

50376
1986
239

50376
1986
239

N° d'ordre : 77

THESE
présentée à

l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR en Biochimie Appliquée

Isabelle T H O M A S

PROFILS PROTEIQUES ET IMMUNOCHIMIE DES METHANOGENES

Implications taxonomiques et caractérisation
d'un antigène commun au genre Methanosarcina

Exemplaire corrigé après avis du jury

Soutenue le 05 Décembre 1986 devant la Commission d'Examen

Jury

Président : Monsieur MONTREUIL
Rapporteurs : Monsieur DUBOURGUIER
Monsieur ZEHNDER
Examineurs : Monsieur ALBAGNAC
Monsieur BOUQUELET
Monsieur PARAF

SCD LILLE 1



D 030 322216 4

50376
1986
239

50376
1986
939

R E M E R C I E M E N T S

A **Monsieur le Professeur MONTREUIL**, (Université des Sciences et Techniques de LILLE I)

Vous m'avez permis, grâce à votre avis favorable à l'obtention d'une bourse de recherche, de poursuivre mes études jusqu'au terme du 3ème cycle. Vous m'avez transmis au cours de ma formation votre passion pour la recherche scientifique, vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous prie de croire en l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A **Monsieur ALBAGNAC**, (Directeur de la Station de Technologie Alimentaire de l'I.N.R.A. de LILLE)

La bienveillance et la sympathie de votre accueil m'ont beaucoup touchée, vous m'avez toujours prodigué aide et conseils et continuez à marquer pour mes travaux votre intérêt en participant au jury de cette thèse. Je vous exprime ma profonde reconnaissance.

A **Monsieur le Professeur ZEHNDER**, (Département de Microbiologie, Université de WAGENINGEN, Pays Bas)

Très sensible à votre participation dans ce jury et à l'intérêt que vous témoignez pour mes recherches, je vous remercie très sincèrement. Puissent ces travaux contribuer à renforcer les relations privilégiées établies avec votre laboratoire.

A **Monsieur PARAF**, (Laboratoire d'Immunopathologie Porcine, I.N.R.A. TOURS)

Votre compétence en immunologie faisant autorité, vous avez accepté de juger cette thèse. Je vous en remercie respectueusement.

A **Monsieur le Professeur BOUQUELET**, (Université des Sciences et Techniques de LILLE)

Pour l'intérêt que vous manifestez à ces travaux en acceptant de les juger, recevez mes sincères remerciements.

A **Monsieur DUBOURGUIER**, (Station de Technologie Alimentaire, I.N.R.A. LILLE)

Vous m'avez fait l'honneur de me confier le sujet de cette thèse et de me guider dans son élaboration, votre patience, votre compréhension, vos observations toujours constructives ont su me guider et me motiver pendant ces travaux. J'espère avoir été digne de la confiance que vous m'avez accordée. Puisse ce travail vous exprimer ma sincère reconnaissance.

A Messieurs DEBEIRE et PRENSIER, (I.N.R.A. LILLE - I.N.S.E.R.M. CERTIA LILLE)

Vous avez suivi avec intérêt l'ensemble de ces travaux. Votre aide, vos conseils, nos nombreuses discussions ont été riches d'enseignements. Soyez en vivement remerciés.

Les travaux qui ont fait l'objet de cette thèse ont été valorisés grâce à de nombreuses collaborations. Je leur exprime en cette occasion mes sincères remerciements.

A Messieurs VAN DER DRIFT (Université de NIJMEGEN, Pays Bas), ALBRACHT (Université d'AMSTERDAM, Pays Bas) et Madame ANKEL-FUCHS (Université de MARBURG, R.F.A.)

Vous avez cordialement accepté d'effectuer des analyses très spécialisées sur nos échantillons et ainsi contribué à la réalisation de cette thèse. Je vous en remercie.

A Monsieur SAUTIERE et ses collaborateurs (I.N.S.E.R.M. - I.R.C.L. LILLE)

Avec gentillesse, vous avez mis vos compétences à ma disposition permettant une meilleure exploitation scientifique de nos expériences. Dommage que le temps m'ait manqué pour étudier les différentes sous-unités, ce travail collaboratif aurait renforcé vos nombreuses relations personnelles et scientifiques avec la Station de Technologie Alimentaire. Je vous exprime Monsieur ma reconnaissance.

A Monsieur LANGRAND et Madame HANOUNE, (Université des Sciences et Techniques de LILLE)

Pour l'accueil toujours très amical que vous nous avez réservé. La patience, la persévérance, nos nombreuses discussions ont permis de faire l'union entre deux disciplines très différentes, les Mathématiques et la Biologie. Je vous en remercie très sincèrement.

A Messieurs CIESIELSKI et PELLERIN, (I.N.R.A. ARRAS - I.N.R.A. LILLE)

Votre collaboration en réalisant des analyses complémentaires a permis de compléter cette étude, je vous en remercie.

A Monsieur TOUZEL, (I.N.R.A. LILLE)

A l'origine de mes recherches sur ces bactéries réputées "fastidieuses", vous m'avez toujours conseillé avec amabilité et compétence en qualité de microbiologiste spécialiste des méthanogènes. Je vous en témoigne une vive reconnaissance.

A Monsieur MIGDAL, (I.N.R.A. LILLE)

La qualité des nombreuses photographies réalisées au cours de ce travail témoigne de votre souci de la perfection. Je vous remercie profondément.

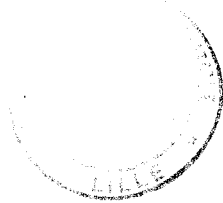
A **Madame VASSEUR**, (I.N.R.A. LILLE)

Vous avez réalisé la dactylographie de ce mémoire, je vous remercie tout particulièrement pour l'aide et le temps que vous m'avez accordés, m'accueillant avec sourire et bonne humeur malgré les mots difficiles et la précipitation des derniers jours.

A **Messieurs ROUSTAN, VERRIER & SAMAIN**, (I.N.R.A. LILLE)

Vous m'avez amicalement fait part de votre expérience professionnelle, je vous remercie de votre sympathie.

J'oublie sans aucun doute des discussions profitables avec mes collègues de tous les jours, des signes d'amitié qui m'ont profondément touchée ... Je garderai un excellent souvenir de **tout le personnel de la Station de Technologie Alimentaire** pour ce que j'y ai appris en sciences biologiques et sciences humaines dans une ambiance chaleureuse et détendue favorable au travail et à la recherche.



P L A N

INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les Archaeobactéries

	Pages
I.- CARACTERISTIQUES GENERALES DES ARCHAEBACTERIES	4.-
II.- ALTERNATIVES A LA NOTION DES ARCHAEBACTERIES	5.-
III.- LES METHANOGENES	6.-

Les bases actuelles de la taxonomie des méthanogènes

I.- TAXONOMIE DES METHANOGENES	9.-
I.1.- Ordre I - Les Méthanobactériales	
I.2.- Ordre II - Les Méthanococcales	
I.3.- Ordre III - Les Méthanomicrobiales	
II.- POSITION TAXONOMIQUE ET STRUCTURE DES ENVELOPPES CELLULAIRES	15.-
II.1.- Les Méthanobactériales	
II.2.- Les Méthanococcales	
II.3.- Les Méthanomicrobiales	
III.- POSITION TAXONOMIQUE ET LIPIDES	21.-
III.1.- Les glycérolipides	
III.2.- Les lipides polaires	
III.3.- Les lipides non polaires	
IV.- POSITION TAXONOMIQUE ET DISTRIBUTION DES POLYAMINES	23.-
V.- POSITION TAXONOMIQUE ET PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES	24.-

Biochimie de la méthanogénèse

I.- LES COENZYMES SPECIFIQUES	27.-
I.1.- Les corrinoides	
I.2.- Le coenzyme F420	
I.3.- La méthanoptérine MPT	
I.4.- Le méthanofurane	
I.5.- Le coenzyme M	

1.6.- Le coenzyme F430	
II.- MECANISME DE SYNTHÈSE DU METHANE	30.-
II.1.- Formation du formylméthanofurane	
II.2.- Obtention d'un dérivé méthylé	
II.3.- Méthylation du CoM	
II.4.- Synthèse de méthane	

MATERIEL ET METHODES

I.- TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES	35.-
I.1.- Culture de masse en milieu liquide	
I.2.- Suivi de la croissance bactérienne : mesure de la production de méthane	
II.- TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	36.-
II.1.- Dosage des protéines	
II.2.- Analyse de la composition en acides aminés	
II.3.- Dosage des sucres	
II.4.- Electrophorèses en gel de polyacrylamide	
II.5.- Chromatographies	
II.6.- Ultracentrifugation différentielle	
III.- TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	39.-
III.1.- Obtention des séra immuns	
III.2.- Analyses immunologiques	
IV.- LA MICROSCOPIE	41.-
IV.1.- La microscopie UV-visible	
IV.2.- La microscopie électronique	

RESULTATS

1ERE PARTIE

Analyse numérique des profils protéiques totaux appliquée aux bactéries méthanogènes

I.- LES PROFILS ELECTROPHORETIQUES	43.-
II.- OBTENTION DU TABLEAU DE DONNEES	44.-
III.- ANALYSE NUMERIQUE	45.-
III.1.- Choix de la matrice 18x64	
III.2.- Choix de la matrice 18x77	
III.3.- Choix de la matrice 42x77	
IV.- DISCUSSION	53.-

2EME PARTIE
**Immunochimie des méthanogènes et
caractérisation d'un antigène commun au genre Methanosarcina**

I.- IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE APPLIQUEE AUX METHANOGENES - IFI -	55.-
1.1.- Titration des immunséra en réaction homologue	
1.2.- Analyse des réactions croisées	
1.3.- Conclusion	
II.- MISE EN EVIDENCE D'UN ANTIGENE COMMUN	59.-
II.1.- En immunodiffusion double	
II.2.- En immunoélectrophorèse	
III.- ANALYSE DE LA SUSPENSION ANTIGENIQUE PAR MIGRATION ELECTROPHORETIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE 10%	61.-
IV.- PURIFICATION DE LA PROTEINE ANTIGENIQUE A PARTIR DE <u>METHANOSARCINA MAZEI MC3</u>	63.-
IV.1.- A partir de la solution obtenue après dispersion mécanique	
IV.2.- A partir des protéines solubles totales	
IV.3.- Contrôle de la pureté	
V.- CARACTERISATION DE LA PROTEINE ANTIGENIQUE	66.-
V.1.- Propriétés physico-chimiques	
V.2.- Propriétés sérologiques	
V.3.- Microscopie	
VI.- DISCUSSION	73.-

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A B R E V I A T I O N S

CDR	Carbon Dioxide Reduction
C.L.H.P.	Chromatographie Liquide Haute Performance
CoM	Coenzyme M
DTT	1,4 dithiothréitol
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Collection allemande de microorganismes
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FAF	Formaldehyde Activating Factor
FP	Presse de French
H ₄ MPT	Tétrahydrométhanoptérine
IDD	Immunodiffusion double
IEP	Immunoélectrophorèse
IFI	Immunofluorescence indirecte
MFR	Méthanofurane
MPT	Méthanoptérine
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
Titre S	Dilution maximale de l'immunsérum permettant une intensité de fluorescence égale à 4+ en IFI
Titre T	Dilution maximale de l'immunsérum permettant une intensité de fluorescence égale à 1+ en IFI
YFC	Yellow Fluorescent Compound

I N T R O D U C T I O N

La fermentation méthanique est un processus anaérobie de minéralisation des matières organiques présent dans différents environnements naturels (rumen, sédiments, sources chaudes ...) ou contrôlés comme les digesteurs. La production d'énergie qui en résulte intéresse de nombreux industriels plus précisément depuis la première crise énergétique. Néanmoins, il faut constater que les filières biologiques sont encore loin d'atteindre les potentiels estimés pour la valorisation des biomasses humides (VERRIER et col., 1982), des obstacles d'ordre technologique, scientifique et surtout économique devant être surmontés.

Cette conversion est réalisée par un ensemble complexe de micro-organismes. Des conditions d'environnement bien précises (potentiel rédox, pH, etc) sont indispensables pour le fonctionnement optimal de ces associations (DUBOURGUIER et col., 1982). La méthanogenèse est décomposée généralement en trois étapes (Fig. 1). **L'étape d'hydrolyse et de fermentation** permet de dégrader les matières organiques complexes en un mélange d'acides (acétate, lactate, propionate, butyrate ...), de composés neutres (éthanol), de produits gazeux (H_2/CO_2) et d'ammoniaque. Les bactéries responsables de cette étape sont variées, toutes anaérobies strictes ou facultatives. **L'étape d'acétogenèse** transforme les produits

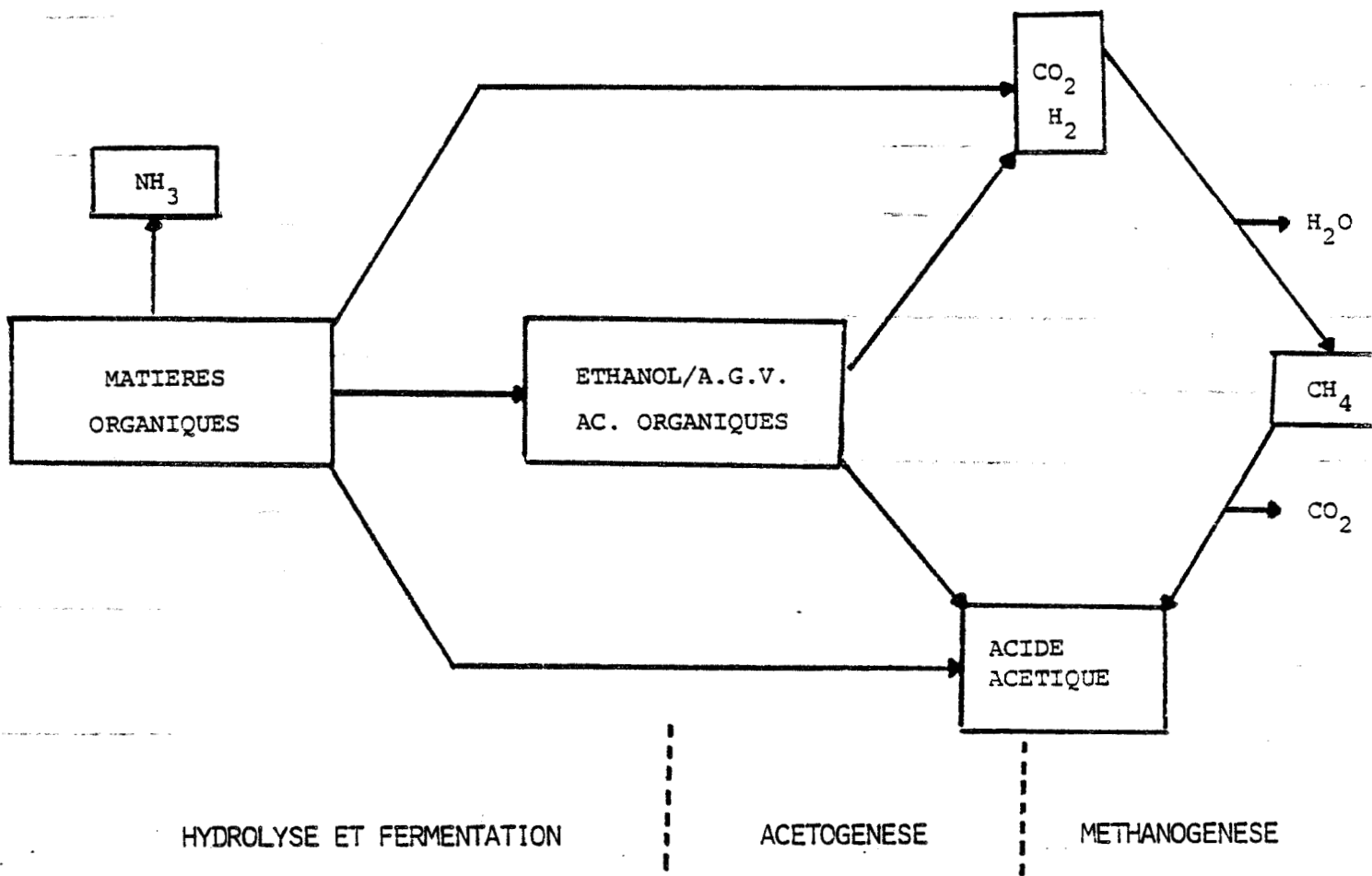


Figure N° 1 : Les trois étapes de la fermentation méthanique

intermédiaires en acétate et hydrogène grâce à l'action des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène. Ces dernières nécessitent une association syntrophique avec les méthanogènes utilisatrices d'hydrogène (transfert inter-espèce d'hydrogène). La **méthanogenèse** au sens strict s'effectue à partir de l'acétate et du mélange gazeux H_2/CO_2 . L'importance de ces différentes voies varie selon l'écosystème méthanogène considéré. Dans les digesteurs il est généralement admis que 70% de l'acétate est décarboxylé en méthane. Dans le rumen, l'acétate et les acides gras volatils sont absorbés par le flux sanguin et le méthane est produit uniquement à partir du gaz carbonique et de l'hydrogène. Dans les écosystèmes thermophiles, le méthane est produit par réduction du gaz carbonique, l'hydrogène étant généralement d'origine biologique ou géothermique.

Les bactéries méthanogènes sont toutes anaérobies strictes ; très diverses, elles présentent cependant des caractéristiques morphologiques et métaboliques spécifiques.

Toutes mes recherches à l'I.N.R.A. (Station de Technologie Alimentaire - VILLENEUVE D'ASCQ) ont été consacrées à l'étude de ces micro-organismes :

- une première phase centrée sur l'approfondissement de mes connaissances concernant les coenzymes spécifiques de ces bactéries suivi de la mise au point d'une technique de séparation en C.L.H.P. applicable à la détermination de leur teneur dans les différentes espèces méthanogènes (dans le cadre de mon D.E.A.)

- une seconde phase orientée sur l'analyse des profils protéiques, et l'application des techniques immunologiques indispensables à la précision taxonomique de certaines souches. Cette étude m'a permis de mettre en évidence et de caractériser une protéine antigénique commune au genre Methanosarcina.

L E S A R C H A E B A C T E R I E S

L'un des intérêts majeurs des biologistes fut de tout temps de reconstituer les premiers éléments évolutifs de la vie ; la cellule, riche des témoignages de son passé, fut un outil très apprécié. L'étude des séquences d'acides aminés constituant les protéines et plus récemment celles des bases des acides nucléiques (ARN, ADN) permit des progrès considérables dans ce domaine.

L'analyse comparative de la séquence du cytochrome C appliquée à la phylogénie des eucaryotes s'est avérée d'un intérêt limité chez les bactéries (FITCH et col., 1976). Par contre, la détermination du catalogue des oligonucléotides libérés à partir des ARN ribosomaux apporta une approche moléculaire étendue au domaine bactérien et eucaryote. Cette approche a fourni trois informations sur l'évolution : elle révèle les liens généalogiques, mesure la durée de l'évolution, témoigne de caractéristiques ancestrales et a permis de définir une "troisième forme fondamentale de vie", le royaume des Archaeobactéries (WOESE et FOX, 1977). En effet, ces organismes très particuliers s'apparentent aux Procaryotes dans la mesure où ils ne possèdent pas de noyau et où ils ressemblent aux bactéries classiques. Mais la biochimie et la structure de certaines de leurs molécules sont telles que ces organismes présentent des analogies à la fois avec les Procaryotes et les Eucaryotes.

FOX et col. proposèrent dès 1980 un schéma général de phylogénie basé sur la comparaison de la séquence d'oligonucléotides de l'ARN ribosomal 16S (Fig. 2). La détermination complète et la fréquence des gènes de l'ARN ribosomal 16S ont été récemment déterminées chez 10 espèces représentatives des Archaeobactéries dont trois méthanogènes Methanococcus vannielii (JARSCH et BÖCK 1985), Methanobacterium formicicum (LECHNER et col., 1985),

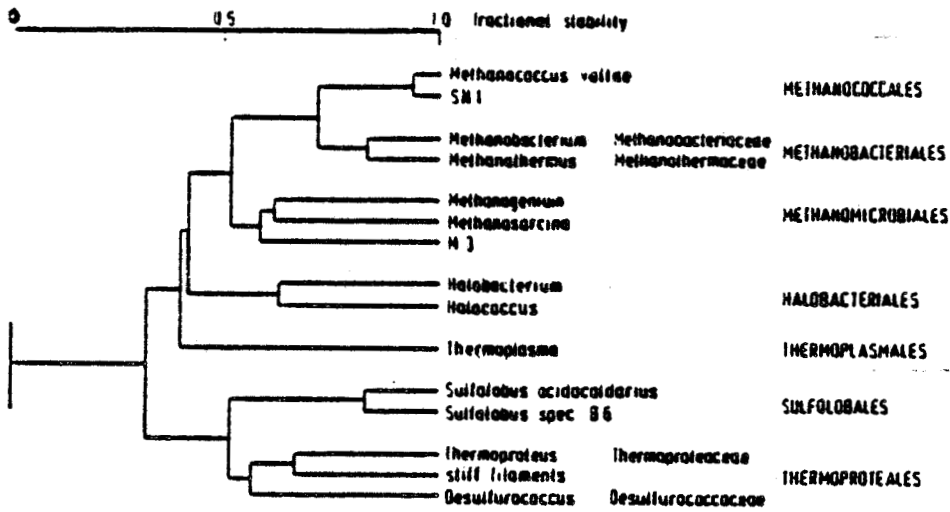


FIGURE n° 3 : DENDOGRAMME proposé par TU et COL 1982

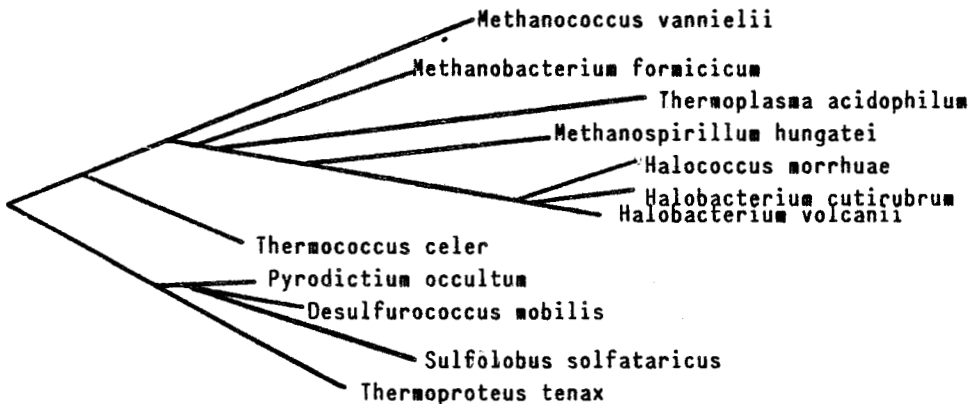


FIGURE n° 4 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES ARCHAEBACTERIES proposé par WOESE et OLSEN 1986

	percent homology 1168 positions									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>Mc. vannielii</i>	-	83.0	77.5	77.5	76.2	83.2	77.1	76.9	79.7	79.3
2 <i>M. formicicum</i>	19.3	-	80.7	79.1	76.8	83.1	76.5	77.7	80.1	80.0
3 <i>Ms. hungatei</i>	26.8	22.3	-	80.7	74.0	78.5	73.9	74.4	75.7	75.8
4 <i>H. volcanii</i>	26.8	24.5	22.3	-	75.3	77.9	72.6	73.8	74.5	75.7
5 <i>Tp. acidophilum</i>	28.6	27.8	32.0	29.9	-	78.7	73.7	73.5	73.8	75.1
6 <i>Tc. celer</i>	19.0	19.1	25.3	26.2	25.1	-	79.8	83.0	83.3	84.8
7 <i>S. Solfataricus</i>	27.4	28.3	32.1	34.1	32.4	23.5	-	85.3	88.8	88.7
8 <i>T. tenax</i>	27.6	26.4	31.3	32.2	32.6	19.2	16.4	-	87.3	89.6
9 <i>D. mobilis</i>	23.7	23.2	29.4	31.2	32.2	18.0	12.1	13.9	-	93.3
10 <i>P. occultum</i>	24.2	23.3	29.3	29.4	30.3	17.0	12.2	11.2	7.0	-

MATRICE DES HOMOLOGIES DES DIFFERENTES ESPECES ARCHAEBACTERIENNES

Methanospirillum hungatei (YANG et col., 1985). Elle confirme l'hypothèse initiale que toutes les Archaeobactéries semblent dérivées d'un ancêtre commun, le progénote (WOESE et OLSEN, 1986).

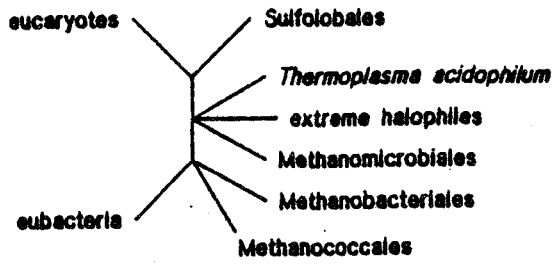
Les acquis de plus en plus étendus sur ces micro-organismes soulignent leur très grande diversité et l'impossibilité de regrouper les Archaeobactéries en une unité cohérente. Les similitudes étroites avec les deux autres règnes conduisent à penser que les Archaeobactéries ne constituent pas une troisième forme de vie mais représentent un stade intermédiaire succédant directement à l'ancêtre universel. C.R. WOESE et R.S. WOLFE en 1985 proposent le terme de "Urkingdom" pour définir ce groupe primaire d'organisme.

I.- CARACTERISTIQUES GENERALES DES ARCHAEBACTERIES

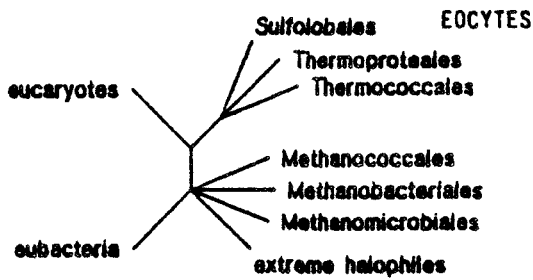
Suite aux travaux de FOX et col. (1980), les Archaeobactéries regroupent trois classes de micro-organismes : les méthanogènes, les bactéries halophiles aérobies et les thermo-acidophiles. L'étude structurale des sous-unités de l'ARN polymérase (ZILLIG et col., 1982), des hybridations croisées ADN et ARNr 16S (TU et col., 1982) et la comparaison des séquences d'ARN ribosomal (YANG et col., 1985 ; WOESE et col., 1986) ont montré des relations taxonomiques plus étroites entre les méthanogènes, les halophiles et les deux thermo-acidophiles : Thermoplasma et Thermococcus. Ce groupe hétérogène s'oppose à l'homogénéité des Archaeobactéries thermophiles dépendantes des sulfures Sulfolobus, Thermoproteus, Pyrodictium et Desulforococcus (Fig. 3 & 4).

En complément des différences génotypiques, les Archaeobactéries s'identifient par des caractéristiques phénotypiques : la composition de la paroi, la structure des lipides pariétaux et l'absence de ribothymidine dans la boucle T γ CG de l'ARN de transfert (FOX et col., 1977 ; BEST, 1978).

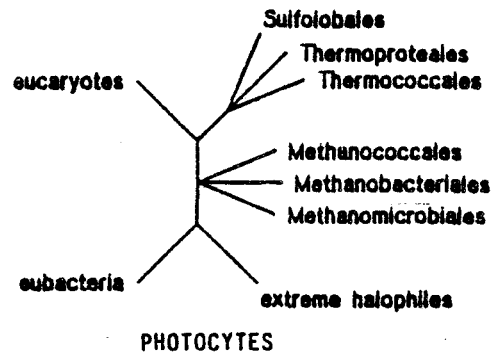
FIGURE n° 5 : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DES ARBRES PHYLOGENETIQUES PROPOSEES PAR DIFFERENTS AUTEURS



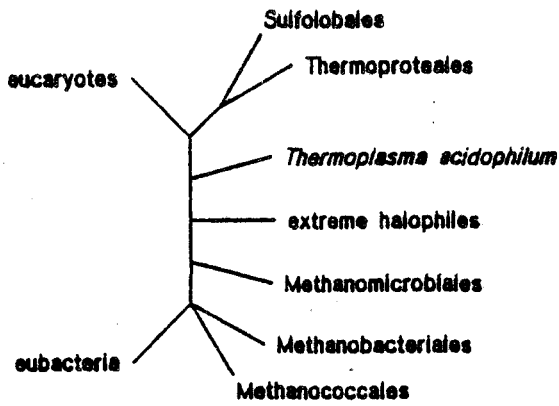
a. FOX et col , 1982



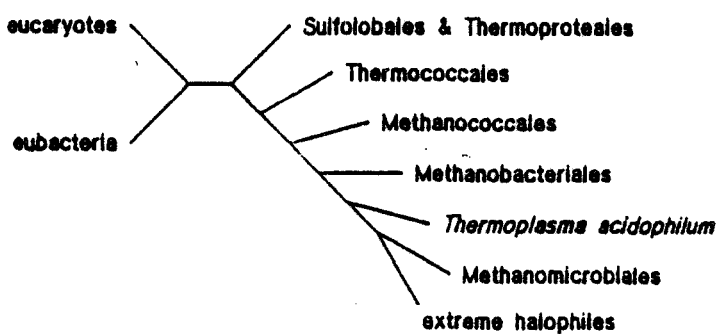
b. LAKE et col , 1984



c. LAKE et col , 1985



d. ZILLIG et col , 1985



e. WOESE ET OLSEN , 1986

TABLEAU n° I

REPARTITION DE QUELQUES CARACTERISTIQUES CHEZ LES ARCHAEBACTERIES , LES EUBACTERIES , LES EUCARYOTES
d'après WOESE et OLSEN , 1986 .

Feature	Archaeobacteria						Eubacteria	Eucaryotes
	Methano- coccales	Methano- bacterales	Methano- microbiales	extreme halophiles	<i>T. acid- ophilum</i>	Sulfolobales & Thermoproteales		
16S rRNA sequences (schematic repre- sentation of tree branching with arbitrary root position)								
number of modified nucleotides in 16S rRNA	5-6	4	4-5	4	5	28-35	7-8	>25
5S rRNA group	I	I	IIa, IIb	IIa	IIb	II (b)	I (b)	II (b)
initiator tRNA positions 23, 46	7	?	?	U, A	U, A	C, G	C, G	C, G
elongator tRNA position 54 (c)	mIF	F	mIF	F, mIF	F	F	T, U	T, U, F (rare), Tm (rare)
elongator tRNA position 56 (c)	Cm	Cm	Cm	Cm	Cm	Cm	C	C
I or mI at elongator tRNA position 57 (c)	+	+	+	+	-	+	-	-
dihydrouracil in tRNA	-	-	+	-	-	-	+	+
tRNA gene introns found	-	?	?	+	?	+	-	+
cell envelope:								
S-layer or sheath	protein subunits	protein subunits	(glyco)protein subunits or fibrills	glycoprotein subunits	none	glycoprotein subunits	protein subunits	none
sacculus polymer	none	pseudo- murein	methano- chondroitin (d)	sulfated heteropoly- saccharide (e)	none	none	murein	various poly- saccharides, none
major membrane lipid chain type	phytanyl, biphytanyl	phytanyl, biphytanyl	phytanyl, biphytanyl	phytanyl	phytanyl, biphytanyl	phytanyl, biphytanyl	fatty acid	fatty acid
major membrane lipid to glycerol linkage	ether	ether	ether	ether	ether	ether	ester	ester
glycerol lipid C-2 configuration	L	L	L	L	L	L	R	R
small subunit lobes	+	±	±	-	+	+	-	++
small subunit gap & platform split	"only some" + (f)	+	+	-	?	+	-	+
large subunit lobe	>25% + (f)	±	±	-(g)	+	+	-	+
large subunit bulge	30-50% + (f)	±	±	-	++	++	-	+
poly-A reported	-	-	-	-	-	+	+	+

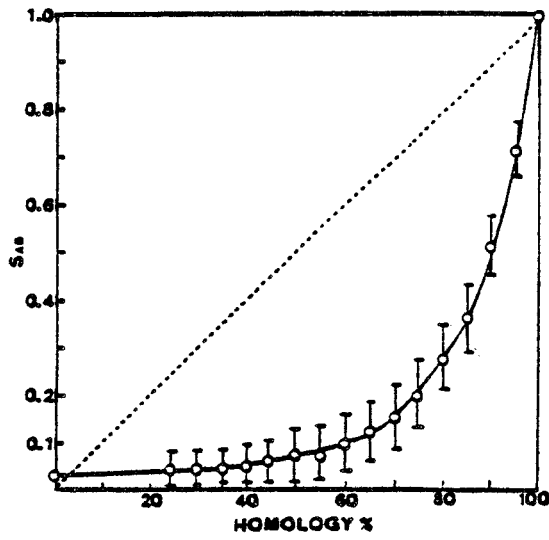


FIGURE n° 6 : SIMULATION EXPERIMENTALE DE LA METHODE S₁₆

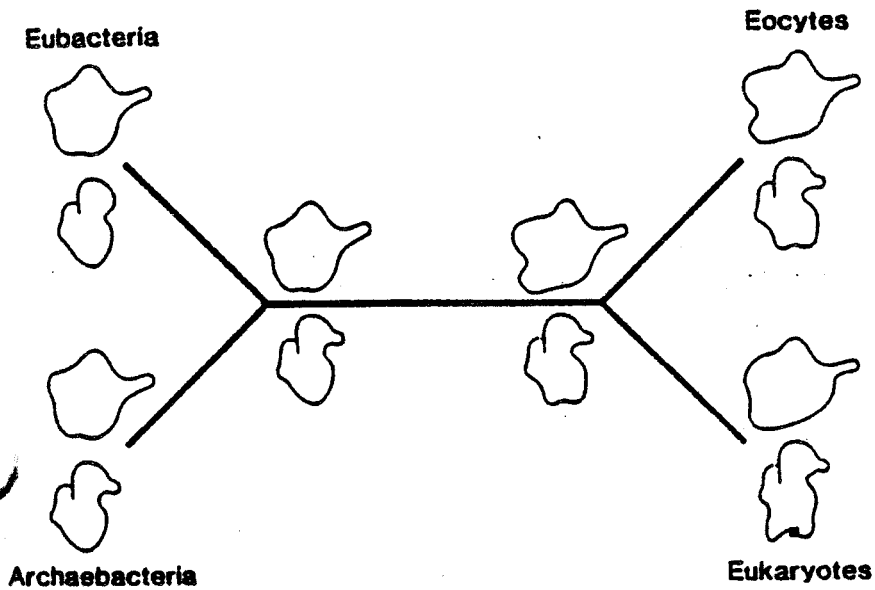


FIGURE n° 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SOUS-UNITES RIBOSOMALES proposée par LAKE et col , 1984

II.- ALTERNATIVES A LA NOTION DES ARCHAEBACTERIES

En 1977, les Archaeobactéries étaient présentées comme un groupe d'organismes hétérogènes par leurs propriétés physiologiques et écologiques mais distinct des Eubactéries et Eucaryotes par leur distance phylogénétique. Ce concept de base est aujourd'hui très controversé (Tableau I, Fig. 5). Il était parfaitement reconnu que ces premiers résultats devaient être complétés, pour une comparaison plus significative par une analyse totale des séquences et des études de structure secondaire des éléments.

En 1982, HORI et col. discutaient la validité de la méthode SAB utilisée par WOESE et col. et démontraient l'absence de proportionnalité entre cet indice et l'homologie calculée sur la base du taux de substitution d'une séquence d'ARN 16S connue (Fig. 6). Le terme de Métabactérie était proposé par ces auteurs en remplacement d'Archaeobactérie.

L'étude morphologique et structurale des ribosomes a permis à LAKE et son équipe (1982, 1984, 1985) de proposer des résultats restreignant la notion d'Archaeobactéries aux seules méthanogènes. Sur la base d'une unité structurale commune, et la présence de caractères morphologiques spécifiques sur les petites et grandes sous-unités ribosomales, ils différenciaient quatre regroupements principaux correspondant aux Eubactéries, Eucaryotes, Archaeobactéries et Eocytes. Ce nouveau royaume, les Eocytes, regroupe les organismes dépendants des sulfures (Fig. 7). Ultérieurement, l'aptitude à la photosynthèse partagée à la fois par les bactéries halophiles et les Eubactéries était à la base d'un regroupement de tous les micro-organismes photosynthétiques dans le royaume des photocytes (LAKE et col., 1985). Ceux-ci descendraient en ligne directe d'une cellule primitive possédant les molécules nécessaires, les caroténoïdes en particulier. Mais WOESE et OLSEN en 1986 s'opposent vivement aux arguments de LAKE et de ses collaborateurs et contestent la valeur phylogénétique des résultats exposés. Actuellement, l'étendue de la notion d'Archaeobactéries à d'autres classes que les méthanogènes reste une question ouverte faisant l'objet de débats passionnés entre spécialistes.

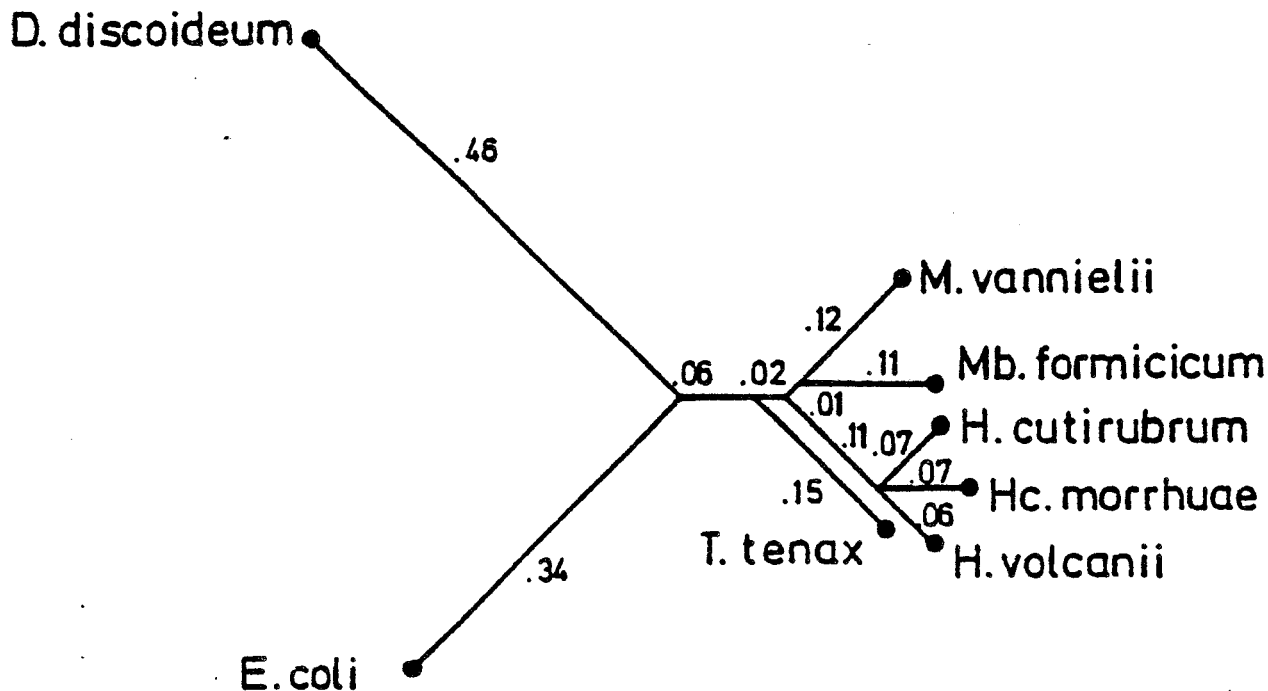


FIGURE n° 8 : ARBRE PHYLOGENETIQUE proposé par BOCK et col , 1986

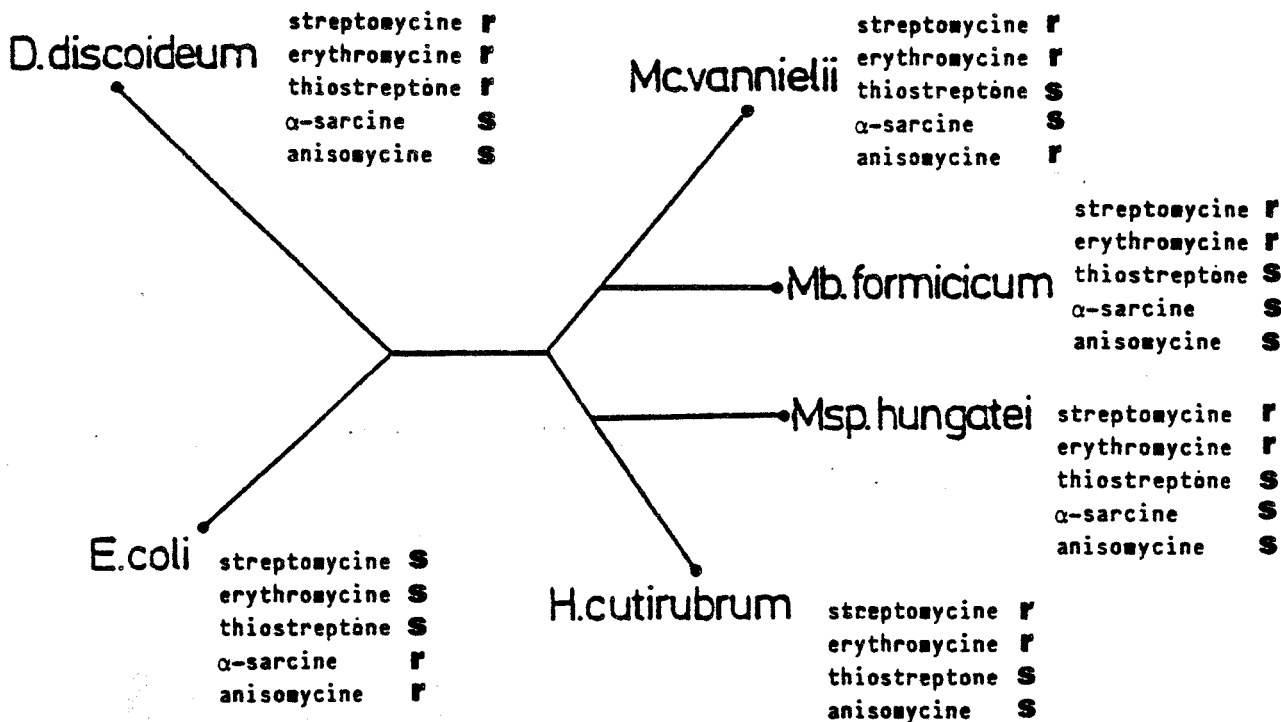


FIGURE n° 9 : MODELE SIMPLIFIE DES RELATIONS PHYLOGENETIQUES et SENSIBILITE A DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES

La détermination complète des gènes codant pour la synthèse des ARN stables : ARNt, ARNr 16S a apporté des conclusions intéressantes renforçant l'idée que toutes les Archaeobactéries définies selon WOESE dérivent d'un ancêtre commun (BöCK et col., 1986). Ces résultats confirment que les Archaeobactéries forment un groupe phylogénétique cohérent excluant toutes dérivations de l'une des branches des Archaeobactéries vers l'un des deux autres règnes. Cependant, quelque soit la séquence des gènes étudiée, les Archaeobactéries présentent une homologie plus grande avec les Eubactéries qu'avec les Eucaryotes. La figure 8 proposée par BöCK montre les lignes d'évolution entre les trois règnes et souligne les relations plus étroites entre les bactéries halophiles et méthanogènes. Le mode d'action des antibiotiques sur les ribosomes (BöCK et col., 1986 ; LONDEI et col., 1986) confirme l'originalité des Archaeobactéries. Leurs ribosomes présentent une hétérogénéité de sensibilité aux antibiotiques (Fig. 9) et sont tous résistants aux inhibiteurs classiques de la synthèse protéique chez les Procaryotes (streptomycine, érythromycine). Par contre, la synthèse polypeptidique est inhibée chez les méthanogènes et les halophiles par plusieurs composés qui sont également sensibles vis à vis des ribosomes eucaryotiques (anisomycine).

III.- LES METHANOGENES

Ces bactéries anaérobies strictes présentent en plus des caractères spécifiques des Archaeobactéries une hétérogénéité morphologique, structurale et trophique (BALCH, 1979 ; DUBACH, 1985).

Toutes les formes morphologiques trouvées chez les Eubactéries (cocci, bâtonnets, filaments, sarcines ...) ont été mises en évidence chez les méthanogènes mais, contrairement aux Eubactéries, elles ne se développent que sur un nombre limité de substrats : l'hydrogène, le gaz carbonique, le formate, le méthanol, l'acétate et les méthylamines.

Order	Family	Genus	Species	
Asporulales	Micrococcaceae	<i>Methanococcus</i>	<i>M. coccus mazeti</i> <i>M. coccus vannieli</i>	
		<i>Methanosarcina</i>	<i>M. sarcina methanica</i> <i>M. sarcina barkeri</i> <i>M. sarcina vacuolata</i>	
		<i>Methanogenium</i>	<i>M. genium cariaci</i> <i>M. genium marisnigri</i>	
	Ristellaceae	<i>Methanobacterium</i>	<i>M. bacterium soehngenii</i> <i>M. bacterium formicicum</i>	
		<i>Methanoploeticum</i>	<i>M. ploeticum mobilis</i>	
	Bacteriaceae	<i>Zeikusella</i>	<i>Zeikusella ruminantium</i> <i>Zeikusella thermoautotrophicum</i> <i>Zeikusella ruminantium</i>	
		Spirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	<i>M. spirillum hungatii</i>
			Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>
	Plectridiaceae	<i>Plectridium</i>		<i>Plectridium omelianskii</i> <i>Plectridium suboxydans</i>
		Terminosporaceae	<i>Methanobacillus</i>	<i>M. bacillus kuznetsovi</i>
	<i>Terminosporus</i>		<i>Terminosporus thermocellulolyticus</i>	

FIGURE n° 10 : CLASSIFICATION DES BACTERIES METHANOGENES proposée par PREVOT , 1980

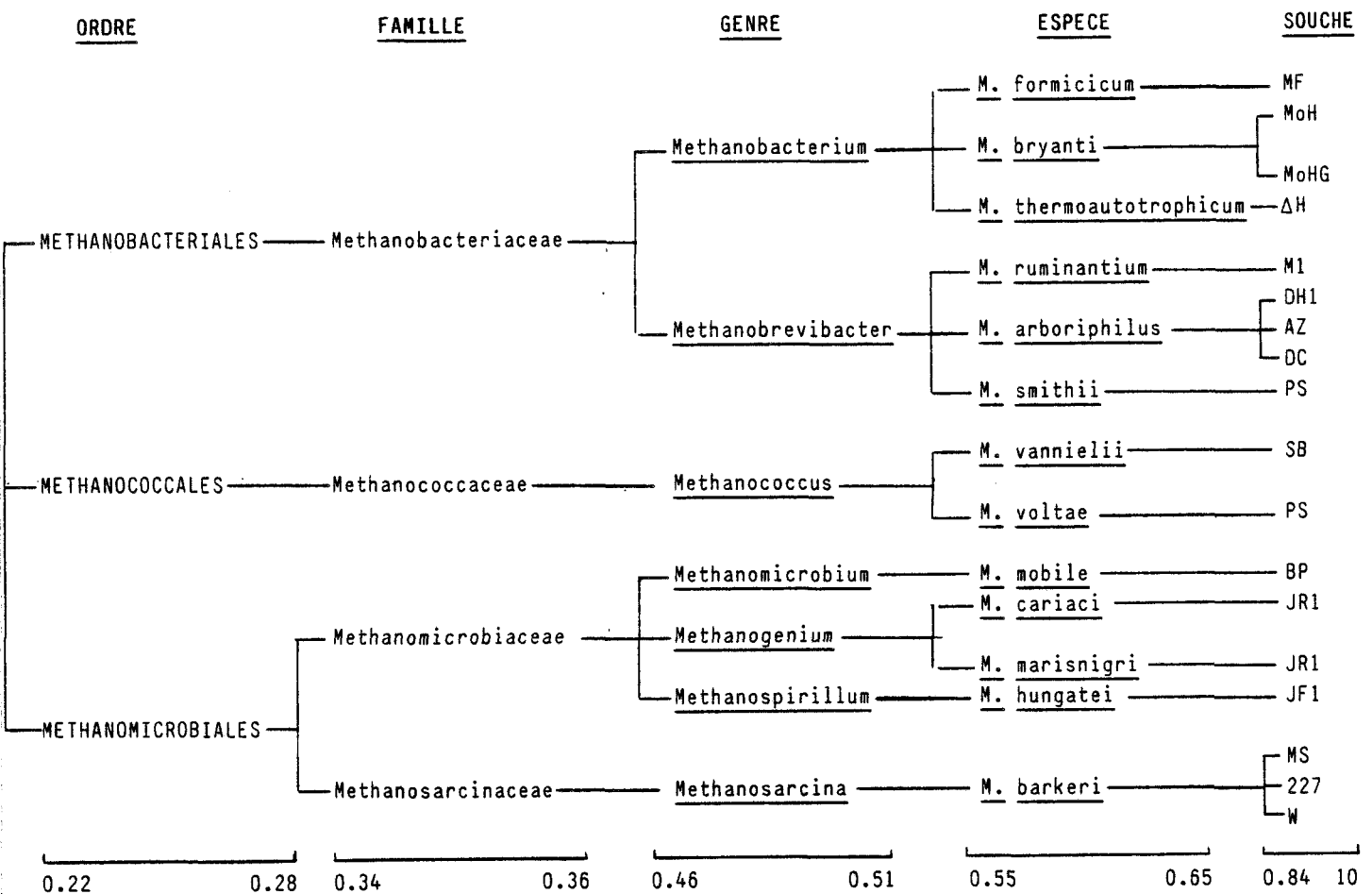


Figure n° 11 : Classification des bactéries méthanogènes par BALCH, 1979

La synthèse de CH_4 nécessite la présence de co-enzymes spécifiques intervenant comme transporteurs d'électrons ou de regroupements monocarbonés.

Sur la base des critères taxonomiques classiques : morphologie, sporulation, substrat, gram, mobilité, PREVOT en 1980 a proposé une classification des bactéries méthanogènes (Fig. 10). Il pense que la fonction méthanogène est répartie de façon diverse dans tout l'arbre bactérien comme le sont les autres grandes fonctions : cellulolyse, pectinolyse, ligninolyse, chitinolyse, sulfatoréduction. Soulignant l'hétérogénéité de ces bactéries, il s'oppose à l'hypothèse émise par WOLFE que ce groupe constitue un rameau archétype des bactéries. Le schéma proposé par PREVOT présente deux ordres, Asporulales et Sporulales, en contradiction avec le fait qu'aucune spore n'a été mise en évidence quelque soit les conditions de culture et l'espèce étudiée. Cette classification n'est donc citée que pour mémoire.

La classification de BALCH et col. (1979) reste à la base de la taxonomie des méthanogènes, elle étudie plus précisément 18 souches connues en 1979 (Fig. 11) à partir des résultats de séquençage de l'ARNr 16S et différencie trois ordres principaux :

- Les Méthanobactériales (ordre I) qui incluaient une seule famille les *Methanobacteriaceae* et deux genres Methanobacterium et Methanobrevibacter.

- Les Méthanococcales (ordre II) qui ne comprenaient qu'une seule famille *Methanococcaceae* et un seul genre Methanococcus.

- Les Méthanomicrobiales (ordre III) qui incluaient les genres Methanomicrobium, Methanogenium, Methanospirillum dans la famille des *Methanomicrobiaceae* et le genre Methanosarcina pour la famille *Methanosarcinaceae*.

