2- méthyl pentanoïque) ; C1 : acide formique ; C2 : acide acétique ; C3 : 0 acide propanoïque 2-MeC3:0 : acide 2-méthyl propanoïque ; 2-MeSC3:0 : acide 3-(méthylthio) propanoïque ; 2-OHC3:0 acide lactique ; PhC2 : acide phényl acétique 4-OHPhC2 : acide 4-hydroxyphényl acétique ; IndC2 : acide indole 3-acétique ; U1 : inconnu 1 ; U2 : inconnu 2.

GC chromatogram of organic acids in the presence of the strain ST 546 (BHI-S medium).

Dans le cas des cultures réalisées en milieu 20 AA-S, le profil chromatographique est plus simple. La comparaison avec le contrôle correspondant permet de noter, dans les cultures, la présence des acides formique, propanoïque, 2-méthyl propanoïque, 3-(méthylthio) propanoïque, 2-hydroxy propanoïque, phénylacétique, 4-hydroxy phénylacétique et indole-3-acétique à des concentrations sub-millimolaires et celle des composés correspondant aux pics référencés U1 et U2. L'acide acétique est toujours présent, à des concentrations élevées et comparables à la fois dans la culture et le contrôle. Alors que, dans les milieux peptonés, l'acide acétique analysé provient souvent de la peptone, dans un milieu chimiquement défini comme le milieu 20 AA-S, l'apport d'acide acétique par les constituants ne peut expliquer les quantités retrouvées. La formation d'acide acétique par saponification de l'acétate d'éthyle sous l'action de la triéthylamine reste alors à considérer. Le fait que le contrôle pour le milieu 20 AA-S présente un nombre restreint de pics corrobore les données de Berhardt *et al.* (1984), relatives à la stabilité thermique des acides aminés en solution aqueuse.

Les spectres de masse des dérivés TBDMS sont caractérisés par la présence d'un pic à m/z $(M-57)^+$, un pic à m/z $(M-15)^+$, et très souvent par l'absence de pic moléculaire. L'identification du dérivé mono-TBDMS de l'acide 3-(méthylthio) propanoïque (fig. 2 a) est fondée sur la présence d'un ion intense à m/z 177, d'un ion à m/z 219 et à m/z 61 qui suggère la présence d'un groupe méthylthio dans la molécule par la formation du fragment $\text{CH}_3\text{-S}^+ = \text{CH}_2$. De façon similaire, le dérivé mono-TBDMS de l'acide phénylacétique (fig. 3 a) est identifié par la présence d'un fragment intense à m/z 193 $(M-57)^+$, d'un autre fragment à m/z 235 $(M-15)^+$, des pics à m/z 149 et 165 correspondant respectivement, à la perte de CO_2 et CO à partir du fragment $(M-57)^+$, et d'un pic intense à m/z 91, correspondant à l'ion tropylium C_7H_7^+ . Pour le dérivé di-TBDMS de l'acide 4-hydroxy phénylacétique, la comparaison de son spectre de masse avec celui du composé de référence et ceux d'isomères, à savoir les dérivés di-TBDMS des acides 2-hydroxy phénylacétique, 3-hydroxy phénylacétique et mandélique, en permet l'identification sans aucune ambiguïté. Pour le dérivé mono-TBDMS de l'acide indole-3-acétique, un fragment intense à m/z 232 $(M-57)^+$, un fragment à m/z 274 $(M-15)^+$, et l'ion moléculaire à m/z 289 sont observés. La présence d'un pic à m/z 130 correspond au fragment $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$, ce qui indique un composé indolique substitué et l'absence de silylation sur le noyau indole. Sur la base du temps de rétention, le composé correspondant au pic U1 peut être identifié comme étant l'acide 3-méthyl butanoïque ou l'acide 2-méthyl butanoïque.