Nombreux sont encore les critiques ou points obscurs en cours de vérification. Nous devons à ZEIKUS 1983 une synthèse objective des divers problèmes et questions non résolus. Il émet des réserves sur la différenciation précise souche-espèce car l'ARNr 16S n'est codé que par une fraction de l'ADN total et souligne quelques considérations pratiques sur la méthodologie utilisée : un matériel cellulaire important, l'emploi de radio-éléments et une technique lourde à mettre en oeuvre non négligeable pour son application en

routine dans les laboratoires. Nous verrons dans les chapitres suivants, les apports possibles d'autres techniques telles qu'immunologie, profil protéique ...

Sur la base des substrats métabolisés, on distingue deux classes majeures chez les méthanogènes : les hydrogénophiles qui se développent sur H_2/CO_2 et pour certaines utilisent le formate, et les acétoclastes qui se multiplient sur acétate et parfois sur méthanol et les méthylamines. Cependant, quelques exceptions sont connues à ce jour : les Methanosarcina barkeri qui sont les seules méthanogènes capables d'utiliser l'acétate ou le mélange gazeux H_2/CO_2 . Methanosphaera stadtmanae, Methanococcus halophilus, Methanococcoïdes methylutens, Methanolobus tindarius qui n'appartiennent à aucune de ces classes car elles ne synthétisent le méthane qu'à partir du méthanol et(ou) des méthylamines.

Cette "classification" métabolique est commodément utilisée en technologie de la fermentation méthanique ou dans les études sur les populations mixtes. Par contre, elle n'a aucune validité en taxonomie.

TABLEAU II

1- H₂/CO₂ 2- formate 3- acétate 4- méthanol 5- méthylamines nd- non déterminé

NOM	SOUCHE	DSM	T°	GC%	SUBSTRAT DE CROISSANCE	MORPHOLOGIE	GRAM	MOBILITE	MARINE	BALCH et col., 1979 BALCH et col., 1979 BALCH et col., 1979 ZEIKUS et col., 1972 BALCH et col., 1979 TOUZEL, comm. pers. ZHILINA et col., 1984 KÖNIG et col., 1984 WINTER et col., 1984 BLOTEVOGEL et col., 85 BLOTEVOGEL et col., 85
Methanobacterium bryantii	MbH	863	35°C	32,7	1	bâtonnets	+	-	-	BALCH et col., 1979
Methanobacterium bryantii	MbHG	862	35°C	33,2	1	bâtonnets	+	-	-	BALCH et col., 1979
Methanobacterium formicicum	Mf	1535	35°C	40,7	1-2	bâtonnets	+	-	-	BALCH et col., 1979
Methanobacterium thermoautotrophicum	H	1053	65°C	49,7	1	bâtonnets	+	-	-	ZEIKUS et col., 1972
Methanobacterium thermoautotrophicum	Marb	2133	65°C	48	1	bâtonnets	+	-	-	BALCH et col., 1979
Methanobacterium thermoformicum	Ff	3012	65°C	41,1	1-2	bâtonnets	+	-	-	TOUZEL, comm. pers.
Methanobacterium thermoformicum	Z245	3720	65°C	nd	1-2	bâtonnets	nd	-	-	ZHILINA et col., 1984
Methanobacterium uliginosum	P2St	2956	35°C	33,8	1	bâtonnets	+	-	-	KÖNIG et col., 1984
Methanobacterium wolfei	nd	2970	55°C	61,0	1	bâtonnets	+	-	-	WINTER et col., 1984
Methanobacterium thermoaggregans	FRG	3266	55°C	42,0	1	bâtonnets	-	-	-	BLOTEVOGEL et col., 85
Methanobacterium thermoalcaliphilicum	AC60	3267	55°C	38,8	1	bâtonnets	-	-	-	BLOTEVOGEL et col., 85
Methanobrevibacter arboriphilicus	DH1	1125	35°C	27,5	1	bâtonnets courts	+	-	-	ZEIKUS et col., 1975
Methanobrevibacter arboriphilicus	AZ	0744	35°C	31,6	1	bâtonnets courts	+	-	-	ZEHNDER et col., 1977
Methanobrevibacter arboriphilicus	DC	1536	35°C	27,7	1	bâtonnets courts	+	-	-	BALCH et col., 1979
Methanobrevibacter arboriphilicus	A2	2462	35°C	29,6	1	bâtonnets courts	+	-	-	MORII et col., 1983
Methanobrevibacter ruminantium	M1	1093	35°C	30,6	1-2	bâtonnets courts	+	-	-	BALCH et col., 1979
Methanobrevibacter smithii	PS	0861	35°C	31,0	1-2	bâtonnets courts	+	-	-	BALCH et col., 1979
Methanosphaera stadtmanae	MCB3	3091	35°C	26,0	4 en Atm H ₂	cellules sphériques	+	-	-	MILLER et col., 1985
Methanothermobacter fervidus	V24S	2088	83°C	33,0	1	bâtonnets	+	-	-	STETTER et col., 1981
Methanococcus aeolicus	PL15H	nd	nd	nd	nd	cocci	nd	nd	nd	SCHMID et col., 1984
Methanococcus deltae	RC	2771	35°C	40,5	1-2	cocci irréguliers	nd	-	+	CORDER et col., 1983
Methanococcus jannaschii	JAL1	2661	65°C	31,0	1	cocci	+	+	+	JONES et col., 1983
Methanococcus marisplacidis	JJ	2067	35°C	33,0	1-2	cocci	-	+	+	JONES et col., 1983
Methanococcus thermolithotrophicus	SN1	2095	55°C	31,3	1-2	cocci	-	+	+	THOMM et col., 1982
Methanococcus vanniellii	SB	1224	35°C	31,1	1-2	cocci	-	+	+	STADTMAN et col., 1951
Methanococcus voltae	PS	1537	35°C	30,7	1-2	cocci	-	+	+	BALCH et col., 1979
Methanococcus halophilus	Z7982	nd	35°C	nd	4-5	cocci	nd	nd	+	ZHILINA et col., 1983
Methanococcus frisius	C 16	3318	35°C	38,2	1-4-5	cocci	-	-	+	BLOTEVOGEL et col., 86
Methanomicrobium mobile	BP	1539	35°C	49,0	1-2	bâtonnets	-	+	+	BALCH et col., 1979
Methanomicrobium paynterii	2000	2545	35°C	45,0	1	cocci	-	-	+	RIVARD et col., 1983

<i>Methanogenium marisnigri</i>	JR1m	1498	25°C	61,2	1-2	cocci	-	+	ROMESSER et col., 1979
<i>Methanogenium frittonii</i>	FR4	2832	55°C	49,2	1-2	cocci irréguliers	nd	-	HARRIS et col., 1984
<i>Methanogenium olentangyi</i>	RCER	2772	35°C	54,4	1	cocci	nd	-	CORDER et col., 1983
<i>Methanogenium tationis</i>		2702	35°C	54,0	1-2	cocci	-	+	ZABEL et col., 1984
<i>Methanogenium thermophilicum</i>	CR-1	2373	55°C	59,0	1-2	cocci irréguliers	-	+	RIVARD et col., 1982
<i>Methanogenium thermophilicum</i>	L.A.	/	55°C	59,0	1-2	cocci irréguliers	-	-	FERGUSON et col., 1983
<i>Methanogenium thermophilicum</i>	Rat.	/	55°C	57,0	1-2	cocci irréguliers	-	-	ZABEL et col., 1985
<i>Methanogenium aggregans</i>	MSt	3027	35°C	52,0	1-2	cocci + agrégats	-	-	OLLIVIER et col., 1985
<i>Methanogenium bourgense</i>	MS2T	3045	35°C	59,0	1-2	cocci irréguliers	-	+	OLLIVIER et col., 1986
<i>Methanospirillum hungatei</i>	JF1	864	35°C	49,5	1-2	bacilles incurvés	-	+	FERRY et col., 1974
<i>Methanospirillum hungatei</i>	GPI	1101	35°C	46,5	1-2	bacilles incurvés	-	+	PATEL et col., 1976
<i>Methanoplanus limicola</i>	M3	2279	35°C	47,5	1-2	bactéries plates	-	+	WILDGRUBER et col., 82
<i>Methanoplanus endosymbiosus</i>	MC1	3599	35°C	38,7	1-2	disques irréguliers	-	+	VAN BRUGGEN et col., 86
<i>Methanosarcina barkeri</i>	MS	800	35°C	44,0	1-3-4-5	sarcines	+	-	WEIMER et col., 1978
<i>Methanosarcina barkeri</i>	227	1538	35°C	44,0	1-3-4-5	sarcines	+	-	BALCH et col., 1979
<i>Methanosarcina barkeri</i>	UBS	1311	35°C	43,5	1-3-4-5	sarcines	+	-	BALCH et col., 1979
<i>Methanosarcina barkeri</i>	FRI	2256	35°C	40,7	1-3-4-5	sarcines	+	-	ARCHER et col., 1983
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	C2A	2834	35°C	41,0	3-4-5	sarcines	-	+	SOWERS et col., 1984
<i>Methanosarcina thermophila</i>	TM1	1825	55°C	nd	3-4-5	sarcines	nd	-	ZINDER et col., 1985
<i>Methanosarcina mazei</i>	S6	2053	35°C	nd	3-4-5	sarcines + cocci	-	-	MAH et col., 1980 ; 84
<i>Methanosarcina mazei</i>	MC3	2907	35°C	nd	3-4-5	sarcines + cocci	-	-	TOUZEL et col., 1983
<i>Methanosarcina mazei</i>	LYC	nd	35°C	nd	1-4-5	cocci irréguliers	nd	nd	LIU et col., 1985
<i>Methanosarcina vacuolata</i>	nd	1232	35°C	51,0	3-4-5	sarcines	+	-	ZHILINA et col., 1979
<i>Methanosarcina sp.</i>	CHT1	2902	55°C	39,3	3-4-5	sarcines	-	-	TOUZEL et col., 1985
<i>Methanosarcina sp.</i>	MST	2905	55°C	39,3	3-4-5	sarcines	-	-	TOUZEL, comm. pers.
<i>Methanosarcina sp.</i>	MP	2980	55°C	nd	3-4-5	sarcines + cocci	nd	-	OLLIVIER et col., 1984
<i>Methanotherix soehngeni</i>	Opfi.	2139	35°C	51,9	3	filaments	-	-	HUSER et col., 1982
<i>Methanotherix soehngeni</i>	FE	3013	35°C	52,8	3	filaments	-	-	TOUZEL, comm. pers.
<i>Methanotherix concilii</i>	GP6	3671	35°C	60,2	3	filaments	-	-	PATEL et col., 1984
<i>Methanotherix thermoacetophila</i>	Z517	/	65°C	nd	3	filaments	nd	nd	NOZHEVNIKOVA et col. 84
<i>Methanococcoides methylutens</i>	TMA10	2657	35°C	42,0	4-5	cocci irréguliers	-	+	SOWERS et col., 1983
<i>Methanobolus tindarius</i>	Tind.	2278	25°C	45,9	4-5	cocci irréguliers	-	nd	KÖNIG et col., 1982



LES BASES ACTUELLES DE LA TAXONOMIE DES METHANOGENES

I.- TAXONOMIE DES METHANOGENES

Le tableau II résume l'ensemble des souches caractérisées à ce jour.

I.1.- Ordre I - Les Méthanobactériales

La présence d'une pseudomuréine et l'abondance d'éthers d'isopranyl glycérol C20-C40 caractérisent toutes les souches de cet ordre. Deux familles ont été différenciées : les Methanobacteriaceae et les Methanothermaceae.

I.1.1.- Famille : Les Methanobacteriaceae

Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanosphaera sont les trois genres classés parmi les Methanobacteriaceae.

- le genre Methanobacterium Mb regroupe des bacilles allongés, non mobiles, leur G+C oscille entre 33 et 50% à l'exception de Mb wolfei 61%. On y distingue essentiellement des espèces thermophiles : Mb thermoautotrophicum, Mb thermoformicicum, Mb wolfei, Mb thermoaggregans, Mb thermoalcaliphilum. Celles-ci partagent avec les espèces Mb bryantii, Mb formicicum, Mc uliginosum une croissance unique sur hydrogène deux exceptions cependant, les espèces : Mb thermoformicicum et Mb formicicum capables de se développer et de produire du méthane également en présence de formate.

Dans tous les cas, le pH de croissance varie entre 6,0 et 10,0 mais l'optimum avoisine la neutralité.

Toutes ces espèces sont résistantes aux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane (pénicilline, ampicilline, vancomycine).

- le genre Methanobrevibacter ne comprend que des souches mésophiles. Aucune espèce supplémentaire n'a été identifiée depuis la mise au point de BALCH en 1979. Mbv ruminantium, Mbv smithii utilisent comme substrat de croissance l'hydrogène et le formate contrairement à Mbv arboriphilicus qui ne métabolise que l'hydrogène. Morphologiquement semblables, Mbv ruminantium et Mbv smithii se différencient par une exigence particulière de Mbv ruminantium M1 pour le co-enzyme M (TAYLOR et col., 1974).

- le genre Methanosphaera a été proposé sur la base des résultats : d'analyses de paroi, du séquençage de l'ARNr 16S et d'une étude sérologique. Ce nouveau genre est composé d'une seule espèce Methanosphaera stadtmanae souche MCB3 qui présente une forme sphérique et possède des propriétés trophiques tout à fait particulières. Elle n'utilise pas le mélange gazeux H_2/CO_2 et sa croissance n'est possible que sur méthanol en présence d'hydrogène dans la phase gazeuse.

1.1.2.- Famille : les Methanothermaceae

Cette famille est la seconde de l'ordre des Methanobactériales, elle a été décrite en 1981 par SETTER et col. L'analyse immunologique, l'hybridation ADN-ARN (TU et col., 1982), la composition de l'ARNr 16S ont été les critères distinctifs de classification. Un seul représentant de cette famille est actuellement connu : Methanothermus fervidus V24S. Il s'agit d'un bacille, Gram+, extrêmement thermophile (température optimale : 83°C) et qui n'utilise que le mélange H_2/CO_2 . Par ailleurs, sa paroi est de type pseudomurétique.

I.2.- Ordre II - Les Méthanococcales

L'ordre des Méthanococcales contient une seule famille les Methanococcaceae et un seul genre Methanococcus. Leur paroi est de nature protéique. Toutes les souches testées se caractérisent par une teneur élevée d'éthers d'isopranyl glycérol en C20 et l'absence d'éthers en C40. Ce sont des coques irréguliers dont le G+C% varie de 30% à 40% et qui utilise principalement l'hydrogène et le formate pour leur croissance. Les exceptions sont Mc jannaschii, Mc maripaludis qui ne métabolisent pas le formate, et Mc halophilus, Mc frisius qui utilisent les substrats typiques des Methanosarcina : les méthylamines et le méthanol. D'une manière générale, elles présentent des exigences en NaCl et selenium. Cette particularité est à relier avec la lyse très aisée des cellules en milieu de faible force ionique. L'accumulation de réserves de glycogène a été rapportée (KÖNIG et col., 1985). On distingue 8 espèces entièrement décrites (Tableau II) auxquelles on peut rattacher 22 nouveaux isolats partiellement caractérisés (WHITMAN et col., 1986). Deux d'entre elles sont thermophiles Mc jannaschii, Mc thermolithotrophicus et six mésophiles Mc deltae, Mc maripaludis, Mc vanniellii, Mc voltae, Mc halophilus, Mc frisius. L'espèce Mc aeolicus dont le G+C et l'optimum de température ne sont pas connus, est utilisée pour la production de 3 endonucléases de restriction Mac I, II, III (SCHMID et col., 1984).

I.3.- Ordre III - Les Méthanomicrobiales

En complément des deux familles proposées par BALCH et col. (1979) une troisième famille a été décrite suite à des expériences d'hybridation ADN-ARN (TU et col., 1982) mais ces résultats sont actuellement très discutés.

1.3.1.- Famille : les Methanomicrobiaceae

Cette famille se caractérise par une très grande diversité morphologique : bâtonnets, spirilles, cocci et une grande homogénéité dans les substrats de croissance H_2/CO_2 et formate. Toutes les souches étudiées présentent une paroi de nature protéique et contiennent des éthers d'isopranyl glycérol en C20 et C40.

- le genre Methanomicrobium est représenté par deux espèces mésophiles : Mm mobile et Mm paynteri. Ces bactéries se présentent sous forme de bâtonnets et ont des exigences de croissance strictes (TANNER et col., 1982).

- le genre Methanogenium a été depuis 1979 complété par 6 espèces. Les deux espèces thermophiles Mg frittonii, Mg thermophilicum se distinguent entre elles par les teneurs en guanine et cytosine de leur ADN respectivement 49 et 59% et par des exigences nutritionnelles différentes. ZABEL et col. en 1985 proposent, sur la base des critères morphologiques et de croissance, l'appartenance à l'espèce thermophilicum de la souche isolée par FERGUSON et MAH (1983), malgré des relations antigéniques étroites avec Mm mobile.

Les espèces mésophiles Mg olentangyi, Mg tatii, Mg agregans, Mg bourgense se différencient respectivement par l'incapacité d'utiliser le formate, une flagellation péritriche, l'aptitude à la formation d'agrégats, une exigence en NaCl très élevée et des propriétés sérologiques distinctives quelque soit l'espèce.

Enfin, les deux espèces psychrophiles Mg cariaci, Mg marisnigri possèdent une flagellation péritriche et se caractérisent par des exigences nutritionnelles différentes et leur G+C%.

- Le genre Methanospirillum n'est constitué que d'une seule espèce Methanospirillum hungatei. Les souches isolées à ce jour JF1, GP1 se présentent sous forme de bâtonnets incurvés s'associant parfois en filaments. Peu de critères les différencient, GP1 a sa croissance stimulé en présence d'acétate. SPOTT et ses

collaborateurs ont étudié la composition et l'ultra-structure des enveloppes cellulaires et obtenu des sphéropastes après traitement au dithiothréitol (SPROTT et col., 1979).

1.3.2.- Famille : les Methanoplanaceae

Cette famille ne comporte qu'un seul genre et deux espèces : Methanoplanus limicola et Methanoplanus endosymbiosus. Elles présentent une morphologie caractéristique, inédite chez les bactéries synthétisant du méthane, sous la forme d'un disque plat avec de longs flagelles en position lophotriche (Mp limicola). La membrane cytoplasmique n'est entourée que d'une couche protéique. Cette famille a été créée sur la base des résultats d'hybridation ADN-ARN (TU et col., 1982), les hybrides ADN (M3)-ARN de Methanogenium ou de Methanosarcina présentent une stabilité comparable et très faible. Néanmoins, l'analyse du séquençage de l'ARN 16S de M3 présente une homologie importante avec les espèces du genre Methanogenium et renforce des caractéristiques nutritionnelles sensiblement identiques. L'identification d'une troisième famille chez les Méthanomicrobiales est très controversée et ne fait pas l'unanimité des spécialistes (WHITMAN, 1985).

1.3.3.- Famille : les Methanosarcinaceae

Incapables de croître en présence de formate, toutes les souches se caractérisent par une croissance sur acétate. Une seule espèce Ms barkeri utilise aussi le mélange H_2/CO_2 .

- le genre Methanosarcina se caractérise par une morphologie sous forme d'agrégats irréguliers caractéristiques. Chez Methanosarcina mazei, un stade sous forme de cocci a été mis en évidence au cours du cycle de croissance (ROBINSON, 1986).

. Methanosarcina barkeri, parmi les souches de cette espèce, la souche de référence MS (DSM 800) a fait l'objet d'études structurales et métaboliques approfondies, la protéine Hmb liée au DNA a été caractérisée (CHARTIER et col., 1985). Leurs exigences

nutritionnelles varient en fonction de la souche. Les structures lipidiques membranaires sont des éthers en C20 de l'isopranyl glycérol.

. Methanosarcina mazei avait été initialement classé dans le genre Methanococcus. Des travaux ultérieurs sur le séquençage de l'ARNr 16S ont conduit à sa position taxonomique actuelle (MAH et col., 1984).

. Methanosarcina acetivorans se distingue des autres Methanosarcina par des exigences en magnésium et chlorure de sodium. Sa paroi est très facilement altérée par les détergents (SDS) et présente une structure typique des micro-organismes à Gram-.

. Methanosarcina vacuolata est caractérisé par le G+C% le plus élevé des souches de Methanosarcina mais également par une morphologie typique avec des vacuoles de gaz inclus dans le cytoplasme.

. Methanosarcina thermophila est le nom d'espèce proposé en 1985 par ZINDER et col. pour la souche TM1 (ZINDER et MAH, 1979). Elle possède un pourcentage d'homologie ADN-ADN de 90% et ARN-ARN de 85% avec les autres souches du genre Methanosarcina. Deux autres souches thermophiles très voisines ont été isolées et particulièrement caractérisées CHTI 55 (TOUZEL et col., 1985) et MP (OLLIVIER et col., 1984).

- le genre Methanotherix a été rattaché à la famille des Methanosarcinaceae (STACKEBRANDT et col., 1982) bien que morphologiquement très différent du genre Methanosarcina. Les espèces se présentent sous forme de bacilles allongés associés en filaments qui se regroupent pour former des amas spécifiques. Elles utilisent l'acétate comme substrat unique de la méthanogenèse. L'espèce de référence est Methanotherix soehngenii "Opfikon".

. Methanotherix concilii se différencie de Methanotherix soehngenii principalement par la teneur en guanine plus cytosine de son ADN, qui est supérieure de 10%. Cette différence est à notre avis insuffisante pour justifier la création d'une nouvelle espèce.

TABLEAU III

Structure des enveloppes cellulaires chez les bactéries méthanogènes

FAMILLE	GENRE	SACCULE RIGIDE	ENVELOPPE PROTEIQUE	NATURE DU POLYMERE
Methanobacteriaceae	<u>Methanobacterium</u>	+	-	pseudomuréine
	<u>Methanobrevibacter</u>	+	-	pseudomuréine
	<u>Methanosphaera</u>	+	-	pseudomuréine
Methanothermaceae	<u>Methanothermus</u>	+	-	pseudomuréine & sous-unités protéiques
Methanococcaceae	<u>Methanococcus</u>	-	+	sous-unités protéiques
Methanomicrobiaceae	<u>Methanomicrobium</u>	-	+	sous-unités protéiques
	<u>Methanogenium</u>	-	+	sous-unités protéiques (<u>Mg cariaci</u>) & sous-unités glycoprotéiques (<u>Mg marisnigri</u>)
	<u>Methanospirillum</u>	-	+	glycoprotéines fibrillaires
Methanosarcinaceae	<u>Methanosarcina</u>	+	-	polysaccharide
	<u>Methanococcoïdes</u>	-	+	sous-unités protéiques
	<u>Methanlobus</u>	-	+	sous-unités glycoprotéiques
	<u>Methanotherix</u>	-	+	glycoprotéines fibrillaires
Methanoplanaceae	<u>Methanoplanus</u>	-	+	sous-unités glycoprotéiques

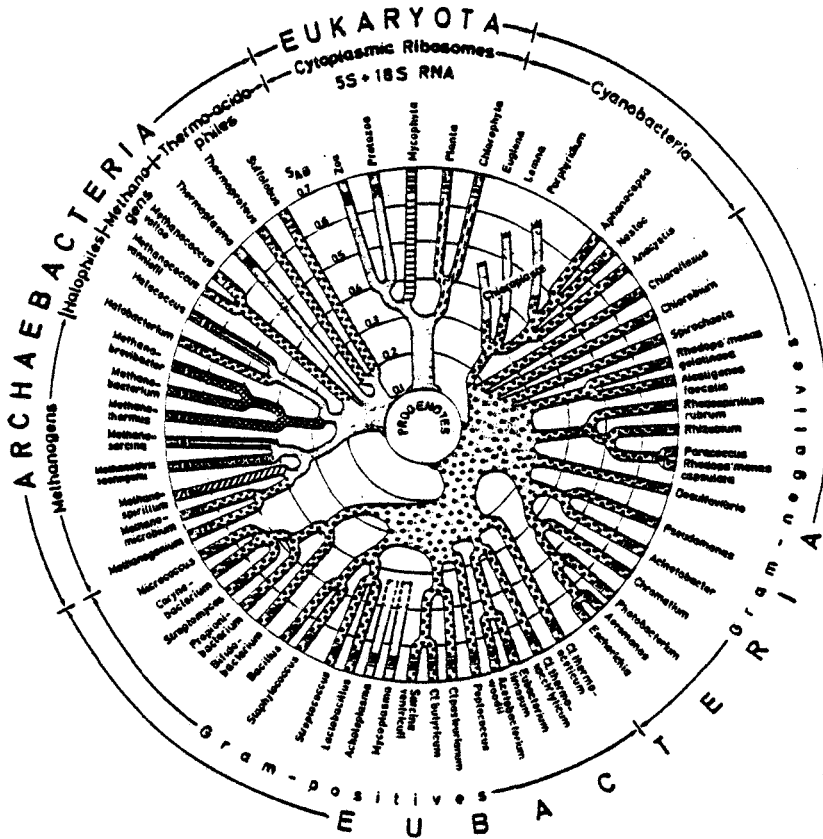


Figure n° 12 :

Distribution des polymères de paroi chez les Archaeobactéries, les Eubactéries et les Eucaryotes

. Methanothrix thermoacetophila se différencie des deux autres espèces par un optimum de croissance de 65°C et par la présence de vacuoles de gaz caractéristiques des cellules jeunes de l'espèce thermophile.

L'incapacité des souches de Methanothrix de croître sur milieu gélosé rend difficile l'obtention d'une culture pure, et nécessite de nombreux repiquages et contrôles microscopiques. Du glycogène assez peu ramifié a été purifié et caractérisé à partir des cellules de Methanothrix soehngeni souche FE (PELLERIN et col., sous presse).

- Les genres Methanolobus et Methanococcoides forment un groupe homogène parmi les Methanosarcinaceae selon SOWERS et col. (1984). Ils ne sont représentés que par une seule espèce, toutes deux isolées de sédiments marins, Methanolobus tindarius, Methanococcoides methylutens. Elles n'utilisent que le méthanol et les méthylamines et sont dépourvues d'une paroi rigide vraie, la membrane cytoplasmique étant entourée d'une enveloppe protéique. Les différences mineures morphologiques et physiologiques de ces souches portent à croire qu'il s'agit d'une même espèce (KANDLER et KÖNIG, 1986).

II.- POSITION TAXONOMIQUE ET STRUCTURE DES ENVELOPPES CELLULAIRES

Dès 1977, KANDLER et HIPPE soulignaient l'originalité de la paroi de Methanosarcina barkeri due à l'absence d'acide muramique et de D-aminoacides, constituants essentiels du peptidoglycane des Eubactéries. En fait, il n'existe aucun constituant pariétal commun caractéristique des Archaeobactéries. Apparemment, la nature de la paroi est étroitement liée aux relations phylogéniques définies par WOESE (KANDLER, 1982)(Fig. 12 et Tableau III).

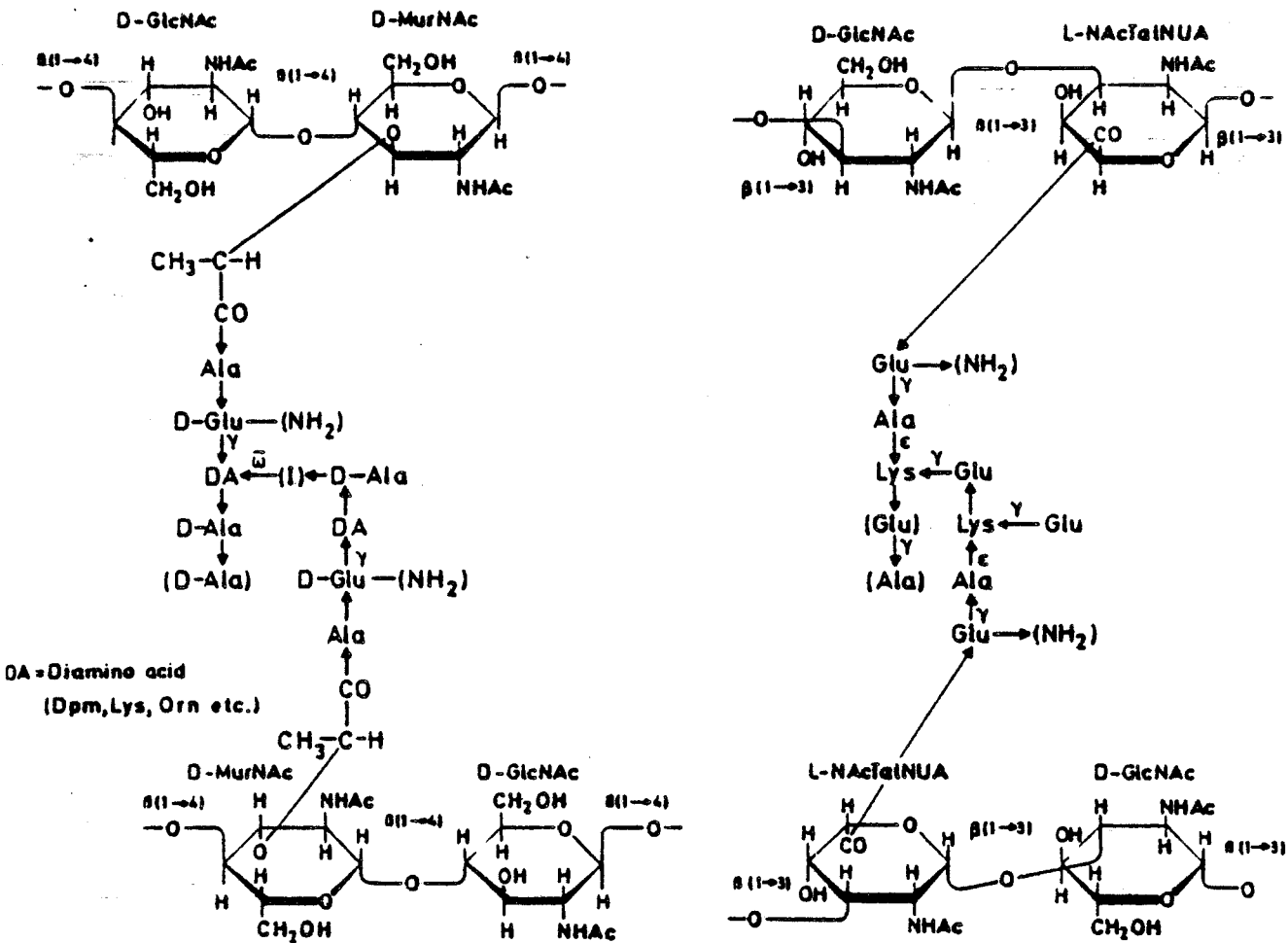


FIGURE n° 13 : STRUCTURE PRIMAIRE DU DIMERE DE LA MUREINE ET DE LA PSEUDOMUREINE
les composés entre parenthèses peuvent être absents dans certains cas

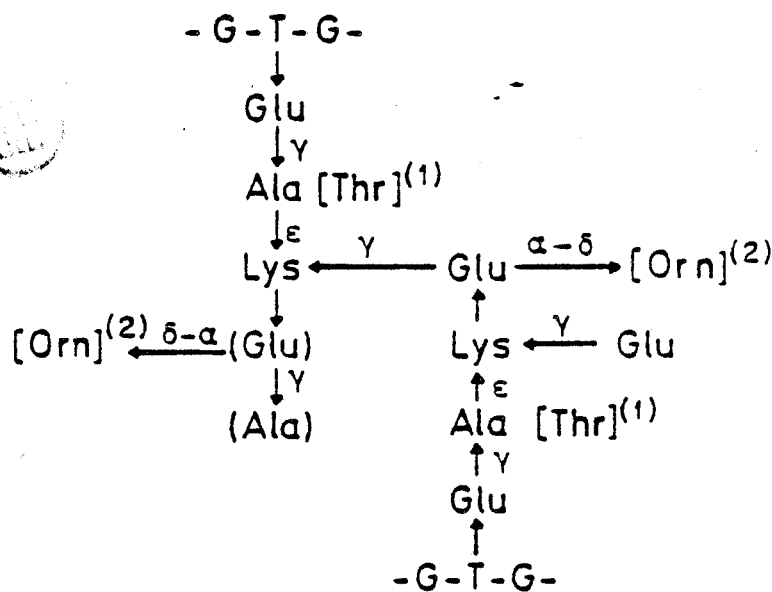


FIGURE n° 14 : SEQUENCE DES ACIDES AMINES COMPOSANT LES SOUS-UNITES PEPTIDIQUES DE LA PSEUDOMUREINE
G, N-acétyl-D-glucosamine ; T, acide N-acétyl-L-talosaminuronique
modifications observées chez (1) Methanobrevibacter ruminantium, (2) Methanobrevibacter smithii

II.1.- Les Méthanobactériales

Toutes les espèces identifiées chez les Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanosphaera, Methanothermus se caractérisent par des polymères de parois formant des saccules rigides ou pseudomuréine. Son analogie avec la muréine des parois des Eubactéries a permis une détermination très rapide de sa structure (Fig. 13). Trois caractéristiques distinctives majeures ont été mises en évidence : l'absence d'acide N acétylmuramique, la présence d'acides aminés de la série L et la présence inédite d'acide N-acétyl-L talosaminuronique (H. KÖNIG et O. KANDLER, 1979 b).

La partie glycanique est constituée de l'enchaînement de dimères d'acide 2-amino-2-deoxy-L-talosaminuronique et de la N-acétylglucosamine. Les expériences de méthylation et d'oxydation chromique (KÖNIG et KANDLER 1982) ont montré une liaison 1-3 entre ces 2 composés présentant tous deux une configuration anomérique de type β . Des résultats plus récents (KÖNIG et col., 1983) laisseraient supposer la possibilité de liaisons $\beta(1 + 3)$ ou $\alpha(1 + 3)$.

La séquence d'acides aminés de la fraction peptidique de la pseudomuréine a été déterminée par hydrolyse ménagée de parois isolées de Methanobacterium thermoautotrophicum (KÖNIG et KANDLER, 1979 a)(Fig. 14) avec des rapports molaires de 2,3, 1, 1,2 respectivement pour glu, lys, ala. L'analyse étendue à toutes les Méthanobactériales (Tableau IV) montre quelques exceptions :

- la présence de thréonine chez Methanobrevibacter ruminantium qui peut dans certain cas remplacer totalement l'alanine.

- l'ornithine liée au groupement carboxylique d'un résidu d'acide glutamique est mise en évidence chez Methanobrevibacter smithii.

- l'isolement récent de Methanosphaera stadtmaniae (MILLER, 1985) se distingue, de tous les autres membres, par la présence de sérine dans la composition en acides aminés de la pseudomuréine.

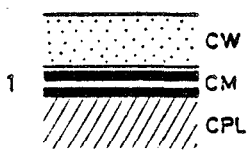
Les différences structurales muréine/pseudomuréine impliquent une sensibilité aux antibiotiques différente, la synthèse de la paroi est insensible à la D-cyclosérine, vancomycine et pénicilline en

TABLEAU n° IV

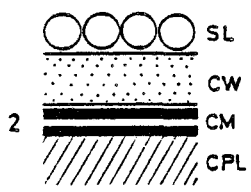
CONCENTRATIONS MOLAIRES DES CONSTITUANTS DE LA PAROI CHEZ LES METHANOBACTERIALES

Species	Amino acids					NH ₃	N-Acetyl amino sugars			Neutral sugars				Phosphate % d.W.
	Ala	Thr	Glu	Lys	Om		GalNH ₂	GlcNH ₂	TalNUA	Gal	Glc	Man	Rha	
<i>Methanobrevibacter</i>														
<i>M. arboriphilus</i> DH1	1.52	—	2.13	1.00	—	1.36	0.67	—	(1.00)	—	—	0.02	0.02	4.54
<i>M. arboriphilus</i> AZ	1.17	—	2.32	1.00	—	3.92	0.91	—	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>M. smithii</i> PS	1.42	—	2.04	1.00	0.40	0.81	0.44	0.56	(1.00)	0.11	0.14	—	0.09	1.0
<i>M. ruminantium</i> M1 ^d	—	0.90	1.85	1.00	—	0.85	0.80	0.60	(1.00)	0.29	0.02	0.02	0.21	4.65
<i>M. ruminantium</i> M1 ^d	0.70	0.40	1.80	1.00	—	1.00	0.80	0.50	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>Methanobacterium</i>														
<i>M. bryantii</i> M.o.H.	1.39	—	2.39	1.00	—	1.12	0.45	1.25	(1.00)	0.84	0.09	1.18	+	0.20
<i>M. bryantii</i> M.o.H.G.	1.32	—	2.21	1.00	—	0.84	—	0.84	(1.00)	0.53	0.26	0.26	+	○
<i>M. formicicum</i> MF	1.51	—	2.11	1.00	—	1.53	1.00	1.16	(1.00)	0.76	0.27	0.37	0.62	0.64
<i>M. thermoautotrophicum</i> Δ H	1.20	—	2.27	1.00	—	0.61	0.16	1.18	(1.00)	0.02	0.13	—	+	0.28
<i>M. thermoautotrophicum</i> Marburg	1.32	—	2.37	1.00	—	0.77	0.87	0.23	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>M. thermoautotrophicum</i> JW 500	1.43	—	2.36	1.00	—	1.64	1.29	1.14	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>M. thermoautotrophicum</i> JW 501	1.29	—	2.57	1.00	—	1.07	0.86	1.07	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>M. thermoautotrophicum</i> JW 510	1.25	—	2.25	1.00	—	1.25	1.42	1.00	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>Methanothermus</i>														
<i>M. fervidus</i>	1.47	—	2.23	1.00	—	1.64	0.35	0.49	(1.00)	—	0.01	—	○	○

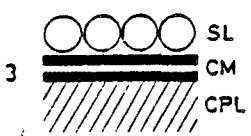
Mises en evidence chez :



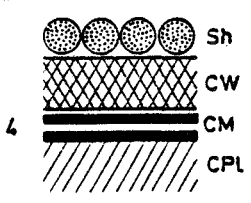
Typiques des bacteries Gram+
 cw=pseudomureine (Methanobacteriales)
 cw=methanochondroïtine (Methanosarcina)



Methanothermus fervidus (Gram+)
 cw=pseudomureine , sl=sous-unites proteiques



Typiques des bacteries Gram-
 sl=sous-unites proteiques ou glycoproteiques



Methanospirillum hungatei

FIGURE n° 15 : STRUCTURES DES ENVELOPPES CELLULAIRES CHEZ LES ARCHAEBACTERIES - REPRESENTATION SCHEMATIQUE
 (CW, paroi , CM, membrane cytoplasmique , CPL, cytoplasme , SL, S-layer , Sh, fourreau fibrillaire)

raison de l'absence de D-alanine. Les résistances de la pseudomuréine au lysozyme et aux protéines sont expliquées respectivement par l'absence d'acide muramique, la présence de liaison ($\beta 1 + 3$) sur la partie glycanique et par la présence de liaisons peptidiques inhabituelles (KANDLER et col., 1985).

La biosynthèse de la pseudomuréine n'est pas à ce jour parfaitement connue, néanmoins sa structure très proche de la muréine suggère un mécanisme similaire. Différentes formes nucléotidiques activées ont été identifiées comme précurseurs de synthèse de la pseudomuréine : un UDP-peptide, l'UDP-N-acétyl-D-glucosamine, l'UDP-D-galactosamine et un dimère UDP-activé composé de UDP-N-acétyl-D-glucosamine et N-acétyl-L talosaminuronique. L'absence de forme activée de l'acide talosaminuronique suggère une réaction possible d'épimérisation ou d'oxydation d'un disaccharide, formé par transfert d'un précurseur monomérique sur UDP-N-acétyl-D-glucosamine (KANDLER et col., 1985).

La détection d'alanine dans le milieu de culture de Methanobacterium thermoautotrophicum (SCHÖNHEIT et THAUER, 1980) suggère la libération d'un résidu d'alanine lors de la fusion des deux chaînes peptidiques, identique à la biosynthèse de la muréine.

II.2.- Les Méthanococcales

Quelque soit l'espèce étudiée, les préparations d'enveloppe ne contiennent ni acide muramique, ni glycoprotéine et sont insensibles aux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. En microscopie électronique, aucune structure de type pariétal ne peut être mise en évidence. La membrane cytoplasmique est entourée d'une couche formée de sous-unités protéiques (Fig. 15). L'étude de Methanococcus jannaschii en cryo-fracture a dévoilé des sous-unités ordonnées orthogonalement. Il a été observé l'inclusion de corps globulaire dans l'enveloppe dont la composition est inconnue (JONES, 1983). L'analyse en PAGE-SDS des protéines des enveloppes isolées de Mc vanniellii a révélé 7 bandes protéiques négatives à la coloration de SCHIFF dont la bande majeure PM 60 000 représente 20% du total

TABLEAU n° V
 COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS ISOLEES DE 7 SOUCHES DE METHANOSARCINA

Compound	DSM 800		DSM 804		DSM 1232		DSM 1825		DSM 2053		DSM 1538	
	% d.w.	mmol/g	% d.w.	mmol/g	% d.w.	mmol/g	% d.w.	mmol/g	% d.w.	mmol/g	% d.w.	mmol/g
D-Glucose	3.75	0.20	5.0	0.27	2.2	0.12	0.5	0.027	0.42	0.023	3.5	0.19
D-Galactosamine	27.5	1.54	35	1.95	30.8	1.72	41.45	2.3	40.0	2.23	20.6	1.15
D-Glucuronic acid	16.0	0.82	14.8	0.76	18.0	0.92	18.8	0.97	6.9	0.35	11.2	0.58
D-Galacturonic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	6.9	0.35	—	—
N-Acetyl residues	8.3	1.9	8.7	2.0	8.7	2.0	10.5	2.4	9.6	2.23	n.d.	—
Ash	20.0	—	12.2	—	2.5	—	8.35	—	1.0	—	n.d.	—
H ₂ O	14.0	—	8.4	—	16.0	—	14.6	—	16.8	—	n.d.	—



FIGURE n° 16 : UNITE DE BASE TRIMERIQUE DE LA METHANOCHONDROITINE

protéique de l'enveloppe. Des résultats similaires étaient obtenus sur les autres souches testées. Cette enveloppe protéique se retrouve également chez certaines Méthanomicrobiales.

II.3.- Les Méthanomicrobiales

II.3.1.- Enveloppes cellulaires contenant des hétéropolysaccharides

Un seul genre Methanosarcina présente une paroi polysaccharidique.

L'hydrolyse totale (KANDLER, HIPPE, 1977) a montré l'absence de peptidoglycane chez les Methanosarcina mais la présence de D-galactosamine, D-glucose, d'acide D-glucuronique et d'acide acétique. La D-galactosamine, et l'acide D-glucuronique sont quantitativement les plus abondants, le glucose est un composé mineur, et l'acide D-galacturonique n'est décelé que chez Methanosarcina vacuolata (Tableau V).

L'hydrolyse acide partielle a permis l'identification d'un disaccharide, l'acide D-glucuronique lié au N-acétyl-D-galactosamine. Cette unité disaccharidique élémentaire est identique à la chondrosine qui compose la chondroïtine, celle-ci, liée aux sulfates, forme des polymères porteurs de très nombreuses charges négatives capables de fixer les cations d'où leur présence dans les zones d'ossification. Récemment, une structure de base trimérique était proposée associant deux résidus de N-acétyl-D-galactosamine par résidu d'acide uronique (KANDLER et col., 1985 ; KREISL et col., 1986)(Fig. 16).

Le nom de Methanochondroïtine est proposé pour les parois de Methanosarcina afin de souligner la ressemblance eucaryote-archaeobactérie.

Remarquons cependant qu'à l'intérieur du genre Methanosarcina, l'unité de paroi ne semble pas vérifiée. Methanosarcina acetivorans ne présentent pas d'enveloppes saccharidiques et seule une couche protéique constitue l'enveloppe externe. Cependant, l'appartenance de Ms acetivorans au genre

Methanosarcina est confirmée par les techniques d'hybridation ADN-ADN et ADN-ARN (SOWERS et col., 1984). Une enveloppe protéique similaire était trouvée entre la membrane cytoplasmique et la paroi rigide de Ms mazei (ALDRICH, 1986). Considérant cette couche protéique identique à une S layer, il appelle "matrice" les polymères hétéropolysaccharidiques.

La détection de sucre aminé et d'acide aminé dans l'hydrolysate de paroi de Methanosarcina barkeri strain 227 renforce l'idée d'une paroi hétéropolysaccharidique associée à une layer protéique interne, d'où l'hypothèse de SOWERS (1984) que Methanosarcina acetivorans aurait pu perdre sa capacité de produire une paroi externe contrairement aux espèces non marines développant par protection osmotique une paroi hétéropolysaccharidique. Néanmoins, cette espèce mériterait une étude beaucoup plus approfondie avant de conclure sur l'absence réelle de la paroi typique présente chez toutes les autres Methanosarcina.

II.3.2.- Enveloppes cellulaires composées de sous-unités protéiques ou glycoprotéiques

* En microscopie électronique, les genres Methanogenium, Methanomicrobium, Methanoplanus, Methanolobus, Methanococcoïdes ne présentent pas d'enveloppe rigide caractéristique de paroi vraie. Leurs membranes cytoplasmiques sont entourées d'une couche protéique de type S. Après isolement et désintégration, sa composition n'a révélé que des sous-unités protéiques et glycoprotéiques essentiellement étudiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

. La couche S de Methanogenium d'une épaisseur de 9,5 à 10,5 nm est organisée en sous-unités hexagonales. Une glycoprotéine PM 143 000 est présente sur Mg marisnigri mais non vérifiée sur Mg cariaci dont la bande majeure est une protéine de PM 125 000 qui ne se colore pas au réactif de SCHIFF.

. A partir de Methanomicrobium mobile les profils électrophorétiques des structures d'enveloppe ont montré la présence de protéines exemptes de glucides (KANDLER et KÖNIG, 1985).

TABLEAU n° VI

COMPOSITION CHIMIQUE DES ENVELOPPES CELLULAIRES DE 4 SOUCHES METHANOGENES
 COMPOSEES DE SOUS-UNITES PROTEIQUES OU GLYCOPROTEIQUES

I, umol/mg de poids sec , II, concentration molaire

Component	<i>Methanospirillum hungatei</i>		<i>Methanohalobium</i> <i>soehngenii</i> ^a		<i>Methano-</i> <i>coccoides</i> <i>methylutens</i>		<i>Methanobolus</i> <i>tindarius</i>			
	strain JF1		strain GP1							
	I	II	I	II	I	II	I	II		
Amino acids										
Ala	0.69	23.00	0.47	11.75	0.445	1.92	0.147	3.24	0.7033	5.08
Arg	0.07	2.33	0.09	2.25	0.155	0.67	0.091	2.01	0.3651	2.64
Asp	0.88	29.33	0.71	17.75	0.826	3.56	0.187	4.14	0.7674	5.54
Cys	0.04	1.33	0.06	1.50	0.016	0.07	0.025	0.55	0.0285	0.21
Glu	0.52	17.33	0.54	13.50	1.109	4.78	0.177	3.92	0.8533	6.16
Gly	0.52	17.33	0.36	9.00	0.909	3.92	0.152	3.39	0.6992	5.07
His	0.03	1.00	0.04	1.00	0.232	1.00	0.045	1.00	0.1385	1.00
Ile	0.17	5.66	0.26	6.50	0.181	0.78	0.113	2.50	0.3677	2.63
Leu	0.37	12.33	0.33	8.25	0.342	1.47	0.134	2.97	0.5903	4.26
Lys	0.22	7.33	0.30	7.50	0.290	1.25	0.121	2.67	0.2953	2.14
Met	0.07	2.33	0.09	2.25	0.012	0.05	0.052	1.15	n.d.	—
Phe	0.22	7.33	0.18	4.50	0.135	0.58	0.057	1.27	0.2734	1.97
Pro	0.15	5.00	0.14	3.50	0.181	0.78	0.070	1.56	0.2417	1.66
Ser	0.38	12.66	0.39	9.75	0.497	2.14	0.100	2.26	0.5216	3.77
Trp	0.05	1.66	0.22 ^a	5.50	n.f.	—	n.d.	—	n.f.	—
Tyr	0.22	7.33	0.14	3.50	0.219	0.94	0.052	1.15	0.7255	1.25
Val	0.22	7.33	0.35	8.75	0.439	1.89	0.123	2.72	0.4280	3.09
NH ₃	0.59	19.67	n.d.	—	0.497	2.14	n.d.	—	1.3263	95.86
Carbohydrates										
Ara	0.19	6.33	n.f.	—	n.f.	—	—	—	n.f.	n.f.
Gal	0.13	4.33	0.03	0.75	n.f.	—	—	—	n.f.	n.f.
Glc	0.10	3.33	0.02	0.50	0.260	1.11	—	—	19.614	141.62
GlcN	n.f.	—	n.f.	—	n.f.	—	—	—	n.f.	n.f.
Man	0.03	1.00	0.02	0.50	0.580	2.50	—	—	n.f.	n.f.
Rha	0.04	1.33	0.16	4.00	n.f.	—	—	—	n.f.	n.f.
Rib	n.f.	—	0.14	3.50	n.f.	—	—	—	n.f.	n.f.

. L'analyse des enveloppes cellulaires de Methanoplanus limicola a révélé la présence d'une glycoprotéine PM 143 000. WILDGRUBER et col. en 1982 ont montré un arrangement hexagonal de ces sous-unités séparées de 14 nm.

. Methanobolus tindarius contient dans sa S layer une glycoprotéine de PM 156 000 daltons dont la composition en acides aminés a été déterminée (Tableau VI). A la présence unique de glucose détecté par KANDLER et col. (1985) s'ajoutent celles du xylose et du rhamnose mises en évidence par KÖNIG et col. (1986).

. Methanococcoïdes methylytens est très voisine morphologiquement et physiologiquement à Methanobolus tindarius. La couche S ne contient pas de sucres aminés.

* Methanospirillum hungatei, Methanothrix soehngenii présentent toutes deux des fourreaux complexes et inhabituels constitués par des protéines fibrillaires.

Le fourreau de Methanospirillum hungatei JF1 est composé à 65% de protéines, 8,2% de sucres neutres (Glc, Gal, Man) et de cendres (KANDLER et col., 1978)(Tableau VI). Ce fourreau protéique est résistant aux détergents et aux protéases. Il est dissout en présence de soude 1N séparant un fragment majeur polypeptidique de 12 000 daltons.

La membrane cytoplasmique contient 0,16% de nickel (poids sec). Ce métal est également présent dans la gaine externe (SPROTT et col., 1983). L'action du DTT à pH alcalin sur les cellules altère la substance interpariétale et les sites d'attachement entre les enveloppes internes et externes permettant la libération de sphéroplastés (SPROTT et col., 1979 - BEVERIDGE et col., 1985).

Gram-, Methanothrix soehngenii présente à la surface de son fourreau une striation de forme concentrique et une composition chimique globale très voisine à Msp hungatei (KANDLER et col., 1985).

Remarque : Methanoplasma elizabethii est la seule méthanogène isolée qui ne présente aucune structure d'enveloppe associée à la membrane cytoplasmique (ROSE et col., 1981). Son identité n'est à ce jour pas reconnue.

TABLEAU n° VII

DISTRIBUTION DES DIETHERS ET DES TETRAETHERS CHEZ LES ARCHAEBACTERIES

Group	Archaeobacterium	Diether (%)	Tetraether (%)
Halophiles	<i>Halobacterium cutirubrum</i>	100	0
	<i>H. salinarium</i>	100	0
	<i>H. volcanii</i>	100	0
	<i>H. halobium</i>	100	0
	<i>H. saccharovororum</i>	100	0
	<i>H. morrhuae</i>	100	0
	<i>H. simoncinii</i>	100	0
	<i>H. marismortui</i>	100	0
	<i>H. irapanicum</i>	100	0
	<i>H. sp. (Cagliari)</i>	100	0
	<i>H. sp. A-2c</i>	100	0
	<i>H. sp. R-4</i>	100	0
	<i>Halococcus morrhuae</i>	100	0
	<i>Sarcina litoralis</i>	100	0
	Haloalkalophiles	<i>Halobacterium pharaonis</i>	100 ^b
isolate sp1		100 ^b	0
isolate sp2		100 ^b	0
isolate MS3		100 ^b	0
Methanogens	<i>Methanococcus</i> strain PS	100	0
	<i>M. methylutens</i>	100 ^c	0
	<i>Methanotherix söhngeni</i>	100	0
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	100	0
	<i>Methanococcus vannielii</i>	99.9	0.1
	<i>Methanobacterium ruminantium</i> M-1	71.8	28.2
	<i>M. ruminantium</i> PS	44.7	55.3
	<i>M. thermoautotrophicum</i>	44.5	55.5
	<i>M. strain</i> M.O.H.	43.5	56.5
	<i>Methanospirillum hungatei</i>	40.5	59.5
<i>M. strain</i> AZ	37.5	62.4	
	<i>Methanothermus fervidus</i> strain V245	13.5	86.5 ^d
Thermoacidophiles	<i>Thermoplasma acidophilum</i> strain 122-1B2	10	90 ^e
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	5	95 ^f
	<i>S. brierleyi</i>	t	100 ^f
	<i>S. acidocaldarius</i>	t	100 ^f
	<i>Thermoproteus tenax</i>	+	+
Thermophilic anaerobes	<i>Desulfurococcus mobilis</i>	+	+
	<i>D. mucosus</i>	+	+
	<i>Pyrodictium occultum</i>	+	+ ^d

III.- POSITION TAXONOMIQUE ET LIPIDES

Les lipides des Archaeobactéries se distinguent par l'absence d'esters d'acides gras et de glycérol et par l'abondance de lipides non saponifiables. Leurs structures très spécifiques représentent un marqueur taxonomique distinctif des Eucaryotes et des Eubactéries, et modifient les concepts biochimiques de construction des membranes cellulaires. Ceux-ci sont constitués de chaînes hydrocarbonées d'isoprénoïde et d'hydroisoprénoïde (lipides neutres), et d'éthers de glycérol et d'isopranyl.

III.1.- Les glycérolipides

Les glycérolipides des Archaeobactéries se caractérisent par la présence unique de liaisons de type éther en opposition aux liaisons esters reliant acide gras et glycérol chez les deux autres règnes primaires. Des diéthers de diphytanylglycérol (KATES et col., 1965) et des tétraéthers de dibiphytanyldiglycérol (LANGWORTHY et col., 1977) ont été détectés. Leur distribution est très spécifique (Tableau VII).

Les diéthers sont présents chez toutes les Archaeobactéries testées mais dans des proportions variables. Ils représentent la totalité des lipides bactériens chez les halophiles et chez certaines méthanogènes à l'exception des formes bacillaires et spirillaires. Les tétraéthers ont été identifiés à la fois chez les méthanogènes mésophiles et thermophiles et représentent la presque totalité des lipides bactériens des thermoacidophiles. La distribution entre les di- et tétraéthers à l'intérieur des classes des Archaeobactéries était une preuve supplémentaire des relations taxonomiques existantes entre ces bactéries. A l'origine, ces lipides particuliers étaient considérés comme une adaptation aux conditions d'environnements extrêmes, mais leur présence chez les méthanogènes vivant sous des conditions physiologiques normales (température, pH, concentration en sel) modifia ce concept et fut interprétée comme une caractéristique biochimique du type archaeobactérien (LANGSWORTHY et col., 1982).

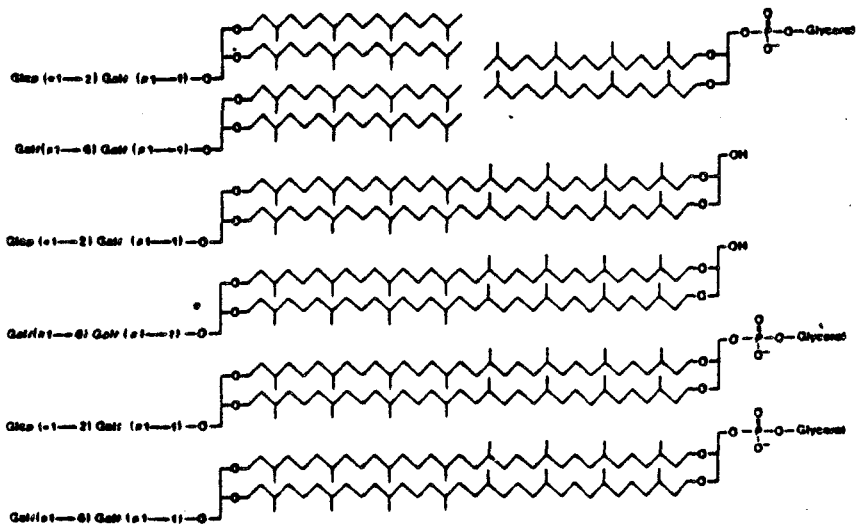


FIGURE n° 17 : LIPIDES POLAIRES CHEZ METHANOSPIRILLUM HUNGATEI
 Glcp, glucopyranose , Galf, galactofuranose

TABLEAU VIII

Répartition des lipides polaires chez Methanospirillum hungatei

	Pourcentage des lipides polaires totaux
- Phospholipides	10%
- Glycolipides	
* diéthers R = Glc (α1 → 2)Gal (β1 → 1)	28%
R' = Gal (α1 → 2)Gal (β1 → 1)	3%
* tétraéthers	0,2 à 0,3%
- Phosphoglycolipides	
* tétraéthers R = Glc (α1 → 2)Gal (β1 → 1)	45%
R' = Gal (α1 → 2)Gal (β1 → 1)	13%

Les méthanogènes se caractérisent aussi par l'absence de cyclisations des chaînes biphytaniques des tétraéthers contrairement à des degrés de cyclisation variable chez Thermoplasma et Sulfolobus.

III.2.- Les lipides polaires

Représentant 80 à 90% du contenu lipidique global, les lipides polaires sont des glyco- et phosphoglycolipides de structure analogue à leurs équivalents glycosyl- ou phosphatidyl-diacylglycérol présents chez les Eucaryotes et les Eubactéries. Leur structure complète a été réalisée chez Methanospirillum hungatei GP1 qui présente à la fois des di- et des tétraéthers (KUSHWAHA et col., 1981 a,b)(Tableau VIII).

Les diéthers polaires sont soit des diéthers homologues au phosphatidyl glycérol (10% des lipides polaires), soit des diéthers glycolipidiques (31% des lipides polaires) qui présentent une extrémité disaccharidique de deux glucopyranoses et/ou de deux galactofuranose $R = \text{Glc}(\alpha 1 \rightarrow 2) \text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 1)$ $R' = \text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 6) \text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 1)$. Une structure diéther inhabituelle a été mise en évidence chez Mc jannaschii. Elle est formée d'une seule chaîne biphytanique en C40 unissant les carbones 2 et 3 du glycérol (COMITA et col., 1986 ; LANGWORTHY et col., 1986).

Parmi les tétraéthers polaires, l'on retrouve les mêmes résidus glycosidiques fixés sur des tétraéthers glycérophosphates (58% des lipides polaires)(Fig. 17).

III.3.- Les lipides non polaires

Les lipides non polaires ont été estimés entre 5 et 8 mg/g de cellules sèches chez les bactéries méthanogènes contrairement à des teneurs nettement plus faibles 1,5 à 2,5 mg/g pour les halophiles et 0,5 à 1,5 mg/g pour les thermoacidophiles (TORNABENE et col., 1979). Les isoprénoïdes et les hydroisoprénoïdes constituent la presque totalité de la fraction lipidique non polaire des Archaeobactéries. Les

Archaeobacterium	C ₃₀ Hexaisoprenoids	C ₂₅ Pentaisoprenoids	C ₂₀ Tetraisoprenoids
<i>Methanobacterium cutirubrum</i>	C _{30:4} , C _{30:5} , C _{30:6} , C _{30:8}	—	—
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	C _{30:0} , C _{30:1} , C _{30:2} , C _{30:3} , C _{30:4} , C _{30:5} , C _{30:6}	C _{25:1} , C _{25:2} , C _{25:3}	C _{20:1} , C _{20:2}
<i>Methanococcus vannielii</i>	C _{30:4} , C _{30:5} , C _{30:6}	C _{25:3} , C _{25:4} , C _{25:5}	C _{20:2} , C _{20:3} , C _{20:4}
<i>Methanobacterium ruminantium</i> PS	C _{30:3} , C _{30:4} , C _{30:5} , C _{30:6}	C _{25:3} , C _{25:3}	—
<i>Methanococcus</i> strain PS	C _{30:3} , C _{30:4} , C _{30:5} , C _{30:6}	C _{25:3}	—
<i>Methanosarcina barkeri</i>	—	C _{25:0} , C _{25:1} , C _{25:2} , C _{25:3}	—
<i>Methanobacterium</i> strain A2	C _{30:6}	—	C _{20:0} , C _{20:1} , C _{20:4}
<i>M.</i> strain M.o.H.	C _{30:4} , C _{30:5} , C _{30:6}	—	C _{20:0} , C _{20:1} , C _{20:2} C _{20:3} , C _{20:4}
<i>M. ruminantium</i> M-1	C _{30:1} , C _{30:2} , C _{30:3} , C _{30:4} C _{30:5} , C _{30:6}	—	—
<i>Methanospirillum hungatei</i>	C _{30:4} , C _{30:5} , C _{30:6}	—	—
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	C _{30:0} , C _{30:1} , C _{30:2}	C _{25:0} , C _{25:1}	C _{20:1} , C _{20:2} , C _{20:3}
<i>S. brierleyi</i>	—	—	C _{20:0}
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	C _{30:6}	C _{25:3}	C _{20:0} , C _{20:4}

TABLEAU n° IX

LES PRINCIPAUX LIPIDES NEUTRES CHEZ LES ARCHAEABACTERIES

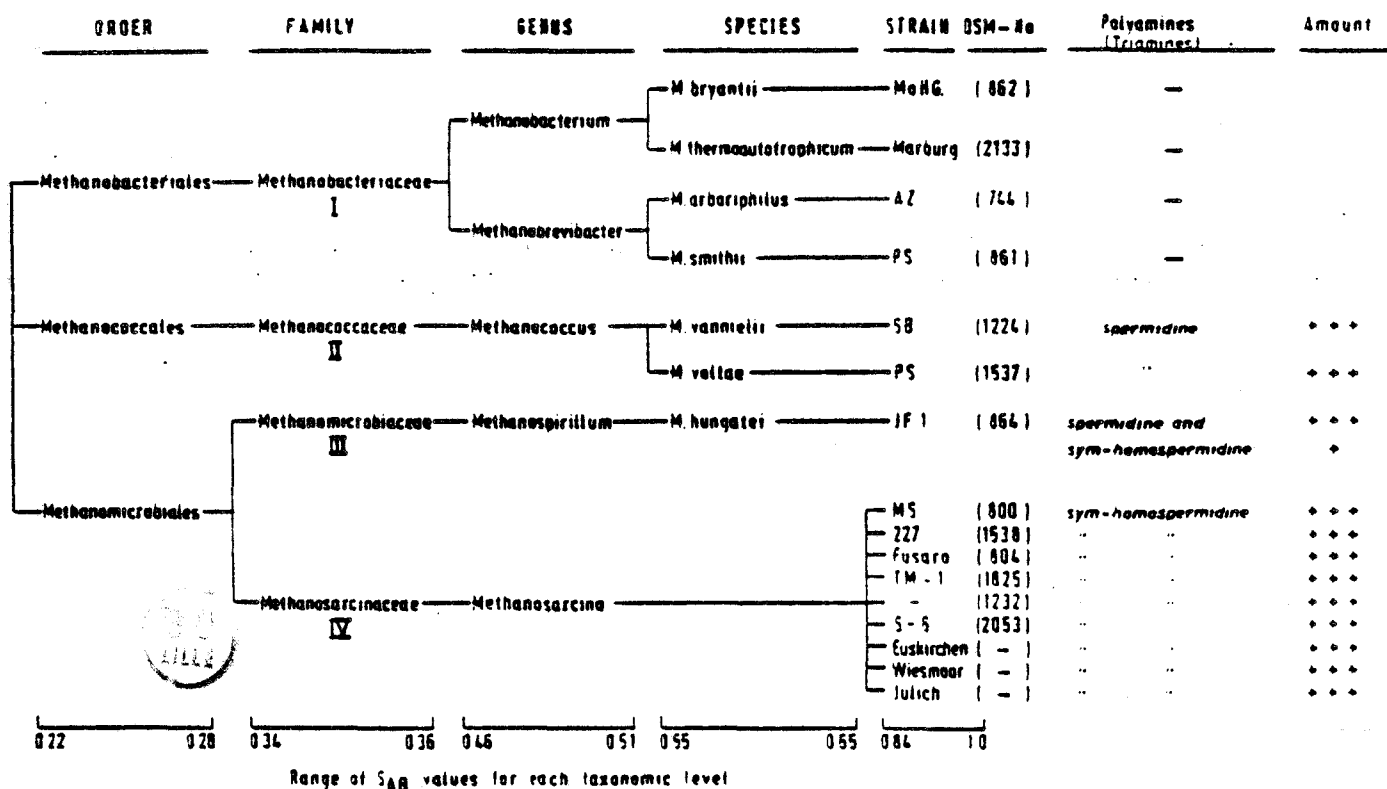


FIGURE n° 18 : DISTRIBUTION DES POLYAMINES CHEZ LES ARCHAEABACTERIES

chaînes hydrocarbonées sont presque entièrement dérivées des squelettes d'isoprénoïdes (C15 au C30) présents dans différents degrés d'insaturation. Parmi les méthanogènes examinées il a été observé essentiellement la présence du squalène C30 à l'exception de Mc voltae dont la chaîne hydrocarbonée majeure est le tétrahydrosqualène et de Ms barkeri qui se caractérise par l'absence totale de dérivé en C30 (Tableau IX).

IV.- POSITION TAXONOMIQUE ET DISTRIBUTION DES POLYAMINES

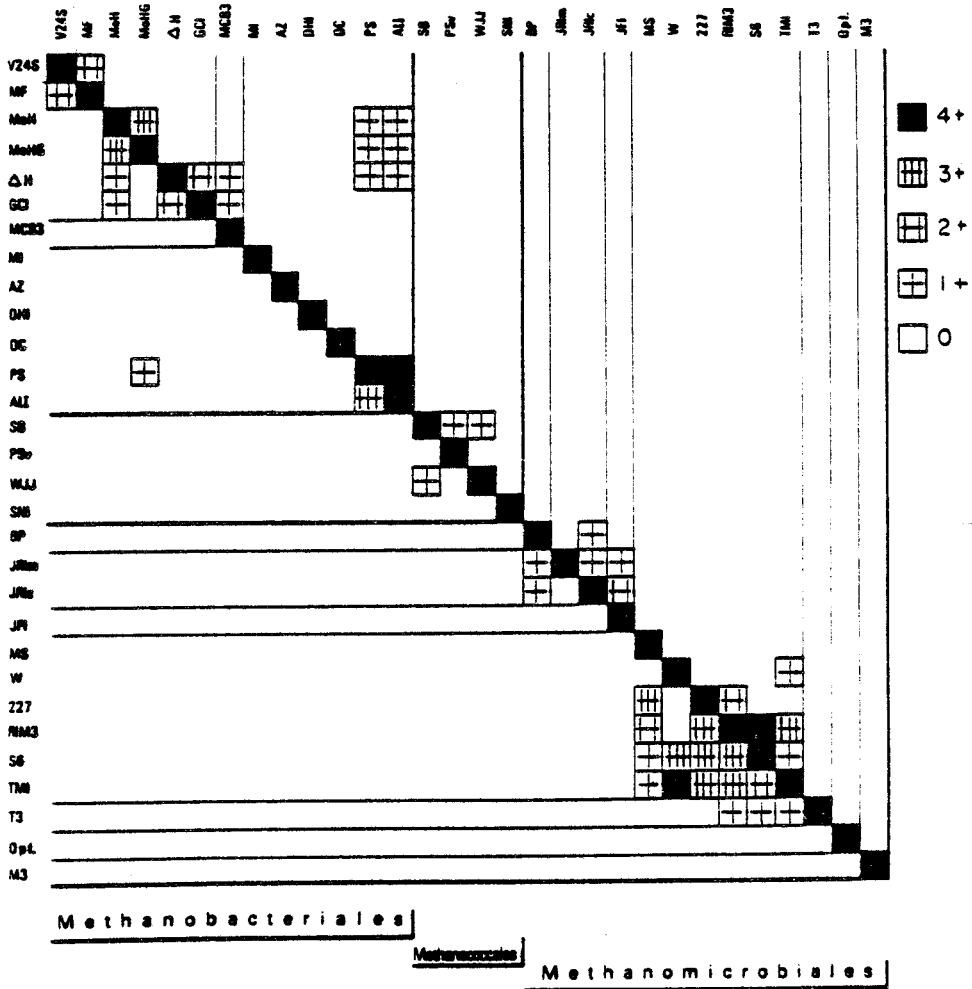
En complément des techniques existantes et de la méthode plus élaborée d'analyse du séquençage de l'ARN 16S, SCHERER et col. (1983) et KNEIFEL et col. (1986) proposent comme paramètre taxonomique la distribution des polyamines chez les méthanogènes et les Archaeobactéries. Universellement répandus dans la nature, les polyamines contribueraient à la stabilisation des membranes et des acides nucléiques à haute température et joueraient un rôle dans de nombreuses réactions enzymatiques. Contrairement à TABOR et col. (1984) qui affirment leur présence chez tous êtres vivants, les polyamines ne sont pas détectées chez les Méthanobactériales et les Halobactériales.

L'analyse des polyamines montre une très grande diversité chez les Archaeobactéries et l'absence d'une polyamine spécifique. Il existe cependant une bonne corrélation entre le dendogramme basé sur les valeurs comparées du séquençage de l'ARNr 16S et la distribution des polyamines chez les méthanogènes (SCHERER, 1983)(Fig. 18).

La spermidine est la seule triamine mise en évidence chez les Methanococcaceae. De même, la sym-homospermidine n'est présente que chez les Methanosarcinaceae tandis que les Methanomicrobiaceae contiennent à la fois spermidine et sym-homospermidine. La présence de spermidine et de sym-homospermidine détectée chez Methanoplanus limicola souche M3 (DSM 2279) est un argument supplémentaire qui renforce d'autres critères taxonomiques pour son classement dans les Méthanomicrobiales (WILGRUBER et col., 1982).

TABLEAU n° X

TABLEAU GENERAL DES RELATIONS ANTIGENIQUES CROISEES CHEZ LES METHANOGENES



- V24S Methanothermus fervidus - MF Methanobacterium formicicum - MoH, MoHG Methanobacterium bryantii -
- H, GC1 Methanobacterium thermoautotrophicum - MGB3 Methanosphaera stadtmaniae - M1 Methanobrevibacter ruminant
- AZ, DH1, DC Methanobrevibacter arboriphilus - PS, ALI Methanobrevibacter smithii - SB Methanococcus vannielii -
- PSv Methanococcus voltae - WJJ Methanococcus maripaludis - SN1 Methanococcus thermolithotrophicus -
- BP Methanomicrobium mobile - JRIa Methanogenium marisnigri - JRIc Methanogeniumccariaci - JF1 Methanospirillum hungatei - MS, W, 227, RIM3 Methanosarcina barkeri - TM1 Methanosarcina thermophila - S6 Methanosarcina mazei
- T3 Methanobrevibacter ruminantium - Opf Methanothermobacter thermoautotrophicus - M3 Methanoplanus limicola -

V.- POSITION TAXONOMIQUE ET PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

L'application des techniques immunologiques aux bactéries méthanogènes commença en 1980. L'obtention d'une banque d'immunséra contre les différentes méthanogènes permit à E. et A. CONWAY DE MACARIO (U.S.A.) de montrer la très grande diversité antigénique de ce type bactérien.

A l'aide d'anticorps polyclonaux, l'I.F.I. (immunofluorescence indirecte) et l'Elisa (Enzyme like immunosorbant assay) sont les deux techniques de routine choisies pour le screening de ces souches (CONWAY DE MACARIO, 1982a, 1983a). La première étape a consisté à titrer en réaction homologue chaque immunsérum. Une cotation de 0 à 4+ en I.F.I., matérialise l'intensité de fluorescence. Trois titres ont été définis : "T" comme la dilution la plus haute de l'antisérum qui donne une réaction faible (1+) avec la souche immunisante, "S" correspondant à la dilution la plus élevée donnant une fluorescence forte (4+) et "R" définit comme la dilution 8 fois moins élevée que S et permettant la détection de réactions faiblement visibles. Ces titres spécifiques définis pour chaque immunsérum sont ensuite utilisés pour analyser les relations antigéniques en réactions hétérologues : le titre T réagissant seulement avec la souche immunisante ou homologue, "S" donnant des réactions croisées fortes avec les souches de la même espèce et "R" révélant des relations interespèces au niveau du genre.

A l'intérieur du genre *Methanosarcina*, des réactions inter-espèces intenses ont été mises en évidence même lorsque les séra sont utilisés à la dilution S. Le tableau global X résume les réactions croisées obtenues en I.F.I. (CONWAY DE MACARIO 1982b,c, 1983b 1986) et confirme les relations taxonomiques proposées par BALCH 1979 entre les espèces méthanogènes.

L'emploi d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de quelques espèces méthanogènes représentatives a permis d'affiner les caractéristiques antigéniques des enveloppes cellulaires. La spécificité fine des anticorps et l'élucidation de la mosaïque antigénique des méthanogènes ont été réalisées par inhibition ou blocage avec des composés de structure connue ou de synthèse

TABLEAU XI

Les déterminants antigéniques de plusieurs bactéries méthanogènes définis par les anticorps monoclonaux d'après E. CONWAY DE MACARIO (1986)

SOUCHE IMMUNISANTE	CODE	MISE EN EVIDENCE SUR LES SOUCHES	STRUCTURE CHIMIQUE COMPLEMENTAIRE
H	4a	<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u> ΔH-GC1	Glc N, Glc N Ac
	4b	<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u> ΔH-GC1	γ-Glu-Ala, N Ac-γ-Glu-Ala
	4c	<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u> ΔH-GC1	Gal N, Gal N Ac
	4c	<u>Methanobacterium formicicum</u> MF	Gal N, Gal N Ac
	4d	<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u> GC1	inconnue
	4e	<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u> ΔH	γ-Glu-Ala, N Ac-γ-Glu-Ala
	4f	<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u> ΔH	Tal N u
PS	6a	<u>Methanobrevibacter smithii</u> PS	Orn, Glu-Lys
	6b	<u>Methanobrevibacter smithii</u> PS	inconnue
	6c	<u>Methanobrevibacter smithii</u> PS	inconnue
	6d	<u>Methanobrevibacter smithii</u> PS	inconnue
	6e	<u>Methanobrevibacter smithii</u> PS	inconnue
	6f	<u>Methanobrevibacter smithii</u> PS	inconnue
DH1	3a	<u>Methanobrevibacter arboriphilus</u> DH1	γ-Glu-Ala
SB	5a	<u>Methanococcus vanniellii</u> SB ; <u>voltae</u> Psv	Lys, Phe, Thr
	5b	<u>Methanococcus vanniellii</u> SB ; <u>voltae</u> Psv	Ser, Try, Tyr
	5c	<u>Methanococcus vanniellii</u> SB	protéine
	5d	<u>Methanococcus vanniellii</u> SB	protéine
	5e	<u>Methanococcus vanniellii</u> SB	protéine
	5f	<u>Methanococcus vanniellii</u> SB	Arg, Phe, Lys
227	8a	<u>Methanosarcina barkeri</u> 227-MS	glucose
	8b	<u>Methanosarcina barkeri</u> 227-MS	inconnue
	8c	<u>Methanosarcina barkeri</u> R1M3	inconnue
JF1	1a	<u>Methanospirillum hungatei</u> JF1	protéine
JR1c	7a	<u>Methanogenium cariaci</u> JR1c	protéine

(Tableau XI). Six anticorps monoclonaux (4A-4F) ont servi à définir les déterminants antigéniques de la souche Methanobacterium thermoautotrophicum ΔH (CONWAY DE MACARIO et col., 1983). Ces résultats, bien qu'obtenus sur un petit nombre de souches, montrent que les deux déterminants E et F sont spécifiques de la souche ΔH tandis que les déterminants A, B, D montrent une spécificité au niveau de l'espèce. La détection de C chez les espèces formicicum et thermoautotrophicum laisse supposer un caractère antigénique commun. Ces travaux ont été étendus à d'autres Méthanobactériales : Methanobrevibacter smithii PS, et Mb arboriphilicus DH1 (CONWAY DE MACARIO et col., 1985, 1982d). Chez Methanobrevibacter smithii, 5 des 6 anticorps monoclonaux reconnaissent un déterminant distinct. La structure complète de ces déterminants n'est pas définie. Il semblerait que ni les sucres, ni les aminosucres ne constituent les épitopes immunodominants, mais que les protéines et les acides aminés seraient les composants majeurs.

L'anticorps obtenu par immunisation de Methanobrevibacter arboriphilicus DH1 : 3A est inhibé par complémentarité avec le peptide glu-ala et semble spécifique de la souche DH1.

Un seul représentant de l'ordre des Méthanococcales, Methanococcus vanniellii SB, a servi à l'immunisation et l'obtention de 6 anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement un déterminant antigénique de nature protéique, localisé sur la couche S. Certains acides aminés présents dans les épitopes ont pu être identifiés par inhibition compétitive (CONWAY DE MACARIO et col., 1984).

Les trois anticorps monoclonaux (8A, 8B, 8C) semblent caractériser spécifiquement l'hétéropolysaccharide de surface des Methanosarcina (GARBERI et col., 1985). Les déterminants 8A, 8B sont détectés à la fois sur Methanosarcina barkeri 227, souche immunisante, et Methanosarcina barkeri MS. Le déterminant 8C s'exprime uniquement sur la souche R1M3, il est présent chez la souche 227 mais non exposé en surface et donc inaccessible aux anticorps s'il n'y a pas rupture de la paroi rigide. La nature chimique des déterminants 8B, 8C n'est pas connue, le glucose a été déterminé comme constituant majeur de 8A.

Methanospirillum hungatei JF1 et Methanogenium cariaci JR1c complètent les souches étudiées. Toutes deux présentent en surface un déterminant antigénique de nature protéique non détecté chez les autres méthanogènes (CONWAY DE MACARIO et col., 1986).

TABLEAU XII

Concentration des coenzymes et des vitamines chez les méthano­gènes

COMPOSE	CONCENTRATION DANS LES CELLULES ENTIÈRES (mol/g de poids sec)
Coenzyme M	0,3 - 16
Coenzyme F420	0,7 - 2,7
Méthanoptérine	0,7 - 1,3
Coenzyme F430	0,2 - 0,8
Méthanofurane	> 0,3
Corrinoïdes	0,1 - 4,0
Acide nicotinique	0,07 - 2,0
Acide panthoténique	0,02
Riboflavine	0,07 - 0,09
Thiamine	7×10^{-4}
Acide folique	$< 4 \times 10^{-5}$

B I O C H I M I E D E L A M E T H A N O G E N E S E

I.- LES COENZYMES SPECIFIQUES

Les bactéries méthanogènes se caractérisent par un certain nombre de coenzymes spécifiques, mis en évidence uniquement chez ce type bactérien avec des taux variables selon la souche étudiée (Tableau XII). Ils jouent un rôle clé dans les mécanismes de biosynthèse du méthane à partir de composé monocarboné ou d'acétate.

I.1.- Les corrinoïdes

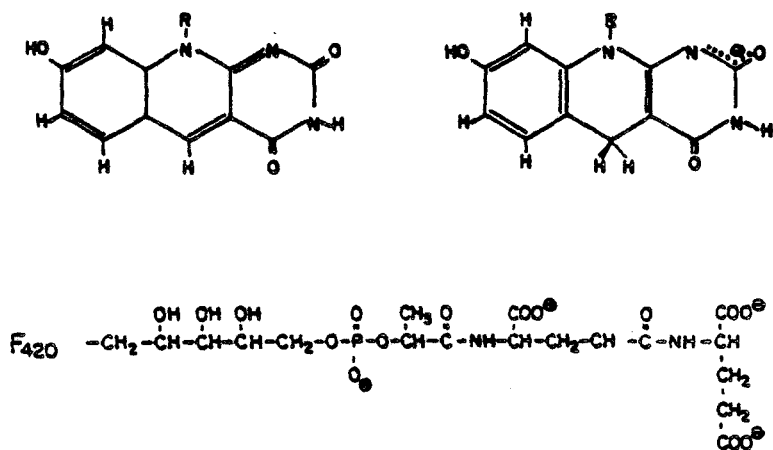
Mise en évidence en quantité importante, la 5 hydroxybenzimidazol cobamide est la forme la plus répandue dans les cultures pures de méthanogènes.

Le rôle précis des corrinoïdes est à ce jour inconnu. Leur abondance dans la cellule laisse supposer une fonction majeure dans la méthanogenèse (KENEALY et col., 1981 ; POL et col., 1982).

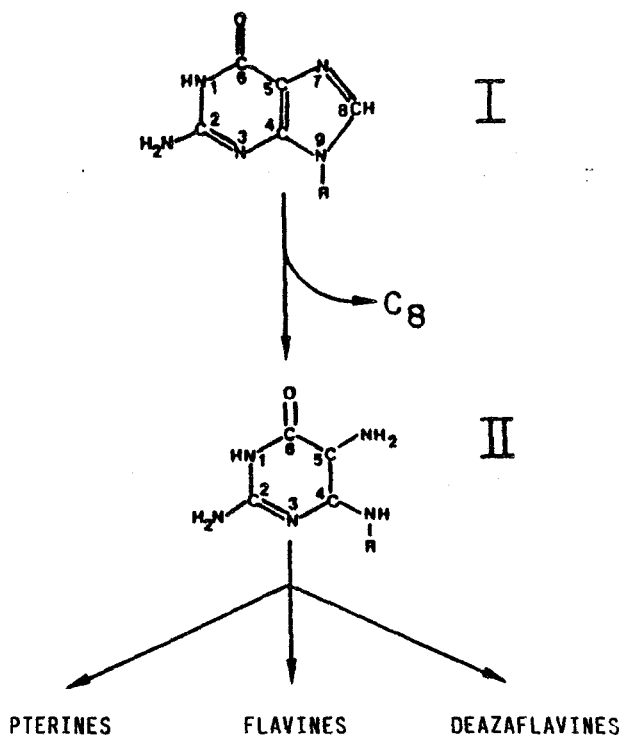
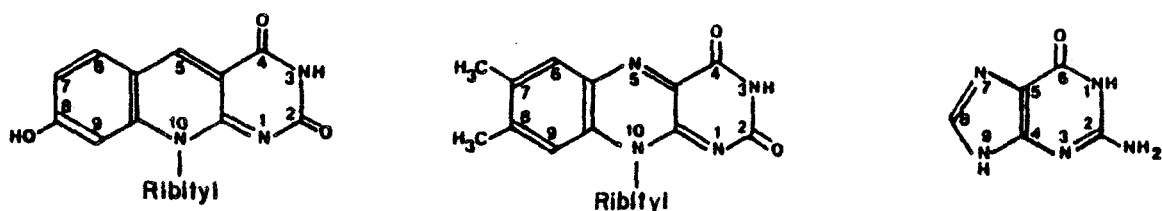
I.2.- Le coenzyme F 420

Mis en évidence chez les méthanogènes à des taux variables (Tableau XII), ce coenzyme isolé par TZENG et col. en 1975, jouerait le rôle de transporteur d'électrons associé à différentes enzymes : hydrogénase, formate déhydrogénase, NADP-réductase, pyruvate synthétase, α - céto glutarate synthétase et carbone monooxide

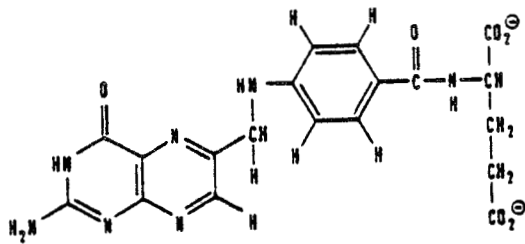
FIGURE n° 19 : LES FORMES OXIDEES ET REDUITES DU COENZYMES F420



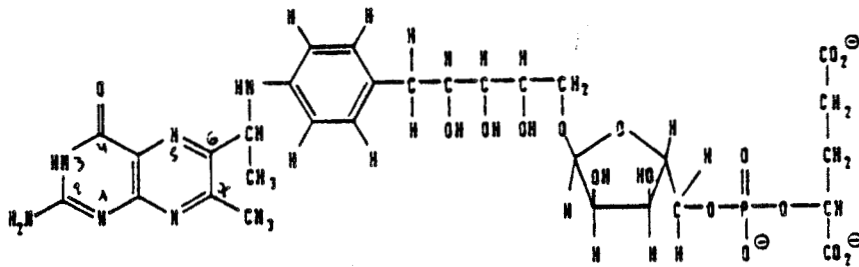
E n° 20 : STRUCTURE DE LA 7,8-DIMETHY-8-HYDROXY-5-DEAZARIBOFLAVINE , DE LA RIBOFLAVINE ET DE LA GUANINE
 le F420 est le 7,8-diméthyl-8-hydroxy-5-deazariboflavine-5- phosphate



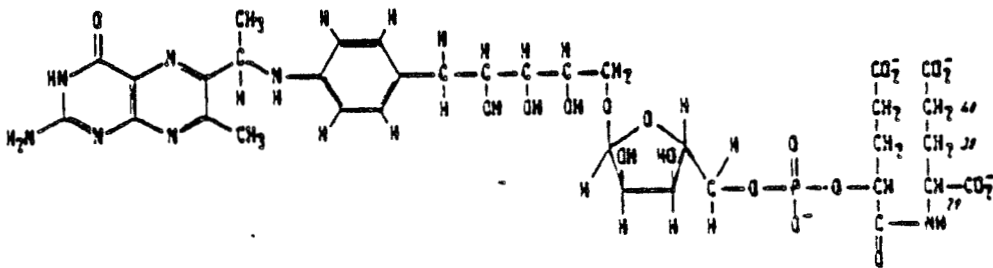
MECANISME COMMUN A LA BIOSYNTHESE DES PTERINES , FLAVINES ET DEAZAFLAVINES



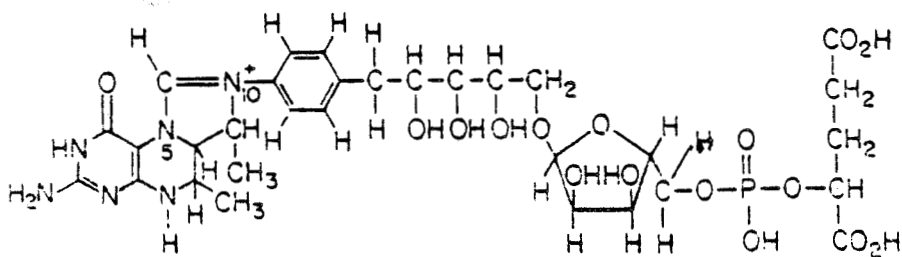
A



B



C



D

FIGURE n° 21 : STRUCTURES DE L'ACIDE FOLIQUE (A) , DE LA METHANOPTERINE (B) , DE LA SARCINAPTERINE (C) DE LA TETRAHYDROMETHANOPTERINE (D) .

déhydrogénase (WHITMAN, 1985). Son potentiel rédox est de $E_0 = -373$ mV. Sous sa forme oxydée, il émet une fluorescence caractéristique et absorbe à 420 nm à pH neutre ou basique.

Sa structure complète a été définie par EIRICH et col. (1978, 1979) à partir de Mb thermoautotrophicum (Fig. 19).

Fixé à un chromophore identique, 4 ou 5 résidus d'acide glutamique, au lieu de 2, étaient mis en évidence sur le F 420 extrait de Methanosarcina barkeri (VAN BEELEN et col., 1983b).

Des recherches sur la biosynthèse du coenzyme F420 ont montré (JAENCHEN et col., 1984) que la guanine était à l'origine du noyau pyrimidique de la déazaflavine, comme dans le cas des dérivés flaviniques. Methanobacterium thermoautotrophicum est marqué en présence de (^{14}C -2). Par contre, l'absence de marquage à partir de guanine (^{14}C -8) suggère la libération d'un méthyl au cours de la synthèse (Fig. 20).

I.3.- La méthanoptérine MPT

Ses ressemblances biochimiques et structurales (Fig. 21) avec l'acide folique sont parfaitement reconnues. Deux types de méthanoptérines isolées de souches différentes Methanobacterium thermoautotrophicum (KELTJENS et col., 1983) et Methanosarcina barkeri (VAN BEELEN et col., 1984 a,b) avaient déjà été remarqués en C.L.H.P. (THOMAS, 1983), leur différence résultant uniquement en un dérivé L-glutamyl de la méthanoptérine. Son rôle, sous sa forme tétrahydrogénée H4MPT est majeur dans les étapes intermédiaires de réduction du CO_2 en CH_4 (VOGELS et col., 1982). Différents composés précédemment isolés : F342, GUNSALUS et WOLFE 1978 ; YFC yellow fluorescent compound, DANIELS et col., 1978 ; KELTJENS et col., 1983c ; FAF Formaldehyde activating factor, ESCALANTE-SEMERENA et col., 1984ab, seraient vraisemblablement des composés dérivés de la méthanoptérine, à savoir, respectivement, la 7 méthylptérine, la méthényl-tétrahydrométhanoptérine et la tétrahydrométhanoptérine (WOLFE 1985, WHITMAN 1986, KELTJENS 1986).

FIGURE n° 22 : STRUCTURE DU METHANOFURANE

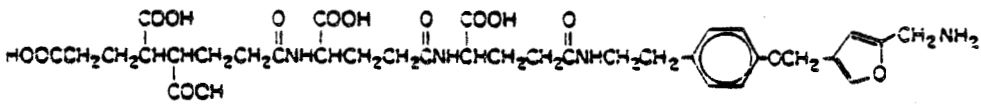


FIGURE n° 23 : STRUCTURE DU COENZYME M ET DE SES DERIVES

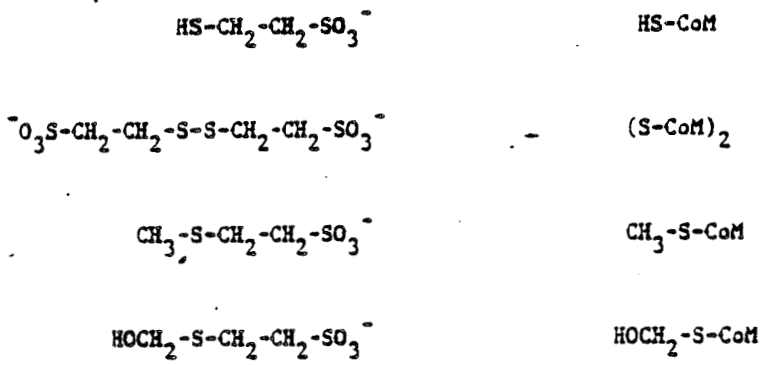
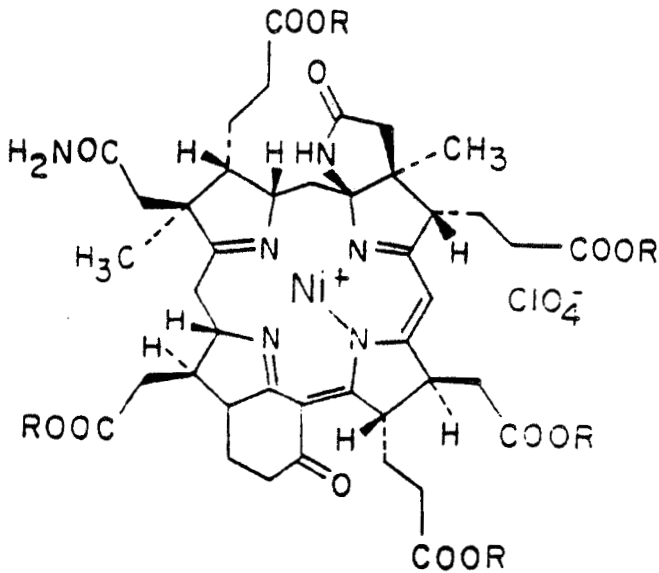


FIGURE n° 24 : STRUCTURE DU COENZYME F430



I.4.- Le méthanofurane

Un facteur réduisant le CO₂ (CDR factor) a été découvert en 1982 par ROMESSER et WOLFE à partir d'extrait de Methanobacterium thermoautotrophicum. Sa structure précise a été identifiée par LEIGHT et col., 1983, 1984 (Fig. 22), la présence d'un cycle furanique suggéra le nom de méthanofurane (MFR). L'incorporation de ¹⁴CO₂ montrant l'accumulation de formyl-méthanofurane en l'absence de méthanoptérine vérifierait l'hypothèse formulée par VOGELS que le CDR factor ou MFR jouerait un rôle clé dans l'étape initiale de la méthanogenèse.

I.5.- Le coenzyme M

Découvert en 1971 par Mc BRIDE et WOLFE, l'acide mercapto 2-éthane sulfonique ou coenzyme M se caractérise par sa petite taille, sa teneur élevée en soufre, sa forte acidité et sa stabilité à chaud en milieu acide.

Indispensable à la croissance de Methanobrevibacter ruminantium souche M1, il a été mis en évidence chez toutes les autres méthanogènes testées (BALCH, 1979). Isolé sous différentes formes dans la cellule (Fig. 23), il permettrait le transport de groupement méthyl, associé au facteur F430 et formerait le groupement prosthétique du complexe multienzymatique méthyl CoM réductase (KELTJENS et col., 1982).

I.6.- Le coenzyme F430

Suite à des recherches de biosynthèses et des études spectroscopiques, la structure du F430 est proposée (Fig. 24) par PFALTZ et col. (1982). C'est un complexe nickel-tétrapyrrole, dérivé tétra-hydrogéné de la corphine. La position de l'atome de Ni perpendiculaire au plan jouerait un rôle majeur dans la fonction

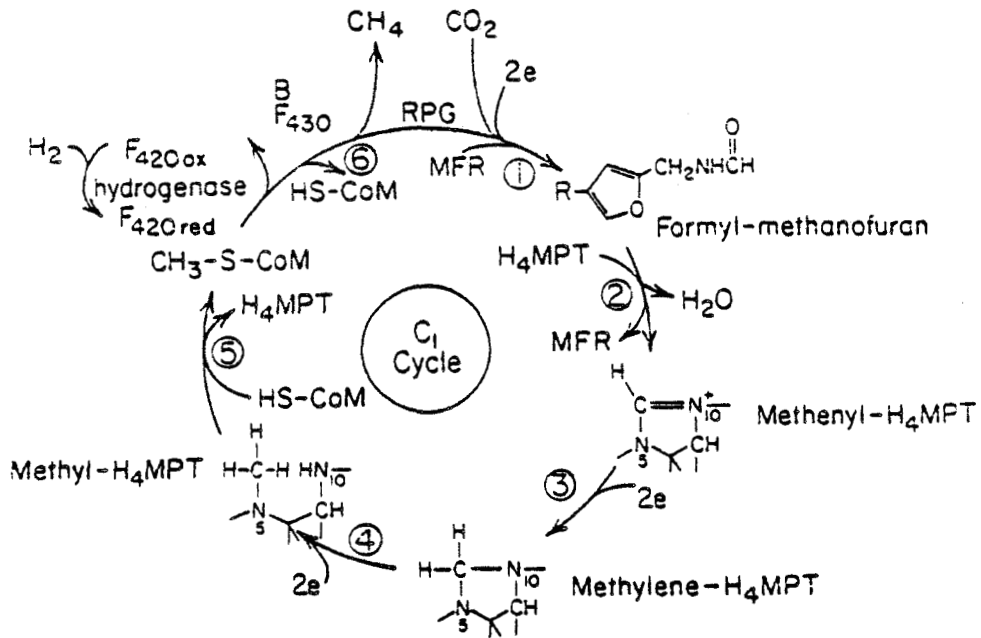


FIGURE n° 25 : SCHEMA SIMPLIFIE DU CYCLE DE REDUCTION DU CO₂ EN CH₄

MFR , methanofurane , H₄MPT , tetrahydrométhanoptérine
 CH₃-S-CoM , acide 2-méthylthioéthanesulfonique ,
 HS-CoM , acide 2- mercaptoéthanesulfonique
 RPG , couplage entre l'activation du CO₂ et la méthyl-
 CoM réductase

biologique du coenzyme (ANKEL FUCHS et col., 1986). De couleur jaune, non fluorescent, ce coenzyme présente une adsorption maximale à 430 nm.

A la périphérie du chromophore, différents éléments ont été détectés, liés par une liaison covalente : des acides aminés, des résidus glucidiques, une chaîne latérale identifiée comme la diméthyl-6,7-ribityl-8-tétrahydro-5,6, 7,8-lumazine (KELTJENS et col., 1983a). Différents dérivés issus du F430 sont connus (WHITMAN et WOLFE 1980, PFALTZ et col., 1985). KELTJENS et col. (1982) ont identifié une molécule MF430 formée de l'association des deux coenzymes CoM et F430 et constituant le groupement prosthétique de la méthyl CoM réductase (rapport molaire = 1).

II.- MECANISME DE SYNTHÈSE DU METHANE

L'isolement et la découverte des différents co-enzymes cités précédemment ont permis d'étudier et de définir leur rôle respectif dans les différentes étapes de la méthanogenèse. BARKER dès 1956 proposait un schéma reliant les différents substrats à un composé méthylé commun permettant la synthèse finale de méthane.

Ces réactions et leur interrelation ont été très étudiées (VOGELS 1982 ; ESCALANTE SEMERENA, 1983 ; KELTJENS, 1984). La figure 25 présente un profil simplifié de la méthanogenèse à partir du CO₂, montrant l'intervention successive des co-facteurs (JONES et col., 1985).

II.1.- Formation du formylméthanofurane

L'utilisation de produits marqués et des études en RMN ont montré que la réduction du CO₂ conduit à la formation de formylméthanofurane (LEIGHT et col., 1985). Thermodynamiquement peu favorable, cette réaction est possible grâce au couplage avec la réaction (n° 6) libérant CH₄ et coenzyme M, aucun autre mécanisme d'activation n'a été mis en évidence (ATP non exigé).

GUNSALUS et WOLFE en 1977, ROMESSER et WOLFE en 1982 ont montré que la réduction du CO_2 était stimulée d'un facteur 30 par addition de $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$. Cette activation de production de méthane est appelée effet RPG, elle justifie la présentation cyclique du schéma global.

II.2.- Obtention d'un dérivé méthylé

La tétrahydrométhanoptérine a été identifiée et quantifiée chez un grand nombre de bactéries méthanogènes (à l'exception de Methanospirillum hungatei) mais non détectée chez les Eubactéries (JONES et col., 1985). La tétrahydrométhanoptérine jouerait un rôle analogue à l'acide tétrahydrofolique présent chez les bactéries vraies comme transporteur de radicaux monocarbonés. Le groupement formyl du formylméthanofurane est d'abord réduit et transféré à la méthanoptérine pour donner la méthényl-méthanoptérine. Deux étapes complémentaires de réduction conduisent à la méthyl-méthanoptérine (ESCALANTE SEMERANA 1984, KELTJENS et col., 1986).

II.3.- Méthylation du CoM

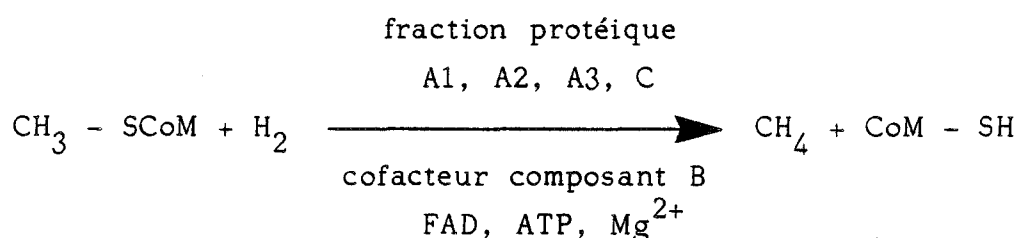
L'enzyme catalysant cette réaction est la méthyltransférase, elle assure l'échange du groupement méthyl entre la méthyl MPT et le CoM. Elle a été mise en évidence sur des cellules croissant sur H_2CO_2 mais aussi sur méthanol (SHAPIRO et WOLFE, 1980). A partir d'une culture de Methanosarcina barkeri sur méthanol, VAN DER MEIJDEN et col. (1983) ont montré que la méthylation du CoM exige la présence complémentaire de Mg^{2+} , d'ATP. Le méthyl CoM a été identifié comme le dérivé méthylé commun proposé dans le schéma de BARKER et apparaît actuellement comme le précurseur unique du méthane, quelque soit le substrat de croissance.

II.4.- Synthèse de méthane

La réduction du méthyl CoM en CH₄ est catalysée par le complexe enzymatique méthyl CoM réductase.

Cette réaction fortement exergonique joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique des bactéries méthanogènes. Ce processus est couplé à la synthèse d'ATP à partir d'ADP + Pi par un mécanisme chimiosmotique indépendant des ions Na⁺ (ROBERTON et col., 1980, BLAUT et col., 1986). La formation d'ATP est possible grâce à une ATP synthétase membranaire, et à un gradient de protons électrochimiques trans-membranaires, cette pompe à protons résultant du transfert d'e⁻ de l'hydrogène moléculaire au méthyl CoM.

L'importance métabolique, la complexité de cette réaction ont motivé de nombreux chercheurs à approfondir, à caractériser les différents constituants mis en jeu :



Les travaux de GUNZALUS et WOLFE 1980 sur Methanobacterium thermoautotrophicum ont montré la présence de 3 composants A, B, C obtenus par élution du complexe enzymatique sur chromatographie d'échange d'ions (DEAE cellulose), ces trois fractions étant complémentaires et indispensables à la déméthylation du méthyl CoM.

- le composant A (PM 500 000) de nature protéique a été lui-même résolu en trois fractions A1, A2, A3 associées au co-facteur FAD (NAGLE et col., 1983).

. La sous-unité A1 est la mieux connue : stable à l'oxygène, elle présente une activité hydrogénasique dépendante du coenzyme F420.

. Le constituant A2, non coloré, résistant à l'oxygène, est constitué d'une chaîne polypeptidique de poids moléculaire 55 000. Son rôle est encore inconnu mais plusieurs hypothèses ont été proposées : il pourrait intervenir dans l'activation du système

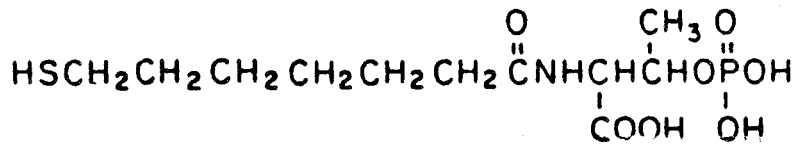


FIGURE n° 26 : FORME ACTIVEE DU COMPOSANT B

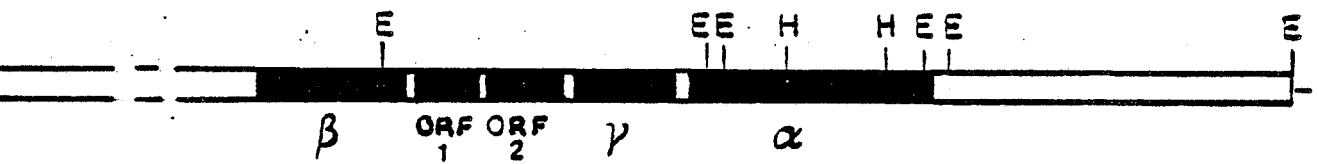


FIGURE n° 27 : ARRANGEMENT DES GENES DE LA METHYL REDUCTASE DE METHANOCOCCUS VOLTAE
 les deux fragments ORF1 , ORF2 n'ont pas de fonction connue

méthyl réductase par l'ATP ou présenter une activité méthylcobalamine coenzyme M méthylréductasique (ROUVIERE et col., 1985).

. Le constituant A3 est sensible à l'oxygène ; sa fonction spécifique est inconnue.