Les expériences réalisées avec les acides aminés marqués par des isotopes stables, la L-Met- d_3 et la L-Phe- $^{13}\text{C}_6$, démontrent que, pour la souche ST 546, l'acide 3-(méthylthio) propanoïque a pour origine la L-méthionine tandis que la L-phénylalanine est le précurseur de l'acide phénylacétique. Après culture dans le milieu 19 AA-S-L-Met- d_3 , le spectre de masse du dérivé mono-TBDMS de l'acide 3-($^2\text{H}_3$ -méthylthio)propanoïque (fig. 2 b) prend la place de celui du dérivé mono-TBDMS de l'acide 3-(méthylthio) propanoïque, tandis que les spectres de masse de tous les autres acides répertoriés dans le tableau 2 restent inchangés. La comparaison des pics entre les figures 2 b et 2 a montre un déplacement de + 3 uma dans le fragment à m/z 64 ($\text{CH}_3\text{-S}^+ = \text{CH}_3$) et dans les fragments

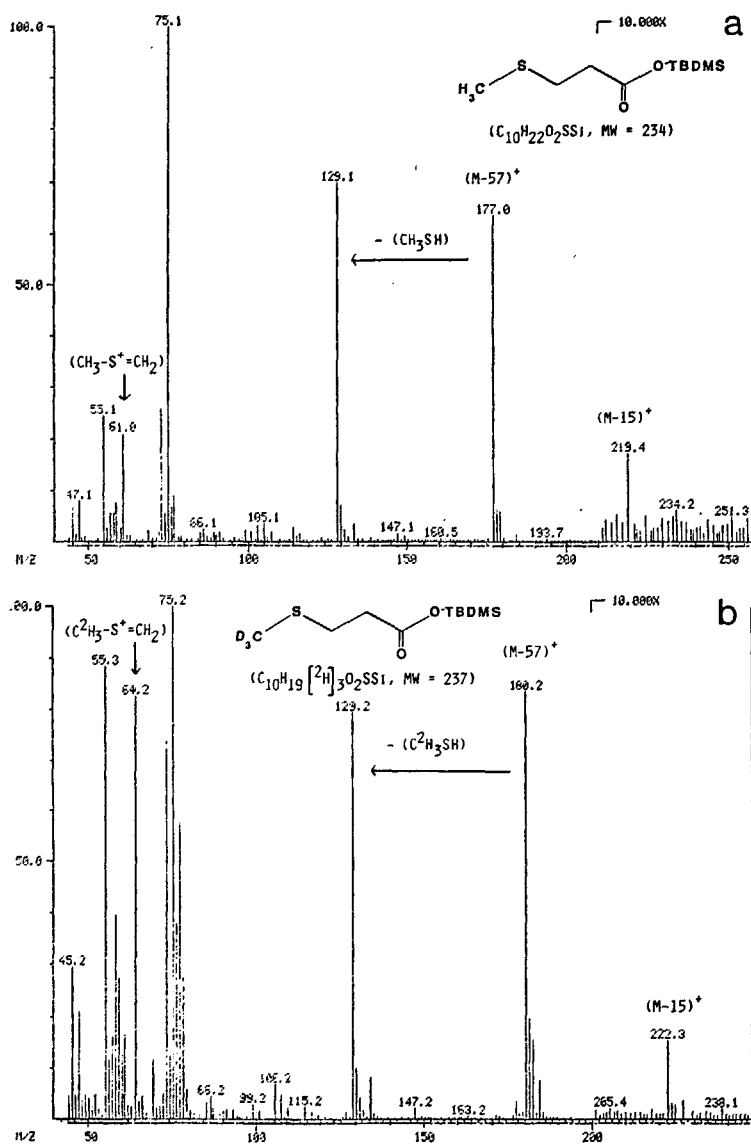


Figure 2

Spectre de masse (EI: 70 eV). a) 3-(méthylthio)propanoïque, dérivé mono TBDMS (PM = 234) : croissance sur milieu 20 AA-S ; b) 3-($^2\text{H}_3$ méthylthio) propanoïque, dérivé mono TBDMS. Croissance sur 19 AA'-S-L Met- d_3 .

Mass spectra (electron impact : 70 eV). a) 3-(methylthio) propanoic acid, mono TBDMS derivative. (20 AA-S medium); b) 3-($^2\text{H}_3$ methylthio) propanoic acid, mono TBDMS derivative. (19 AA'-S-L-Met- d_3 medium).