- le composant B (PM 343) sensible à l'oxygène et aux acides, est dépourvu d'acides aminés mais contient phosphate, sucre, azote (WHITMAN, 1985). Il est indispensable à la réduction du $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ avec H_2 ou NADPH comme donneur d'électrons et à la réduction du CO_2 dépendante du $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ (ELLEFSON et col., 1980 - ROMESSER et col., 1982 b). La structure de ce composé sous forme active a été déterminée : il s'agit du 7 mercaptoheptanoylthréonine phosphate HS-HTP (Fig. 26).

Son analogie structurale avec la pantéthéine 4 monophosphate, entrant dans la composition du coenzyme A, laisserait suggérer divers rôles possibles de ce coenzyme qui reste néanmoins à préciser (NOLL et col., 1986).

- le composant C (PM 300 000) a été purifié et caractérisé par ELLEFSON et WOLFE en 1981 à partir d'extrait de Methanobacterium thermoautotrophicum. Cette protéine acide, stable à l'oxygène, représente 12% des protéines solubles totales. Elle est constituée de trois sous-unités de poids moléculaires respectifs 68 000, 54 000, 38 500 dans une stoechiométrie $\alpha 2, \beta 2, \gamma 2$. Sa composition en acides aminés révèle un rapport de 2 entre les acides aminés acides et basiques et un rapport égal à 1,36 entre les polaires et les apolaires.

Défini sur Mc voltae souche PS et Mb thermoautotrophicum souche Marburg, l'ordre des gènes codant les trois sous-unités de cet enzyme est respectivement β, γ et α . Leur localisation étant très voisine, il pourrait constituer une seule unité de transcription (KONHEISER et col., 1984)(Fig. 27).

La comparaison des structures primaires des sous-unités α sur ces 2 souches a été réalisée après la détermination de la séquence d'ADN des gènes structuraux correspondants, une homologie élevée voisine de 71% a été observée (SCHALLENBERG et col., 1986). Une fréquence plus importante des bases adénine et thymine, guanine et cytosine a été observée respectivement sur la souche mésophile et

thermophile. ELLEFSON et col. en 1980 ont mis en évidence l'activité méthyl CoM réductasique de ce composé. Le groupement prosthétique de cet enzyme est constitué au moins de 2 moles des coenzymes M et F430 (KELTJENS et col., 1982 ; ELLEFSON et col., 1982). La présence caractéristique de nickel dans la composition du coenzyme F430 a permis sa détection en résonance paramagnétique électronique. Les formes Ni (I) ou Ni (III) étaient mises en évidence dans la méthyl CoM réductase active isolée de Mb thermoautotrophicum (ALBRACHT et col., 1986 ; ANKEL-FUCHS et col., 1986) et s'opposent à l'état d'oxydation (II) du nickel sous forme libre dans la cellule.

Le composant C a été détecté chez d'autres méthanogènes représentant les familles Methanococcaceae et Methanosarcinaceae. Sa purification de Methanosarcina barkeri s'est avérée plus complexe avec un rendement de 11% nettement inférieur au 50% obtenu avec les autres souches. L'étape supplémentaire nécessaire à la purification a révélé une protéine étroitement liée au composant C qui pourrait constituer une quatrième sous-unité de PM 56 000. L'addition de cette protéine n'était pas indispensable mais permettait de retrouver l'intégralité de l'activité enzymatique du système méthylréductase (HARTZELL et WOLFE, 1986). Deux protéines analogues ont été mises en évidence chez M. thermoautotrophicum et pourrait intervenir dans la réduction des dithiols permettant le dosage in vitro de l'activité réductasique en l'absence du composant A (ANKEL-FUCHS et col., 1986).

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

TABLEAU XIII

* Origine des souches utilisées et substrats de croissance
 () isolée à la Station de Technologie Alimentaire - I.N.R.A. -

GENRE	ESPECE	SOUCHE	N° DSM	Temp. de croissance (°C)	SUBSTRATS
<u>Methanobacterium</u>	<u>formicicum</u>	M4*	-	35	H ₂ /CO ₂ , formate
	<u>thermoautotrophicum</u>	ΔH*	1053	65	H ₂ /CO ₂
		TC5E*	-	65	H ₂ /CO ₂
		Marburg	2133	65	H ₂ /CO ₂
<u>thermoformicicum</u>	FTF*	-	55	H ₂ /CO ₂ , formate	
<u>Methanobrevibacter</u>	<u>arboriphilicum</u>	AZ	744	35	H ₂ /CO ₂
		DH1	1125	35	H ₂ /CO ₂
<u>Methanospirillum</u>	<u>hungatei</u>	JF1	864	35	H ₂ /CO ₂
<u>Methanosarcina</u>	<u>barkeri</u>	MS	800	35	acétate, méthanol, méthylamines, H ₂ /CO ₂
		3	805	35	acétate, méthanol, méthylamines
		UBS	1311	35	acétate, méthanol, méthylamines
		227	1538	35	acétate, méthanol, méthylamines
		FR1	2256	35	méthanol
	<u>mazei</u>	MC3*	2907	35	acétate, méthanol, méthylamines
		S6	2053	35	acétate, méthanol, méthylamines
	<u>thermophila</u> sp. sp.	TM1*	1825	55	acétate, méthanol; méthylamines
		MST*	2905	55	acétate, méthanol, méthylamines
		CHTI55	2906	55	acétate, méthanol, méthylamines
<u>vacuolata</u>		1232	35	acétate	
<u>Methanotherix</u>	<u>soehngeniei</u>	Opfikon	2139	35	acétate
	<u>concilii</u>	GP6*		35	acétate
	sp.	FE*	3013	35	acétate

I.- TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

I.1.- Culture de masse en milieu liquide

Le besoin constant, durant ces travaux, de cultures microbiennes en cours de croissance a nécessité le maintien d'un stock de cultures régulièrement renouvelé et représentatif des deux classes majeures de méthanogènes : hydrogénophiles et acétoclastes (Tableau XIII).

Les techniques anaérobies de HUNGATE modifiées par MILLER et WOLIN (1974) ont été utilisées pour la préparation des milieux et des cultures bactériennes car ces dernières sont extrêmement sensibles à l'oxygène. Le milieu de base utilisé est le BCYT décrit par TOUZEL et ALBAGNAC (1983), sa composition est détaillée en annexe 1. L'ensemencement des essais est réalisé à 2% (v/v) à partir d'une préculture sur le même substrat : acétate de sodium (50 mM), méthanol (20 mM), méthylamines (20 mM), mélange gazeux H₂/CO₂ (80/20, 1Atm).

I.2.- Suivi de la croissance bactérienne : mesure de la production de méthane

Un volume déterminé de gaz sous pression est prélevé à l'aide d'une seringue munie d'une valve. L'injection directe dans un chromatographe en phase gazeuse munie d'un intégrateur de type Intersmat ICR-1B permet une analyse qualitative et quantitative par corrélation directe avec une courbe d'étalonnage (surface en fonction de la quantité de méthane injectée). Les conditions de chromatographies sont les suivantes :

- chromatographe : PYE UNICAM GCD
- détecteur à conductivité thermique
- gaz vecteur : Hélium 2 bars, 50 ml/mn
- colonne : acier inox 4 mm x 3 m, remplie de Porapak S
- température de la colonne : 50°C
- température de l'injecteur : 60°C

- température du détecteur : 100°C

Le volume d'injection est de 1 ml.

II.- TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

II.1.- Dosage des protéines

La concentration en protéines a été déterminée par coloration au bleu de Coomassie selon la méthode de Bradford (1976) avec l'albumine sérique (SIGMA) comme étalon.

II.2.- Analyse de la composition en acides aminés

L'analyse des acides aminés a été réalisée par le laboratoire de P. SAUTIERE (C.N.R.S. UA 409) selon le protocole publié par B. LAINE et col. (1984).

II.3.- Dosage des sucres

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée après méthanolyse dans le méthanol - HCl 0,5 M anhydre à 80°C pendant 16 heures, suivie d'une dérivation par l'anhydride trifluoroacétique selon la méthode de ZANETTA et col. (1972).

II.4.- Electrophorèses en gel de polyacrylamide

- En conditions dénaturantes, les électrophorèses en gel de polyacrylamide-SDS 1 g/l ont été réalisées selon la méthode de Laemmli (1970-1973) pour le protocole expérimental et selon les propositions de KERCKAERT (1978) pour la réalisation en plaques verticales. Nous avons utilisé soit un gel de séparation isocratique

(10%) soit un gradient de 7 à 15% avec dans les deux cas un gel de concentration (5%). Les échantillons ont été repris dans un tampon de lyse (Tris-HCl 3M pH 8,9 ; 5% SDS ; 5% β -mercaptoéthanol ; 20% glycérol) à raison de 16 mg de cellules sèches par ml. Avant dépôt (teneur en protéines 2 mg/ml) les mélanges ont été portés à 100°C pendant 2 minutes. Après migration, les plaques ont été colorées pour la révélation des protéines soit par le mélange isopropanol (25%), acide acétique (10%), bleu de Coomassie R 250 (0,02%) pendant 2 h., puis décolorées en présence d'acide acétique (10%), soit avec une sensibilité supérieure par la coloration au nitrate d'argent (MOLLISEY, 1981). Pour la mise en évidence des glycoprotéines, les gels sont révélés par coloration au réactif de SCHIFF après oxydation périodique. La détermination du poids moléculaire des différentes bandes protéiques a été définie grâce aux kits de calibration de haut et bas poids moléculaire (Pharmacia Chemicals). L'intensité des bandes protéiques a été obtenue avec le densitomètre LKB.

- En conditions non dénaturantes, le protocole expérimental est identique aux conditions précédemment citées en l'absence de SDS. L'échantillon protéique a été ajusté à une concentration de 2 mg/ml dans le tampon d'électrophorèse. Après découpage de la bande protéique et son mélange homogène avec de l'acrylamide 10%, l'électroélution est réalisée avec le même tampon 20 heures à 60 mA.

- Le point iso-électrique de la protéine a été déterminé par électrofocalisation sur plaques de gels d'ampholines LKB ($3,5 < \text{pHi} < 9,5$). Après élimination complète des ampholines, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie, le gradient de pH étant déterminé par découpage et élution de bandes de 0,5 cm.

II.5.- Chromatographies

- La chromatographie d'exclusion sur gel a été réalisée sur Ultrogel ACA 34 (IBF) qui permet une séparation linéaire entre 20 et 350 Kdaltons. Le tampon de stabilisation et d'élution est le Tris-HCl (25 mM), NaCl (0,1 M), pH 7,2. Les dimensions de la colonne sont de

85x3cm avec un débit de 18 ml/h/cm². Selon les essais de purification, nous avons déposé le surnageant après polytronage des cellules bactériennes ou le surnageant obtenu après lyse cellulaire à la presse de French (130 000 KPa).

- La chromatographie d'échange d'ions a été réalisée sur une colonne DEAE-TRISACRYL M (IBF) 7x3cm. Le débit est de 14 ml/h/cm², le gel est stabilisé dans le tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,2, l'élution se fait par un gradient continu en NaCl de 0 à 0,25 M.

- L'éluat des colonnes chromatographiques a été analysé à une longueur d'onde de 280 nm grâce au détecteur continu LKB. Toutes les mesures de densité optique et les tracés de spectres UV-visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre UVIKON modèle 810 en cuve de quartz de 1 cm.

- La chromatographie liquide haute performance a été réalisée sur un chromatographe Waters muni :

- d'un injecteur automatique WISP
- de deux pompes 6000 A couplées à un programmeur de gradient M 660
- d'un système de colonne à compression radiale RCS
- d'un détecteur UV-visible à variation continue de longueur d'onde modèle M 450

* Coenzyme F 430

La séparation des coenzymes et la détection du coenzyme F 430 a été possible sur une Lichrosorb RP 18 (10 µm) Merck. Après déprotéinisation de l'échantillon par addition de méthanol 80% bouillant et refroidissement dans la glace 30 min., le surnageant de centrifugation contenant le groupement prosthétique soluble a été identifié selon la méthode de VAN BEELEN et col. (1983), une solution étalon de F 430 nous servant de référence (THOMAS, 1983).

* Coenzyme M

La colonne en phase inverse C18 Waters a été utilisée ainsi que le contre-ion Pic A (tétra butyl ammonium Phosphate) pour la séparation des dérivés du méthyl co-enzyme M. La phase mobile est composée des solutions A : méthanol-eau 10%-pic A et B : méthanol-eau 30%-pic A. Après 5 minutes du mélange A (90%)-B (10%), un gradient de forme concave en 10 min. permet l'obtention d'une phase mobile composée de A (70%) B (30%). La longueur d'onde de détection est 204 nm. Une solution de sel de sodium de l'acide mercapto 2-éthane sulfonique Merck à 1 g/l nous sert d'étalon.

II.6.- Ultracentrifugation différentielle

L'ultracentrifugeuse Kontron modèle T-2060 (rotor TFT6538) a été utilisée à des vitesses différentes (12 000xg, 50 000xg, 110 000xg, 200 000xg) et des temps de 60 et 120 min. permettant une analyse qualitative directe des surnageants de centrifugation en PAGE.

III.- TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

III.1.- Obtention des séra immuns

L'ensemble des travaux a été réalisé avec des anticorps polyclonaux obtenus sur des lapins.

a.- Les cellules entières des souches utilisées ont été injectées dans le coussinet plantaire selon le protocole de CONWAY DE MACARIO et col. (1981). Dans le cas de Methanothrix FE, nous avons également préparé des immunséra par hyperimmunisation intra-veineuse classique.

b.- Les lysats cellulaires de Methanosarcina mazei ont été obtenus par passage à la presse de French. La protéine ou ses sous-unités ont été préparées par découpage et broyage des bandes de gel polyacrylamide-SDS en suspension dans le tampon Tris

(0,05 M) glycine (0,38 M) pH 8,3. La teneur en protéine de ces préparations antigéniques a été ajustée à 200 µg/ml. L'émulsion antigénique a été obtenue en mélangeant 1 ml de solution, 1 ml d'adjuvant complet de Freund et 5 mg de Mycobacterium butyricum lyophilisé. Les lapins ont été immunisés par injection intra-dermique en 40 points dorsaux. La réponse immunitaire a été stimulée par injection intra-musculaire simultanée de 1 ml de vaccin anti-coquelucheux. Après un rappel 5 semaines plus tard en présence d'adjuvant incomplet de Freund, le sang est collecté après 4 semaines par ponction intra-cardiaque.

III.2.- Analyses immunologiques

III.2.1.- Immunofluorescence indirecte (IFI)

Selon la morphologie de la bactérie étudiée (bacilles, filaments ou sarcines) deux protocoles différents ont été utilisés pour la réaction d'IFI. L'expérience montrant qu'il est impossible de fixer les sarcines sur lame, les différentes étapes de la réaction antigénique ont été réalisées en tube épendorf, l'intensité de la fluorescence étant lue après dépôt des cellules entre lame et lamelle.

Après traitement des cellules bactériennes au formaldéhyde 4% en tampon NaCl (8,5 g/l) puis lavages dans une solution de PBS (NaCl 7,65 g ; Na₂HPO₄ 12H₂O 1,82 g ; KH₂PO₄ 0,21g qsp 1 000 ml), la réaction d'IFI a été réalisée sur une suspension ajustée à une D.O. de 0,1. Dans le cas des bactéries agrégées de type sarcine, le pré-traitement est réalisé dans l'acétone pur ce qui permet d'éliminer toute fluorescence naturelle. Le protocole de CONWAY DE MACARIO et col. (1980) a été utilisé pour les réactions antigènes-anticorps, avec des immunoséras titrés et de l'immunosérum de chèvre anti-IgG de lapin marqué au fluoroisothiocyanate (CAPPEL, 3 mg de fluorescéine/g de protéine).

III.2.2.- Techniques d'immunoprécipitation

L'immunodiffusion double, les immuno-électrophorèses mono- et bidimensionnelles ont été utilisées dans nos essais selon les techniques classiques de OUTCHERLONY (1949), GRABAR et WILLIAMS

(1953), CLARKE et FREEMAN (1968). Les extraits antigéniques sont en tampon véronal (0,05 M) pH 8,2 et obtenus après polytronage de cellules 2 min. à faible vitesse, ou après lyse par passage à la presse de French (130 000 KPa).

III.2.3.- Immunodétection sur nitrate de cellulose ou "immunoblotting"

De mise au point plus récente (TOWBIN et col., 1979), cette technique très performante permet le repérage d'antigènes à partir d'électrophorèse en gel de polyacrylamide. Après transfert des bandes protéiques sur feuille de nitrocellulose (4 heures, 0,3A/60V), les antigènes ont été révélés à l'aide des immunoséras dilués et un sérum de chèvre anti-Ig de lapin conjugué à la peroxydase de radis noirs (Annexe 2).

IV.- LA MICROSCOPIE

IV.1.- La microscopie en UV-visible

Toutes les observations en contraste différentiel ont été faites avec un microscope Nacet NS 400. Les examens en immunofluorescence ont été effectués avec un LEITZ-ORTHOPLAN.

IV.2.- La microscopie électronique

Pour nos essais, toutes les cellules ont été fixées directement dans les flacons de culture pour une meilleure préservation des conditions d'anaérobiose. Cette fixation in situ améliore considérablement la qualité des images obtenues.

Dans le cadre des observations de routine, la fixation des cellules a été réalisée en 1 heure dans le tampon cacodylate (0,07 M) pH 7,3 contenant de la glutaraldéhyde (1,2% w/v) et du rouge de ruthénium (0,05% w/v). Après lavage en cacodylate 0,07 M

- rouge de ruthénium 0,05%, les échantillons ont été préfixés dans 1% OsO_4 , cacodylate 0,07 M et rouge de ruthénium 0,05%. Après inclusion à Epon, les sections ultra-fines ont été colorées avec de l'acétate d'uranyle (2% w/v) dans de l'éthanol (50% w/v) puis avec du citrate de plomb selon la méthode décrite par REYNOLDS (1963).

Les colorations d'immunomarquage à l'or ont été réalisées sur les bactéries préalablement fixées en tampon PBS (tampon phosphate 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM) contenant 4% w/v de formaldéhyde et 0,1% w/v de glutaraldéhyde. Elles sont ensuite incluses en lowicryl K4M selon la méthode de ROTH et col. (1981). La préparation de la protéine A marquée à l'or (5 nm) a été faite selon la technique de SLOT et GEUZE (1985) permettant l'immunodétection des coupes ultra-fines. Des contrôles négatifs ont été effectués en parallèle, en présence unique soit de la protéine A marquée à l'or ou des anticorps.

Toutes les observations ont été exécutées sur un microscope électronique HITACHI HU 12 A.

1ERE PARTIE

**ANALYSE NUMERIQUE DES PROFILS PROTEIQUES TOTAUX
APPLIQUEE AUX BACTERIES METHANOGENES**

NB : Les figures de la partie "Résultats" ont été regroupées à la fin de ce mémoire.

ANALYSE NUMERIQUE DES PROFILS PROTEIQUES TOTAUX APPLIQUEE AUX BACTERIES METHANOGENES

Parfaitement reconnue chez les Clostridia, où deux souches qui présentent une homologie ADN/ADN supérieure à 80% montrent habituellement des profils protéiques identiques (JONES et col., 1984), cette méthode a été utilisée en taxonomie pour de nombreux autres genres bactériens (KERSTERS et col., 1980).

Nous avons utilisé l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS gradient 7 → 15% sur un certain nombre de souches représentatives des bactéries méthanogènes avec deux objectifs majeurs :

- vérifier la validité de la méthode par comparaison avec la classification de référence établie par BALCH 1979.

- apporter un critère taxonomique complémentaire à l'identification de nouveaux isolats obtenus au laboratoire par J.P. TOUZEL.

I.- LES PROFILS ELECTROPHORETIQUES

La concentration en protéine a été estimée par turbidimétrie après précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique. En effet, des interférences importantes sont observées avec les techniques classiques de dosages des protéines (LOWRY, BRADFORD). Elles sont probablement dues à la présence de SDS et β -mercaptoéthanol à des taux élevés dans le tampon de lyse. Le gradient 7 + 15% a été choisi pour une meilleure interprétation des résultats car il permet l'obtention de bandes fines et échelonnées sur toute la longueur du gel pour des poids moléculaires apparents compris entre 90 000 et 13 000.

Des essais préliminaires de lyse à chaud ont montré que le temps n'intervenait que sur la concentration finale en protéines solubles et qu'après 10 min., celle-ci n'augmentait plus. Nous avons donc retenu les conditions suivantes : 15 minutes à 100°C.

La simple observation visuelle des gels apporte des renseignements intéressants pour la comparaison ou le regroupement rapide des souches (Fig. 29 & 30, p. 81).

- Nous pouvons différencier facilement les profils représentatifs des bactéries hydrogénophiles par un nombre élevé de bandes protéiques spécifiquement vers les bas poids moléculaires. Très fines elles présentent toutes une même intensité de coloration.

- Les profils caractérisant les bactéries acétoclastes s'identifient par la présence de quelques bandes majeures principalement situées dans les poids moléculaires moyens. Parmi celles-ci figurent les 3 bandes S1 : 68 000, S2 : 43 200, S3 : 30 500 daltons qui seront plus précisément étudiées dans la seconde partie de ce travail.

- L'influence du substrat de croissance sur le profil protéique cellulaire n'est pas toujours flagrante. Cependant, chez M. barkeri, le profil sur acétate est très différent de ceux obtenus après culture sur méthanol, méthylamines ou H₂/CO₂.

II.- OBTENTION DU TABLEAU DE DONNEES

Les densitogrammes représentatifs des différents profils électrophorétiques ont permis de quantifier les distances de migration et l'intensité de chaque bande protéique.

L'addition d'un étalon interne utilisé par KERSTERS et DELEY (1975) n'a pas été retenu dans notre étude pour ne pas alourdir les profils, (le nombre de bandes avoisinant parfois les 40) et pour ne pas avoir de superposition avec une protéine de l'échantillon. L'analyse des différents profils électrophorétiques nous a conduit à

définir une échelle de 80 intervalles représentant une fourchette de poids moléculaire définie logarithmiquement sur un écart total de 90 000 à 13 000 daltons.

Chaque gel a été standardisé grâce à des témoins externes de bas et haut P.M. A partir de ce premier étalonnage, la masse moléculaire moyenne de bandes caractéristiques et communes à un grand nombre de souches a été déterminée. Ces bandes ont ensuite été utilisées comme étalon interne afin de corriger les défauts de chaque échantillon.

Le tableau de base (Annexe 3) présente le profil électrophorétique de chaque souche "i" où les bandes caractérisées par leur intensité "X(i,j)" (hauteur de pic mesurée) figurent dans une colonne précise en fonction de leur PM "j". L'analyse numérique est réalisée sur un tableau de données où toutes les hauteurs de pics sont normalisées selon le rapport $X(i,j) / \sum X_j$. Selon nos essais, nous avons modifié le tableau de contingence en supprimant ou des individus, ou des variables, afin d'étudier les implications taxonomiques de différents paramètres.

III.- ANALYSE NUMERIQUE

III.1.- Choix de la matrice 18x64

Cette matrice est constituée des 18 souches étudiées cultivées sur leur substrat préférentiel (H_2/CO_2 ou acétate) pour éviter toute influence du substrat. Les bandes présentes chez un seul individu ou très faibles ont été négligées, ce qui a conduit à 64 bandes protéiques significatives.

III.1.1.- Matrice des coefficients de corrélation de PEARSON

Nous différencions facilement deux groupes majeurs, les Méthanomicrobiales et les Méthanobactériales sur le diagramme obtenu à partir de la matrice de corrélation (Fig. 31, p. 82). Sur la base plus fine d'une similitude supérieure à 50% trois phénons

s'identifient, le premier regroupant les 9 souches de Methanosarcina, le second les souches de Methanobrevibacter et le dernier les souches de Methanobacterium. Au groupe des Methanosarcina se joint ensuite Methanothrix sp FE puis, avec une similitude de 35% Methanospirillum hungatei JF1. Malgré sa croissance sur H_2CO_2 , cette dernière est reliée aux Méthanomicrobiales, confirmant la classification de BALCH (1979). Methanosarcina vacuolata ne présente aucune relation spécifique ni avec les Méthanomicrobiales, ni avec les Méthanobactériales et se différencie du groupe homogène formé par les bactéries du même genre.

III.1.2.- Analyse en composante principale - ACP -

L'ACP conduit à l'obtention de 6 axes principaux qui supportent 68% de l'inertie totale du nuage de points. Les coordonnées des points sur chaque axe pris deux par deux nous permettent d'apprécier la position relative des points dans l'espace (Fig. 32, p. 83).

- L'axe 1 différencie deux groupes : les méthanogènes hydrogénophiles et les méthanogènes acétoclastes.

- L'axe 2 montre une individualisation très nette de Methanosarcina vacuolata (L) par rapport aux autres sarcines étudiées.

- Sur l'axe 3, cette même observation est constatée pour Methanothrix soehngeni FE (A).

- L'axe 4 sépare les souches codées 4 et 5 représentantes du genre Methanobrevibacter mais aussi, et à l'opposé, Methanospirillum hungatei JF1 (6). Les autres souches hydrogénophiles forment un groupe compact au centre n'apportant aucune précision taxonomique complémentaire. Parmi les Methanosarcina aucun regroupement n'est visible sur l'axe 4.

- L'axe 5 sépare les hydrogénophiles regroupant d'une part les Methanobacterium thermoautotrophicum (2, 3) et Methanobacterium formicicum (1), et d'autre part Methanobacterium thermoformicicum (7), Methanobrevibacter arboriphilus (4, 5) et Methanospirillum hungatei (6).

- L'axe 6 différencie les thermophiles des autres sarcines.

Les Methanosarcina barkeri se caractérisent par l'absence d'uniformité. Cette différenciation est très nette pour la souche 227 (J). A l'opposé, les groupes Methanosarcina mazei (E, F) et Methanosarcina thermophila (B, C, D) sont toujours très compacts, quelque soit l'axe étudié.

Il est à remarquer sur chaque axe, des bandes caractéristiques, si les variables sont positionnées dans l'espace des individus (Fig. 33, p. 83). En effet, dans cet espace les variables étant normées, celles qui sont proches d'un cercle de rayon 1 centré sur l'origine sont bien représentées, et deux variables proches l'une de l'autre sont bien corrélées. Ainsi V 33 et V 49 sont toutes deux bien représentées sur l'axe 1 où elles sont très voisines. Nous pouvons donc admettre que ce sont deux bandes très caractéristiques des acétoclastes par opposition avec les bandes V 51 et V 77 qui caractérisent les hydrogénophiles sur ce même axe, ces bandes V 33 et V 49 correspondant aux sous-unités S3, S2 de la protéine qui fait l'objet de la seconde partie de cette thèse.

De même, la seule bactérie possédant à la fois les bandes V 07 et V 10 est Methanosarcina vacuolata.

III.1.3.- Analyse hiérarchique ascendante

Différents critères d'agrégation en analyse hiérarchique ont été utilisés afin de comparer les arbres et les regroupements avec les résultats obtenus précédemment.

III.1.3.1.- Maximisation du moment centré d'ordre 2 d'une partition Méthode de Ward

Au niveau 0,45, l'arbre obtenu (Fig. 34, p. 84) met en évidence quatre groupes distincts dont deux principaux constitués de la plupart des hydrogénophiles et des acétoclastes. Les deux autres groupes sont constitués d'une part des trois souches : Methanospirillum hungatei (6), Methanosarcina vacuolata (L) et Methanosarcina barkeri 227 (J), et d'autre part de Methanotherix sp. FE (A). Il est à remarquer que les souches s'agrégeant les premières sont d'abord les deux souches de Methanosarcina mazei (E, F), puis les Methanosarcina thermophiles (B, C, D). Les regroupements les

plus proches s'observent ensuite entre les Methanobrevibacter arboriphilicus (5, 4) et les Methanosarcina barkeri MS (H) et UBS (I).

Methanotherix sp. FE (A) s'agrège plus rapidement avec les Methanosarcina qu'avec les bactéries de morphologie bacillaires et hydrogénophiles. Nous pouvons observer la liaison de Methanosarcina barkeri 227 (J) et de Methanospirillum hungatei JF1 qui rejoignent ensuite Methanosarcina vacuolata (L). Ces trois souches ont une position intermédiaire vis à vis des deux groupes majeurs.

III.1.3.2.- Minimisation du moment centré d'ordre 2 des classes

Au niveau 0,7, nous pouvons distinguer quatre groupes principaux (Fig. 35, p. 84) :

- le premier regroupant la majorité des Méthanomicrobiales étudiées où se distinguent 3 sous-groupes. Les Methanosarcina barkeri MS (H) et UBS (I), les Methanosarcina thermophiles (D, C, B) avec une très grande identité entre les souches, et les Methanosarcina mazei (E, F) associées à Methanosarcina barkeri 3 (G).

- le second groupe est hétérogène et l'on y retrouve l'association Methanospirillum JF1 (6), Methanosarcina barkeri 227 (J) et deux hydrogénophiles thermophiles Methanobacterium thermoautotrophicum ΔH (2) et Methanobacterium thermoformicum FTF (7).

- le troisième groupe montre quatre souches regroupées deux à deux les Methanobrevibacter arboriphilicus AZ, DH1 (4, 5) et les Methanobacterium thermoautotrophicum TC5E (3) et formicum M4 (1).

- le groupe 4 est formé des deux souches Methanotherix soehngeni FE (A) et Methanosarcina vacuolata (L).

Nous pouvons remarquer, une agrégation très rapide des souches, selon ce critère les quatre regroupements majeurs sont formés avec une distance normée inférieure à 0,3. Malgré des regroupements toujours vérifiés, nous observons quelques associations assez "insolites", plus spécifiquement parmi les Méthanobactériales.

III.1.3.3.- Minimisation de la distance moyenne entre les classes

Comparativement à l'arbre précédent, l'ensemble des regroupements montre une distance normée supérieure à 0,5 à l'exception des Methanosarcina mazei (E, F), des 3 sarcines thermophiles (D, C, B) et des Methanobrevibacter arboriphilus DH1 (4), AZ (5) (Fig. 36, p. 85). Nous retrouvons avec cette analyse les deux clusters majeurs composés des Méthanobactériales et des Méthanomicrobiales, se distinguent à nouveau les quatre souches : Methanospirillum hungatei JF1 (6), Methanosarcina barkeri 227 (J), Methanotherix soehngenii FE (A) et Methanosarcina vacuolata (L) dont la position taxonomique précise est assez confuse. Parmi les Méthanobactériales, la souche FTF malgré son appartenance au genre Methanobacterium se relie plus vite au genre Methanobrevibacter.

Parmi les Méthanomicrobiales, nous retrouvons les Methanosarcina mazei (E, F) agrégées aux sarcines thermophiles (B, C, D), puis aux deux souches de Methanosarcina barkeri MS (H), et UBS (I) qui se différencient de Methanosarcina barkeri 3 (G). L'ensemble de ces souches forme un cluster à une distance normée voisine de 0,65.

III.1.3.4.- Minimisation de la variance des classes

L'arbre obtenu (Fig. 37, p. 85) dissocie à nouveau l'ensemble des Méthanomicrobiales et les Méthanobactériales. Avec une courte distance normée, nous retrouvons à l'intérieur des Méthanomicrobiales : les sarcines thermophiles (D, C, B), les Methanosarcina mazei (F, E) et les Methanosarcina barkeri (H, I). Quatre autres souches classées parmi la famille Methanosarcinaceae, d'après la classification de BALCH 1979, s'associent aux sarcines précédemment citées avec successivement Methanosarcina barkeri 3 (G), Methanotherix sp. FE (A), Methanosarcina barkeri 227 associé à Methanospirillum hungatei JF1 et Methanosarcina vacuolata (L).

A l'intérieur du groupe des Méthanobactériales, les deux souches AZ (5) et DH1 (4) s'agrègent très vite formant un cluster avec FTF Methanobacterium thermoformicum (7). Le second cluster est constitué de l'association des souches de Methanobacterium thermoautotrophicum TC5E (3), Δ H (2) et formicum M4 (1).

III.1.3.5. Conclusion

Les quatre critères d'agrégation étudiés en analyse hiérarchique mettent en évidence des constances :

- A l'intérieur des Méthanomicrobiales s'agrègent toujours très rapidement les trois sarcines thermophiles (CHTI 55, MST, TM1) ; les deux Methanosarcina mazei (S6, MC3) et M. barkeri (MS, UBS) puis, plus tardivement, la souche 3. Les autres souches d'espèce barkeri représentées dans cette étude ont une position taxonomique plus confuse notamment Methanosarcina barkeri 227 et Methanosarcina vacuolata.

En accord avec les résultats de STACKEBRANDT et col. (1982) précisant l'appartenance de Methanothrix à la famille des Methanosarcinaceae, nous retrouvons la souche codée A très vite reliée au groupe des sarcines. Methanospirillum hungatei JF1 présente une affinité plus grande avec Methanosarcina barkeri 227, elles se relient ensemble quelque soit le critère d'agrégation.

- les Méthanobactériales, à l'exception du critère d'agrégation 2 (minimisation du moment centré d'ordre 2 des classes), forment un groupe homogène avec des distances normées étroites entre d'une part les Methanobrevibacter arboriphilus AZ et DH1, entre d'autre part les deux souches Methanobacterium thermoautotrophicum TC5E et Methanobacterium formicicum M4 qui s'associent respectivement à Methanobacterium thermoformicicum FTF. et Methanobacterium thermoautotrophicum Δ H.

En excluant le critère 2, les clusters obtenus en analyse hiérarchique parmi les Méthanobactériales ont été à trois reprises identiques mais pas exactement conformes à la classification de référence BALCH 1979 et aux regroupements obtenus en analyse binaire (coefficient de PEARSON) et en analyse en composante principale.

III.2.- Choix de la matrice 18x77 : analyse hiérarchique ascendante - maximisation du moment centré d'ordre 2

Cette matrice tient compte de l'ensemble des bandes observées, même si elles sont très faibles ou présentes chez une seule souche.

L'analyse hiérarchique ascendante a été effectuée par maximisation du moment centré d'ordre 2 d'une partition. L'arbre obtenu (Fig. 38, p. 86) ne modifie pas les principaux clusters acquis à partir d'une matrice 18x64.

Les différences observées se situent principalement aux distances de jonction. Nous pouvons noter également que Methanosarcina barkeri 3 (G) s'agrège plus rapidement avec les Methanosarcina mazei (E, F) et que, contrairement aux arbres précédents Methanosarcina barkeri 227 (J) se relie d'abord à Methanosarcina vacuolata (L) puis à Methanospirillum hungatei JF1 (6). Les 13 variables supprimées n'ont pas changé la ligne générale des arbres obtenus après analyse hiérarchique suivant les trois critères d'agrégation précédemment retenus.

III.3.- Choix de la matrice 42x77 : étude de l'influence du substrat

La matrice étudiée comporte 42 individus représentatifs d'un ou plusieurs essais des souches hydrogénophiles cultivées sur H_2/CO_2 et des souches acétoclastes sur différents substrats : acétate, méthanol, méthylamines, et H_2/CO_2 pour Methanosarcina barkeri MS. Les 77 variables correspondent à l'ensemble des intervalles de PM à l'exception des variables V 72, V 43, V 15 caractérisées par une absence de bande quelque soit la souche.

III.3.1.- Analyse en composante principale

Deux combinaisons des axes (1-2) et (3-4) sont présentées dans notre étude (Fig. 39, p. 86 & 87). L'axe 1 permet de discriminer les bactéries cultivées sur hydrogène et un groupe relativement homogène formé des bactéries acétoclastes sur les différents substrats. La culture sur H_2/CO_2 de Methanosarcina barkeri MS déplace nettement sa position vers les hydrogénophiles.

La croissance sur méthanol montre un nuage de points assez étendu, qui différencie très bien les souches mazei S6 (E), MC3 (F) et barkeri MS (H), UBS (I) et 227 (J). Les profils électrophorétiques des souches thermophiles sur ce même substrat sont peu différents des souches homologues cultivées sur acétate. Si l'on excepte

Methanothrix (A) et M. barkeri 227 (J) discriminées par l'axe 2, toutes les souches cultivées sur acétate forment un nuage très homogène.

Les souches cultivées sur méthylamines sont réparties le long de l'axe 1 et proches de l'origine sur l'axe 2. Ce nuage allongé reste peu éloigné des souches sur acétate. Quoique moins représentatif car très centré au point origine des axes 3 et 4, nous retrouvons le regroupement des souches selon leur substrat de croissance : acétate, méthanol, méthylamines mais la position des hydrogénophiles n'est pas représentative dans ce cas.

III.3.2.- Analyse hiérarchique ascendante - maximisation du moment centré d'ordre 2 d'une partition

L'on distingue deux groupes majeurs : les Méthanobactériales et les Méthanomicrobiales (Fig. 40, p. 87).

- A l'intérieur des Méthanobactériales, la répartition des souches est identique à celles précédemment obtenues avec les matrices 18x64 ; 18x77 différenciant trois sous-classes constituées des Methanobacterium, des Methanobrevibacter et de la souche Methanobacterium thermoformicicum FTF.

- A l'intérieur des Méthanomicrobiales, une seule espèce mazei se dissocie nettement après croissance sur acétate des cultures sur méthanol ou méthylamines. Tous les autres individus s'agrègent en priorité par identité de souche, après un regroupement par substrat, pour différencier ensuite des analogies d'espèces ou de genres.

III.3.3.- Conclusion

L'influence du substrat de croissance sur le métabolisme cellulaire peut traduire la synthèse de protéines inductibles et spécifiques. Les deux analyses mathématiques testées ne modifient pas sensiblement les résultats d'agrégation précédemment obtenus, bien que le substrat modifie, plus ou moins, les profils protéiques selon les souches.

IV.- DISCUSSION

L'utilisation des profils protéiques totaux dans un but taxonomique en complément des critères classiques tels que la morphologie, les substrats de croissance ou le G+C% est d'une valeur incontestable (JONES et col., 1984). Cette technique permet de comparer très rapidement un nouvel isolat avec des souches de référence, à condition d'obtenir une bonne résolution électrophorétique et d'utiliser un substrat commun. Au laboratoire, ces profils ont contribué à la description de deux nouvelles espèces Desulfobulbus elongatus (SAMAIN et col., 1984) et Clostridium thermolacticum (LE RUYET et col., 1985). Actuellement, ils sont utilisés pour la différenciation fine de souches du genre Methanothrix et Methanobacterium thermoformicum (travaux non publiés).

Cependant, l'application de cette technique à des fins taxonomiques sur un grand nombre de souches nécessite l'utilisation de la densitométrie et de l'exploitation mathématique des résultats. Malgré la finesse et le nombre élevé de bandes, l'analyse du tableau de données, reflet des profils électrophorétiques standardisés, a été parfaitement possible contrairement aux réserves formulées par KERSTERS et col. (1975). Les deux standardisations successives (externe puis interne) permettent de calibrer les gels et de compenser les irrégularités de gradient. S'il est difficile de définir un critère universel d'agrégation pour l'analyse numérique des profils électrophorétiques, il ressort toutefois de notre étude des tendances taxonomiques indéniables.

Dans tous les cas, les Méthanobactériales sont très bien différenciées des Méthanomicrobiales. Au sein des Méthanobactériales, la séparation entre les souches des genres Methanobacterium et Methanobrevibacter est en accord avec la classification de BALCH et col. (1979) malgré un échantillonnage très limité.

Parmi les Méthanomicrobiales, on distingue les Methanomicrobiaceae (hydrogénophiles) et les Methanosarcinaceae (acétoclastes) (WHITMAN et col., 1985). Ceci peut expliquer l'incertitude de la position de Methanospirillum hungatei qui s'aggrave soit avec les Méthanobactériales, soit avec les

Méthanomicrobiales. L'adjonction à notre échantillon de souches de Methanomicrobium ou(et) de Methanogenium aurait sans doute permis un positionnement plus clair.

Methanothrix sp. FE s'agrège toujours avec les souches appartenant au genre Methanosarcina confirmant ainsi son inclusion dans la famille des Methanosarcinaceae proposée par STACKEBRANDT et col. (1982) sur la base des séquences d'oligonucléotides de l'ARN 16S.

Dans le genre Methanosarcina, les deux souches mazei S6 et MC3 s'associent toujours très précocement confirmant ainsi leur identité déjà établie sur les critères morphologiques et physiologiques classiques. De la même façon, les trois souches thermophiles paraissent très proches, Methanosarcina thermophila TM1 étant très légèrement plus distant que CHTI 55 et MST. Cependant, cette différence ne paraît pas significative. Nous pouvons donc considérer que Methanosarcina sp. CHTI 55 (TOUZEL et col., 1985) et MST (TOUZEL et col., non publié) appartiennent à l'espèce Methanosarcina thermophila (ZINDER et col., 1985) et représentent chacune un biotype différent.

L'espèce barkeri est marquée par une analogie entre les souches MS et UBS mais par une différenciation sensible de la souche 3 et très nette de la souche 227. Cette dernière présente cependant des homologies ADN/ADN et ADN/ARN de 93% et 98% avec la souche type MS (SOWERS et col., 1984).

Enfin, les profils protéiques obtenus sont plus ou moins influencés par le substrat de croissance, l'acétate permettant l'expression de bandes majeures. Dans le cas de Methanosarcina barkeri, le profil sur hydrogène est très différent. Cette observation peut être rapprochée aux difficultés d'adaptation de la souche MS à la culture sur acétate lorsque l'inoculum a été entretenu sur H_2/CO_2 (ZEIKUS et col., 1983).

2EME PARTIE

IMMUNOCHIMIE DES METHANOGENES ET
CARACTERISATION D'UN ANTIGENE COMMUN AU GENRE METHANOSARCINA

*

NB : Les figures de la partie "Résultats" ont été regroupées à la fin de ce mémoire.

IMMUNOCHIMIE DES METHANOGENES
CARACTERISATION D'UN ANTIGENE COMMUN AU GENRE METHANOSARCINA

Le choix des immunséra polyclonaux utilisés dans cette étude a été volontairement orienté vers les méthanogènes acétoclastes puisqu'elles sont responsables, dans les sédiments et dans les digesteurs, de 70% de la synthèse du méthane. Par ailleurs, nous n'avons pris en compte que les deux méthanogènes hydrogénophiles dominantes dans les fermenteurs de méthanisation Methanobrevibacter arboriphilicum et Methanospirillum hungatei.

I.- IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE APPLIQUEE AUX METHANOGENES
- IFI -

L'autofluorescence des bactéries méthanogènes due à la présence du coenzyme F420 à l'état oxydé, nous oblige à effectuer pour une étude en IFI un prétraitement dans une solution de formaldéhyde à 4% (CONWAY DE MACARIO, 1982) afin d'éliminer toute fluorescence non représentative de la réaction antigène-anticorps. Dans ces conditions, les méthanogènes hydrogénophiles et Methanothrix soehngenii présentent une fluorescence spécifique uniformément répartie à la surface des cellules.

Mais, ce traitement n'a aucun effet sur les agrégats de sarcines qui présentent toujours une autofluorescence intense. Le passage dans l'acétone pur sous agitation 15 minutes permet d'extraire les co-enzymes et de supprimer ainsi cette coloration parasite qui rend difficile la lecture. Après ce traitement, la fluorescence spécifique apparaît irrégulièrement répartie autour des agrégats sous forme de zones intenses. Par ailleurs, même après

dispersion par passage dans une aiguille de seringue, les frottis de sarcines se sont avérés instables au cours des divers rinçages malgré la fixation des lames à la chaleur. Ceci nous a obligé à réaliser les réactions antigènes-anticorps avec les sarcines en milieu liquide en tube épendorf, la lecture au microscope étant effectuée après dépôt des agrégats entre lame et lamelle. Cette technique pose le problème d'accessibilité des réactifs aux cellules situées à l'intérieur des granules et nécessite le parcours de plusieurs champs afin d'obtenir une estimation plus précise de l'intensité de fluorescence (Fig. 41 & 42, p. 88).

I.1.- Titration des immunséra en réaction homologue

Les titrations des immunséra effectuées en IFI sont réalisées en réaction homologue sur une gamme de dilution (1/10 au 1/3200). Les titres S obtenus sont généralement égaux à la dilution 1/100 (dernière fluorescence maximale 4+), les titres T sont voisins de 1/800 (Tableau XIV). Methanothrix soehngeni présente une réponse immunitaire des lapins très différente. En effet, les séra obtenus par immunisation intra-coussinet présentent des titres S très faibles (1/20 et 1/40). Même l'hyperimmunisation ne permet pas d'obtenir des titres supérieurs au 1/100.

I.2.- Analyse des réactions croisées

L'analyse des résultats montre globalement deux blocs distincts (Fig. 43, p. 89).

* La spécificité de l'immunsérum anti-Methanospirillum hungatei JF1 est très étroite puisqu'il ne reconnaît dans notre étude que la souche immunisante. Les anticorps présents dans l'immunsérum anti-Methanobrevibacter arboriphilus AZ réagissent à la fois avec les déterminants antigéniques des souches AZ et DH1, réaction croisée

traduite par une même intensité de fluorescence. Il faut noter également que le sérum préparé croise très légèrement avec trois autres souches méthanogènes du genre Methanobacterium.

* L'analyse des relations croisées entre les différentes souches de Methanothrix présentait un intérêt comme critère complémentaire pour le positionnement taxonomique de Methanothrix soehngeni FE (DSM 3013) isolé au laboratoire en comparaison avec les souches de Methanothrix concilii GP6 et Methanothrix soehngeni Opfikon (DSM 2139). En fait, l'immunsérum contre Methanothrix FE est très spécifique. Il réagit faiblement avec les souches M. soehngeni et M. concilii qui appartiennent pourtant au même genre (Fig. 44, p. 90). A l'exception d'une réaction croisée avec Methanosarcina mazei, cet immunsérum ne reconnaît ni les méthanogènes hydrogénophiles, ni les autres Methanosarcinaceae.

* Par contre, les immunséra obtenus avec les souches appartenant au genre Methanosarcina contiennent des anticorps reconnaissant les antigènes présents sur toutes les sarcines étudiées. Dans certains cas, on observe même une fluorescence élevée (4+, 3+). Ceci souligne l'absence de spécificité des immunséra et probablement l'existence de déterminants antigéniques communs à l'ensemble des Methanosarcina. Les immunséra anti-Methanosarcina thermophiles (TM1, CHTI 55, MST) présentent un comportement analogue. Même les titrations des immunséra en réactions hétérologues ne permettent pas de différencier radicalement les trois souches (Fig. 45, p. 90). De même, les antigènes présents sur les souches barkeri MS (800) et vacuolata (1232) sont reconnus intensément par les trois immunséra. Par contre, les souches MC3, S6, 227, 3, UBS se différencient par des réactions croisées plus faibles. Les deux immunséra anti-Methanosarcina barkeri MS et 227 mettent également en évidence des réactions croisées, les plus faibles étant observées avec deux des souches thermophiles MST et TM1.

L'immunsérum anti-Methanosarcina vacuolata contient des anticorps reconnaissant les antigènes présents sur toutes les souches étudiées, les thermophiles et les barkeri (exceptée la souche type MS) étant très faiblement reconnus.

Contrairement aux immunoséras anti-Methanosarcina, l'immunosérum anti-mazei (S6 ou MC3) reconnaît très bien et sans exception les antigènes de surface de toutes les autres espèces.

I.3.- Conclusion

En immunofluorescence indirecte, les séras polyclonaux dirigés contre les souches hydrogénophiles Methanobrevibacter arboriphilus AZ et Methanospirillum hungatei JF1 ainsi que l'immunosérum dirigé contre Methanothrix FE sont très spécifiques. Ils sont désormais utilisés comme marqueur spécifique d'identification in situ dans des écosystèmes méthanogènes agglomérés où les deux premières souches jouent un rôle fondamental dans la captation de l'hydrogène. Par exemple, on peut identifier parfaitement Methanobrevibacter au sein de colonies mixtes par immunomarquage à la protéine A marquée à l'or colloïdal sur des coupes fines (Fig. 46, p. 91). L'identité de Methanothrix soehngeni FE, très abondant dans les digesteurs, a été confirmée sur coupes fines par cette technique (Fig. 47, p. 92). En ce qui concerne les Methanosarcina, nous avons confirmé la non-spécificité des séras obtenus après injection de cellules entières (MACARIO et col., 1986). Cependant, des différences de résultats entre les deux laboratoires peuvent être notées. Nous n'obtenons jamais de réponse négative lorsque E. CONWAY DE MACARIO obtient une réponse positive. Par contre, nous avons parfois des réponses positives pour des réactions négatives chez cet auteur. Ceci peut être dû à la différence de méthode. En effet, nos résultats sont acquis sur des cultures fraîches uniquement traitées à l'acétone alors que CONWAY DE MACARIO travaille sur des cultures traitées au formaldéhyde et envoyées par la poste, ce qui peut permettre une perte notable d'antigènes de surface.

A ce stade, nos résultats pouvaient nous orienter dans deux directions.

- Il paraît important de pouvoir quantifier très précisément les biomasses méthanogènes dans les digesteurs afin de contrôler précisément le démarrage et le fonctionnement d'unités industrielles (MACARIO et col., 1982, 1985). Ce type de travaux impliquerait

d'utiliser une technique fiable et rapide qui sans doute serait l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay). Une telle méthode a déjà été développée par ARCHER (1984) sur les Methanosarcina. Mais les technologies les plus performantes des fermentations méthaniques font appel le plus souvent à des procédés à cellules "immobilisées" (lit de boues, filtre anaérobie). Dans ce contexte, les bactéries présentes sont organisées en biofilms ou en granules. Et les travaux du laboratoire ont montré la présence de nombreux débris cellulaires piégés dans ces agglomérats (DUBOURGUIER et col., 1984), ce qui probablement conduirait à un bruit de fond important ou à des résultats surestimés. Les techniques courantes basées sur la mesure d'activité spécifique, de par leur simplicité et leur fiabilité, restent donc d'actualité.

- Au sein du genre Methanosarcina, il existe de nombreuses réactions croisées. Les travaux de CONWAY DE MACARIO tendent à trouver des épitopes communs chez les méthanogènes qui se sont surtout attachés à des structures de la paroi. Or, nos simples observations microscopiques suggérant qu'il existait une structure externe "agglomérable à l'acétone" et se dissociant aisément des agrégats de sarcines, nous ont conduit à caractériser cette structure.

II.- MISE EN EVIDENCE D'UN ANTIGENE COMMUN

Afin de préciser le ou les déterminants responsables de la similitude antigénique à l'intérieur du genre Methanosarcina, nous avons utilisé dans un premier temps des techniques complémentaires d'immunoprécipitation en gel. Les solutions antigéniques ont été préparées simplement par centrifugation de suspensions bactériennes préalablement dispersée au Polytron pendant 2 minutes.

II.1.- En immunodiffusion double

Parmi les arcs de précipitation obtenus (Fig. 48a, p. 93) avec les immunoséra représentatifs des trois espèces de Methanosarcina, on observe un arc majeur présentant des continuités entre les différentes solutions antigéniques. Cependant, les antigènes issus de M. barkeri (1538) ne sont apparemment pas reconnus par l'immunsérum dirigé contre M. thermophila TM1, sans doute en raison d'une concentration trop faible, puisque ce résultat est en opposition avec ceux de l'IFI. Les solutions antigéniques n'étant pas purifiées, il est difficile d'interpréter les éperons observés.

La figure 48b (p. 93) représente plus spécifiquement les relations antigéniques croisées entre les différentes solutions antigéniques de Methanosarcina et trois immunoséra anti-thermophiles TM1, MST, CHTI 55. On observe qu'à partir d'une quantité identique de cellules bactériennes, les souches MS, MST et l'espèce vacuolata produisent après polytronage un taux d'antigènes inférieur à celui des autres sarcines, probablement en liaison avec une morphologie différente. Les agrégats de ces sarcines sont nettement plus petits et plus homogènes, et présentent sans doute moins d'exopolymères. La fusion des arcs obtenus après différents essais de concentration nous permettent cependant d'affirmer l'existence d'une identité antigénique commune à l'ensemble des Methanosarcina.

Cette reconnaissance antigénique est confirmée à la figure 48c (p. 93) présentant plus spécifiquement l'immunodiffusion réalisée avec la solution antigénique de Methanosarcina mazei MC3 et différents immunoséra. L'absence de précipité en réaction hétérologue avec l'immunsérum anti-Methanospirillum JF1 souligne le caractère spécifique de cet antigène. La présence d'une réaction croisée faible avec l'immunsérum anti-Methanothrix peut paraître surprenante. Mais, nous verrons ultérieurement que cet antigène que nous caractériserons plus spécifiquement est présent à l'intérieur des cellules de Methanothrix.

II.2.- En immunoélectrophorèse

Quelque soit la sarcine étudiée, la séparation des composants des solutions antigéniques en immunoélectrophorèse montre qu'il existe un arc de précipitation majeur avec une mobilité électrophorétique légèrement différente observée en fonction de la souche ce qui traduit des charges globales ou des poids moléculaires différents (Fig. 49, p. 93). Cet arc de précipitation est présent, que l'immunsérum utilisé soit homologe ou hétérologue.

Après lyse cellulaire à la presse de French ou polytronage de Methanosarcina mazei MC3, les réactions antigènes-anticorps avec l'immunsérum anti-Methanosarcina mazei (FP) présente des arcs complémentaires, mais l'arc identifié précédemment reste dominant (Fig. 50, p. 93). L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle en réaction homologe (Fig. 51, p. 93) montre que la solution antigénique de Methanosarcina mazei MC3 révèle, en plus de l'arc dominant, un arc mineur de mobilité électrophorétique plus faible qui n'est pas reconnu par l'immunsérum anti-Methanosarcina sp. CHTI 55.

Conclusion : Les techniques d'immunoprécipitation confirment l'existence d'un antigène commun chez toutes les Methanosarcina légèrement différent en fonction de la souche par son P.M. ou sa charge ionique. Cet antigène reconnu par tous les immunséra anti-Methanosarcina peut être isolé par simple dispersion en phase aqueuse des agglomérats typiques de ce genre bactérien.

III.- ANALYSE DE LA SUSPENSION ANTIGENIQUE PAR MIGRATION ELECTROPHORETIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE 10%

Les résultats précédents nous ont conduit à analyser cette suspension antigénique en utilisant la souche mésophile Methanosarcina mazei MC3 (TOUZEL et col., 1983).

Pour faciliter l'interprétation, nous pouvons comparer les profils électrophorétiques en gel de polyacrylamide 10% de la solution d'antigènes (B) et de l'extrait cellulaire obtenu à la presse de French (A). Le gel de polyacrylamide a été retenu car il est plus résolutif que le gel d'agar.

- En conditions non dénaturantes, la migration de la solution antigénique standardisée à 2 mg/ml de protéines suivie d'une coloration au bleu de Coomassie met en évidence une bande majeure et plusieurs bandes de faible intensité (Fig. 54, p. 95). Aucune de ces bandes n'est révélée par le réactif de Schiff, ce qui laisse supposer l'absence de glycoprotéines. La bande majeure de la suspension antigénique représente au moins 90% des protéines solubles extraites après dispersion mécanique. Par contre dans les mêmes conditions, on observe un nombre beaucoup plus élevé de bandes dans les extraits cellulaires solubles.

- En conditions dénaturantes, c'est à dire après migration en présence de SDS à 1 g/l (Fig. 55, p. 95), les composants de la solution antigénique sont séparés en trois bandes majeures de poids moléculaire respectif S1 : 68 000, S2 : 43 200, S3 : 30 500 et quelques bandes de moindre intensité. On obtient un profil très dense avec les extraits cellulaires totaux où quatre protéines donnent une intensité plus importante. Trois d'entre elles ont les mêmes distances de migration que les constituants de la solution antigénique.

Ces résultats sont à comparer avec ceux des profils protéiques totaux chez les Methanosarcinaceae réalisés sur gel de polyacrylamide gradient (7 → 15%) en conditions dénaturantes. Cette étude a en particulier montré que certaines bandes protéiques étaient présentes chez toutes les souches étudiées. Parmi celles-ci, les protéines dont le poids moléculaire correspond à celui des fractions S1, S2, S3 sont systématiquement présentes et constituent globalement de 28 à 33% des protéines cellulaires.

Conclusion : ces résultats nous permettent de confirmer l'extraction par simple dispersion mécanique d'une protéine soluble, non liée à des polysaccharides et constituée de trois sous-unités. Par

TABLEAU XV

Rendements des différentes techniques de purification

	METHODE	RENDEMENT GLOBAL DE LA METHODE	QUANTITE DE PROTEINE PURIFIEE (mg)	
			par mg de protéine contenue dans l'extrait	par g de cellules sèches
Extraits obtenus par dispersion mécanique (3,4 mg protéine/g de cellules sèches)	Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide	26%	0,22	0,75
	Chromatographie d'exclusion sur ULTROGEL ACA34	85%	0,64	2,17
<hr/>				
Extraits cellulaires solubles après broyage à la presse de French (300 mg protéine/g de cellules sèches)	Chromatographie d'exclusion sur ULTROGEL ACA34	87%	0,32	96
	Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE SEPHACRYL	44%	0,06	19

ailleurs, l'immunoprécipitation et l'électrophorèse des protéines cellulaires totales ont mis respectivement en évidence le caractère antigénique de cette protéine et son ubiquité chez les souches de Methanosarcina étudiées.

IV.- PURIFICATION DE LA PROTEINE ANTIGENIQUE A PARTIR DE METHANOSARCINA MAZEI MC3

IV.1.- A partir de la solution obtenue après dispersion mécanique

Deux techniques ont été utilisées pour obtenir cette protéine à l'état pur :

- l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide 10% en conditions non dénaturantes suivie d'une électroélution de la bande correspondante.

- la chromatographie d'exclusion sur ULTROGEL ACA34 qui permet une bonne séparation des protéines dont les poids moléculaires sont compris entre 20 et 360 Kdaltons.

* La purification par électrophorèse, avec un rendement global de 26%, a permis d'obtenir une teneur finale de 0,70 mg de protéine antigénique par gramme de cellules sèches. Les pertes inévitables lors des étapes successives de dialyse, de concentration, d'électrophorèses, etc, la longueur de ce protocole et son faible rendement nous ont conduit à utiliser la chromatographie sur gel dans la suite de ce travail.

* La séparation de la suspension antigénique sur colonne de gel conduit à l'élution de deux pics absorbant à 280 nm. Un seul donne une réaction positive avec le réactif de Bradford et son volume d'élution correspond à celui d'une protéine dont le poids moléculaire est d'environ 340 Kdaltons. En parallèle, l'antigénicité des composés élués est vérifiée par un contrôle rapide en immunoprécipitation. Par

rapport à la technique précédente, le rendement de purification est multiplié par trois et nous donne 2,17 mg de protéine antigénique par gramme de cellules sèches (Tableau XV).

IV.2.- A partir des protéines solubles totales

Après lyse cellulaire d'un gramme de bactéries (poids sec) à la presse de French, on recueille 300 mg de protéines solubles qui sont chromatographiées sur ULTROGEL ACA34. Le profil montre un pic d'éluion ($v = 245$ ml) coloré en jaune qui succède au pic des composés non retenus sur la colonne (Fig. 52, p. 94). Ce pic parfaitement individualisé et symétrique correspond à l'éluion d'une protéine de poids moléculaire voisin de 300 Kdaltons. Le poids moléculaire et les deux réponses positives en immunoprécipitation et avec le réactif de Bradford confirment la présence de la protéine antigénique dans les composés élués à ce niveau. On obtient ainsi 96 mg de protéine/g de cellules sèches.

Afin d'augmenter la pureté de la protéine obtenue sur ACA34, les fractions de quatre chromatographies successives ont été rassemblées, concentrées par ultrafiltration et chromatographiées sur DEAE TRISACRYL. Ce support a été retenu en fonction du caractère acide de la protéine qui a été au préalable estimé rapidement par électrofocalisation. La protéine est éluée par une teneur en NaCl voisine de 0,18 M (Fig. 53, p. 94). Le rendement chromatographique est légèrement inférieur à 50% et finalement on obtient 19 mg de protéine/g de cellules sèches.

Parmi nos différents essais de purification, nous avons testé l'ultracentrifugation différentielle. L'analyse en électrophorèse, sous des conditions dénaturantes des surnageants centrifugés à des temps et des vitesses variables (Fig. 57, p. 95) a montré la disparition des trois bandes protéiques caractéristiques du surnageant après 60 minutes à 200 000xg. L'observation fine montre également l'absence d'autres bandes d'intensité mineure mais nous n'avons pas détaillé davantage la composition du culot de centrifugation.

IV.3.- Contrôle de la pureté

Les résultats de chaque étape de purification sont contrôlés par électrophorèse en gel de polyacrylamide 10% et par immunoélectrophorèse.

Les profils électrophorétiques se simplifient bien évidemment après chaque étape de purification (Fig. 54 & 55, p. 95). On remarque en particulier la disparition après passage sur l'échangeur d'ions des bandes mineures présentes dans la fraction purifiée sur ACA34. La lecture des profils électrophorétiques sur le densitomètre LKB visualise trois pics principaux de surface d'intégration sensiblement identique. Compte-tenu du poids moléculaire de cette protéine voisin de 300 Kdaltons nous pouvons proposer une stoechiométrie $\alpha 2$, $\beta 2$, $\gamma 2$. Considérant le poids moléculaire de chaque sous-unité, celui de la protéine serait de 283 400 daltons.

Afin de confirmer les résultats négatifs obtenus après coloration des gels d'électrophorèse au réactif de Schiff, la détection des polysaccharides a été réalisée sur l'éluat après chromatographie DEAE TRISACRYL. La présence unique d'une holoprotéine a été démontrée car moins de 1 mg de sucre par gramme de protéine a été mis en évidence dans notre échantillon.

Le contrôle par immunoélectrophorèse (Fig. 56, p. 95) confirme les résultats précédents. Les réactions antigènes-anticorps en présence de l'immunsérum anti-Methanosarcina mazei MC3 (en A) révèlent plusieurs arcs de précipitation à partir de l'extrait obtenu par dispersion mécanique (puits 1) ou dans l'extrait cellulaire brut (puits 2). Après chromatographie sur gel (puits 3) on n'observe plus que deux arcs. L'arc de plus faible intensité, qui est le plus proche du dépôt, n'est plus révélé au puits 4 où a été déposé l'échantillon obtenu après chromatographie d'échange d'ions.

TABLEAU XVI

**Composition en acides aminés de la protéine antigénique isolée
à partir de Methanosarcina mazei NC3**

- (1) Valeur moyenne de 5 déterminations
(2) Valeur moyenne de 3 déterminations
(3) Calculé à partir d'une structure $\alpha 2 \beta 2 \gamma 2$ (P.M. = 283400)

	RESIDUS % (1)	NOMBRE DE RESIDUS PAR MOLE (3)
ASP	9,62 +/- 0,68	258
THR	5,18 +/- 0,37	139
SER	7,91 +/- 0,68	212
GLU	11,14 +/- 0,83	299
PRO	3,82 +/- 0,28	102
GLY	12,23 +/- 0,72	328
ALA	11,36 +/- 0,54	305
CYS	0,35 +/- 0,04	9
VAL	6,49 +/- 0,44	174
MET	2,88 +/- 0,35	77
ILE	5,10 +/- 0,48	137
LEU	6,51 +/- 0,26	175
TYR	3,20 +/- 0,56	86
PHE	3,35 +/- 0,22	90
HIS	2,25 +/- 0,22	60
LYS	4,37 +/- 0,34	117
ARG	3,91 +/- 0,27	105
TRP	0,34 +/- 0,03 (2)	9

V.- CARACTERISATION DE LA PROTEINE ANTIGENIQUE

V.1.- Propriétés physico-chimiques

V.1.1.- Propriétés spectroscopiques

La solution protéique éluée présente une coloration jaune, mais aucune fluorescence ne peut être détectée. Elle ne renferme donc pas de coenzyme F420. Le spectre UV-visible présente un maximum à 420 nm et un épaulement à 440 nm (Fig. 58a, p. 96).

V.1.2.- Détermination du pHi

Un pHi égal à 4,5 a été défini pour la protéine native par la technique d'électrofocalisation en gel de polyacrylamide en présence d'ampholines (Fig. 58b, p. 97).

V.1.3.- Composition en acides aminés

La composition molaire a été calculée en attribuant à la protéine un poids moléculaire de 283,4 Kdaltons calculé à partir de la somme de poids moléculaires des sous-unités et de la stoechiométrie précédemment définie (Tableau XVI). La composition en acides aminés obtenue après 24 et 72 heures d'hydrolyse ne donne pas de résultats significativement différents. En conséquence, les résultats sont la moyenne de cinq déterminations réalisées indifféremment avec ces deux durées d'hydrolyse. Nous constatons une teneur élevée en acide aspartique et glutamique, ce qui confirme le caractère acide de la protéine, la proportion de glycine et d'alanine est également importante (Fig. 58c, p. 97). Par contre, celle de cystéine est faible, ce qui suggère qu'il existe peu de ponts disulfures entre les sous-unités.

V.1.4.- Détermination de la teneur en protéine

La méthode colorimétrique de Bradford a été le protocole utilisé pour toutes les déterminations de protéines en utilisant la sérum albumine bovine comme étalon. L'analyse des amino-acides nous a permis de définir un facteur de correction entre la teneur vraie en

protéine et celle définie par coloration au bleu de Coomassie R 250 : 1 g de protéine "vraie" = 0,56 g de protéine déterminée par colorimétrie.

V.1.5.- Dosage du nickel

La coloration jaune de la solution obtenue nous a incité à rechercher la présence d'ions métalliques dans la protéine. L'aluminium, le fer, le chrome, le cobalt sont les éléments non détectés. Le nickel, le calcium, le magnésium sont les éléments pour lesquels une concentration a pu être mesurée. Le nickel est de loin le métal le plus abondant, sa concentration est de 1,34 mole/mole de protéine déterminée "vraie". Le calcium et le magnésium ne sont présents qu'à l'état de trace.

V.1.6.- Etude de l'état d'oxydation du nickel en résonance paramagnétique électronique

Présenté parallèlement au spectre R.P.E. de la méthyl CoM réductase isolée de Methanobacterium thermoautotrophicum souche Marburg par le Dr. D. ANKEL-FUCHS, le spectre R.P.E. de notre échantillon ne met en évidence aucun signal du nickel en dépit de la haute sensibilité de la technique (Fig. 59, p. 98). Sa détection sous forme nickel (II) s'oppose aux formes plus oxydée Ni (III), plus réduite Ni (I) identifiées sur la méthyl CoM réductase de la souche hydrogénophile.

V.1.7.- Détection des coenzymes

* le coenzyme F430 : la présence de nickel, l'analyse spectroscopique, la couleur jaune de la solution protéique ont été à la base de notre recherche du coenzyme F430 sur l'échantillon protéique isolé. En C.L.H.P. la détection du coenzyme F430 a été réalisée par comparaison avec une solution étalon de ce coenzyme (THOMAS, 1983). Après déprotéinisation, en présence de méthanol 80% à chaud, le groupement prosthétique de la protéine présente un volume d'éluion identique à notre référence (Fig. 60a, p. 98). Sur la base d'un coefficient molaire du coenzyme F430 = $23\ 000\ \text{ml}^{-1} \times$

cm^{-1} (DIEKERT et col., 1980), une teneur égale à 1,26 mole de F430/mole de protéine "vraie" a été calculé, d'où un rapport Ni/F430 égal à 1,06 pour la protéine isolée.

* le coenzyme M : l'étude bibliographique a montré l'existence du complexe coenzymatique MF430 dans le composant C de la méthyl CoM réductase chez les méthanogènes. Nous avons essayé de détecter sa présence sur notre échantillon. Sur la base d'une quantité équimolaire des coenzymes F430 - CoM dans ce complexe, le coenzyme M (P.M. = 140) ne représente qu'une proportion faible de la protéine globale. Sa mise en évidence a néanmoins été vérifiée au seuil de sensibilité grâce à une concentration protéique élevée (environ 10 g/l)(Fig. 60b, p. 98).

V.1.8.- Test enzymatique de la méthyl CoM réductase

L'activité méthyl CoM réductasique a été déterminée sur notre échantillon par Dr C. VAN DER DRIFT. Aucune formation de méthane n'a été détectée, contrairement à des essais réalisés en parallèle avec le composant C isolé de Methanobacterium thermoautotrophicum Δ H. Notre échantillon assimilé au composant C de Methanosarcina mazei n'a aucune activité dans le système de Methanobacterium thermoautotrophicum (le composant A indispensable à cette réaction est isolé de Mb thermoautotrophicum) et est même inhibé de 50% lors de la présence simultanée des deux composants C. En présence du système extrait de Methanosarcina barkeri, des résultats similaires sont obtenus.

D'autres essais sont à ce jour en cours afin de vérifier ces résultats préliminaires.

V.2.- Propriétés sérologiques

Les immunséras dirigés contre la protéine purifiée et ses trois sous-unités ont été préparés selon le protocole précisé dans la partie Matériel et Méthodes.

V.2.1.- Spécificité des immunoséra

* En immunofluorescence indirecte, les cellules entières de Methanosarcina mazei MC3 montrent une fluorescence intense avec l'immunosérum anti-protéine, elle se présente essentiellement par petites tâches sur le pourtour externe de la sarcine. Cette répartition est probablement due à un artéfact causé par le traitement à l'acétone. Une réaction positive est également détectée à proximité des agrégats cellulaires sous forme de points fluorescents comparables à un "ciel d'été étoilé".

La localisation de la fluorescence obtenue est totalement différente après réaction antigénique avec les trois immunoséra anti sous-unités. Elle est diffuse, de faible intensité et apparemment, semble liée à la révélation de composés cytoplasmiques.

* En immunodiffusion double, la protéine purifiée à différentes concentrations ne donne qu'un seul arc de précipitation avec l'immunosérum "protéine". Avec l'immunosérum "S3", l'arc est beaucoup plus diffus. Aucune précipitation n'est visible avec les immunoséra "S1 et S2", probablement en raison d'un masquage des sites des sous-unités S1 et S2 dans la protéine native.

* En immunoélectrophorèse (Fig. 61, p. 99), l'immunosérum "protéine" ne met en évidence qu'un seul arc de précipitation avec l'extrait cellulaire total ou la protéine purifiée. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus en présence de l'immunosérum anti-Methanosarcina mazei MC3 (FP) souligne la très grande spécificité du sérum dirigé contre la protéine. En présence de l'immunosérum "S1" aucune réaction antigénique n'est visible par précipitation en accord avec les observations d'immunodiffusion double.

* L'immunodétection a été utilisée pour vérifier la spécificité des immunoséra anti sous-unités puisque cette méthode a une sensibilité supérieure à celles précédemment citées (Fig. 65, p. 99). Parmi les bandes protéiques d'un extrait cellulaire total, seules les deux sous-unités S1, S2 sont révélées avec l'immunosérum anti-protéine

totale. Par contre, les bandes S1, S2 et S3 ne sont reconnues que par leurs immunoséras spécifiques. Quelque soit l'immunosérum, une bande de P.M. voisin de 100 Kdaltons est également détectée.

V.2.2.- Mise en évidence de protéine et de sous-unités analogues chez les autres méthanogènes

* En IFI, aucune fluorescence n'est observée avec les souches Methanotherix soehngeni FE et Methanobacterium thermoautotrophicum H quelque soit l'immunosérum testé. Mais avec Methanosarcina barkeri MS on observe une fluorescence localisée différemment en fonction de l'immunosérum anti-protéine totale ou des immunoséras anti sous-unités, les observations étant identiques à celles obtenues sur Methanosarcina mazei MC3.

* En immunodiffusion double et en immunoélectrophorèse, quelque soit la souche testée appartenant au genre Methanosarcina, l'on retrouve un arc de précipitation majeur (Fig. 62 & 63, p. 99) avec l'immunosérum anti-protéine. Les mêmes essais en présence des extraits cellulaires à la presse de French de Methanobacterium thermoautotrophicum Δ H et Methanotherix sp. FE n'ont révélé aucun arc de précipitation.

* Pour vérifier les résultats précédents, suggérant l'absence de reconnaissance de protéines des souches FE et Δ H par les immunoséras "spécifiques" de MC3, l'immunodétection a été appliquée comparativement aux profils électrophorétiques de ces trois souches en conditions dénaturantes (Fig. 64, p. 99).

- Dans l'extrait de Methanotherix soehngeni FE, on met en évidence deux bandes protéiques équivalentes à S2, S3 et une bande de poids moléculaire légèrement inférieur à S1. Ces bandes sont reconnues par les immunoséras correspondants dirigés contre les protéines de MC3, l'immunosérum "protéine" ne reconnaissant que S1 et S2. Cependant, une bande supplémentaire d'un poids moléculaire d'environ 80 000 daltons est révélée chez Methanotherix par

l'immunsérum "S1". Il est difficile de préciser la nature de cet antigène car il n'est pas reconnu par l'immunsérum "protéine" et aucun doublet n'est mis en évidence à partir de la souche MC3.

- Très différent est le profil protéique obtenu à partir de Methanobacterium thermoautotrophicum H (Fig. 64, p. 99). Les bandes révélées au bleu de Coomassie se situent à des poids moléculaires différents à l'exception d'une bande équivalente à S1. La révélation des bandes, à partir des extraits de Methanobacterium thermoautotrophicum H, a nécessité un temps de contact nettement plus long (environ 30 min.). Les bandes obtenues sont de faible intensité. L'immunsérum "protéine" révèle deux doublets correspondant à S1 et S2. Un seul doublet est mis en évidence avec les immunséra S1, S2. L'immunsérum "S3" révèle une bande analogue à S3 et au moins une bande mineure. Mais les temps de contact longs et la faiblesse des réponses témoignent soit de réactions croisées (MC3/ Δ H) faibles soit de faibles concentrations des protéines recherchées dans les extraits.

Conclusion : Quelque soit la technique mise en oeuvre, l'immunsérum anti-protéine totale reconnaît une protéine antigénique, commune à toutes les espèces du genre Methanosarcina. Les immunséra anti sous-unités ne donnent pas de réactions visibles avec les extraits cellulaires lorsque l'on utilise l'immunoprécipitation. Cependant, leur spécificité a été vérifiée par immunodétection. Cette technique néanmoins plus sensible a permis de mettre en évidence une protéine voisine chez Methanotherix soehngeni FE. Les caractéristiques antigéniques de la protéine purifiée à partir de Methanosarcina mazei MC3 sont donc étendues à l'ensemble des souches de la famille des Methanosarcinaceae.

Nous observons une réaction faible mais significative avec les extraits d'une méthanogène taxonomiquement très éloignée des Methanosarcinaceae : Methanobacterium thermoautotrophicum Δ H. Ces résultats suggèrent que la protéine isolée est présente avec des structures différentes chez l'ensemble des méthanogènes.

V.3.- Microscopie

V.3.1.- Morphologie cellulaire

Isolée au laboratoire par J.P. TOUZEL (1983) Methanosarcina mazei MC3 est mésophile et peut présenter différentes structures morphologiques au cours de sa croissance.

. En microscopie optique (Fig. 68a, p. 100), l'on observe de larges agrégats constitués d'amas cellulaires reliés par un ciment invisible. Une surface parfaitement lisse est observée. Cette morphologie est classique du genre Methanosarcina mais l'espèce mazei se différencie par la présence simultanée de cocci isolés.

. En microscopie électronique à balayage (Fig. 68c, p. 100), la représentation dans l'espace permet de mieux visualiser la morphologie typique des sarcines comparable à une mûre. Dans les espaces intercellulaires, des exopolymères sont présents.

. En microscopie électronique à transmission (Fig. 68b, p. 100), nous pouvons observer plus précisément l'association des cellules dans la constitution des agrégats. Le contenu intracytoplasmique montre une masse importante plus claire constituant le matériel nucléaire qui s'oppose à de petites tâches sombres en forme de rosettes disséminées dans tout le cytoplasme représentatif des réserves de glycogène.

A la périphérie des cellules, l'enveloppe hétéropolysaccharidique permet l'agrégation des cellules entre elles.

V.3.2.- Immunocyto-localisation

* En réaction homologue

Des coupes de Ms mazei MC3 ont été marquées avec les anticorps présents dans les différents immunoséras spécifiques puis avec la protéine A marquée à l'or colloïdal. La répartition des particules d'or dans la cellule varie en fonction des immunoséras testés. En présence des immunoséras anti sous-unités S1, S2, S3 un marquage exclusivement intra-cytoplasmique est observé, celui-ci est légèrement plus important pour la sous-unité S1. L'immunosérum anti-protéine permet de visualiser une reconnaissance spécifique à la fois

à l'intérieur et à l'extérieur des cellules : des structures se détachant de la surface externe présentent un marquage intense mais celui-ci ne reconnaît ni la paroi ni la membrane cytoplasmique (Fig. 69, p. 101).

* En réaction hétérologue

Chez Methanosarcina thermophila et barkeri, les mêmes immunséras donnent le même type de marquage. Par contre, à l'absence totale de marquage chez M. thermoautotrophicum quelque soit les immunséras utilisés, s'oppose une reconnaissance uniquement intra-cytoplasmique des anticorps chez Methanotherix souche FE. Aucune structure extra-cellulaire n'est immunologiquement reconnue en présence de l'immunsérum anti-protéine (Fig. 70, p. 102).

VI.- DISCUSSION

Les résultats obtenus en IFI ont été confirmés par les techniques d'immunoprécipitation en gel : bien que différent par son poids moléculaire ou sa charge, un antigène protéique commun au genre Methanosarcina peut être extrait par simple dispersion des agrégats en phase aqueuse.

Les propriétés physico-chimiques de la protéine purifiée à partir de M. mazei MC3 l'identifie clairement au composant C du complexe méthyl-CoM réductasique, enzyme-clé de l'étape finale de la synthèse du méthane. L'étude comparative de cette protéine chez différentes méthanogènes hydrogénophiles et acétoclastes (HARTZELL et WOLFE, 1986) dénote une homogénéité de poids moléculaire de la protéine native (295-305 Kd) et de ses sous-unités α , β et γ (65-73 Kd, 41,5-45 Kd et 33-37 Kd respectivement). Le composant C que nous avons purifié n'est donc globalement pas différent. Chez M. barkeri, une quatrième protéine mineure d'un poids moléculaire de 56 000 daltons est associée à l'enzyme. Observée également chez M. thermoautotrophicum Δ H, elle augmente sensiblement l'activité réductasique du composant C (HARTZELL et col., 1986). Dans nos purifications, nous avons observé deux bandes mineures (PM = 53 600

et 57 800) lors de la chromatographie d'exclusion. Mais ces deux protéines sont éliminées après passage sur colonne échangeuse d'ions. Deux protéines analogues ont été observées chez M. thermoautotrophicum souche Marburg (ANKEL-FUCHS et col., 1986).

La couleur jaune non fluorescente et le spectre UV-visible de la protéine purifiée sont également typiques du composant C et de la présence du chromophore F430 (ELLEFSON et WOLFE, 1982 ; KELTJENS et col., 1983). Ce chromophore a été aisément mis en évidence dans les extraits méthanoliques par C.L.H.P. et identifié par son temps de rétention et ses caractéristiques spectrales. Le rapport Ni/F430 que nous avons déterminé est voisin de 1 et correspond à la stoechiométrie déterminée chez M. thermoautotrophicum (ELLEFSON et col., 1982). Dans le cas du coenzyme M, la technique que nous avons utilisée a permis sa détection mais non sa quantification.

Théoriquement le rapport CoM/F430 serait de 1 (KELTJENS et col., 1982). La protéine isolée contient donc bien les deux coenzymes F430 et CoM caractéristiques des méthanogènes. Cependant, le rapport F430/protéine que nous avons déterminé d'après la teneur en chromophore (1,26) ou en nickel (1,34) est faible comparativement à la stoechiométrie théorique de 2 généralement admise (ANKEL-FUCHS et col., 1986). En fait, les travaux publiés font état de stoechiométries expérimentales comprises entre 1,4 et 1,9 (HAUSINGER et col., 1984 ; ELLEFSON et col., 1982) et attribuent généralement cet écart à une perte de coenzyme lors de la purification de la protéine. Même les travaux les plus récents sur le coenzyme F430 libre ou lié au composant C montrent que le rapport molaire F430/protéine est de 1,39, résultat très proche des nôtres (ANKEL-FUCHS et col., 1984). De surcroît, tous ces travaux établissent ces rapports en déterminant la teneur en protéines par la méthode de Lowry avec pour étalonnage l'albumine sérique bovine alors que nous avons étalonné le dosage de Bradford par comparaison avec l'analyse d'acides aminés effectuée sur une quantité connue de protéine.

En complément de ces critères physico-chimiques, le contrôle de l'activité biologique de la protéine s'imposait. Quelque soient les systèmes hétérologues mettant en jeu les différents composants A, B et C isolés de M. barkeri, M. voltae, M. thermoautotrophicum et M. jannaschii, l'activité méthyl CoM réductasique est reconstituée

(HARTZELL et col., 1986). L'activité de la protéine purifiée a donc été déterminée en utilisant les composants A et B de M. thermoautotrophicum ou un extrait brut de M. barkeri dans le laboratoire de C. VAN DER DRIFT. Un échantillon a été également testé dans le laboratoire de D. ANKEL-FUCHS en l'absence du composant A mais avec le DTT comme donneur d'électrons. Dans ce cas, le composant B était soit synthétique, soit isolé de M. thermoautotrophicum.

Les résultats indiquent que le composant C de M. mazei MC3 n'a aucune activité en système hétérologue, traduisant ainsi soit la présence d'un inhibiteur inconnu, soit l'absence d'un activateur spécifique. La pureté de nos préparations nous permet d'exclure l'hypothèse d'un inhibiteur. Par contre, si les deux bandes mineures (PM = 60 000) signalées précédemment sont nécessaires à l'activité réductasique comme chez M. thermoautotrophicum ou M. barkeri (HARTZELL et WOLFE, 1986), le test biologique aurait dû se faire en leur présence.

Enfin, les résultats de résonance paramagnétique électronique tendent à confirmer l'hypothèse d'une inactivité biologique du composant C que nous avons purifié. Le nickel présent dans le coenzyme F430 est très stable puisqu'il n'y a pas d'échange avec le Ni^{2+} libre présent dans la phase liquide même en milieu chlorhydrique 6N (DIEKERT et col., 1980). Selon ALBRACHT et col. (1986) et ANKEL-FUCHS et col. (1986), le signal RPE observé sur le composant C actif serait dû au Ni (III) état oxydé ou Ni (I) état réduit, le Ni (II) ne donnant aucun signal RPE. Vu le silence RPE, le composant C purifié de M. mazei serait donc Ni (II) et de ce fait biologiquement inactif. On pourrait penser à "activer" la protéine par oxydation ou par réduction du Ni lié. Mais l'état rédox de celui-ci ne peut être modifié par les agents d'oxydo-réduction classique car il serait sous une forme "bloquée" ou "inaccessible" (ALBRACHT, communication personnelle). Ceci renforce l'hypothèse de l'existence d'une molécule-clé permettant de changer l'état rédox du Ni dans le F430 lié.

TABLEAU XVII

Spécificité des immunoséras anti-composant C

1.- ELLEFSON et WOLFE (1981) : IDD et immunodétection

2.- HARTZELL et WOLFE (1986) : IDD

3.- OSSMER et col. (1986) : IDD et immunodétection

	anti-composant C ΔH	anti-composant <u>Mc voltae</u>
<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u>	+ (1)(2)	- (2)(3)
<u>Methanobacterium formicicum</u>	+ (1)	
<u>Methanobacterium bryantii</u>	+ (1)	
<u>Methanobrevibacter ruminantium</u>	- (1)(2)	
<u>Methanogenium marisnigri</u>	- (1)	
<u>Methanococcus voltae</u>	+ (2) - (3)	+ (2)
<u>Methanococcus jannaschii</u>	- (2)	+ (2)
<u>Methanococcus limicola</u>	- (2)	
<u>Methanospirillum hungatei</u>	+ (1)	
<u>Methanosarcina barkeri</u>	- (2)	- (2)

Bien que les composants C isolés de diverses méthanogènes hydrogénophiles et acétoclastes présentent des similitudes prononcées dans leurs caractères physico-chimiques et leurs activités biologiques (HARTZELL et WOLFE, 1986), les différences immunologiques sont marquées (Tableau XVII). En particulier, les immunséra préparés avec le composant C de M. thermoautotrophicum Δ H et M. voltae ne reconnaissent pas le composant C ou ses sous-unités de M. barkeri. Nos travaux montrent qu'à l'intérieur de la famille des Methanosarcinaceae (genres Methanothrix et Methanosarcina), les relations immunologiques sont étroites. En effet, que ce soit en IFI, en IDD ou en IEP, l'immunsérum anti-composant C de M. mazei reconnaît toujours le même type de protéine chez les Methanosarcina. En immunodétection sur membrane, ce même sérum reconnaît bien des protéines de Methanothrix sp. de poids moléculaires analogues aux sous-unités du composant C. Par contre, chez M. thermoautotrophicum, la reconnaissance est beaucoup plus faible et nécessite des temps de réaction plus longs.

L'immunsérum anti-protéine totale reconnaît majoritairement les deux sous-unités lourdes S1 et S2 comme cela avait déjà été noté chez M. thermoautotrophicum (OSSMER et col., 1986). Les immunséra anti-sous-unités que nous avons préparés ne semblent pas être précipitants. Par contre, en immunodétection, leur spécificité est étroite et il n'y a pas de réactions croisées en réaction hétérologue. Cette spécificité est également observée chez Methanococcus voltae et utilisée pour le clonage des gènes codant pour les différentes sous-unités dans des plasmides d'Escherichia coli (KONHEISER et col., 1984 ; SCHALLENBERG et col., 1986). Grâce à cette technique, les gènes des sous-unités α , β et γ ont été clonés. Les séquences de fragments d'ADN ont été déterminées et comparées chez M. voltae et M. thermoautotrophicum. L'homologie globale est de 71% indiquant ainsi une grande conservation de cette sous-unité. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer les relations immunologiques croisées observées dans nos travaux ou par d'autres auteurs. Par ailleurs, sur une séquence de 60 amino-acides, aucun résidu cystéine et un seul résidu méthionine est observé, ce qui est en accord avec l'analyse d'acides aminés effectuée sur le composant C que nous avons isolé.

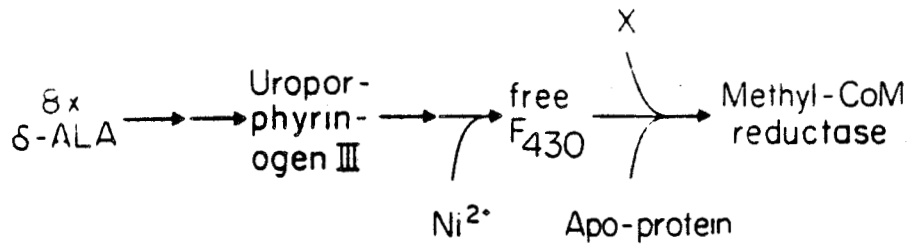
La spécificité de nos immunoséras a été mise à profit pour une étude plus fine de la cytolocalisation du composant C en microscopie électronique grâce aux techniques de marquage à l'or colloïdal. L'absence de marquage significatif chez M. thermoautotrophicum par les immunoséras issus de M. mazei confirment la faiblesse des relations croisées déjà observées en immunodétection sur membrane. Chez toutes les souches acétoclastes, le composant C, localisé par l'immunosérum anti-protéine ou ceux anti-sous-unités est toujours distribué régulièrement dans le cytoplasme sans indice apparent de localisation membranaire. Cette distribution est analogue à celle observée chez M. thermoautotrophicum et en opposition avec celle chez M. voltae où le composant C est essentiellement membranaire (OSSMER et col., 1986).

Enfin, la présence de composant C à l'extérieur des cellules de M. mazei était suggérée par les résultats de l'IFI. Les techniques d'extraction utilisées et leurs rendements massiques suggéraient qu'environ 10% de cette protéine était externe. Cette localisation est confirmée en microscopie électronique. Des zones extra-cellulaires condensées sont bien marquées par le sérum anti-protéine chez M. mazei et à un moindre degré chez les autres espèces de Methanosarcina. Par contre, chez Methanotherix, aucun marquage n'est visible à l'extérieur des cytoplasmes. Ce fait original peut être expliqué par la morphologie particulière des sarcines. En effet, dans tous les travaux d'ultrastructure de ce type bactérien, des cellules altérées sont identifiables par leur cytoplasme clair, en particulier lors de la croissance sur méthanol (TOUZEL et col., 1985). Lors de la mort des cellules, il est donc possible que cette protéine soit en partie retenue sur l'enveloppe hétéropolysaccharidique par des phénomènes d'adsorption ou ioniques. Par contre, une excrétion active et un rôle physiologique de ce composant C externe nous paraissent deux hypothèses moins plausibles.

C O N C L U S I O N

L'analyse des profils protéiques totaux, bien qu'effectuée sur un faible nombre de souches et d'essais, montre clairement que ce type d'analyse peut être aussi utilisé en taxonomie des méthanogènes. Elle s'ajoute aux nombreux critères distinctifs et conduit à des résultats analogues à la classification de référence basée sur des techniques plus lourdes telles que l'hybridation des acides nucléiques ou le séquençage d'oligonucléotides.

Aux protéines nombreuses et quantitativement peu abondantes chez les hydrogénophiles s'opposent la présence de bandes protéiques majeures chez les acétoclastes. Ces dernières ont permis la standardisation interne des profils qui facilite l'interprétation des résultats obtenus après électrophorèse en gel de polyacrylamide. Insoupçonnées au départ, trois d'entre-elles ont présenté un intérêt majeur dans notre étude, celles-ci formant les sous-unités d'une protéine antigénique analogue au composant C de la méthyl CoM réductase. L'analyse densitométrique a permis d'estimer leur teneur dans la cellule à environ 30% des protéines solubles totales chez les acétoclastes, ce taux a ensuite été vérifié après isolement de la protéine antigénique chez Methanosarcina mazei MC3. Le pourcentage nettement plus faible voisin des 10% obtenu après extraction de la protéine chez Methanobacterium thermoautotrophicum (ELLEFSON et col., 1981) est en accord avec la faible intensité des bandes observées chez toutes les hydrogénophiles et chez Ms barkeri croissant sur H₂/CO₂. Chez cette dernière espèce, GORRIS et col. (1986) ont observé que la teneur en sarcinaptérine, transporteur intermédiaire de radicaux monocarbonés, est de 187 et 40 μmol/g de protéine respectivement sur acétate et sur H₂/CO₂. Si l'on considère les Y_{CH₄} chez Ms barkeri (1,6-1,9 g/mole sur acétate et 6,4-



SCHEMA HYPOTHETIQUE PRECISANT LE ROLE DU F430 LIBRE DE METHANOBACTERIUM
THERMOAUTOTROPHICUM PROPOSE PAR D. ANKEL-FUCHS et CoL (1984)

8,8 g/mole sur H_2/CO_2), les teneurs en sarcinaptérine et en composant C rapportées à la mole de CH_4 sont analogues. Seul le rendement cellulaire diminue d'un facteur 3 à 4 sur acétate.

Chez Mb thermoautotrophicum, le coenzyme F430 est sous deux formes : soit libre dans la cellule (70%), soit associé au CoM (30%) pour former le groupement prosthétique de la méthyl CoM réductase. Le F430 libre pourrait avoir, soit un rôle de stockage intracellulaire du Ni, soit être le précurseur du F430 lié. Cette dernière hypothèse a été confirmée et conduit à un schéma hypothétique dans lequel au moins le CoM et un dérivé de la lumazine contribuent à la formation de la méthyl CoM réductase active (ANKEL-FUCHS, 1984). En fait, ce schéma doit être modifié puisqu'il existe au moins une protéine qui active cette enzyme chez Mb thermoautotrophicum (HARTZELL et WOLFE, 1986) et que la forme libre du F430 est sous forme Ni (II) (ANKEL-FUCHS et col., 1986). Or ces mêmes auteurs ont émis l'hypothèse que ce métal doit être sous forme Ni (III) ou Ni (I) dans la protéine pour qu'elle ait une activité.

L'isolement d'un composant C de Methanosarcina mazei MC3 inactif, sous forme Ni (II) confirme cette hypothèse et l'existence d'une étape d'activation indispensable pour une activité maximale de la méthyl CoM réductase. Cette étape est probablement due à la présence d'un composé modifiant l'état d'oxydation du nickel lié sous sa forme plus réduite (Ni -I-) ou plus oxydée (Ni -III-). Sa structure est actuellement inconnue mais il pourrait s'agir de la protéine activatrice décrite par HARTZELL et WOLFE. Il faut remarquer que dans notre travail, des protéines de poids moléculaires analogues ont été mises en évidence mais éliminées au cours de l'ultime étape de purification alors que dans les travaux de D. ANKEL-FUCHS, elles sont présentes même après passage sur différentes chromatographies d'affinité.

Enfin, les études immunologiques sur le composant C (HARTZELL et WOLFE, 1986 ; OSSMET et col., 1986 ; nos travaux) montrent qu'excepté à l'intérieur des Methanosarcina, il existe apparemment une spécificité de genre, voire d'espèce. Compte tenu des réserves faites précédemment sur l'utilisation d'immunséras polyclonaux anticellules pour la quantification des méthanogènes dans les digesteurs, le composant C pourrait être un bon marqueur biologique de l'activité méthanogène. En effet, les images de microscopie

électronique suggèrent qu'à l'inverse des parois, le contenu cytoplasmique est dégradé lors de la lyse cellulaire. La mise au point d'une technique type Elisa pourrait être comparée à l'activité biologique globale d'utilisation des substrats. Par contre, la "banque" de séra polyclonaux que nous avons préparée peut désormais être utilisée pour la localisation ou l'identification présomptive des espèces correspondantes.

FIGURES DE LA PARTIE "RESULTATS"

Figure n° 29 : Profils électrophorétiques en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes gradient 7+ 15%

a - Méthanogènes hydrogénophiles

- (1) Methanobacterium formicicum MF
- (2) Methanobacterium thermoautotrophicum Marburg
- (3) Methanobacterium thermoautotrophicum ΔH
- (4) Methanobacterium thermoformicicum FTF
- (5) Methanobrevibacter arboriphilus AZ
- (6) Methanobrevibacter arboriphilus DH1

b - Méthanogènes acétoclastes

- (1) Methanosarcina barkeri MS
- (2) Methanosarcina barkeri 3
- (3) Methanosarcina barkeri UBS
- (4) Methanosarcina thermophila TM1
- (5) Methanosarcina mazei MC3
- (6) Methanosarcina mazei S6
- (7) Methanosarcina vacuolata
- (8) Methanotherix soehngeni FE

Figure n 30 : Profils électrophorétiques en gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes

- | | |
|---|---------------------------------|
| (1) <u>Methanosarcina</u> sp. CHTI 55 | (A) Croissance sur méthanol |
| (2) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 | (B) Croissance sur acétate |
| (3) <u>Methanosarcina</u> sp. MST | (C) Croissance sur méthylamines |

Th : Kit PHARMACIA de haut poids moléculaire

Thyroglobuline PM = 330 000 ; Ferritine PM = 220 000

Albumine PM = 67 000 ; Catalase PM = 60 000

Lactate déshydrogénase PM = 36 000

Tb : Kit PHARMACIA de bas poids moléculaire

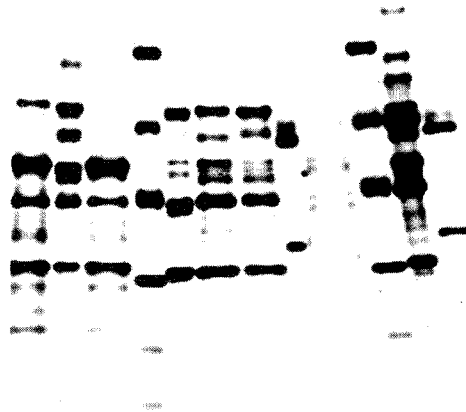
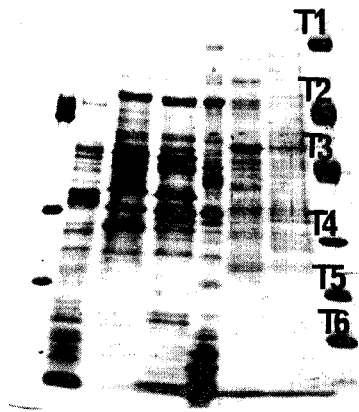
T1 Phosphorylase b PM = 94 000 ; T2 Albumine PM = 67 000

T3 Ovalbumine PM = 43 000 ; T4 Anhydrase carbonique PM = 30 000

T5 Inhibiteur trypsique PM = 20 100 ; T6 αlactalbumine PM = 14 400

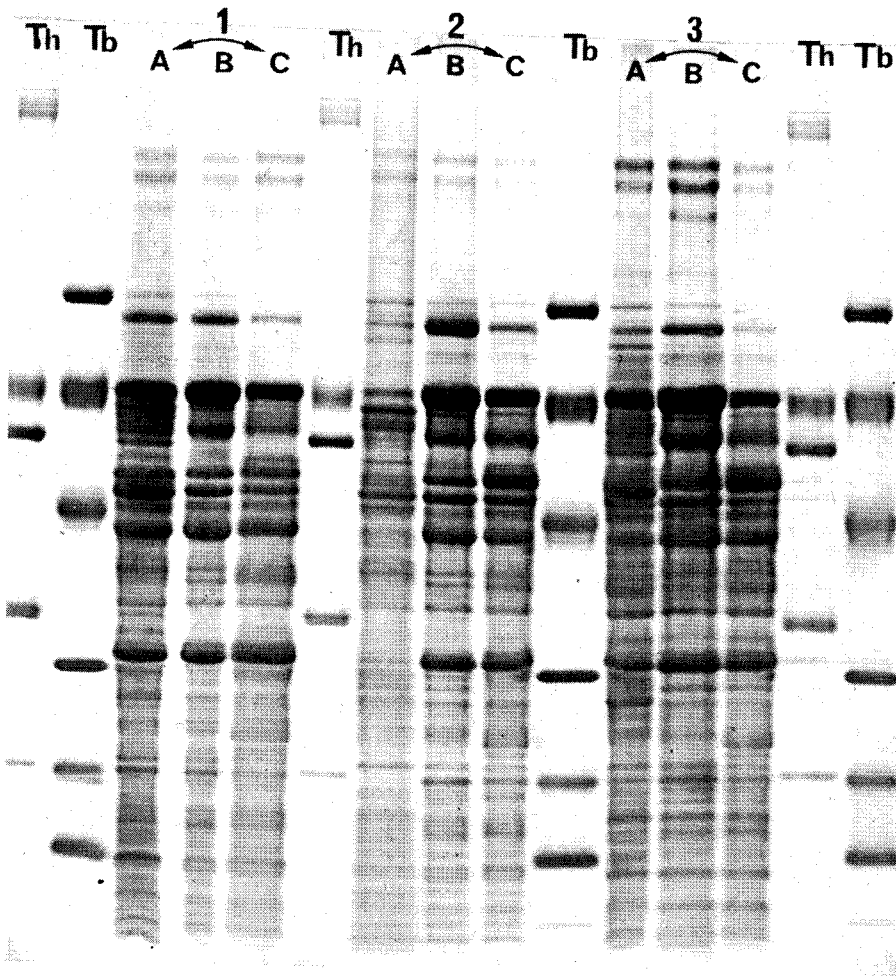
T 1 2 3 4 5 6 T

1 2 3 T 4 5 6 T 7 T 8 T



- FIGURE n°29a -

- FIGURE n°29b -



- FIGURE n°30 -



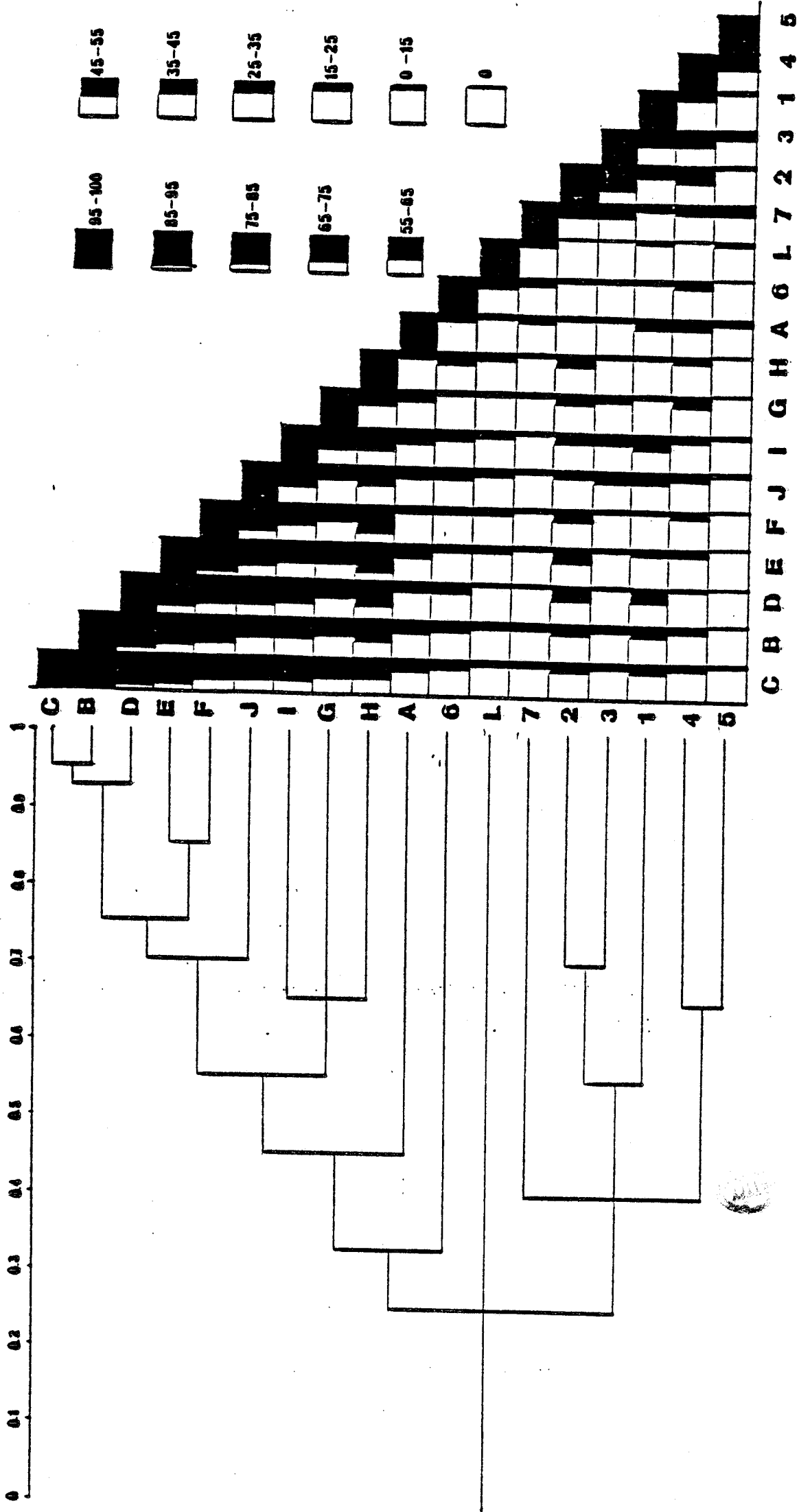


FIGURE n° 31 : MATRICE DES COEFFICIENTS DE PEARSON (18x64)