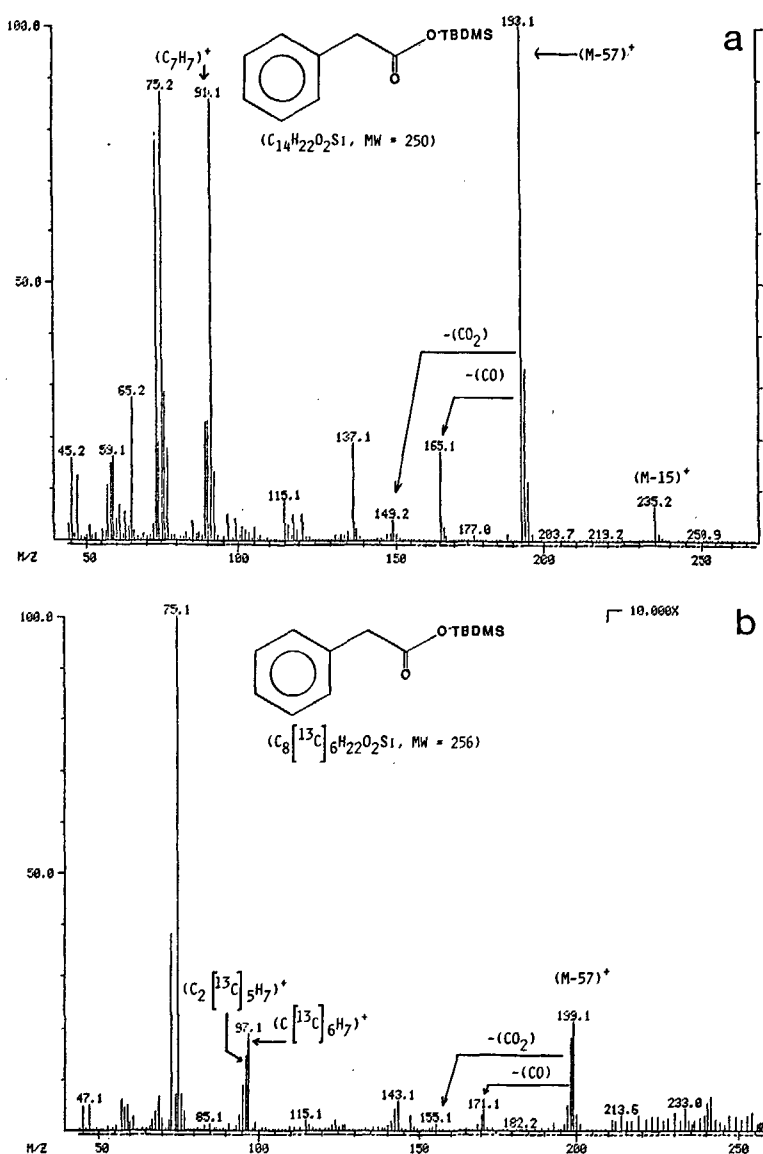


Figure 3

Spectre de masse: (70 eV). a) acide phényl acétique, dérivé mono TBDMS ; croissance sur milieu 20 AA-S ; b) (ring U- $^{13}\text{C}_6$) acide phényl acétique, dérivé mono TBDMS. Croissance sur milieu 19 AA'-S-L-Phe- $^{13}\text{C}_6$.

Mass spectra (electron impact 70 eV). a) phenyl acetic acid, monoTBDMS derivative. (20 AA-S medium); b) (ring U- $^{13}\text{C}_6$) Phenyl acetic acid, mono TBDMS derivative (19 AA'-S-L-Phe- $^{13}\text{C}_6$ medium).

(M-57) $^+$ et (M-15) $^+$ à m/z 180 et 222, respectivement. Dans le cas des cultures en milieu 19 AA'-S-L-Phe- $^{13}\text{C}_6$, le spectre de masse du dérivé mono-TBDMS de l'acide (ring U- $^{13}\text{C}_6$) phénylacétique (fig. 3 b) a été obtenu sans aucune modification des spectres de masse des autres composés répertoriés dans le tableau 2, particulièrement pour le dérivé di-TBDMS de l'acide 4-hydroxy phénylacétique. Dans le spectre de masse du dérivé mono-TBDMS de l'acide (U- $^{13}\text{C}_6$) phénylacétique, un déplacement de + 6 uma est observé dans les fragments cités pour le dérivé mono-TBDMS de l'acide phénylacétique non marqué. En outre, la présence de pics importants à m/z 96 et m/z 95 indique la présence d'espèces partiellement marquées dans la L-Phe $^{13}\text{C}_6$ commerciale.

DISCUSSION

Les travaux publiés précédemment rapportaient la présence, dans les cultures de quelques archaébactéries, d'acides organiques aliphatiques, identifiés sur la base des données de la CG seule. Ce sont les acides acétique, 2-méthyl propanoïque, 3-méthyl butanoïque chez *Thermococcus stetteri* (Miroshnichenko *et al.*, 1989), *Thermoproteus uzoniensis* et *T. tenax* (Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 1990), *Staphylothermus marinus* (Fiala *et al.*, 1986) et *Pyrodictium abyssi* (Pley *et al.*, 1991). En revanche, les acides acétique, propanoïque, phénylacétique et hydroxy phénylacétique ainsi que l'acétophénone, l'hydroxyacétophénone, le propylbenzène, et le butanol-1 ont été identifiés pour une autre archaébactérie hyperthermophile, *Hyperthermus butylicus*, cultivée en présence d'un mélange de peptides avec ou sans hydrogène et soufre, bien que les quantités soient 10 fois plus fortes en présence de ces éléments (Zillig *et al.*, 1990). Cependant, pour l'hydroxyacétophénone et l'acide hydroxyphénylacétique, la position du groupement hydroxy sur le noyau benzénique n'a pas été précisée. A notre connaissance, aucune étude n'a été consacrée à la détermination des précurseurs des acides organiques décrits pour les archaébactéries thermophiles non méthanogènes.

L'acide 3-(méthylthio) propanoïque n'a jamais été, à notre connaissance, décrit chez les archaébactéries. Sa présence a été rapportée pour des eubactéries facultatives, par exemple *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis* (Perreaux *et al.*, 1986 ; Ewbank et Maraite, 1990) et pathovar *oryzae* (Sreeramulu *et al.*, 1987), *Klebsiella pneumoniae* (Furfine et Abeles, 1988), *Streptomyces kasugaensis* (Sturdikova *et al.*, 1990), des eubactéries anaérobies des genres *Clostridium* (Moss et Nunez-Montiel, 1982 ; Carlier, 1992), *Bacteroides* et *Tissierella* (Carlier, 1992), et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Marchitto et Ferro, 1985). Généralement, la méthionine est le précurseur de l'acide 3-(méthylthio) propanoïque, comme le démontrent les expériences de marquage (Ewbank et Maraite, 1990) ou de supplémentation (Moss et Nunez-Montiel, 1982 ; Carlier, 1992) mais chez *Klebsiella pneumoniae* (Furfine et Abeles, 1988) et *Saccharomyces cerevisiae* (Marchitto et Ferro, 1985), il a pour précurseur le 1-phospho-5-S-méthylthioribose. Chez l'archaébactérie thermophile aérobie *Sulfolobus acidocaldarius*, les expériences de marquage ont montré que le groupement méthylthio de la méthionine est incorporé dans la caldariellaquinone (Zhou et White, 1990). Chez cette même archaébactérie, l'acide indole-3-acétique est présent dans la fraction lipidique mais il n'y a aucune donnée quant à la présence de cet acide dans les cultures (White, 1987). Chez les eubactéries, les acides phénylacétique, 4-hydroxy phénylacétique et indole-3-acétique sont des métabolites classiquement décrits, notamment dans le genre *Clostridium* (Elsden *et al.*, 1976 ; Elsden et Hilton, 1979 ; Moss et Nunez-Montiel, 1982).

Parmi les archaébactéries thermophiles étudiées à ce jour, seules les cultures de la souche ST 546 présentent une telle variété d'acides organiques. Ce type de profil observé pour la souche ST 546 n'est pas sans évoquer celui de certaines espèces du genre *Clostridium*. La contamination par un *Clostridium* mésophile (germination d'une spore non détruite par la tyndallisation) a été écartée car des cultures de contrôle en milieu peptone-extrait de levure-glucose selon Holdeman *et al.* (1977), sous une atmosphère H₂:CO₂ (95:5) à 37°C sont restées négatives après cinq jours d'incubation. Enfin, aucune espèce du genre *Clostridium* n'est capable de se développer à 95°C, l'espèce la plus thermophile, *C. fervidus*, ayant une température limite de culture de 80°C (Patel *et al.*, 1987). Zillig *et al.* (1990) remarquent aussi que l'hétérotrophie par fermentation et le profil métabolique d'*Hyperthermus butylicus* évoquent «*Clostridium butylicum*», une espèce n'ayant plus de statut taxonomique (Skerman *et al.*, 1989).