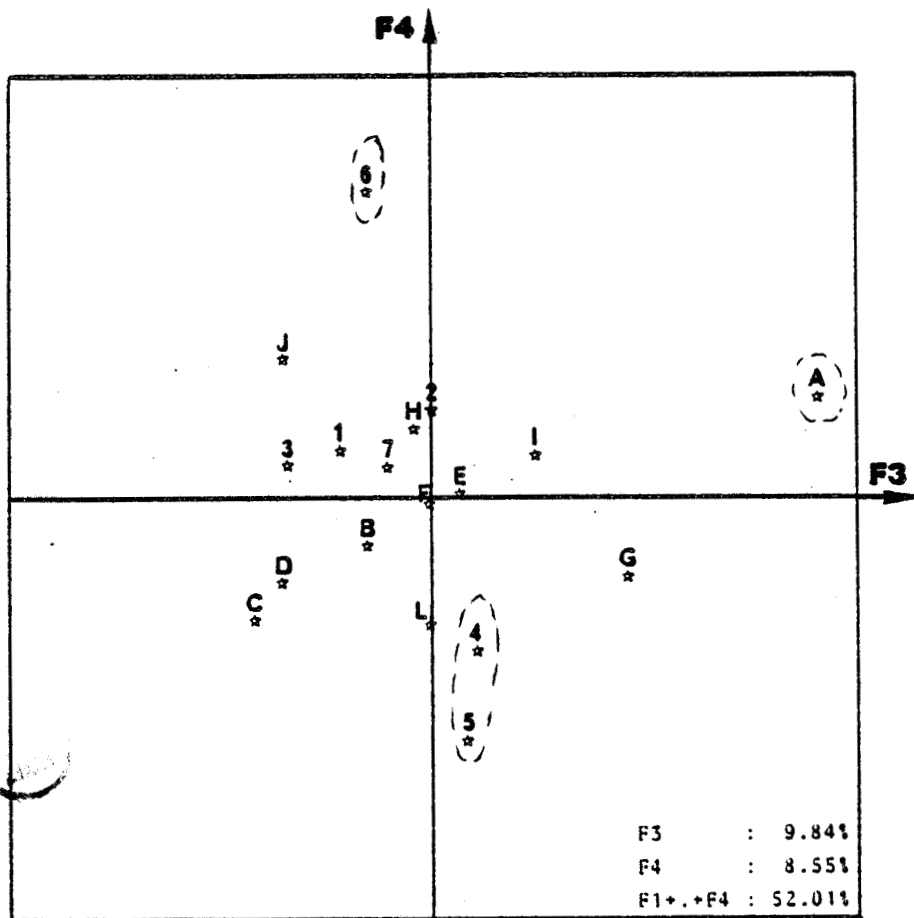
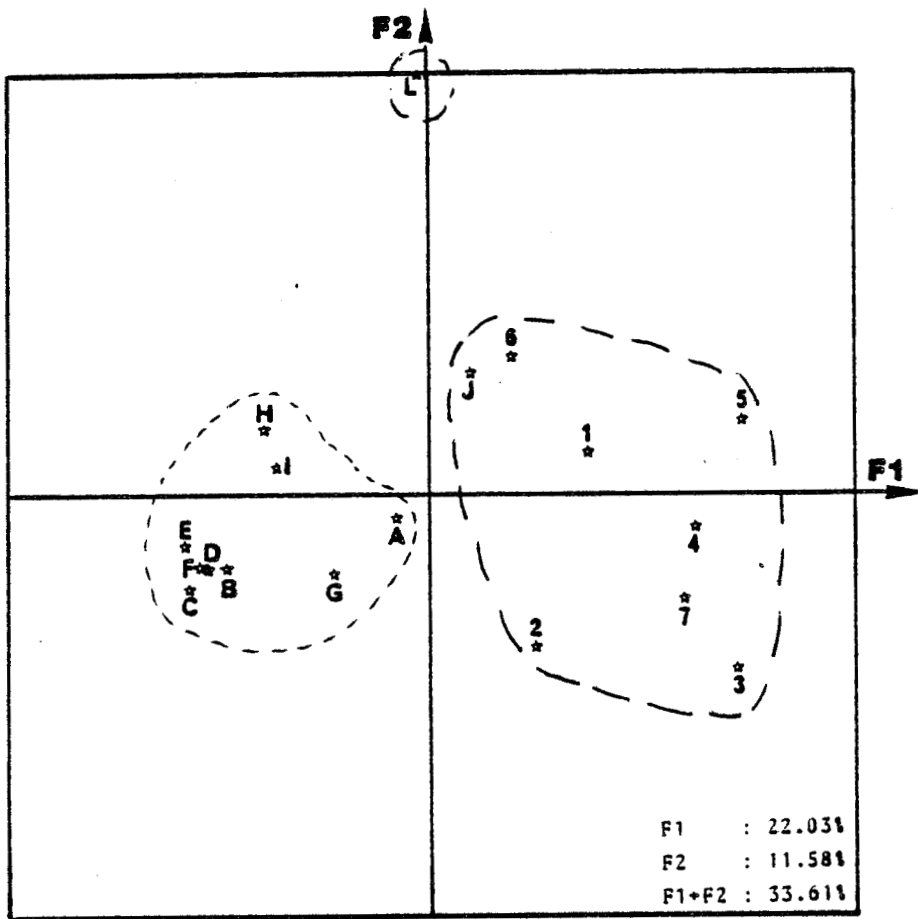


FIGURE n° 32 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (18x64)

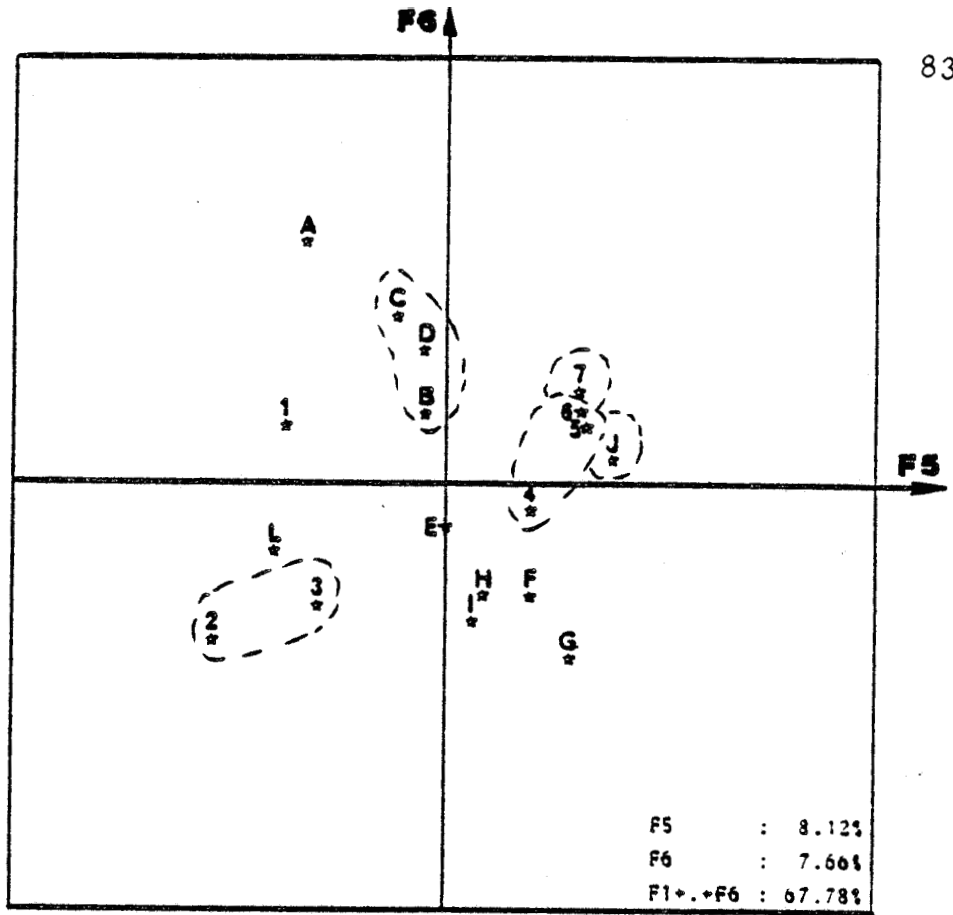


FIGURE n° 32 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (18x64)

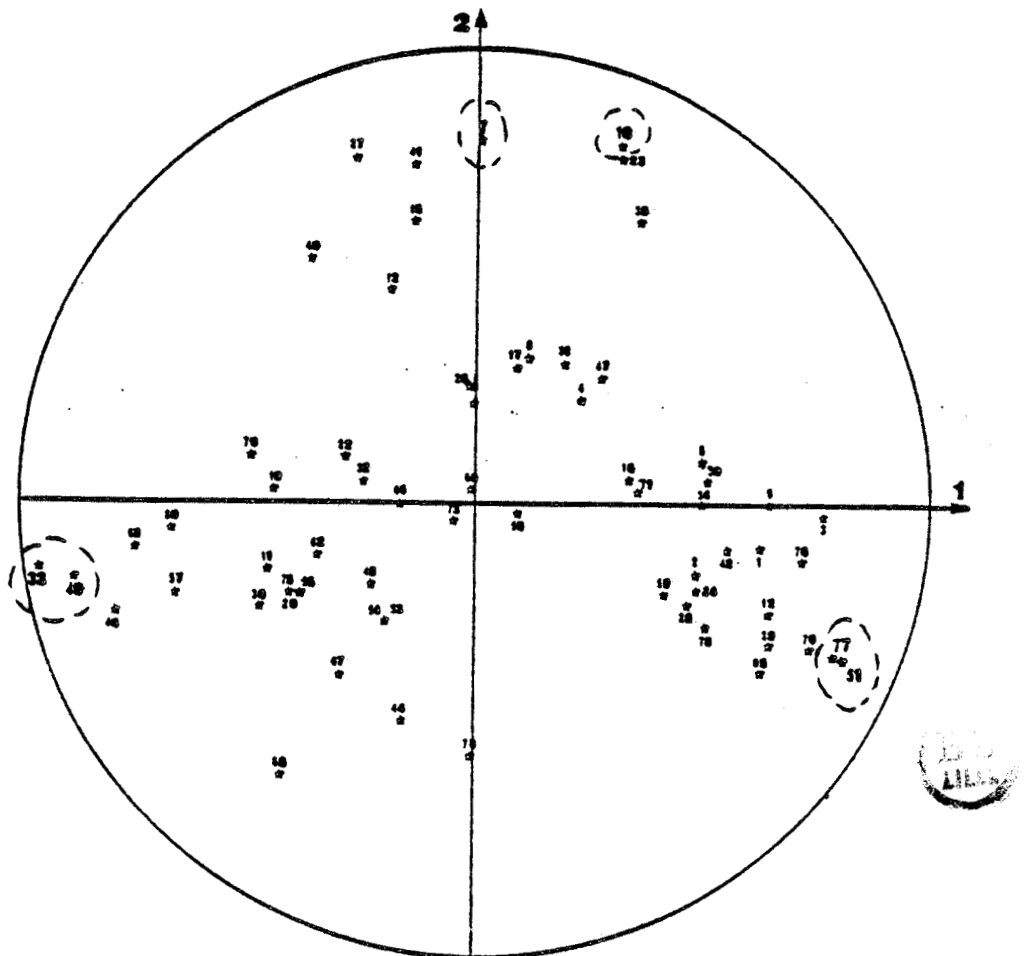


FIGURE n° 33 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (18x64)

Variables positionnées dans l'espace des

Individus

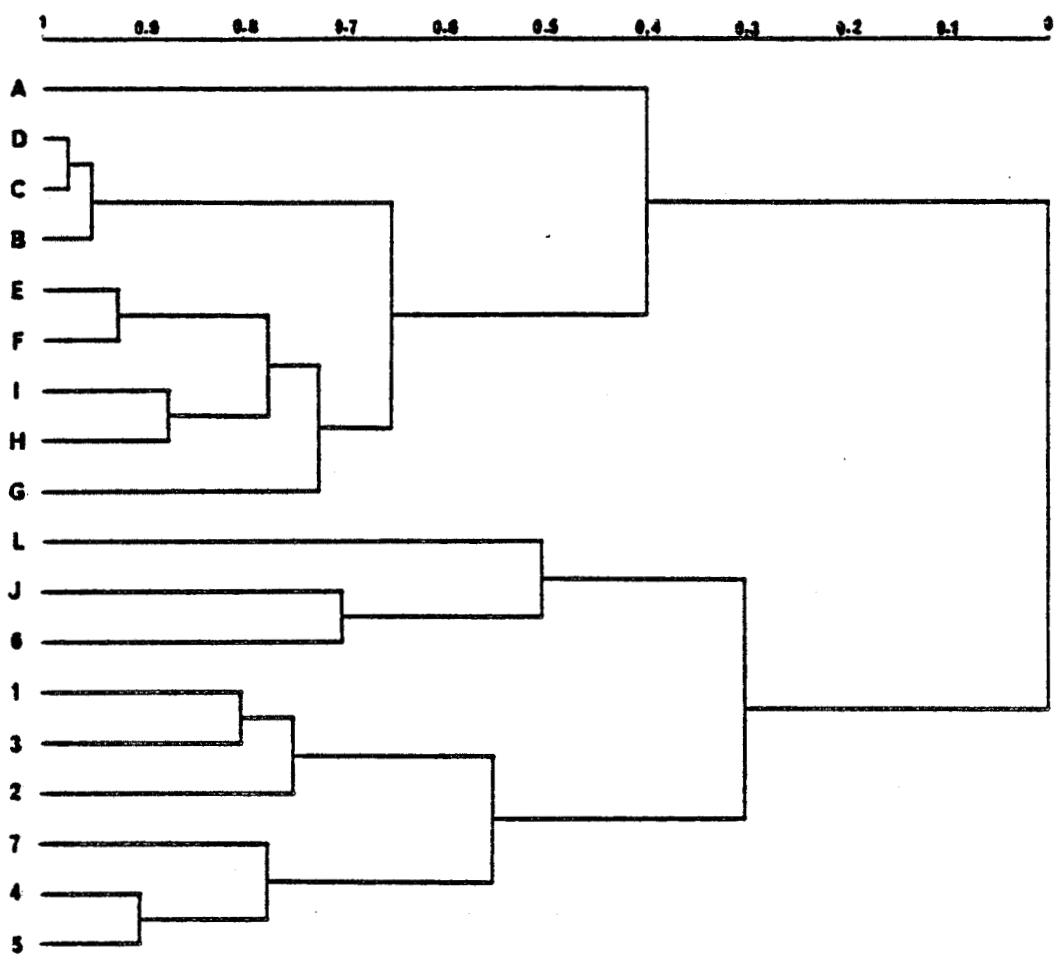


FIGURE n° 34 : ANALYSE HIERARCHIQUE ASCENDANTE (18x64)
 MAXIMISATION DU MOMENT CENTRE D'ORDRE 2 D'UNE PARTITION

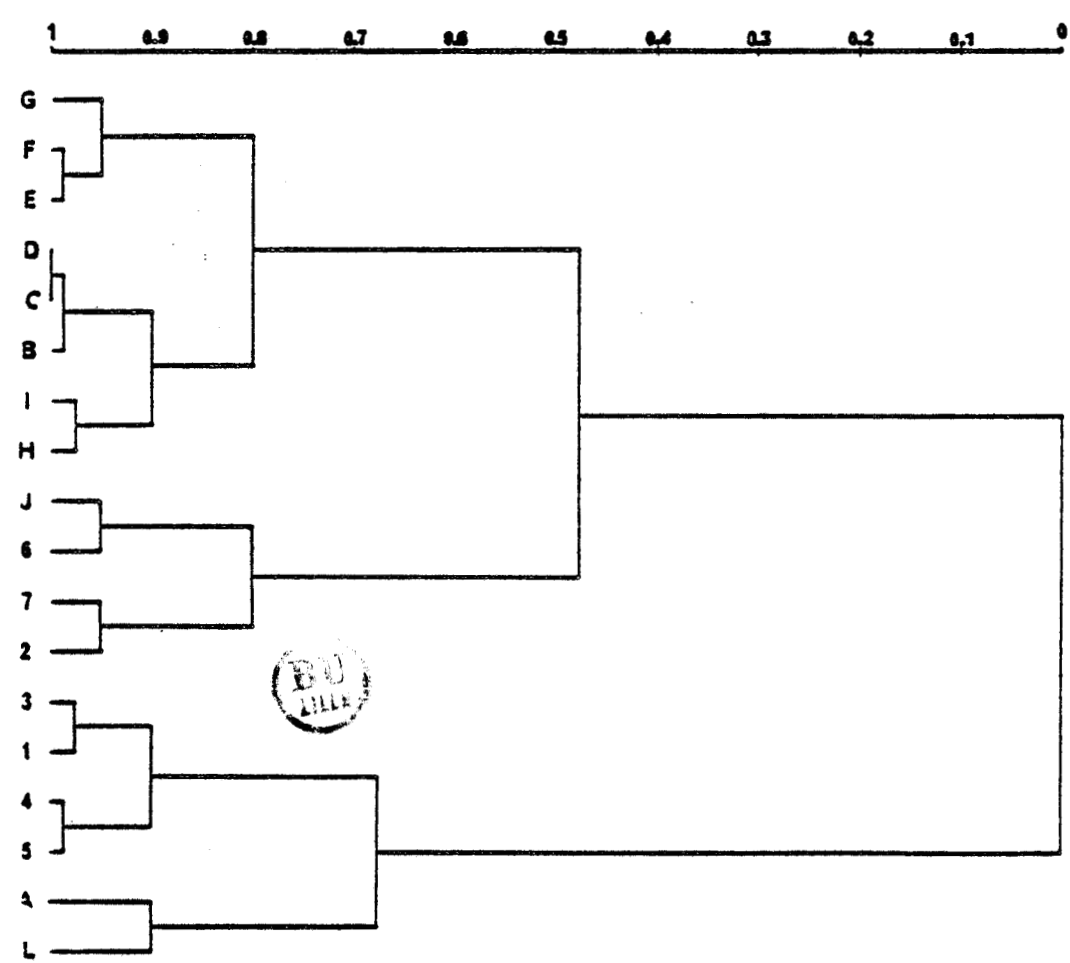


FIGURE n° 35 : ANALYSE HIERARCHIQUE ASCENDANTE (18x64)
 MINIMISATION DU MOMENT CENTRE D'ORDRE 2 DES CLASSES

GENRE	ESPECE	SOUCHE	CODE *
<u>Methanobacterium</u>	<u>formicum</u>	M4	1
	<u>thermoautotrophicum</u>	Δ H	2
		TC5E	3
	<u>thermoformicum</u>	FTF	7
<u>Methanobrevibacter</u>	<u>arboriphilicus</u>	AZ	5
		DH1	4
<u>Methanospirillum</u>	<u>hungatei</u>	JF1	6
<u>Methanosarcina</u>	<u>barkeri</u>	MS	H
		3	G
		UBS	I
		227	J
		FR1	K
	<u>mazei</u>	MC3	F
		S6	E
	<u>thermophila</u> sp. sp.	TM1	B
		MST	D
		CHT155	C
<u>vacuolata</u>		L	
<u>Methanotherix</u>	<u>soehngenii</u>	FE	A

* Code attribué à chaque souche "i" pour faciliter l'interprétation

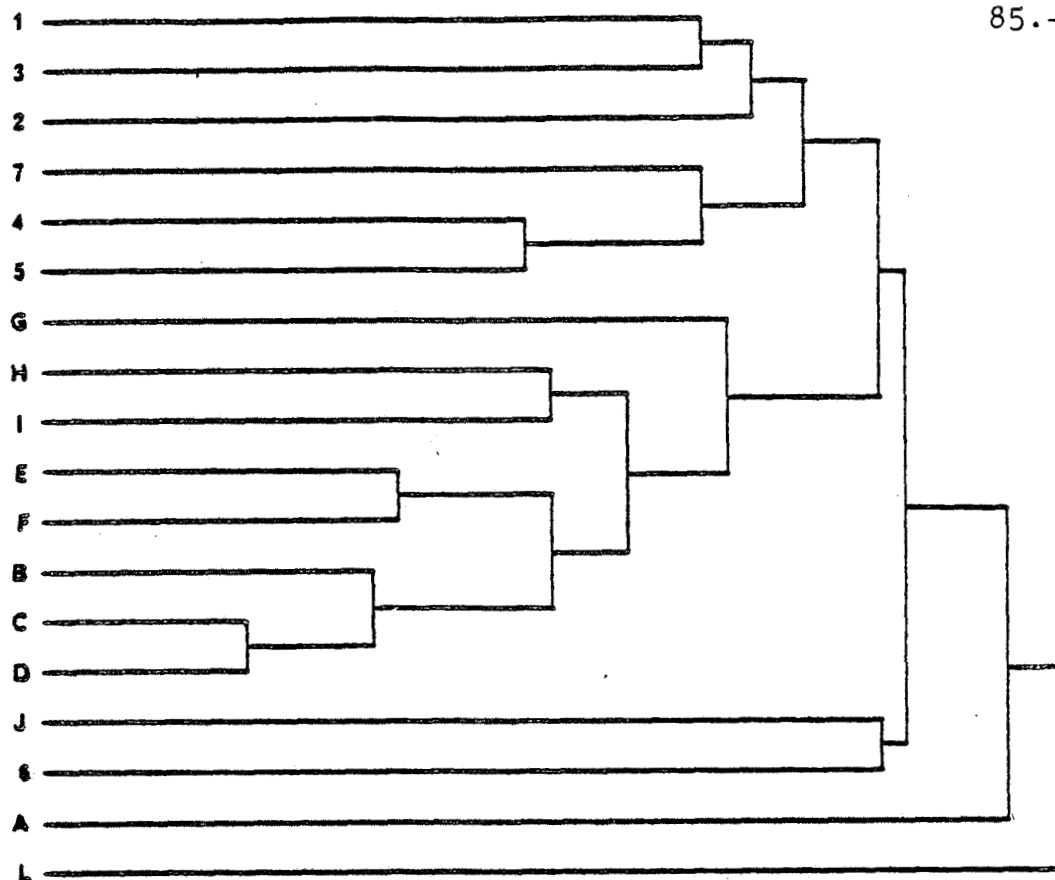


FIGURE n° 36 : ANALYSE HIEARCHIQUE ASCENDANTE (18x64)

MINIMISATION DE LA DISTANCE MOYENNE ENTRE LES CLASSES

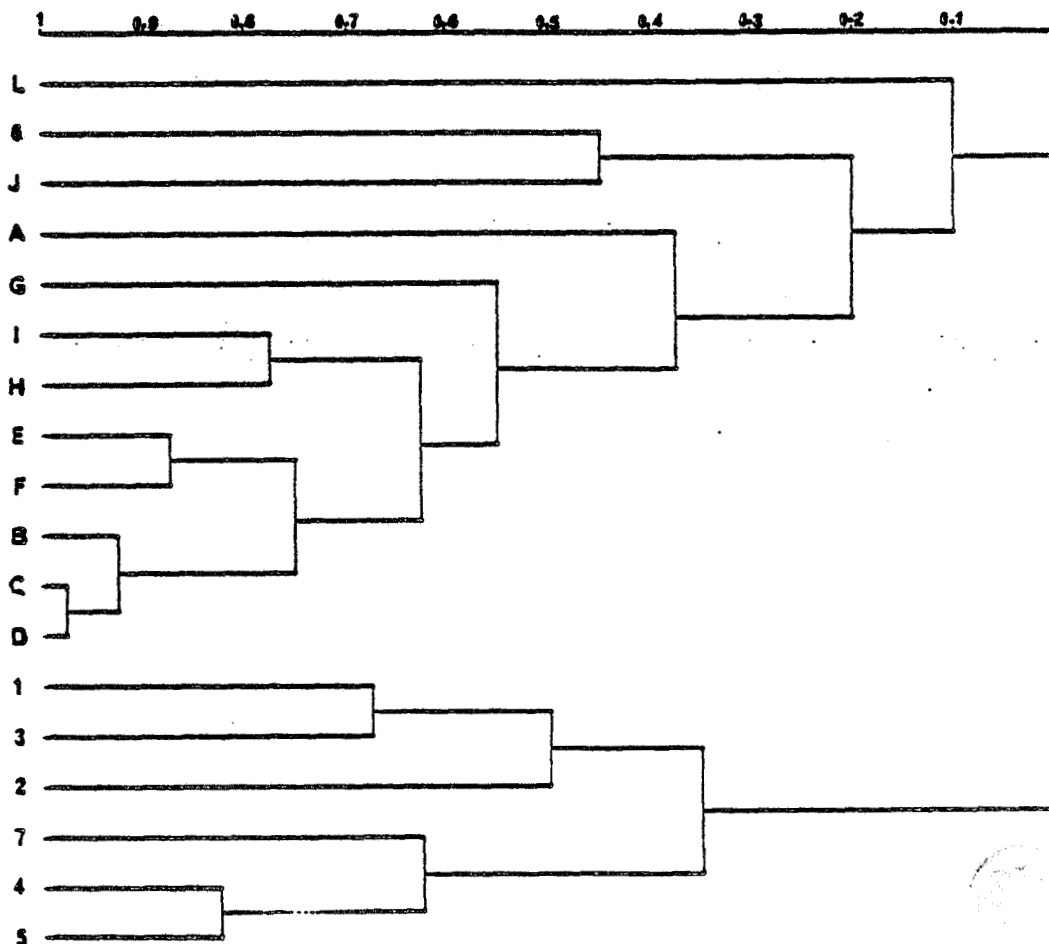


FIGURE n° 37 : ANALYSE HIEARCHIQUE ASCENDANTE (18x64)

MINIMISATION DE LA VARIANCE DES CLASSES

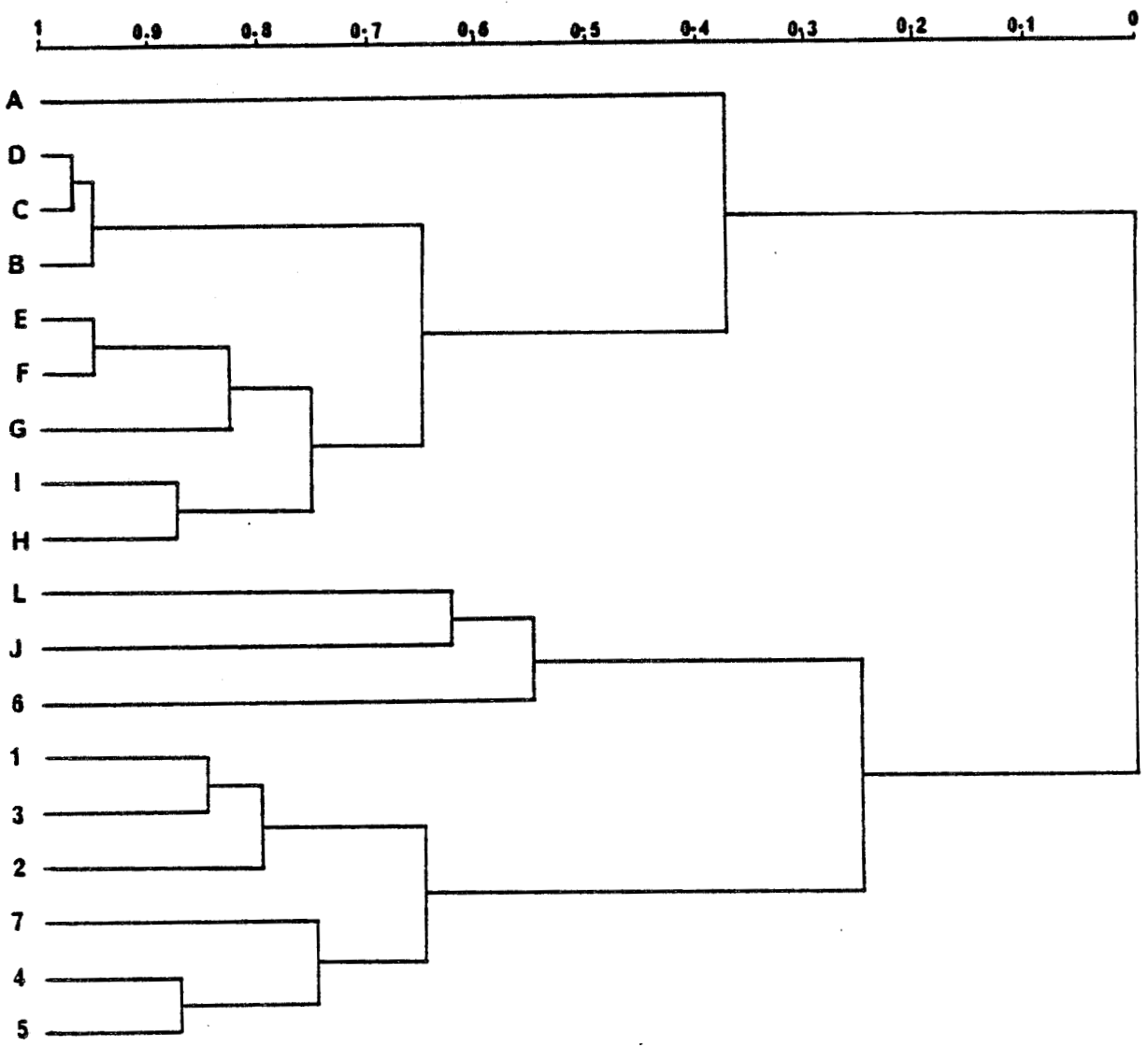


FIGURE n° 38 : ANALYSE HIEARCHIQUE ASCENDANTE (18x77)

MAXIMISATION DU MOMENT CENTRE D'ORDRE 2 D'UNE PARTITION



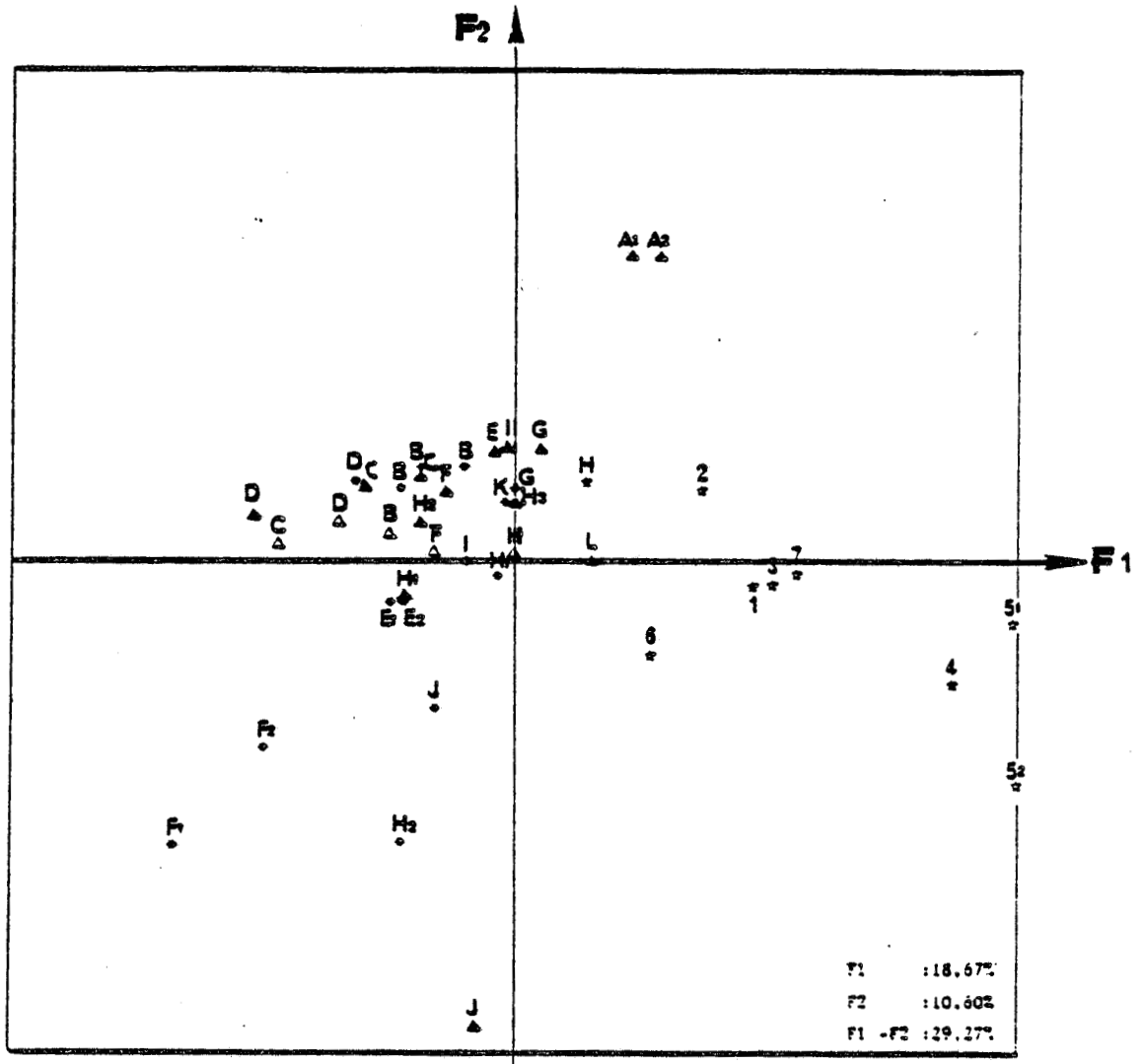


FIGURE n° 39 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (42x77)

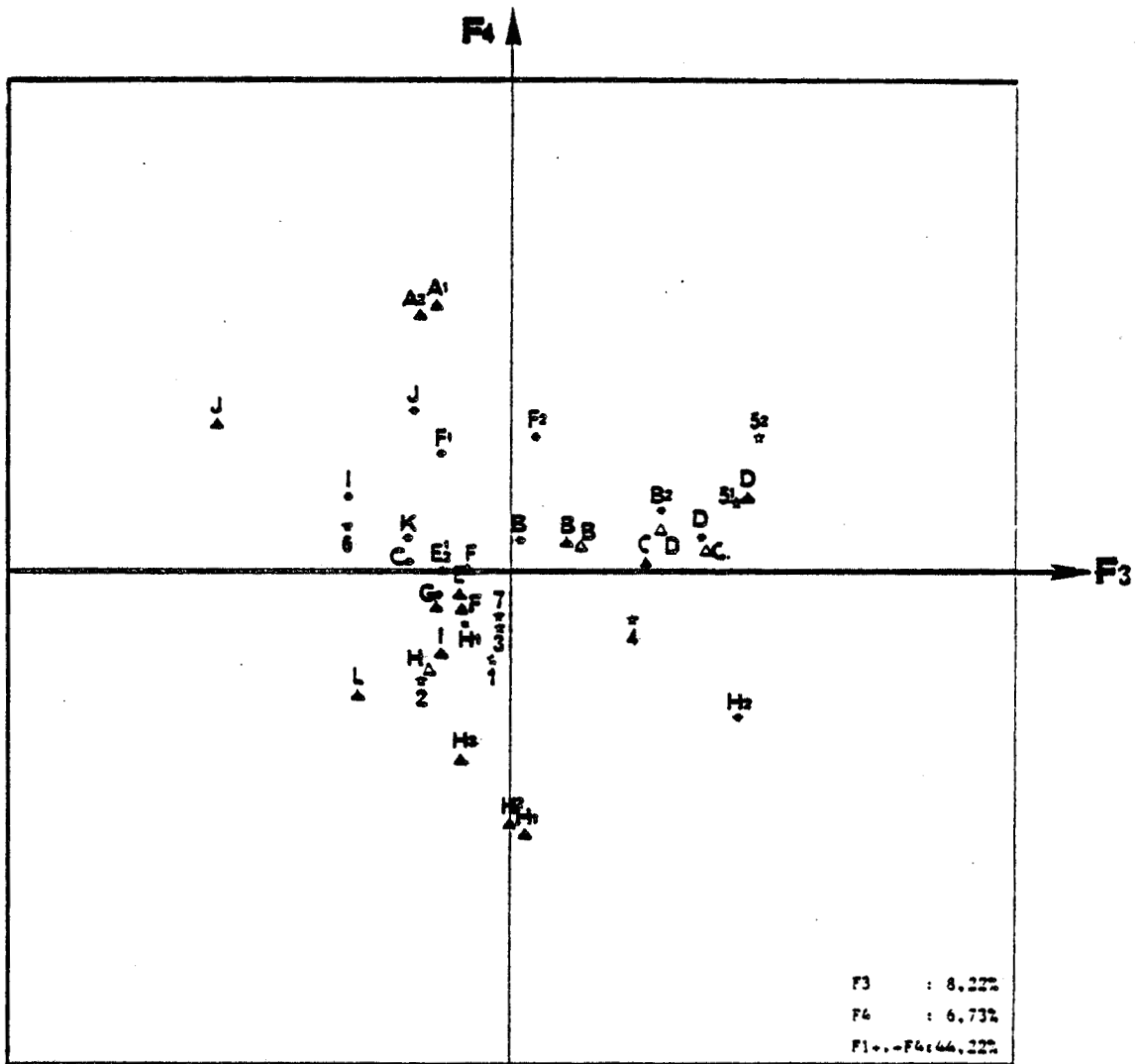
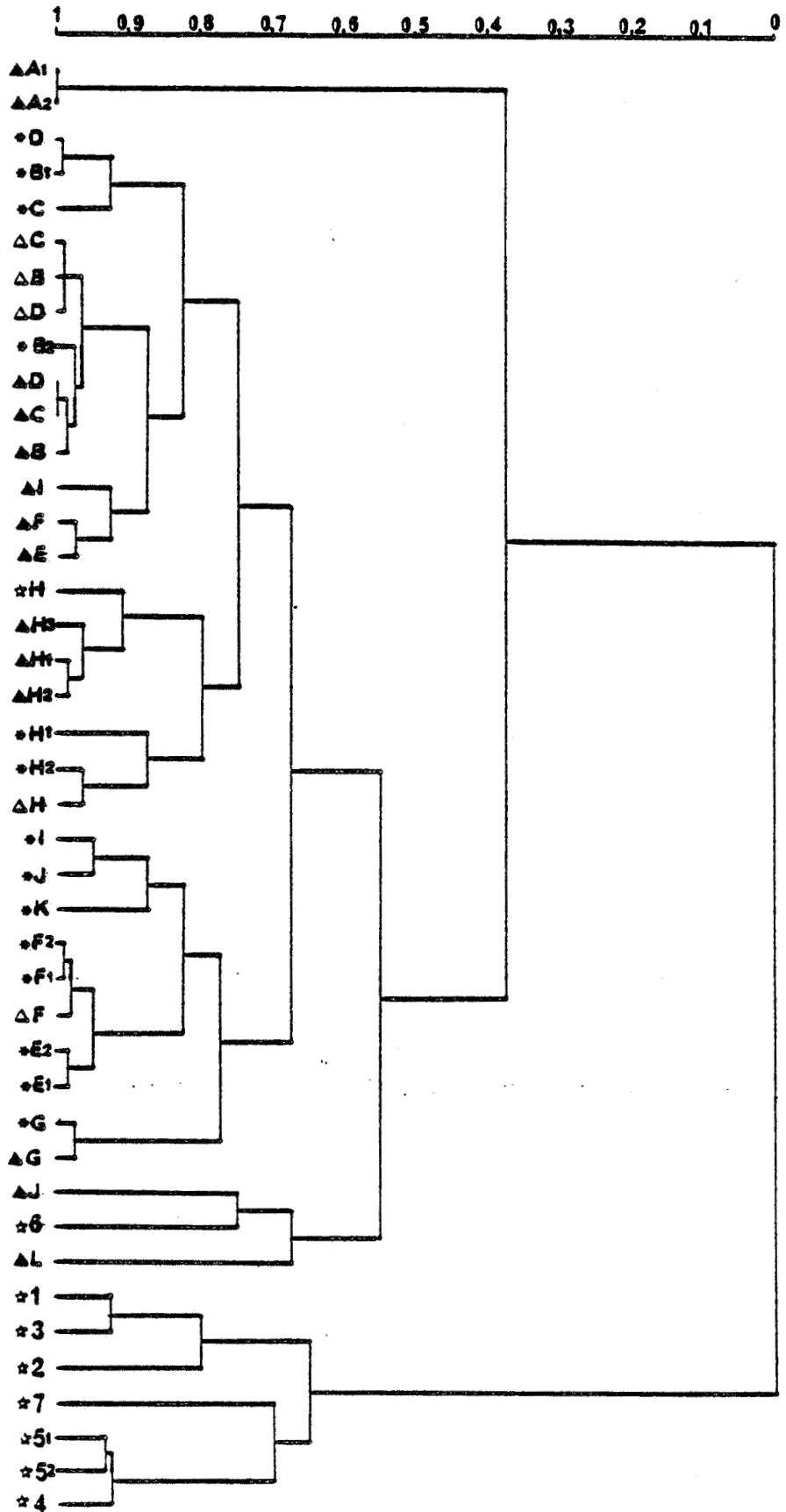


FIGURE n° 39 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (42x77)

- ▲ ACETATE
- * METHANOL
- △ METHYLAMINES
- ☆ HYDROGENE

MAXIMISATION DU MOMENT CENTRE D'ORDRE 2 D'UNE PARTITION



▲ ACETATE
 * METHANOL
 Δ METHYLAMINES
 ☆ HYDROGENE

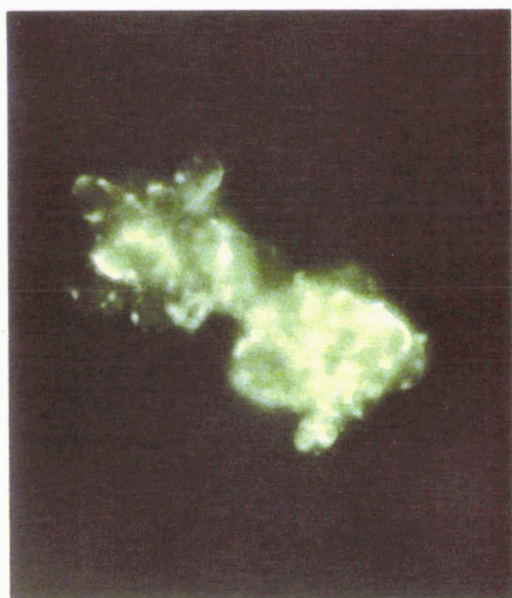
Figure n° 41 : Immunofluorescence indirecte des sarcines en réaction homologue après traitement à l'acétone

- a : Methanosarcina mazei MC3 (G = 1200)
- b : Methanosarcina sp. CHTI 55 (G = 1200)

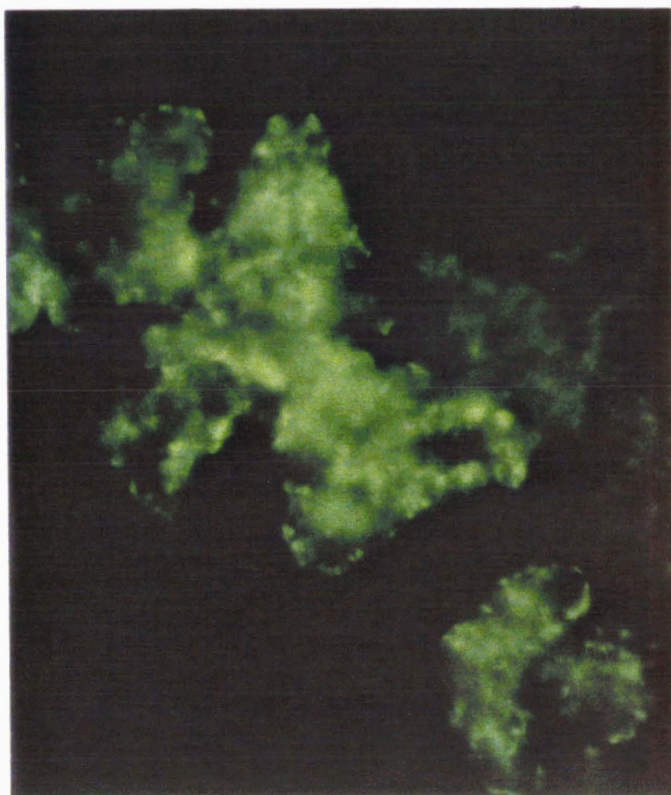
Noter le marquage irrégulier et externe des agrégats

Figure n° 42 : Immunofluorescence indirecte en réaction homologue de Methanotherix soehngeni FE (G = 1200)

Noter le marquage régulier des filaments

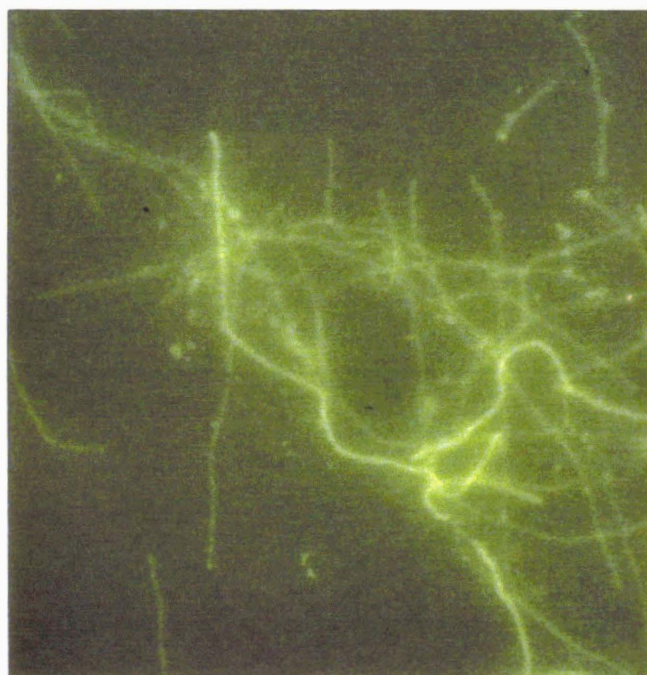


a



b

- FIGURE n° 41 -



- FIGURE n° 42 -

AG \ AC	ANTICORPS										
	AZ	JF1	FE	S6	MC3	TM1	CHT1	MST	VAC	MS	227
M4	+										
ΔH											
TC5E	+										
MAR											
FTF	+										
AZ											
DH1										+	+
JF1											
FE											
S6			+		+	+	+	+	+	+	+
MC3			+			+	+	+	+	+	+
TM1					+			+	+	+	
CHT1				+	+				+	+	+
MST				+	+	+	+				+
VAC					+	+	+			+	+
MS						+	+	+	+		+
227				+	+	+	+	+	+	+	
3				+	+	+		+	+	+	+
UBS				+	+	+	+		+	+	+
OPF.			+								
GP6			+								

FIGURE n° 43 : ANALYSE DES REACTIONS CROISEES CHEZ LES METHANOGENES EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

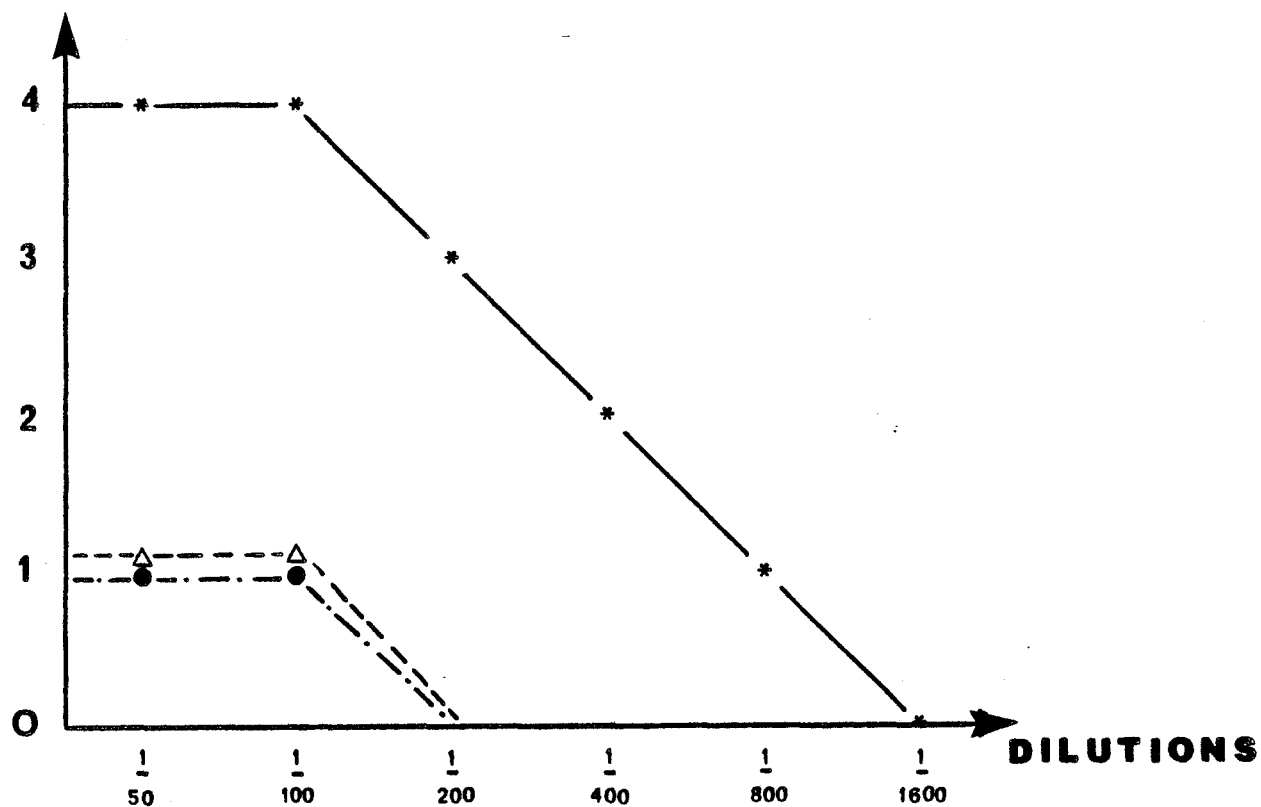
FIGURE n° 44 : TITRATION DE L'IMMUNSERUM ANTI-METHANOTHRIX SOEHNGENII FE

en présence des antigènes : Methanothrix soehngeniei FE *

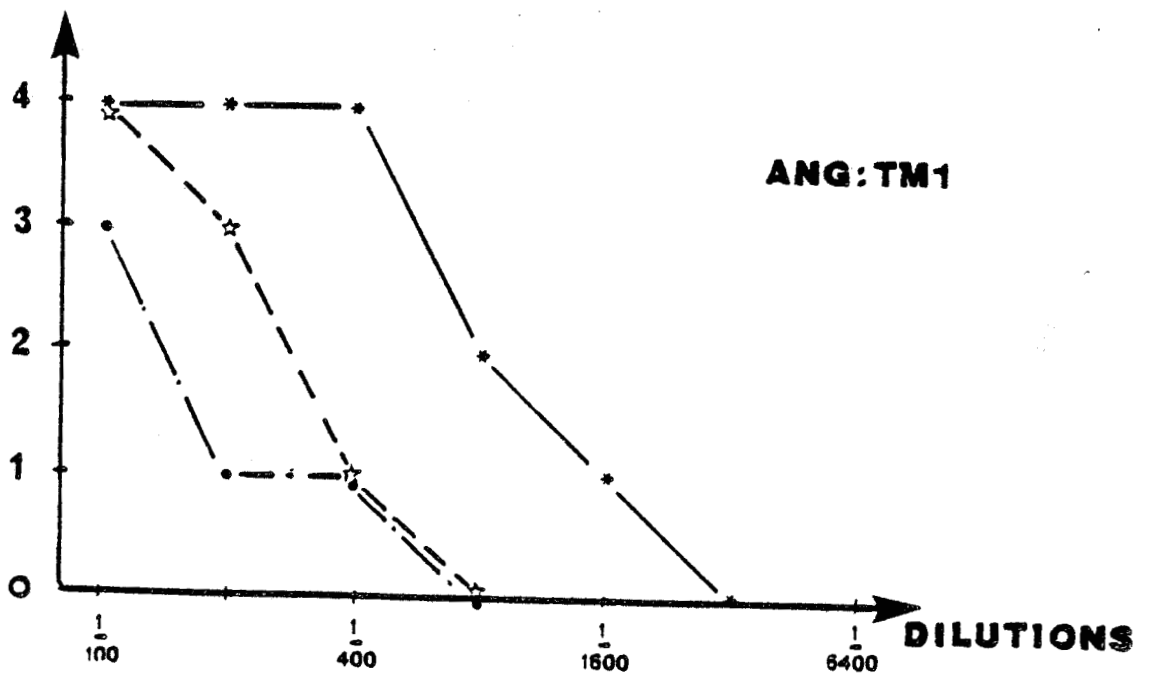
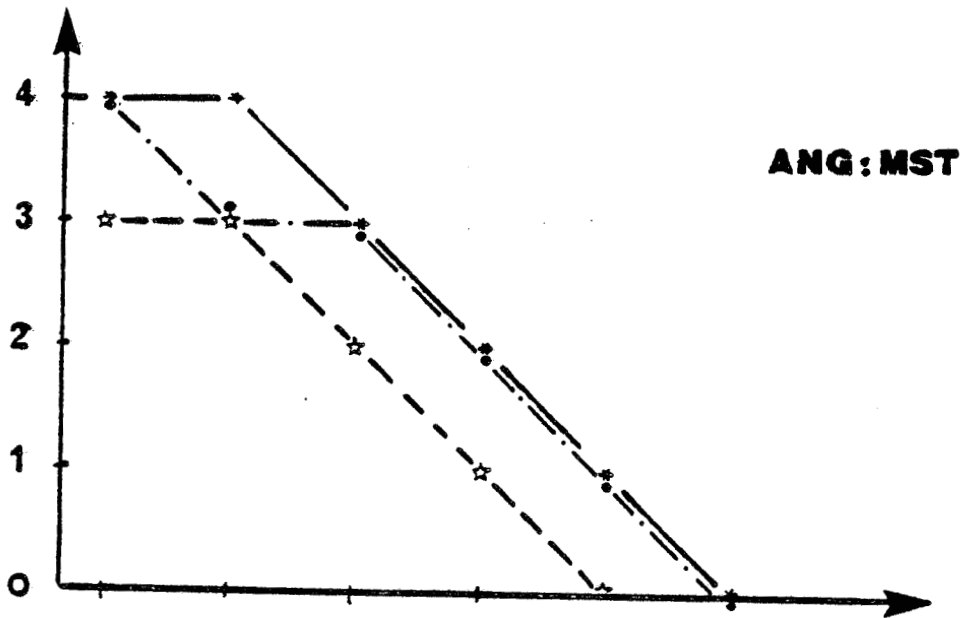
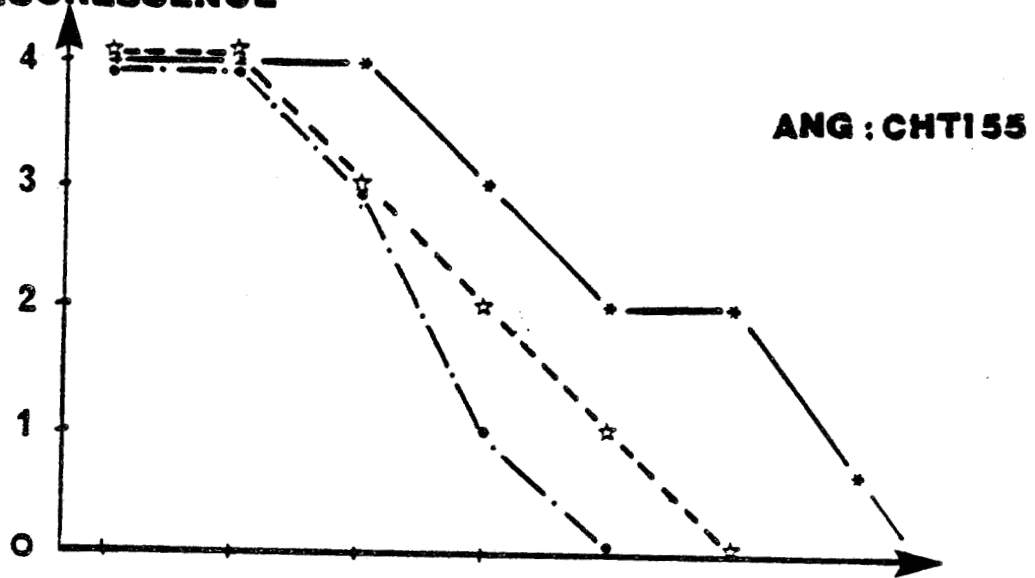
Methanothrix soehngeniei Opficon Δ

Methanothrix concilii GP6 \bullet

**INTENSITE DE
FLUORESCENCE**



**INTENSITE DE
FLUORESCENCE**



* Immunserum anti-Methanosarcina sp. CHTI 55

☆ Immunserum anti-Methanosarcina thermophila TM1

• Immunserum anti-Methanosarcina sp. MST

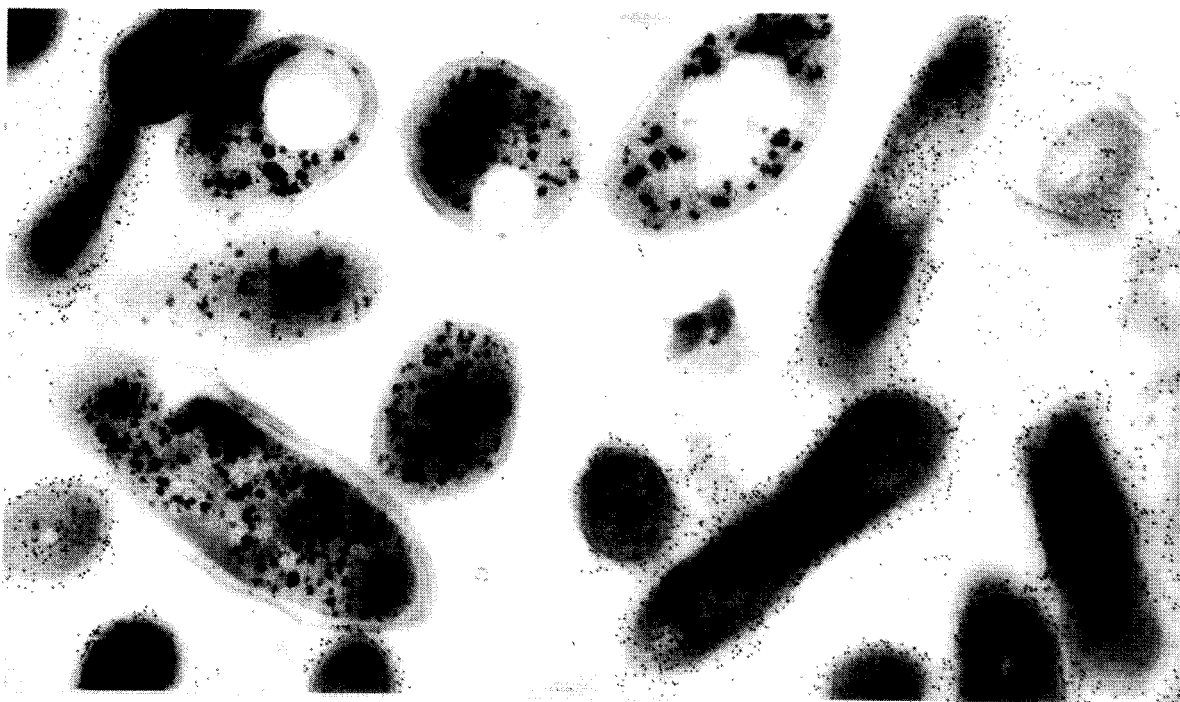
Figure n° 46 : Granule méthanogène

- a : microcolonie mixte de bactéries Gram négatives et de bacilles de morphologie analogue à Methanobrevibacter arboriphilus (G = 28 000)

- b : identification de Methanobrevibacter arboriphilus AZ au sein de colonies mixtes par immunomarquage à l'or colloïdal (G = 30 000)



- FIGURE n°46a -

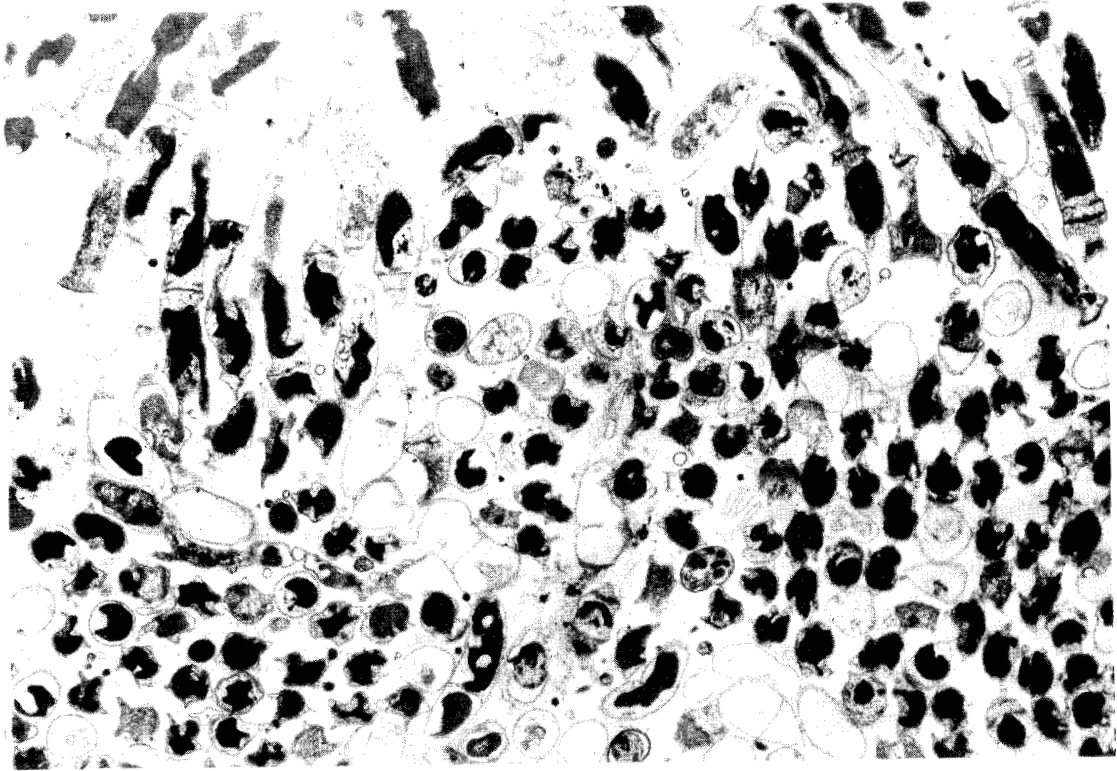


- FIGURE n°46b -

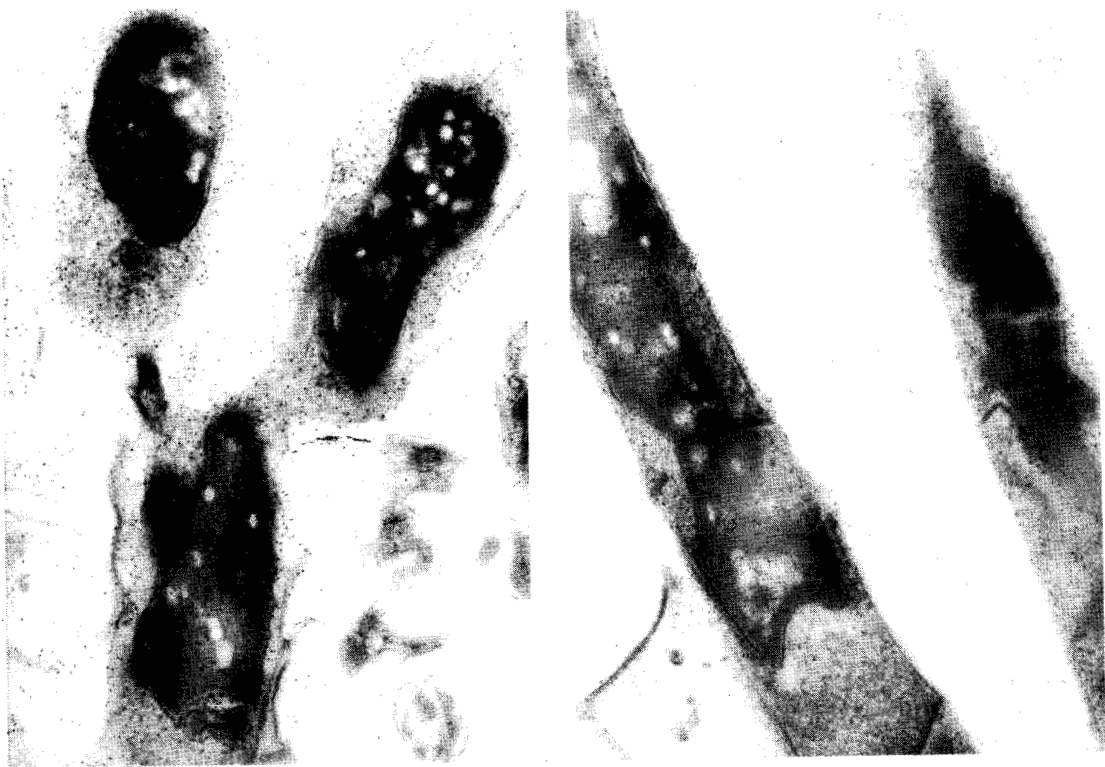
BU
LILLE

Figure n° 47 : Granule méthanogène

- a : microcolonie de bactéries filamenteuses de structure analogue à Methanothrix (G = 9 600)
- b : identification correspondante de Methanothrix soehngeni par immunomarquage à l'or colloïdal (G = 11 400 - G = 36 000)



- FIGURE n°47a -



- FIGURE n°47b -



ANALYSE DES REACTIONS CROISEES

avec les surnageants centrifugés (12 000 rpm) après dispersion mécanique

Figure n° 48 : En immunodiffusion double entre :

a - les surnageants de :

- | | |
|---------------------------------------|---|
| (1) <u>Methanosarcina barkeri</u> 227 | (2) <u>Methanosarcina mazei</u> MC3 |
| (3) <u>Methanosarcina mazei</u> S6 | (4) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 |
| (5) <u>Methanosarcina vacuolata</u> | (6) <u>Methanosarcina barkeri</u> MS |
- et les immunséra anti :
- | | |
|--------------------------------------|---|
| (A) <u>Methanosarcina barkeri</u> MS | (B) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 |
| (C) <u>Methanosarcina mazei</u> S6 | |

b - les surnageants de :

- | | |
|---|--------------------------------------|
| (1) <u>Methanosarcina mazei</u> S6 | (2) <u>Methanosarcina vacuolata</u> |
| (3) <u>Methanosarcina</u> sp. CHTI 55 | (4) <u>Methanosarcina</u> sp. MST |
| (5) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 | (6) <u>Methanosarcina barkeri</u> MS |
- et les immunséra anti :
- | |
|---|
| (A) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 |
| (B) <u>Methanosarcina</u> sp. CHTI 55 |
| (C) <u>Methanosarcina</u> sp. MST |

c - le surnageant de Methanosarcina mazei MC3 (1) & les immunséra anti :

- | | |
|--|---|
| (A) <u>Methanosarcina barkeri</u> MS | (B) <u>Methanosarcina barkeri</u> 227 |
| (C) <u>Methanospirillum hungatei</u> JF1 | (D) <u>Methanosarcina vacuolata</u> |
| (E) <u>Methanosarcina mazei</u> S6 | (F) <u>Methanosarcina mazei</u> MC3 |
| (G) <u>Methanothrix soehngeni</u> FE | (H) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 |
| (I) <u>Methanosarcina</u> sp. MST | (J) <u>Methanosarcina</u> sp. CHTI 55 |

Figure n° 49 : En immunoelectrophorèse

les surnageants de :

- | | |
|--|---|
| (1)(3) <u>Methanosarcina</u> sp. CHTI 55 | (2) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 |
| (4) <u>Methanosarcina mazei</u> MC3 | (5) <u>Methanosarcina mazei</u> S6 |
- et les immunséra anti :
- | | |
|---|---------------------------------------|
| (A) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 | (B) <u>Methanosarcina</u> sp. CHTI 55 |
| (C) <u>Methanosarcina mazei</u> MC3 | (D) <u>Methanosarcina mazei</u> S6 |

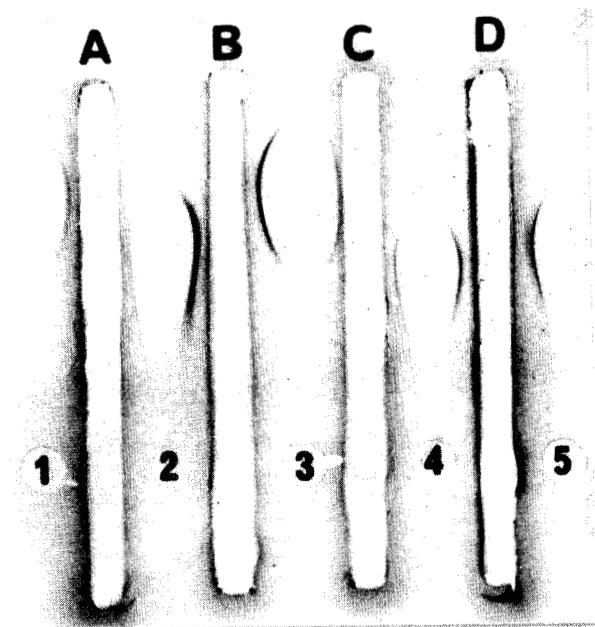
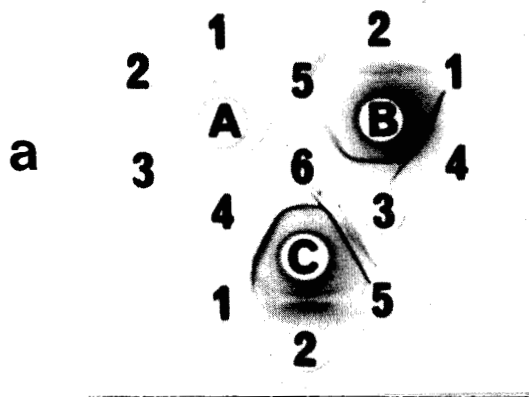
Figure n° 50 : En immunoelectrophorèse

les surnageants de :

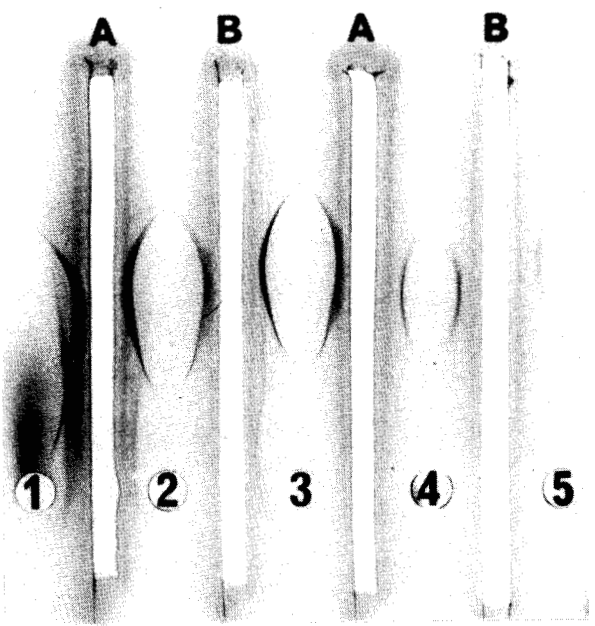
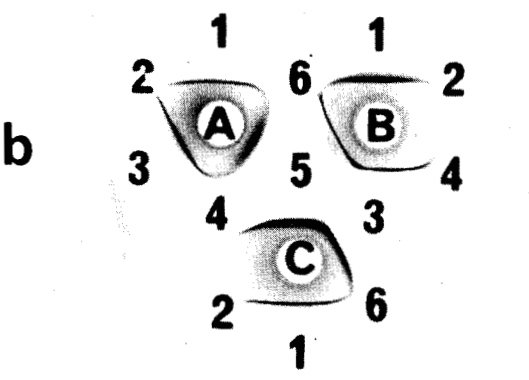
- | | |
|---|---|
| (1) <u>Methanosarcina mazei</u> MC3 (lysée à la presse de French) | |
| (2) <u>Methanosarcina mazei</u> MC3 | (3) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 |
| (4) <u>Methanosarcina barkeri</u> MS | (5) <u>Methanosarcina vacuolata</u> |
- et les immunséra anti :
- | | |
|-------------------------------------|---|
| (A) <u>Methanosarcina mazei</u> MC3 | (B) <u>Methanosarcina thermophila</u> TM1 |
|-------------------------------------|---|

Figure n° 51 : En immunoelectrophorèse bidimensionnelle

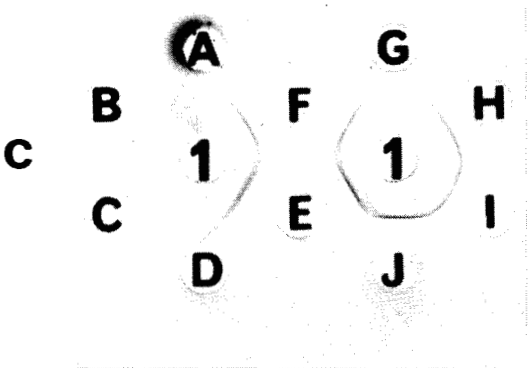
- a - antigène : Methanosarcina sp. CHTI 55/Immunsérum anti CHTI 55
b - antigène : Methanosarcina mazei MC3/Immunsérum anti MC3
c - antigène : Methanosarcina mazei MC3/Immunsérum anti CHTI 55



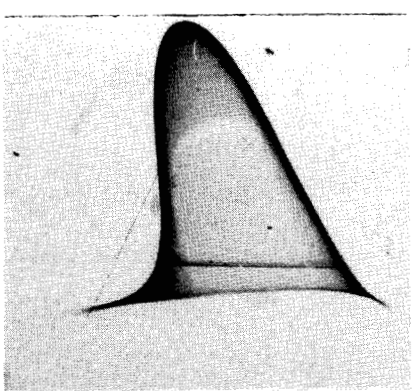
- FIGURE n°49 -



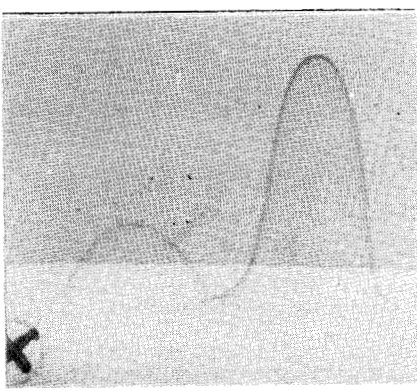
- FIGURE n° 50 -



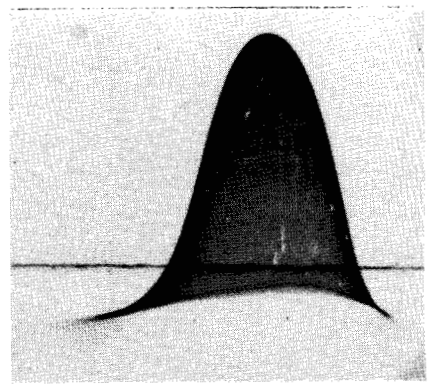
- FIGURE n°48 -



a



b



c

- FIGURE n°51 -

arbitraire dépôt : Lysat cellulaire à la presse de French
 débit : 18.0 ml/h
 Tp : Tris-HCl, NaCl pH 7.2
 $\lambda = 280 \text{ nm}$

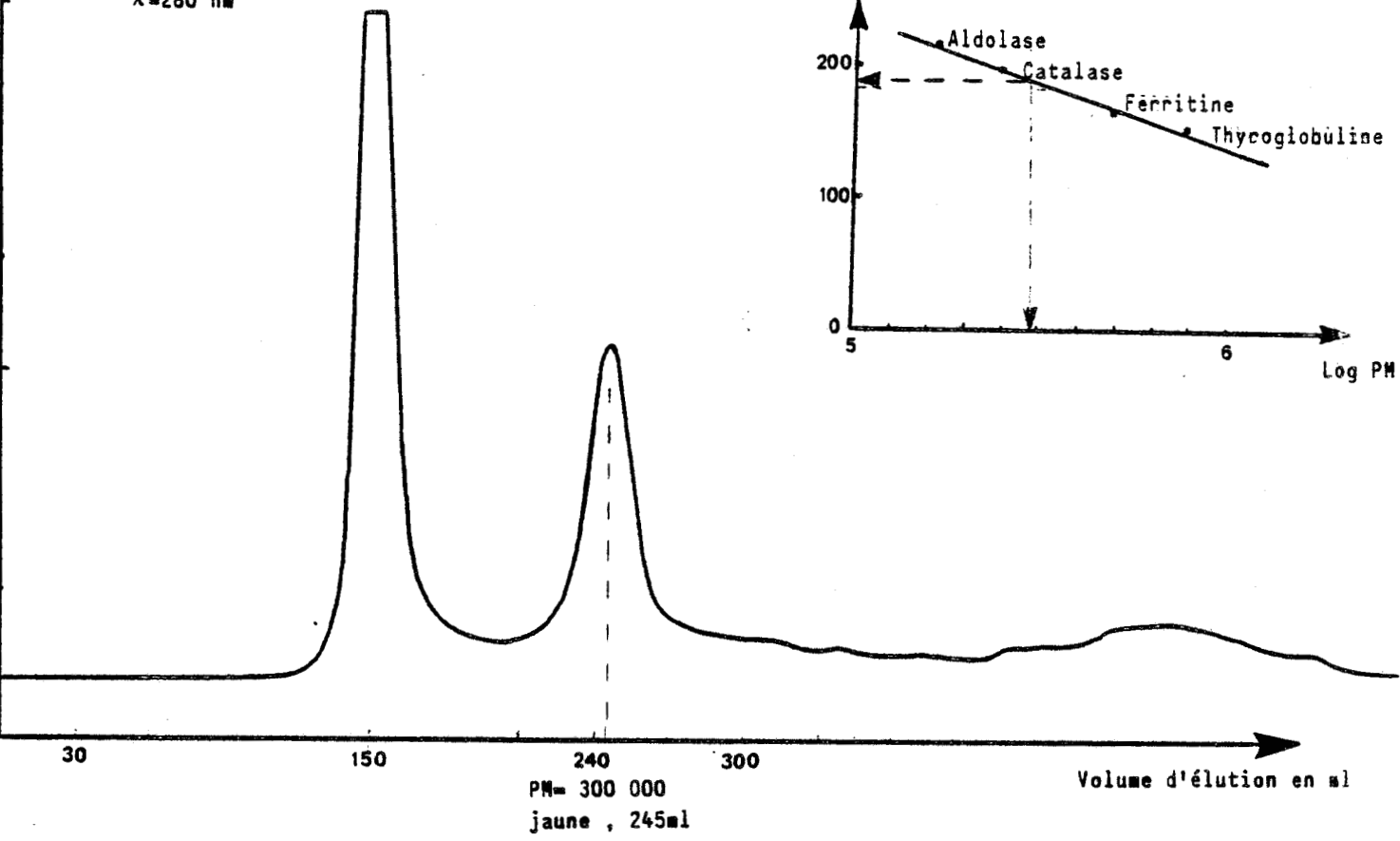


FIGURE n° 52 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE SUR ULTROGEL ACA34

OPTIQUE
arbitraire

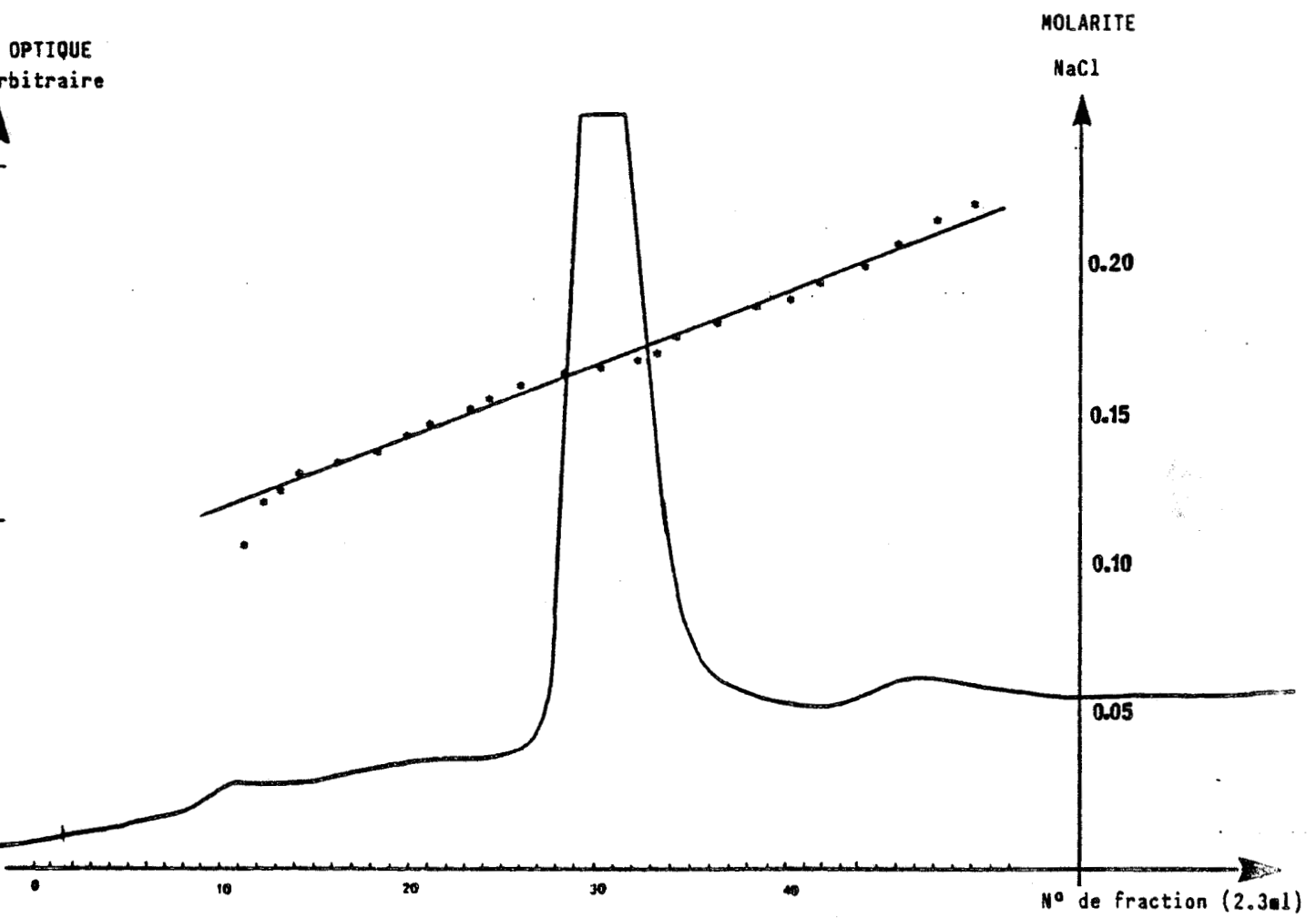


FIGURE n° 53 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE SUR DEAE TRISACRYL

O B T E N T I O N D E L A P R O T E I N E

Figure n° 54 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes

Figure n° 55 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

(A, C, D, Th, Tb) : Révélation au bleu de Coomassie

(Th, Tb, B, C) : Révélation au nitrate d'argent

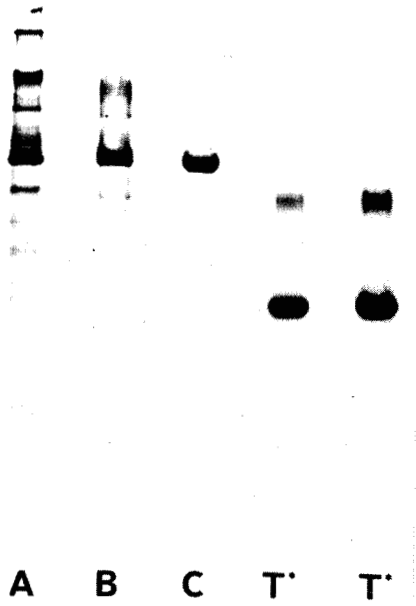
- A - Surnageant de centrifugation (12 000 rpm) de Methanosarcina mazei MC3 après lyse cellulaire à la presse de French
 - B - Surnageant de centrifugation (12 000 rpm) de Methanosarcina mazei MC3 après dispersion mécanique
 - C - Eluat après chromatographie d'exclusion sur ULTROGEL ACA34
 - D* - Eluat après chromatographie échangeuse d'ions DEAE SEPHADEX
 - T - Sérum albumine bovine
 - Th - Kit PHARMACIA de haut poids moléculaire
 - Tb - Kit PHARMACIA de bas poids moléculaire
- (1) Phosphorylase b - PM = 94 000 ; (2) Albumine - PM = 67 000
(3) Ovalbumine - PM = 43 000 ; (4) Anhydrase carbonique - PM = 30 000

Figure n° 56 : Contrôle de purification en immunoélectrophorèse

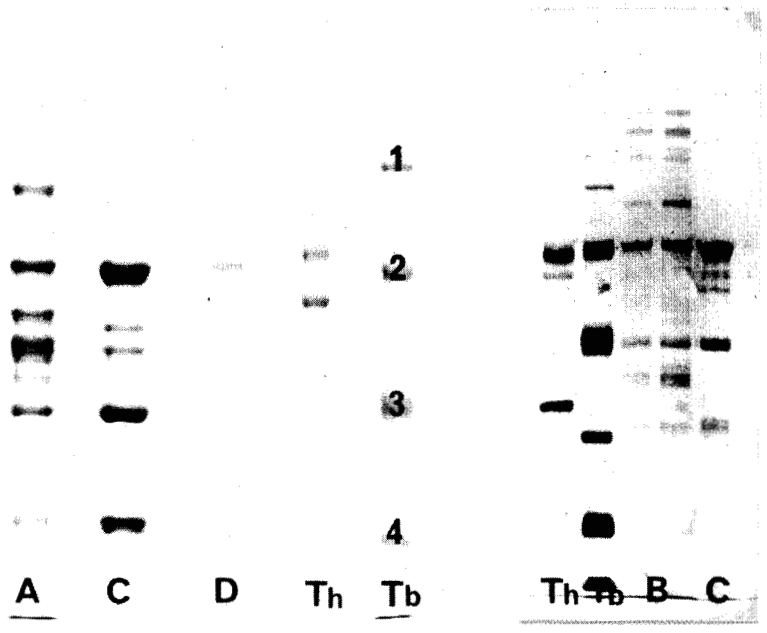
- (A) Immunsérum anti-Methanosarcina mazei MC3 (FP)
- (B) Immunsérum anti-protéine purifiée
- (1)(5) Surnageant de centrifugation (12 000 rpm) de Methanosarcina mazei MC3 après dispersion mécanique
- (2) Surnageant de centrifugation (12 000 rpm) de Methanosarcina mazei MC3 après lyse cellulaire à la presse de French
- (3) Eluat après chromatographie d'exclusion sur ULTROGEL ACA34
- (4) Eluat après chromatographie échangeuse d'ions DEAE TRISACRYL

Figure n° 57 : Analyse des surnageants d'ultracentrifugation de Methanosarcina mazei MC3 après lyse cellulaire à la presse de French. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

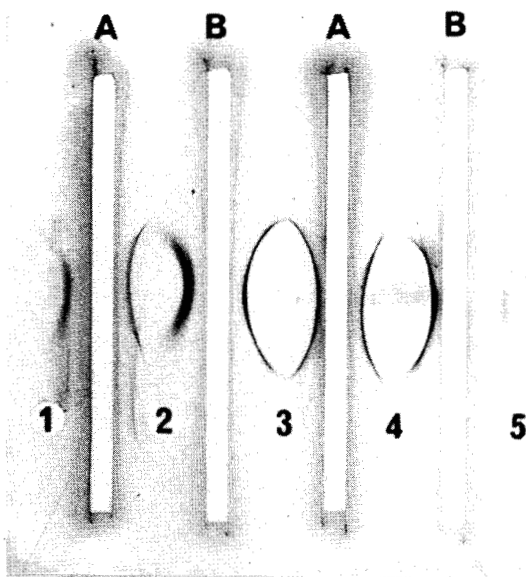
- (1) solution initiale ; (2) 12 000xg 1h ; (3) 50 000xg 1h
- (4) 110 000xg 1h ; (5) 200 000xg 1h ; (6) 110 000xg 2h
- (7) 200 000xg 2h ; Th-Tb témoins de poids moléculaire



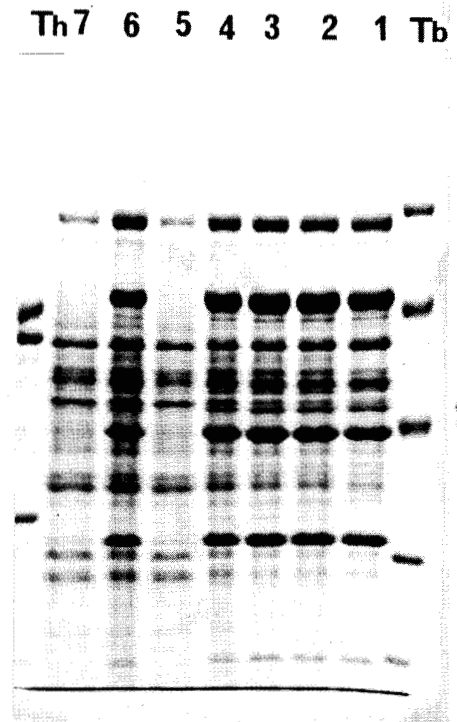
- FIGURE n° 54 -



- FIGURE n° 55 -



- FIGURE n° 56 -



- FIGURE n° 57 -

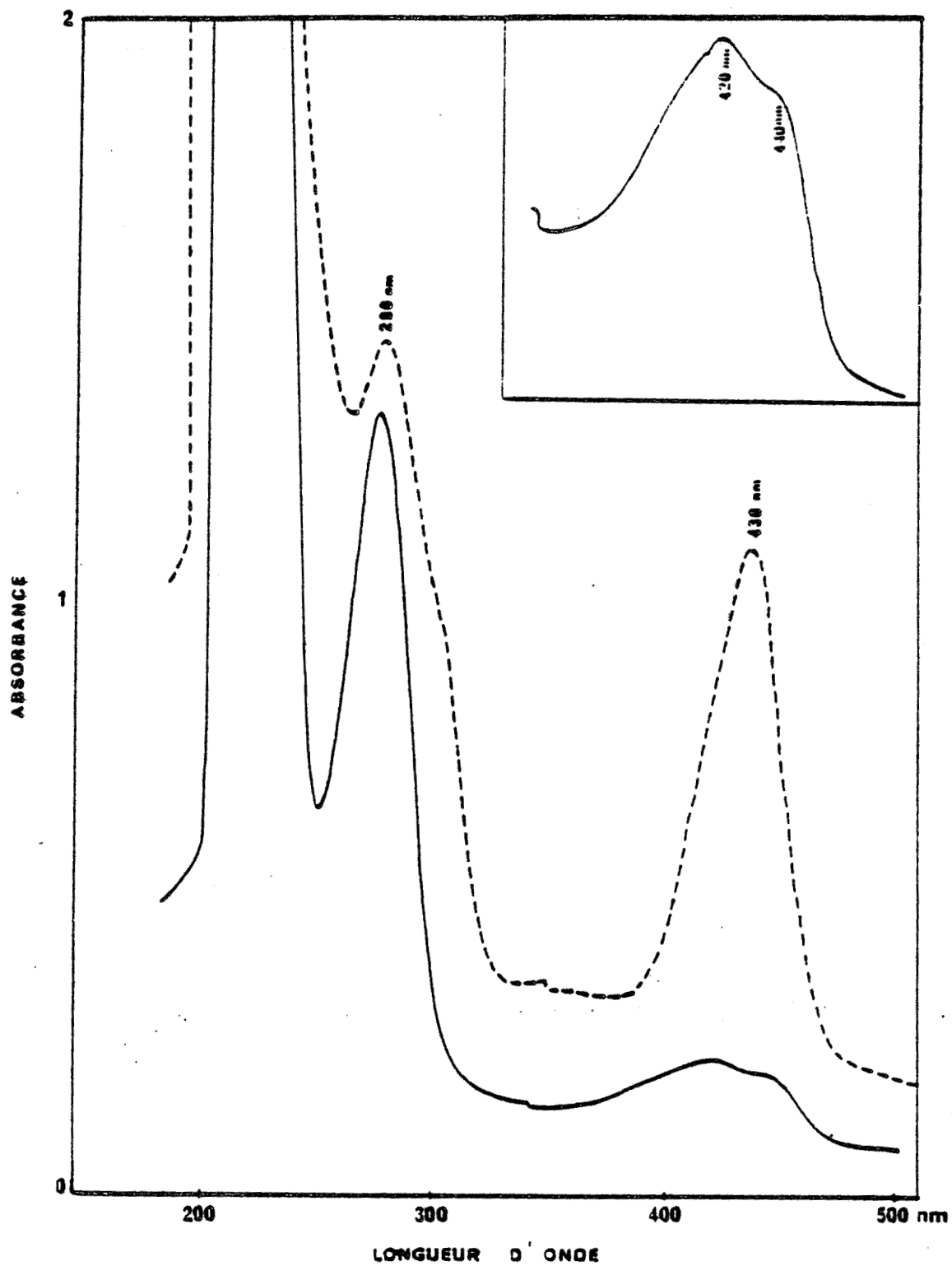


FIGURE n° 58a : SPECTRE UV- VISIBLE DE LA PROTEINE PURIFIEE
- - - SPECTRE UV-VISIBLE DU CO-ENZYME F430 ETALON

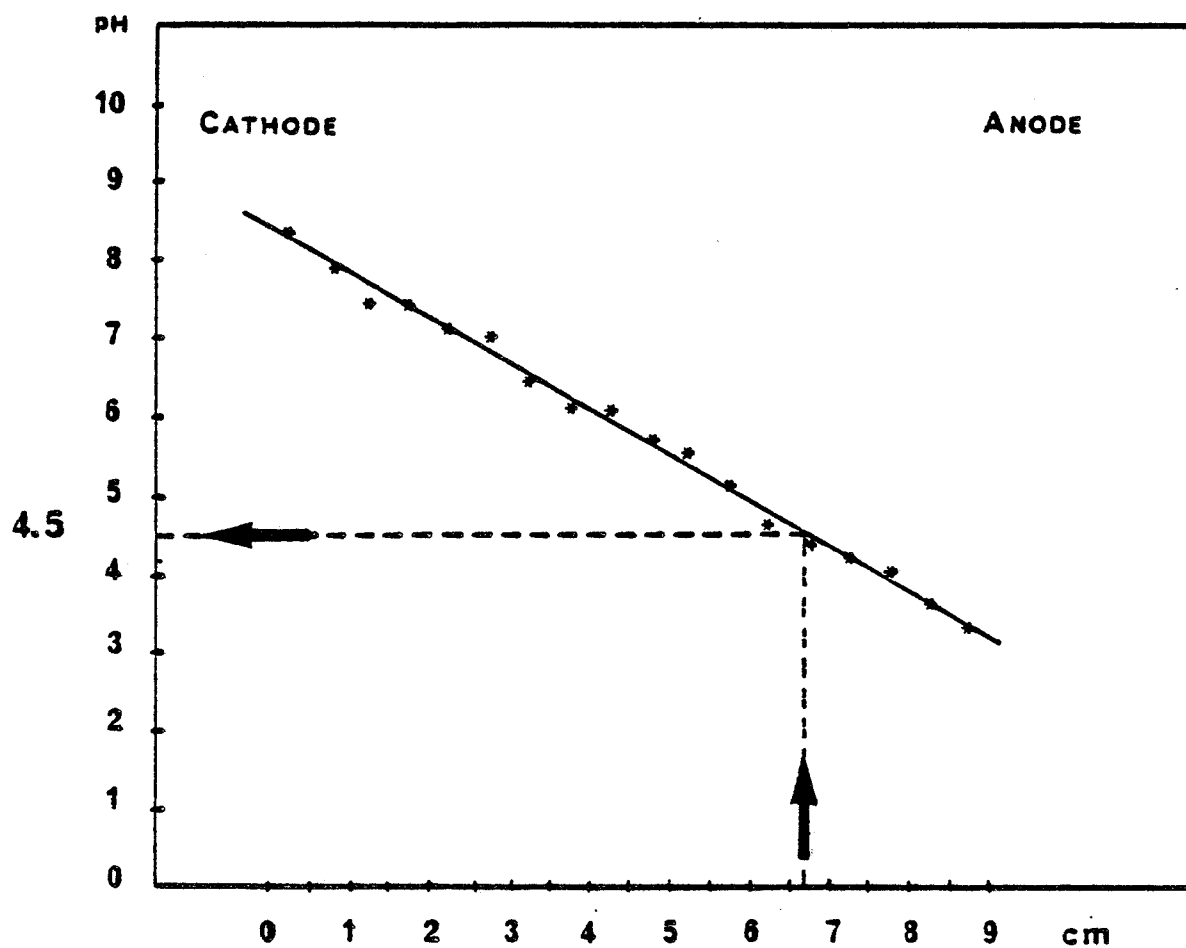
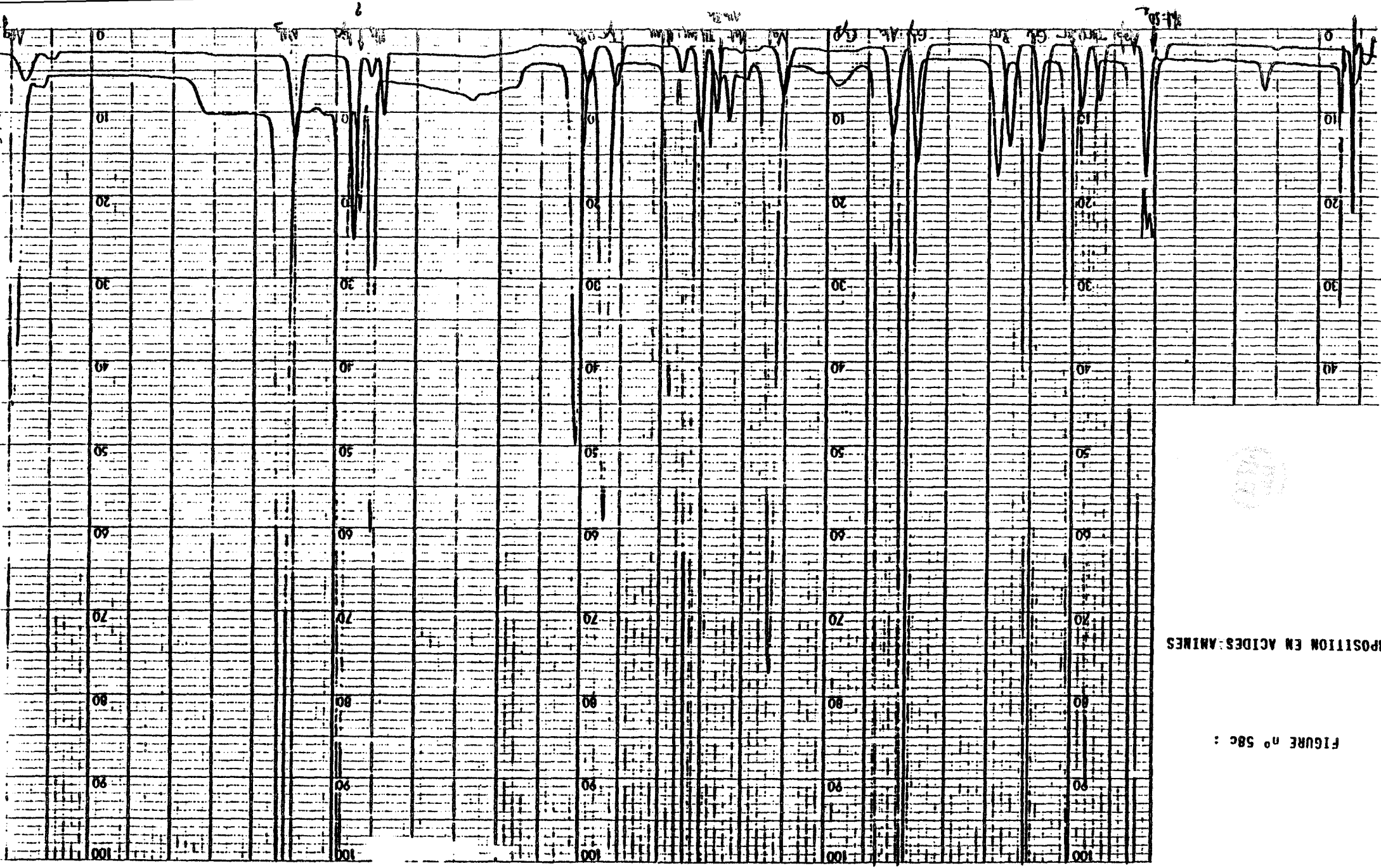


FIGURE n° 58B :: DETERMINATION DU POINT ISO-ELECTRIQUE DE LA PROTEINE PURIFIEE

97.-



COMPOSITION EN ACIDES-ANINES

FIGURE n° 58c :