Les analyses par CG et CG/SM réalisées à partir de composés marqués indiquent clairement que la souche ST 546 transforme pratiquement totalement la L-méthionine en acide 3-(méthylthio) propanoïque et la L-phénylalanine en acide phénylacétique. Ces acides organiques peuvent provenir de l'acide aminé correspondant par une réaction de désamination suivie par une réaction de décarboxylation avec déshydrogénation, comme cela a été décrit pour les eubactéries du genre *Clostridium* (Andreesen *et al.*, 1989 ; Gottschalk, 1986). Il peut être supposé que les acides indole-3-acétique et 4-hydroxy phénylacétique sont formés par un mécanisme similaire à partir de L-tryptophane et de L-tyrosine, respectivement. L'étude des enzymes thermostables mises en jeu pourrait avoir des applications biotechnologiques.

Au regard de la production de biomasses en fermenteurs, la production d'acides organiques en quantités significatives est à considérer. La présence d'acides organiques à bas carbone peut initier une corrosion localisée sur des alliages passivables tels les aciers

inoxydables par altération et rupture de la couche passive. L'ensemble des acides organiques déterminés dans cette étude, à l'exception des acides acétique, butyrique et valérique, n'a pas encore été étudié d'un point de vue impact sur le comportement des matériaux, notamment à haute température. Cette agressivité sur les matériaux est fonction de nombreux paramètres extérieurs et, à concentrations identiques, inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne carbonée (Little *et al.*, 1984). A cette production d'acides organiques à haute température viennent s'ajouter les problèmes inhérents à la seule présence d'un biofilm sur les surfaces métalliques ; celui-ci peut, à lui seul, interférer avec l'ensemble des réactions d'oxydo-réduction se produisant à l'interface matériau-milieu ou encore induire des micro-conditions physico-chimiques au niveau de cette même interface (Dowling *et al.*, 1988). L'utilisation des divers matériaux entrant dans la composition des fermenteurs devra donc être faite en tenant compte des problèmes créés par la formation de ce biofilm et surtout par cette production d'acides, auxquels pourront s'ajouter ceux liés aux températures de croissance de ces micro-organismes et à la nature du milieu réactionnel.

Sans nul doute, des informations supplémentaires relatives aux métabolites des archaébactéries hyperthermophiles des environnements profonds sont nécessaires. Des expériences ultérieures doivent être entreprises, par exemple l'étude de la formation éventuelle d'hydrocarbures et de composés soufrés volatils. Cette étude préliminaire centrée exclusivement sur les acides organiques a permis une meilleure connaissance du métabolisme et des enzymes thermostables des archaébactéries des événements hydrothermaux profonds. Elle pourrait avoir, à l'avenir, des applications dans la chimiotaxonomie de ce groupe bactérien, mais aussi dans l'étude des relations trophiques dans les écosystèmes rencontrés dans ces environnements.

RÉFÉRENCES

- Andresen J.R., H. Bahl et G. Gottschalk (1989). Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*, in: *Clostridia*, N.P. Minton and D.J. Clarke, editors. Biotechnology Handbooks, Vol. 3, Plenum Press, New York, 27-62.
- Balch W.E., G.E. Fox., L.J. Magrum, C.R. Woese et R.S. Wolfe (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, **43**, 260-296.
- Berhardt G., H.-D. Ludemann, R. Jaenicke, H. König and K.O. Stetter (1984). Biomolecules are unstable under "black smoker" conditions. *Naturwissenschaften*, **71**, 583-586.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., M.L. Miroshnichenko, A. Kostrikin, N.A. Chernych et G.A. Zavarzin (1990). *Thermoproteus uzoniensis* sp. nov., a new extremely thermophilic archaeobacterium from Kamchatka continental hot springs. *Arch. Microbiol.*, **154**, 556-559.
- Carrier J.-P. (1992). Gas chromatographic detection of sulfur compounds as methyl esters after growth of anaerobic bacteria in broth media. *Letts appl. Microbiol.*, **14**, 84-87.
- Dowling N.J.E., J.G. Guézennec et D.C. White (1988). Methods for insight into mechanisms of microbially influenced metal corrosion. in: *Biodeterioration*, D.R. Houghton, R.T. Smith and H.O.U. Eggins, editors. Elsevier Applied Science Publ., London.
- Elsden S.R. et M.G. Hilton (1979). Amino acid utilization patterns in clostridial taxonomy. *Arch. Microbiol.*, **123**, 137-141.
- Elsden S.R., M.G. Hilton et J.M. Waller (1976). The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. *Arch. Microbiol.*, **107**, 283-288.
- Ewbank E. et H. Maraitte (1990). Conversion of methionine to phytotoxic 3-methylthiopropionic acid by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J. gen. Microbiol.*, **136**, 1185-1189.
- Fiala G., K.O. Stetter, H.W. Jannasch, T.A. Langworthy et J. Madon (1986). *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *Syst. appl. Microbiol.*, **8**, 106-113.
- Furfine E.S. et R.H. Abeles (1988). Intermediates in the conversion of 5'-S-methylthioadenosine to methionine in *Klebsiella pneumoniae*. *J. biol. Chem.*, **263**, 9598-9606.
- Gottschalk G., éditeur (1986). *Bacterial metabolism*, 2^{ème} édition. Springer-Verlag, New-York, USA.
- Guézennec J. (1991). Influence of cathodic protection of mild steel on the growth of sulphate-reducing bacteria at 35°C in marine sediments. *Biofouling*, **3**, 339-348.
- Holdeman L.V., E.P. Cato et W.E.C. Moore, éditeurs (1977). *Anaerobe Laboratory Manual*, 4^{ème} édition. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 24061.
- Kim K.R., M.K. Hahn, A. Zlatkis, E.C. Horning et B.S. Middletich (1989). Simultaneous gas chromatography of volatile and non-volatile carboxylic acids as tert-butyl dimethylsilyl derivatives. *J. Chromatog.*, **468**, 289-301.
- Little B., M. Walch, P. Wagner, S.M. Gerchakov et R. Mitchell (1984). The impact of obligate thermophilic bacteria on corrosion process. *6th International Congress on Marine Corrosion and Fouling*, Athens, Greece, 511-520.
- Marchitto K.S. et A.J. Ferro (1985). The metabolism of 5'-methylthioadenosine and 5-methylthioribose-1-phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.*, **131**, 2153-2164.
- Miroshnichenko M.L., E.A. Bonchosmolovskaya, A. Neuner, Kostrikin N.A., N.A. Chernych et V.A. Alekseev (1989). *Thermococcus stetteri* sp. nov., a new extremely thermophilic marine sulfur-metabolizing archaeobacterium. *Syst. appl. Microbiol.*, **12**, 257-262.
- Moss C.W. et O.L. Nunez-Montiel (1982). Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column. *J. clin. Microbiol.*, **15**, 308-311.
- Patel B.K.C., H. Littleworth, H.W. Morgan et R.M. Daniel (1987). *Clostridium fervidus* sp. nov., a new chemoorganotrophic acetogenic thermophile. *Int. J. syst. Bact.*, **37**, 123-126.
- Perreux D., H. Maraitte et J.A. Meyer (1986). Detection of 3-(methylthio) propanoic acid in cassava leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Physiol. Mol. plant. Pathol.*, **28**, 323-328.
- Pley U., J. Schipka, A. Gambacorta, H.W. Jannasch, H. Fricke, R. Rachel et K.O. Stetter (1991). *Pyrodicticum abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C. *Syst. appl. Microbiol.*, **14**, 245-253.
- Rimbault A., J.G. Guézennec, M. Fromage, A. Godfroy et F. Rocchiccioli (1993). Organic acids and stable isotope metabolic studies of a thermophilic sulfur-dependent anaerobic archaeon. in press in *J. microbiol. Meth.*, December 1993.
- Skerman V.B.D., V. McGowan et P.H.A. Sneath, éditeurs (1989). Approved lists of bacterial names. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
- Sreeramulu A., S.S. Patil et M.V. Nayudu (1987). Phytotoxic organic acids produced *in vitro* and *in vivo* by isolates of the bacterial leaf blight pathogen of rice. *Indian Phytopathol.*, **40**, 320-326.
- Sturdikova M., B. Proksa, D. Uhrin et R. Fуска (1990). Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*. *J. Folia Microbiol.*, **35**, 278-283.
- White R.H. (1987). Indole-3-acetic acid and 2-(indol-3-ylmethyl)indol-3-ylacetic acid in the thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.*, **169**, 5859-5860.
- Zhou D. et R.H. White (1990). Biosynthesis of the methylthio side chain of caldariellaquinone. *J. chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **8**, 2346-2348.
- Zillig W., I. Holz, D. Janekovic, H.P. Klenk, E. Imself, J. Trent, S. Wunderl, V.H. Forjaz, R. Coutinho et T.J. Ferreira (1990). *Hyperthermus butylicus*, a hyperthermophilic sulfur-reducing archaeobacterium that ferments peptides. *J. Bacteriol.*, **172**, 3959-3965.