FIGURE n° 59 : SPECTRE R.P.E. DU NICKEL

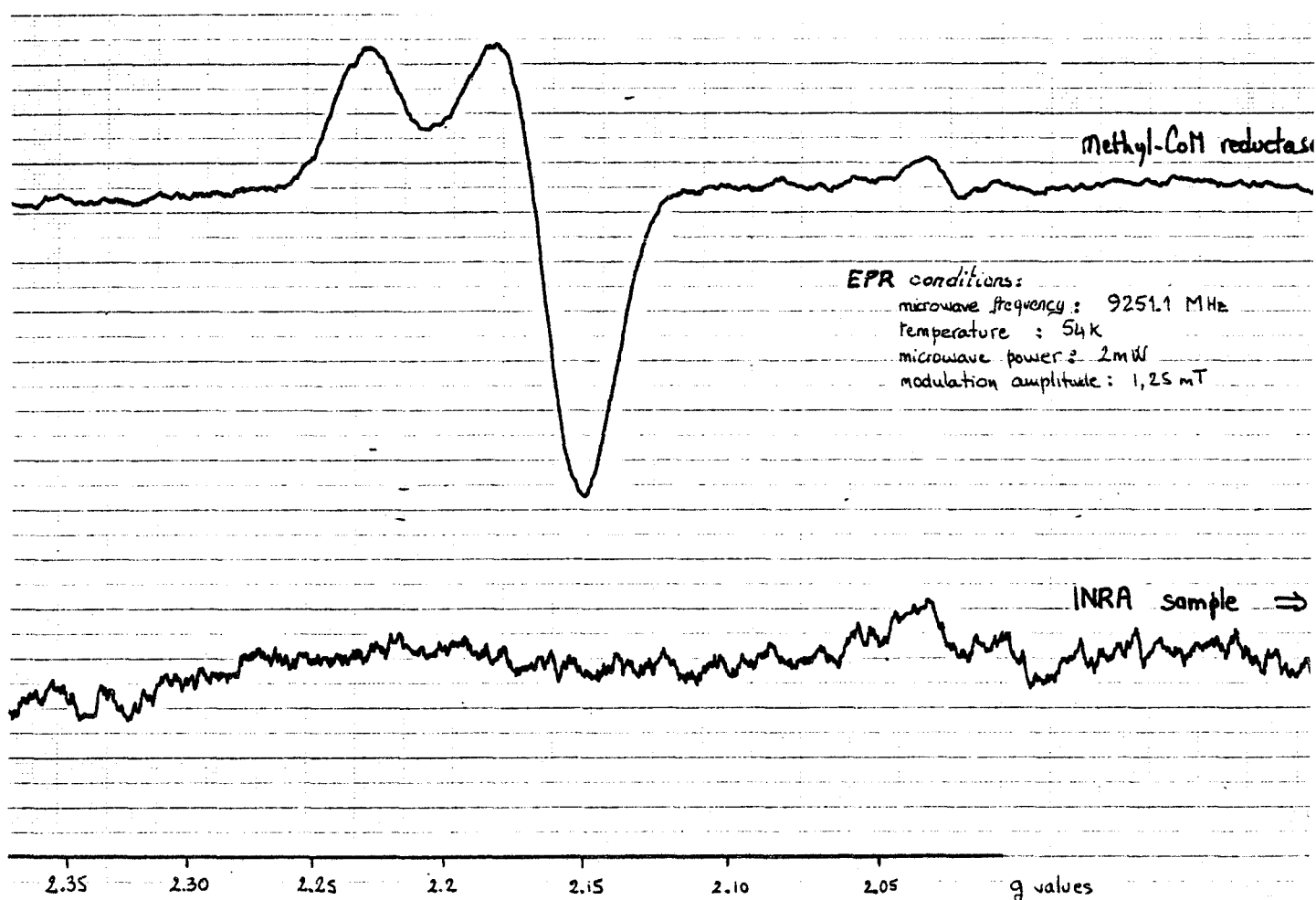
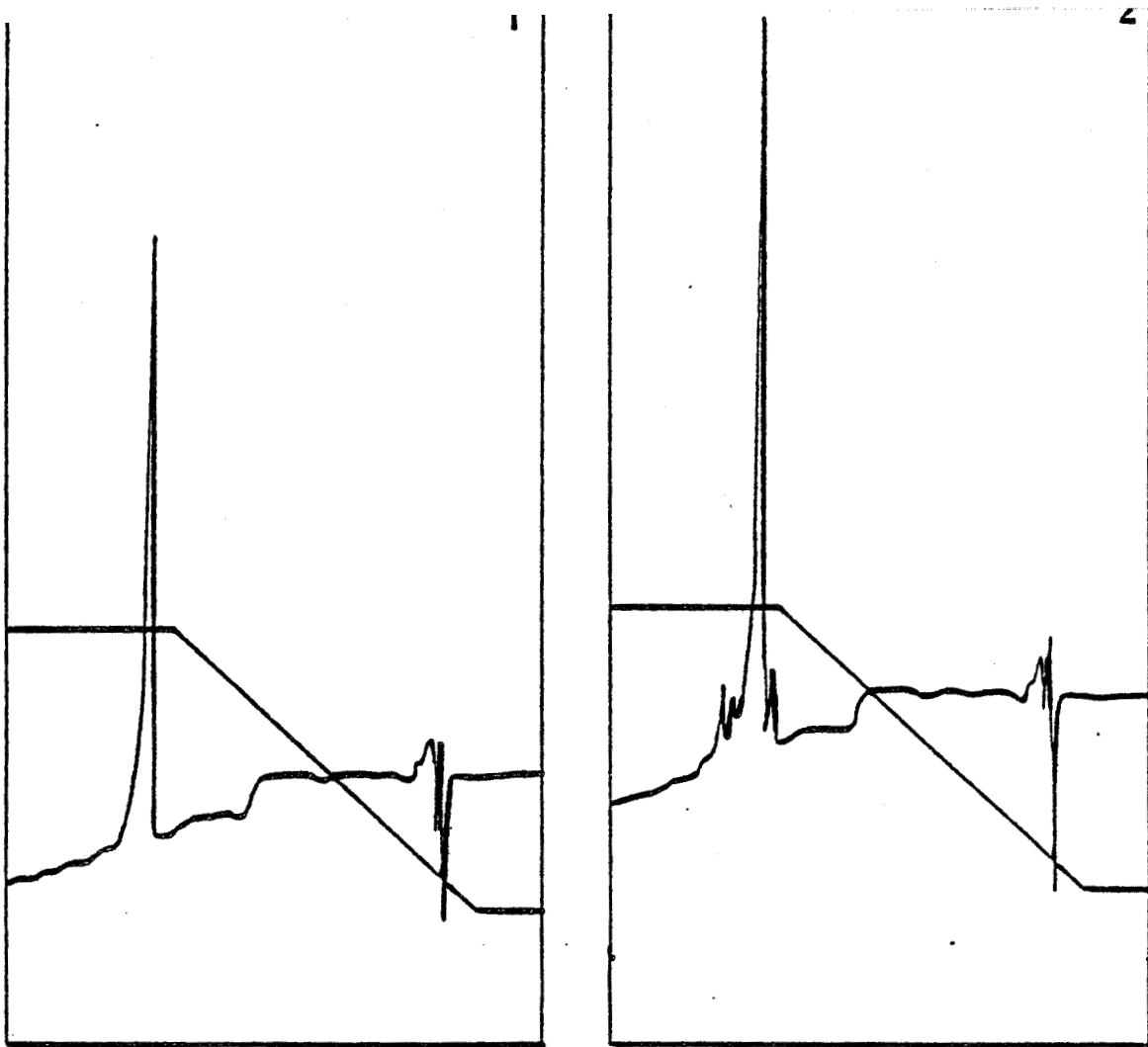


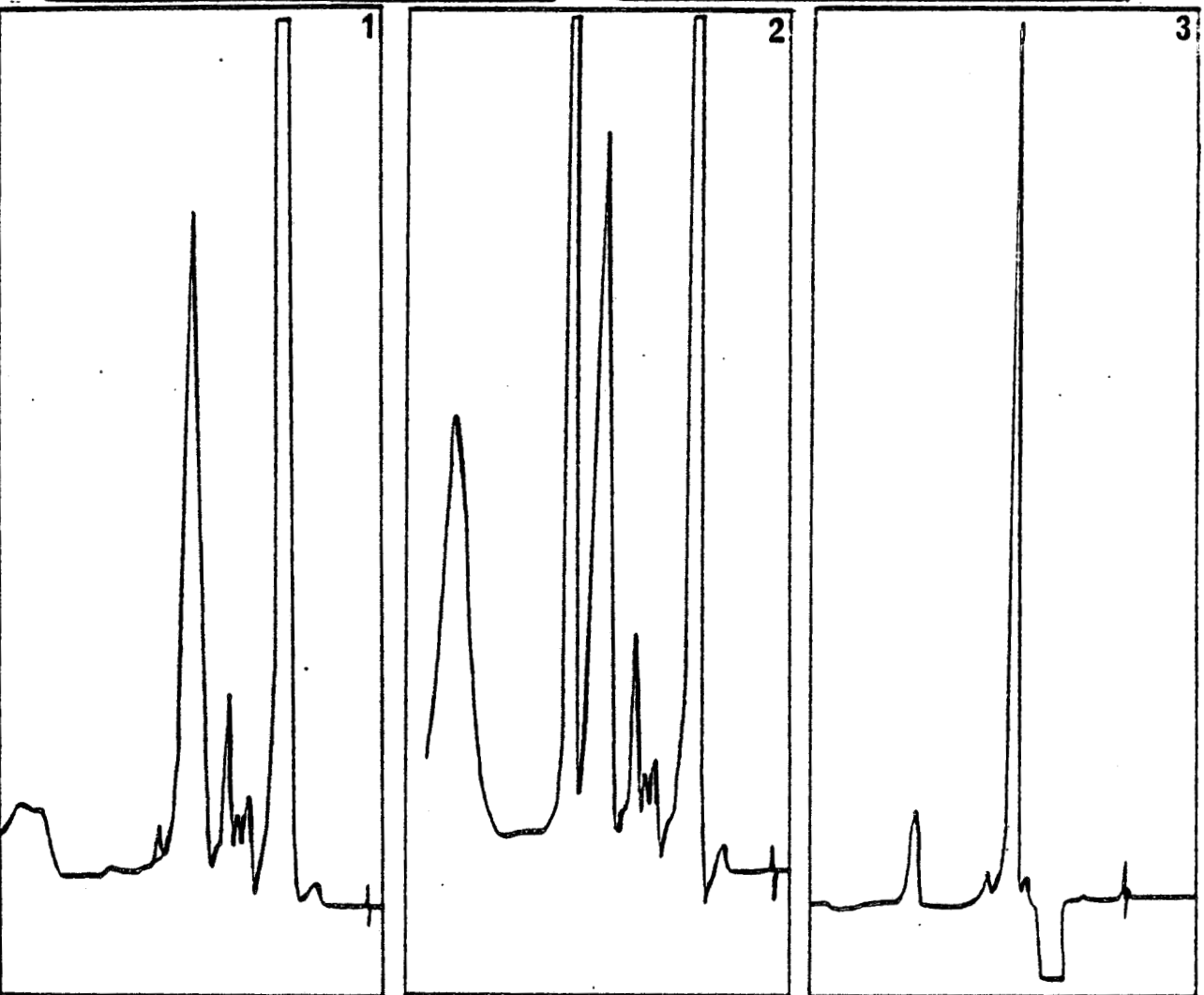
FIGURE n° 60 : DETECTION DES COENZYMES

a1 : FRACTION DEPROTEINISEE v=100µl
 a2 : ETALON F430 v= 50µl
 colonne : Lichrosorb RP 18
 tampon : sol A acide acétique 25 mM pH=6
 sol B méthanol 90%
 débit : 0.8 ml/min
 0.04 AUFS
 λ = 430 nm

b1 : FRACTION DEPROTEINISEE v=100µl
 b2 : MELANGE:FRACTION+ETALON v=100+10µl
 b3 : ETALON CoM 1g/l v=100µl
 colonne : C18
 tampon : sol A méthanol/eau 10%
 sol B méthanol/eau 30% } Pic A
 débit : 0.5 ml/min
 0.01 AUFS
 λ = 240 nm



a



b

FIGURE n° 60 : DETECTION DES COENZYMES

F430 (a) : POM (b)

Figure n° 61 : Immunoélectrophorèse en réactions homologues entre :

- Methanosarcina mazei MC3 lysée à la presse de French (1) ou dispersée mécaniquement (2)
et les immunoséras
- (A) anti-Methanosarcina mazei MC3 (FP)
 - (B) anti-Methanosarcina mazei MC3 (cellules entières)
 - (C) anti-protéine totale
 - (D) anti-sous-unité S1

Figure n° 62 : Immunoélectrophorèse en réactions hétérologues entre :

- (témoin 1) Methanosarcina mazei MC3 lysée à la presse de French
- (témoin 2) Methanosarcina mazei MC3 dispersée mécaniquement
- (3) Methanosarcina thermophila TM1 dispersée mécaniquement
- (4) Methanosarcina barkeri 227 dispersée mécaniquement
- (5) Methanosarcina vacuolata
et l'immunosérum anti-protéine totale de MC3

Figure n° 63 : Immunodiffusion double entre

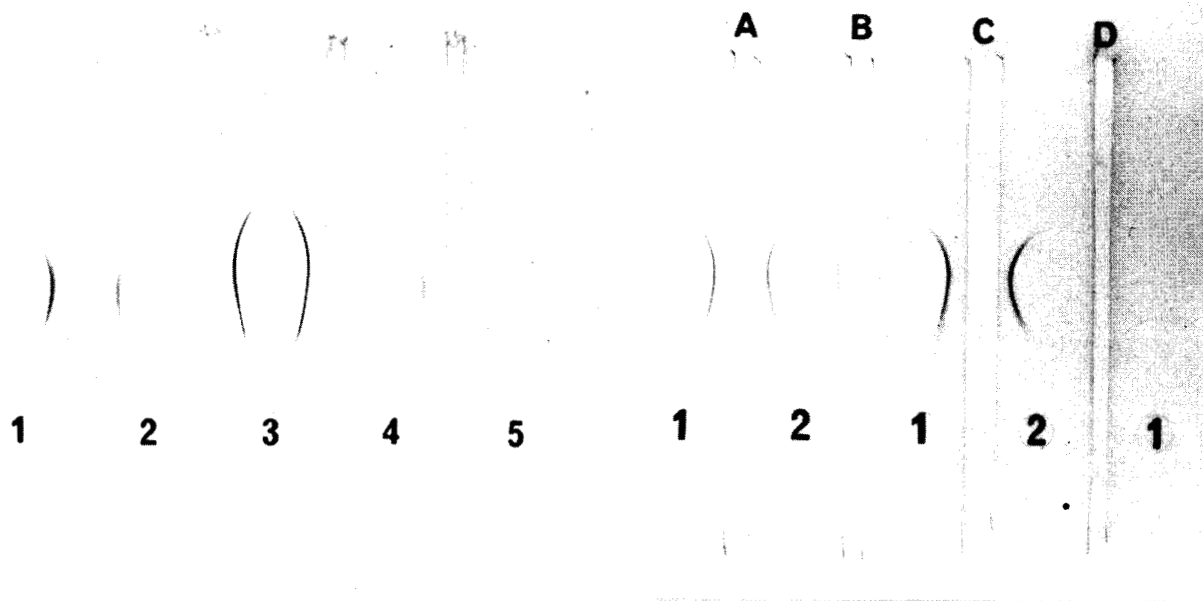
- les cellules lysées à la presse de French
- (1) Methanotherix soehngeni FE
 - (2) Methanosarcina mazei MC3
 - (3) Methanobacterium thermoautotrophicum H
et les immunoséras
- (A) anti-protéine totale
 - (B) anti-Methanosarcina mazei MC3 (FP)
 - (C) anti-Methanosarcina mazei MC3 (cellules entières)
 - (D) anti-Methanotherix soehngeni FE

Figure n° 64 : Profils électrophorétiques en gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes

- (1) Methanotherix soehngeni FE
 - (2) Methanosarcina mazei MC3
 - (3) Methanobacterium thermoautotrophicum H
- Th Kit PHARMACIA de haut poids moléculaire
Tb Kit PHARMACIA de bas poids moléculaire

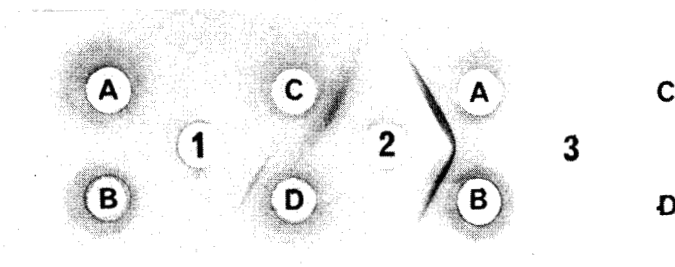
Figure n° 65 : Immunodétection avec les immunoséras

- (0) anti-Methanosarcina mazei MC3 (cellules entières)
 - (1) anti-protéine totale
 - (2) anti-sous-unité S1
 - (3) anti-sous-unité S2
 - (4) anti-sous-unité S3
 - (5) anti-Methanotherix soehngeni FE
- après électrotransfert des profils protéiques des souches MC3, FE, H sur membrane de nitrocellulose

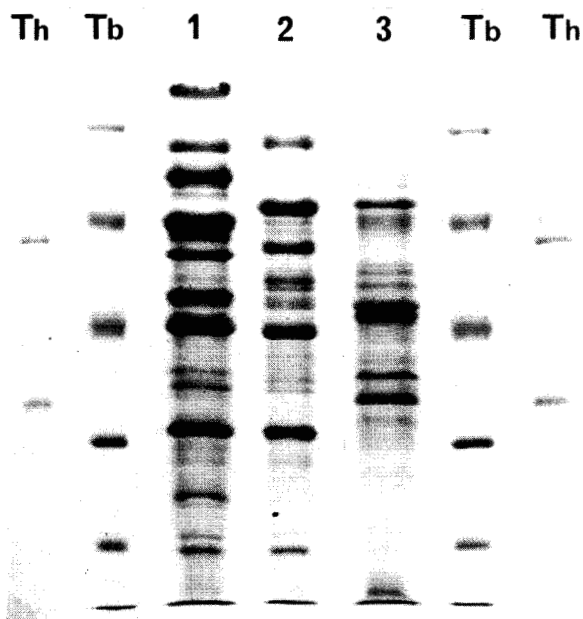


- FIGURE n°62 -

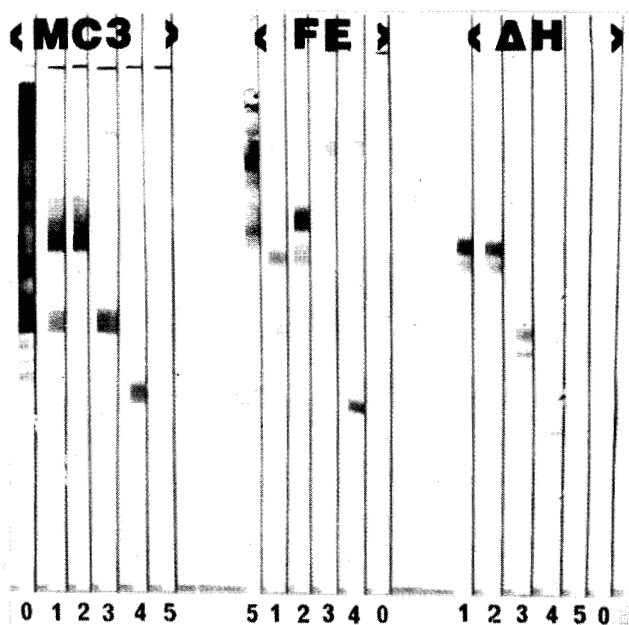
- FIGURE n°61 -



- FIGURE n°63 -



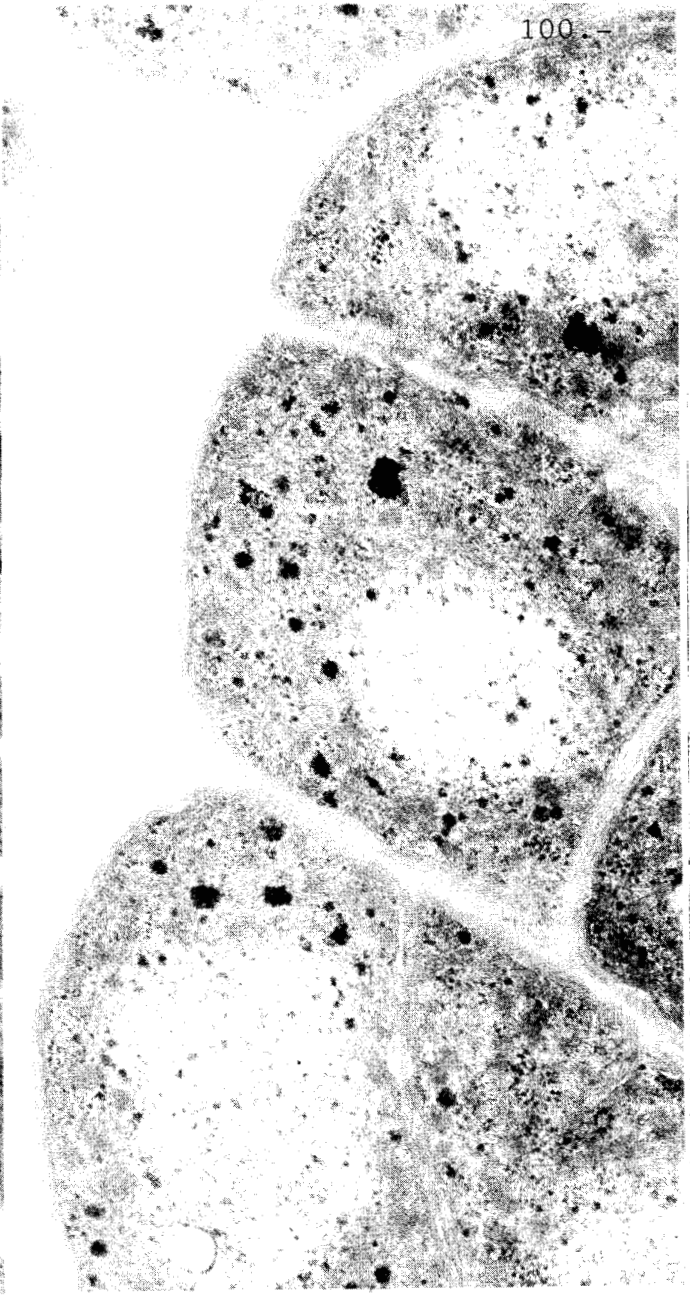
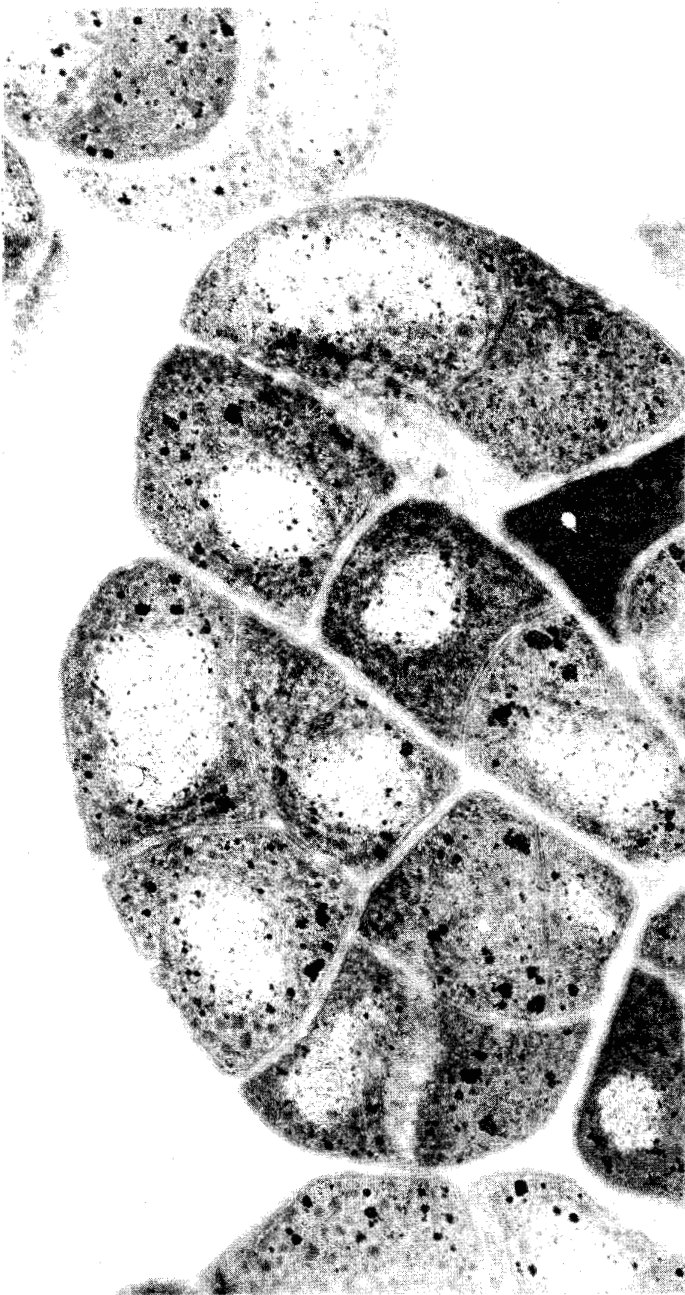
- FIGURE n°64 -



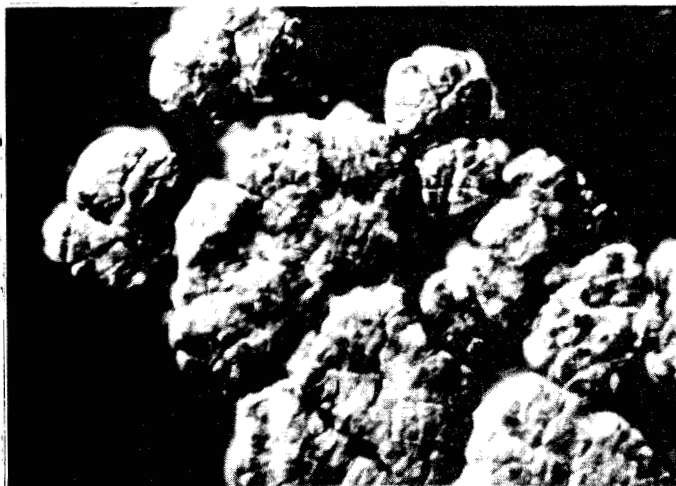
- FIGURE n°65 -

Figure n° 68 : Methanosarcina mazei MC3

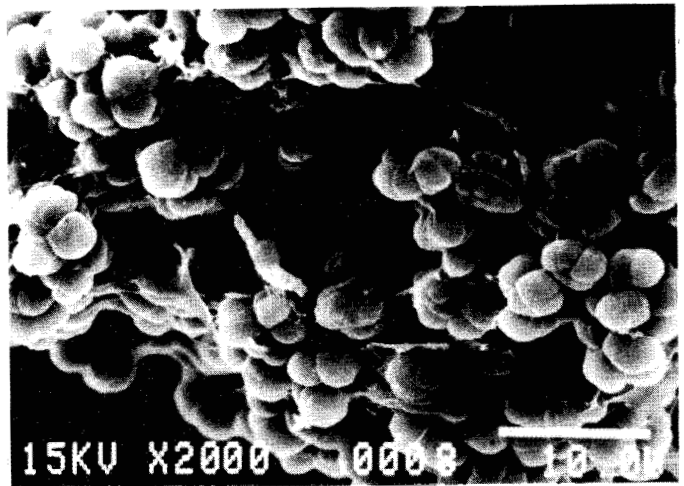
- a : section transversale d'un agrégat
(G = 20 000 ; G = 40 000)
 - b : contraste différentiel (G = 1 000)
 - c : microscopie électronique à balayage (G = 10 000)
- Noter la présence d'exopolymère



- FIGURE n°68a -



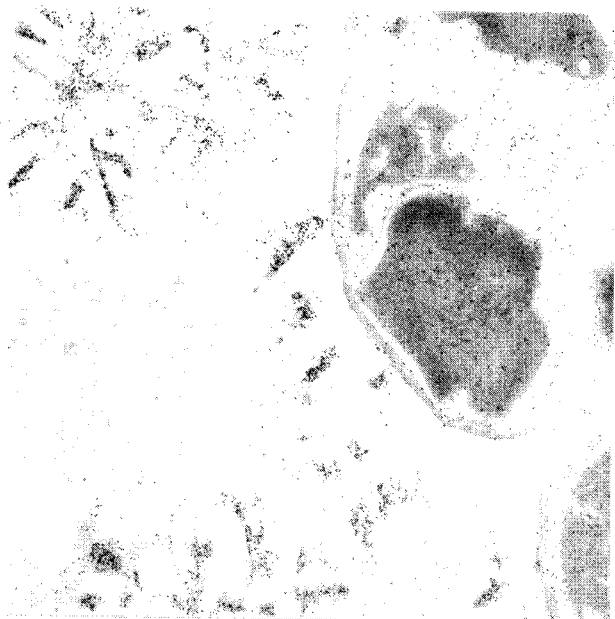
- FIGURE n°68b -



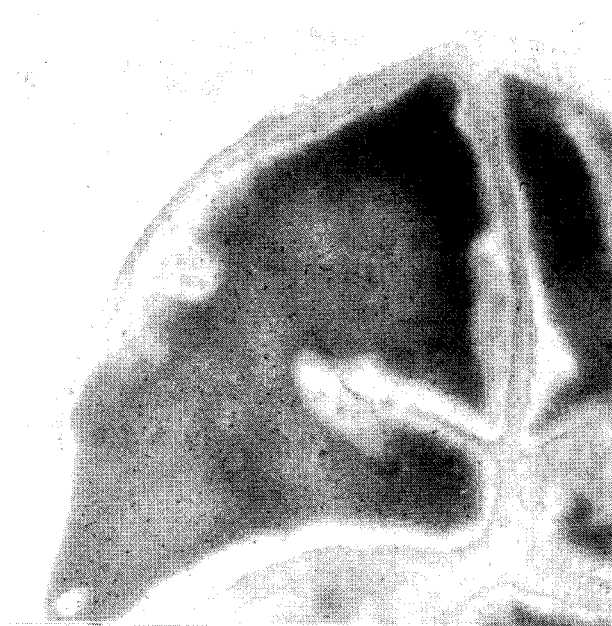
- FIGURE n°68c -

Figure n° 69 : Localisation de la protéine purifiée et de ses sous-unités sur coupes ultra-fines de Methanosarcina mazei MC3 par immunomarquage à l'or colloïdal avec :

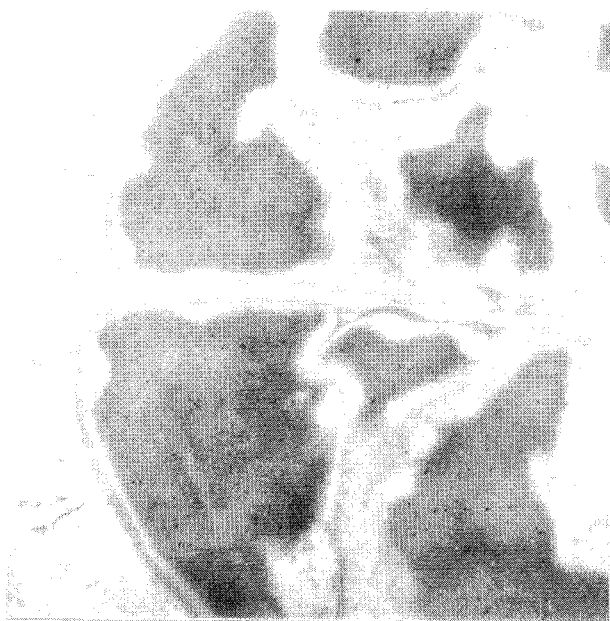
- a - l'immunsérum anti-protéine totale (G = 28 000)
- b - l'immunsérum anti-sous-unité S1 (G = 36 000)
- c - l'immunsérum anti-sous-unité S2 (G = 30 000)
- d - l'immunsérum anti-sous-unité S3 (G = 28 000)



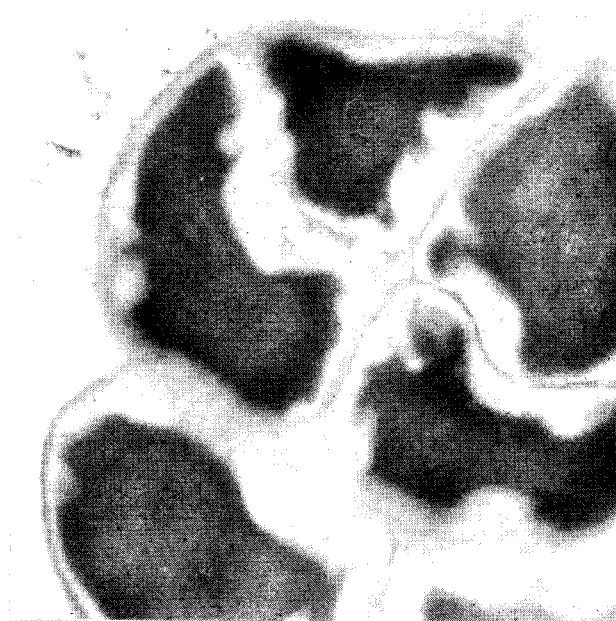
- FIGURE n°69a -



- FIGURE n°69b -



- FIGURE n°69c -

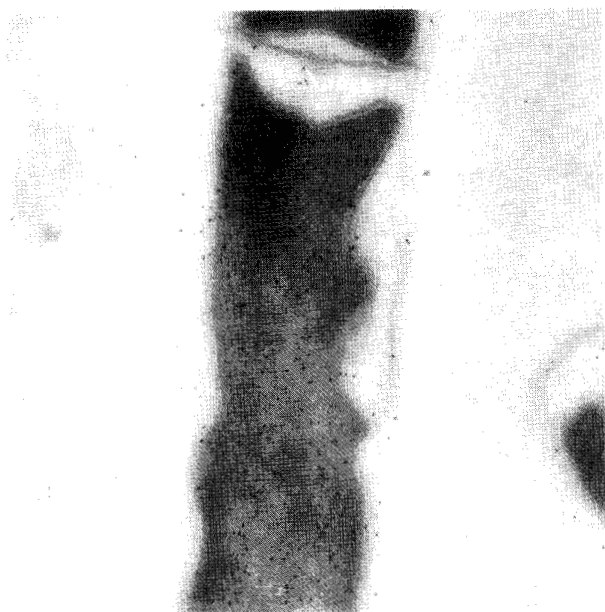


- FIGURE n°69d -

BU
FILE

Figure n° 70 : Localisation de la protéine purifiée et de ses sous-unités sur coupes ultra-fines de Methanothrix soehngeni FE par immunomarquage à l'or colloïdal avec :

- a - l'immunsérum anti-protéine totale (G = 40 000)
- b - l'immunsérum anti-sous-unité S1 (G = 45 000)
- c - l'immunsérum anti-sous-unité S2 (G = 36 000)
- d - l'immunsérum anti-sous-unité S3 (G = 45 000)



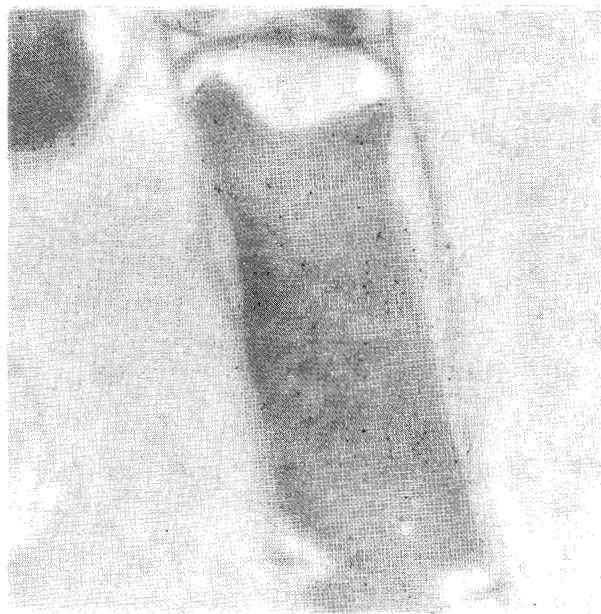
- FIGURE n°70a -



- FIGURE n°70b -



- FIGURE n°70c -



- FIGURE n°70d -



A N N E X E S

ANNEXE I

Composition du milieu BCYT pH 7

H ₂ O bidistillée	800 ml
Solution macrominérale ..	50 ml
Solution vitamine	10 ml
Trace minérale	10 ml
NH ₄ Cl	1 g
Extrait de levure	0,5 g
Trypticase	0,5 g
Résazurine à 0,2%	1 ml
KHCO ₃	2,1 g

Ajusté à pH 7

Répartir en flacons sous N₂/CO₂

Solution trace minérale

Titriplex I acide nitriloacétique 12,8 g/l

FeCl ₃ 6H ₂ O	1,35 g/l
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,1 g/l
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,024 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1 g/l
ZnCl ₂	0,1 g/l
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,025 g/l
H ₃ BO ₃	0,01 g/l
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,024 g/l
NaCl	1 g/l
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,12 g/l
Na ₂ SeO ₃ 5H ₂ O	0,026 g/l

Solution de vitamines

D(+) biotine	2 mg/l
Acide folique	2 mg/l
HCl-pyridoxal	10 mg/l
Riboflavine	5 mg/l
Acide nicotinique	5 mg/l
HCl-thiamine	5 mg/l
D(+) pantothénate de calcium	5 mg/l
Vitamine B12	0,1 mg/l
Acide 4-aminobenzoïque	5 mg/l
Acide DL- α -lipoïque	5 mg/l

Solution macrominérale

KH ₂ PO ₄	6 g/l
NaCl	12 g/l
MgCl ₂ 6H ₂ O ...	2 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O ...	1,6 g/l

ANNEXE II

Immunodétection sur nitrate de cellulose ou "immunoblotting"

1.- Réactifs

- Tampon TBS (Tris Buffered Saline) Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5
- Tampon TTBS Tris 20 mM, NaCl 500 mM, 0,05% Tween 20 pH 7,5
- Solution bloquante gélatine 3% dans une solution TBS (dissolution à 37°C)
- Solution dilution des anticorps gélatine 1% dans une solution TTBS
- Réactif de coloration
 - . Mix de 2 solutions préparées extemporanément
 - . Sol 1 20 ml méthanol refroidi dans la glace
60 mg Horseradish peroxidase réactif Biorad
 - . Sol 2 60 l H₂O₂ 30% refroidi dans la glace
100 ml solution TBS
- Tampon d'électrophorèse Tris 20 mM glycine 150 mM méthanol 20% pH

2.- Différentes étapes expérimentales

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide 10% + SDS d'un échantillon protéique à 2 mg/ml
- Transfert électrophorétique du gel sur feuille de nitrocellulose 4 h., 0,3 A, 60 V. Séchage et découpe de bandelettes largeur 7 mm
- Durée : 30 minutes, immersion sous agitation lente horizontale dans la solution de blocage des bandelettes séparées individuellement
- Durée : 2x10 minutes, immersion sous agitation dans la solution de TTBS
- Durée : 2 heures minimum au mieux une nuit, immersion sous agitation dans une solution d'anticorps spécifique IgG de lapin dilué
- Durée : 2x10 minutes, immersion sous agitation dans une solution de TTBS
- Durée : 1 heure, immersion sous agitation dans la solution de dilution conjuguée au sérum de chèvre anti-lapin marqué par l'horseradish peroxidase
- Durée : 2x10 minutes, 1x10 minutes, deux rinçages successifs en présence de TTBS puis en présence de TBS par immersion sous agitation lente
- Durée : maximum 30 minutes, immersion sous agitation en présence du réactif de coloration
- Durée : 10 minutes, arrêt de la coloration par immersion dans l'eau, les photographies sont prises tandis que la membrane est encore humide afin d'intensifier les bandes colorées.

ANNEXE III

LES VARIABLES SUPPRIMEES SONT :

matrice 18x64 : V09 , V14 , V15 , V21 , V28 , V29 , V35
V37 , V38 , V43 , V52 , V59 , V61 , V66
V69 , V72 .

matrice 18x77 : V15 , V43 , V72 .

— REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

R E F E R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

- Albracht SPJ, Ankel-Fuchs D, Van der Zwaan JW, Fontijn RD and Thauer RK (1986) A new E.P.R. signal of nickel in Methanobacterium thermoautotrophicum. *Biochim Biophys Acta* 50-57
- Aldrich HC, Robinson RW, Williams DS (1986) Ultrastructure of Methanosarcina mazei. *Syst Appl Microbiol* 7:314-319
- Ankel-Fuchs D, Hüster R, Morschel E, Albracht SPJ, Thauer RK (1986) Structure and function of methyl-coenzyme M reductase and of factor F430 in methanogenic bacteria. *Syst Appl Microbiol* 7:383-387
- Ankel-Fuchs D, Jaenchen R, Gebhardt NA, Thauer RK (1984) Functional relationship between protein-bound and free factor F430 in Methanobacterium. *Arch Microbiol* 139:332-337
- Archer DB (1984) Detection and quantification of methanogens by enzyme-linked immunosorbant assay. *Appl Environ Microbiol* 48:797-801
- Archer DB, King NR (1983) A novel ultrastructural feature of a gas vacuolated Methanosarcina. *FEMS Microbiol Lett* 16:217-223
- Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS (1979) Methanogens : reevaluation of a unique biological group. *Microb Rev* 43:260-296
- Barker HA (1956) Biological formation of methane, p. 1-27 in "Bacterial fermentations". John Wiley & sons Inc. New York
- Best AN (1978) *J Bacteriol* 133:240
- Blaut M, Muller V, Gottschalk G (1986) Mechanism of ATP synthesis and role of sodium ions in Methanosarcina barkeri growing on methanol. *Syst Appl Microbiol* 7:354-357
- Blotevogel KH, Fischer U (1985) Methanobacterium thermoalkaliphilicum spec. nov., a new moderately alkaliphilic and thermophilic autotrophic methanogen. *Arch Microbiol* 142:211-217
- Blotevogel KH, Fischer U (1985) Isolation and characterization of a new thermophilic and autotrophic methane producing bacterium : Methanobacterium thermoaggregans spec. nov. *Arch Microbiol* 142:218-222
- Blotevogel KH, Fisher U, Lupkes KH (1986) Methanococcus frisius sp. nov., a new methylotrophic marine methanogen. *Can J Microbiol* 32(2):127-131

Böck A, Hummel H, Jarsch M, Wich G (1986) Genes for stable RNA in methanogens : phylogenetic and functional aspects. In : Biology of anaerobic bacteria : Dubourguier HC, Albagnac G, Montreuil J, Romond C, Sautière P, Guillaume J (eds) Elsevier Science Publisher, Amsterdam 200-206 (in press)

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Brandis A, Thauer RK, Stetter KO (1981) Relatedness of strain delta H and Marburg of Methanobacterium thermoautotrophicum. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C2 311-317

Chartier F, Laine B, Sautière P, Touzel JP, Albagnac G (1985) Characterization of the chromosomal protein HMB isolated from Methanosarcina barkeri. FEBS 183:119-123

Clarke MHG and Freeman T (1968) Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. Clin Sci 35:403

Comita PB, Gagosian RB, Pang H, Costello CE (1984) Structure elucidation of a unique macrocyclic membrane lipid from a new, extremely thermophilic, deep-sea hydrothermal vent archaeobacterium Methanococcus jannaschii. J Biol Chem 259:15234-15241

Conway de Macario E, König H, Macario AJL (1986) Antigenic determinants distinctive of Methanospirillum hungatei and Methanogenium cariaci identified by monoclonal antibodies. Arch Microbiol 144:20-24

Conway de Macario E, König H, Macario AJL, Kandler O (1984) Six antigenic determinants in the surface layer of the archaeobacterium Methanococcus vannielii revealed by monoclonal antibodies. J Immunol 132(2):883-887

Conway de Macario E, Macario AJL (1986) Immunology of Archaeobacteria : identification, antigenic relationships and immunochemistry of surface structures. Syst Appl Microbiol 7:320-324.

Conway de Macario E, Macario AJL, Jovell RJ (1983a) Quantitative slide micro-immunoenzymatic assay (micro-SIA) for antibodies to particulate and non-particulate antigens. J Immunol Meth 59:39-47

Conway de Macario E, Macario AJL, Kandler O (1982d) Monoclonal antibodies for immunochemical analysis of methanogenic bacteria. J Immunol 129(4):1670-1674

Conway de Macario E, Macario AJL, Magarinos MC, König H, Kandler O (1983) Dissecting the antigenic mosaic of the Archaeobacterium Methanobacterium thermoautotrophicum by monoclonal antibodies of defined molecular specificity. Proc Nat Acad Sci 80:6346-6350

Conway de Macario E, Macario AJL, Pastini A (1985) The superficial antigenic mosaic of Methanobrevibacter smithii identification of determinants and isolates by monoclonal antibodies. Arch Microbiol 142:311-316

- Conway de Macario E, Macario AJL, Wolin MJ (1982b) Specific antisera and immunological procedures for characterization of methanogenic bacteria. *J Bacteriol* 149(1):320-328
- Conway de Macario E, Macario AJL, Wolin MJ (1982c) Antigenic analysis of Methanomicrobiales and Methanobrevibacter arboriphilus. *J Bacteriol* 152(2):762-764
- Conway de Macario E, Wolin MJ, Macario AJL (1982a) Antibody analysis of relationships among methanogenic bacteria. *J Bacteriol* 149(1):316-319
- Corder RE, Hook LA, Larkin JM, Frea JI (1983) Isolation and characterization of two new methane-producing cocci : Methanogenium olentangyi sp. nov., and Methanococcus deltae sp. nov. *Arch Microbiol* 134(1):28-32
- Daniels L, Zeikus JG (1978) One carbon metabolism in methanogenic bacteria analysis of short-term fixation products of $^{14}\text{CO}_2$ and $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ incorporated into whole cells. *J Bacteriol* 136:75-84
- Dolfing J, Mulder JW (1985) Comparison of methane production rate and coenzyme F420 content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 49(5):1142-1145
- Dubach AC, Bachofen R (1985) Methanogens : a short taxonomic overview. *Experientia* 41:441-446
- Dubourguier HC, Touzel JP, Albagnac G (1982) Progrès récents en méthanogénèse. VIème réunion des Microbiologistes INRA 39-58
- Dubourguier HC, Prensier G, Samain E, Albagnac G (1985) Granular methanogenic sludge : microbial and structural analysis. In : Energy from biomass : Palz W, Coombs J, Hall DO (eds) Elsevier 542-546
- Eirich LD (1978) The structure of coenzyme F420, a novel electron carrier isolated from Methanobacterium strain MOH. Ph.D thesis University of Illinois at Urbana Champaign
- Eirich LD, Vogels GD, Wolfe RS (1979) Distribution of coenzyme F420 and properties of its hydrolytic fragments. *J Bacteriol* 140:20-27
- Ellefson WL, Whitman WB, Wolfe RS (1982) Nickel containing factor F430 : chromophore of the methylreductase of Methanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3707-3710
- Ellefson WL and WOLFE RS (1980) Role of component C in the methyl reductase system of Methanobacterium *J Biol Chem* 255:8388-8389
- Ellefson WL and WOLFE RS (1981) Component C of the methylreductase system of Methanobacterium *J Biol Chem* 256:4259-4262
- Escalante-Semerena JC, Leigh JA, Rinehart KL, Wolfe RS (1984a) Formaldehyde activation factor, tetrahydromethanopterin, a coenzyme of methanogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1976-1980

- Escalante-Semerena JC, Leigh JA, Wolfe RS (1984) New insights into the biochemistry of methanogenesis of H₂ and CO₂. In "Microbiol growth on C1 compounds" RL Crawford and RS Hanson eds pp 191-198
- Escalante-Semerena JC, Rinehart KL, Wolfe RS (1984b) Tetrahydromethanopterin, a carbon carrier in methanogenesis. J Biol Chem 259(15):9447-9455
- Ferguson TJ, Mah RA (1983) Isolation and characterization of an H₂-oxidizing thermophilic methanogen. Appl Environ Microbiol 45(1):265-274
- Ferry JG, Smith H, Wolfe RS (1974) Methanospirillum, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of Methanospirillum hungatei sp. nov. Int J Syst Bacteriol 24(4):465-469
- Fitch WM (1976) J Mol Evol 8(13)
- Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, Wolfe RS, Woese CR (1977) Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. Proc Natl Acad Sci USA 74(10):4537-4541
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrsen KR, Chen KN, Woese CR (1980) The phylogeny of prokaryotes. Science 209:457-463
- Garberi JC, Macario AJL, Conway de Macario E (1985) Antigenic mosaic of Methanosarcinaceae : partial characterization of Methanosarcina barkeri 227 surface antigens by monoclonal antibodies. J Bacteriol 164:1-6
- Grabar P and Williams CA (1953) Biochim Biophys Acta 10 193
- Gunsalus RP and Wolfe RS (1977) Stimulation of CO₂ reduction to methane by methyl coenzyme M in extracts of Methanobacterium. Biochim Biophys Res Commun 76:790-795
- Gunsalus RP, Wolfe RS (1978) Chromophoric factors F342 and F430 of Methanobacterium thermoautotrophicum. FEMS Microbiol Lett 3:191-193
- Gunsalus RP, Wolfe RS (1980) Methyl coenzyme M reductase from Methanobacterium thermoautotrophicum. J Biol Chem 265:1891-1895
- Harris JE, Pinn PA, Davis RP (1984) Isolation and characterization of a novel thermophilic freshwater methanogen. Appl Environ Microbiol 48:1123-1128
- Hartzell PL, Wolfe RS (1986) Comparative studies of component C from the methyreductase system of different methanogens. Syst Appl Microbiol 7:376-382
- Hausinger RP, Orme-Johnson WH, Walsh C (1984) Nickel tetrapyrrole cofactor F430 : comparison of the forms bound to methyl coenzyme M reductase and protein free in cells of Methanobacterium thermoautotrophicum H. Biochemistry 23:801-804

Hori H, Itoh T, Osawa S (1982) The phylogenic structure of the Metabacteria. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C3, 18-30

Huser BA, Wuhrmann K, Zehnder AJB (1982) Methanothrix soehngenii gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch Microbiol 132(1):1-9

Hüster R, Gilles H, Thauer RK (1985) Is coenzyme M bound to factor F430 in methanogenic bacteria ? Experiments with Methanobrevibacter ruminantium. Eur J Biochem 148:107-111

Jaenchen R, Schönheit P, Thauer RK (1984) Studies on the biosynthesis of coenzyme F420 in methanogenic bacteria. Arch Microbiol 137:362-365

Jarsch M, Böck A (1985) Sequence of the 16S ribosomal RNA gene from Methanococcus vannielii : evolutionary implications. Syst Appl Microbiol 6:54-59

Jones WJ, Donnelly MI, Wolfe RS (1985) Evidence of a common pathway of carbon dioxide reduction to methane in methanogens. J Bacteriol 163:126-131

Jones D and Krieg NR (1984) Bacterial classification serology and chemotaxonomy. In : NR Krieg (Ed.); Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.1, Williams and Wilking, Baltimore, London, pp 1518

Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983) Methanococcus jannaschii sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. Arch Microbiol 136(4):254-261

Jones WJ, Paynter MJB, Gupta R (1983) Characterization of Methanococcus marispaludis sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. Arch Microbiol 135(2):91-97

Kandler O (1982) Cell wall structures and their phylogenetic implications. Zbt Bakt Hyg Abt I Orig C3 149-160

Kandler O, Hippe H (1977) Lack of peptidoglycan in the cell walls of Methanosarcina barkeri. Arch Microbiol 113, 57-60

Kandler O, König H (1985) Cell envelopes of Archaeobacteria. In : Woese CR, Wolfe RS (eds), The Bacteria, Vol.8 : Archaeobacteria, p. 413-457 New York Academic Press

Kates M, Yengoyan LS, Sastry PS (1965) A diether analog of phosphatidyl glycerophosphate in Halobacterium cutirubrum. Biochim Biophys Acta 98, 252-268

Keltjens JT, Caerteling CG, Van Kooten AM, Van Dijk HF, Vogels GD (1983) Chromophoric derivatives of coenzyme MF430, a proposed coenzyme of methanogenesis in Methanobacterium thermoautotrophicum. Arch Biochim Bioph 223:235-253

- Keltjens JT, Caerteling GC, Van Kooten AM, Van Dijk HF, Vogels GD (1983) 6,7 dimethyl-8-ribityl-5,6,7,8-tetrahydrolumazine a proposed constituent of coenzyme MF430 from methanogenic bacteria. *Biochim Biophys Acta* 743:351-358
- Keltjens JT, Caerteling GC, Van der Drift C, Vogels GD (1986) Methanopterin and the intermediary steps of methanogenesis. *Syst Appl Microbiol* 7:370-375
- Keltjens JT, Daniels L, Janssen HG, Borm PJ, Vogels GD (1983) A novel one carbon carrier (carboxy-5,6,7,8-tetrahydromethanopterin) isolated from Methanobacterium thermoautotrophicum and derived from methanopterin. *Eur J Biochem* 130:545-552
- Keltjens JT, Huberts MJ, Laarhoven WJ, Vogels GD (1983) Structural elements of methanopterin, a novel pterin present in Methanobacterium thermoautotrophicum. *Eur J Biochem* 130:537-544
- Keltjens JT, Whitman WB, Caerteling CG, Van Kooten AM, Wolfe RS, Vogels GD (1982) Presence of coenzyme M derivatives in the prosthetic group (MF430) of methylcoenzyme M reductase from Methanobacterium thermoautotrophicum. *Biochim Biophys Acta* 108:2495-2503
- Kenealy W, Zeikus JG (1981) Influence of corrinoïd antagonists on methanogen metabolism. *J Bacteriol* 146:133-140
- Kerckaert JP (1978) Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis. *Anal Biochem* 84:354-360
- Kerstens K and Deley J (1975) Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoresis protein patterns. *J Gen Microbiol* 87:333-342
- Kerstens K and Deley J (1980) Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. IN : Goodfellow (ed), *Microbial classification and identification*, Boart Soc. for Appl Bacteriol Acad Press, 273-296
- Konheiser U, Pasti G, Bollschweiler C, Klein A (1984) Physical mapping of genes coding for two subunits of methyl CoM reductase component C of Methanococcus voltae. *Mol Gen Genet* 198:146-152
- König H (1984) Isolation and characterization of Methanobacterium uliginosum sp. nov. from a marshy soil. *Can J Microbiol* 30(12):1477-1481
- König H, Kandler O (1979a) The aminoacid sequence of the peptide moiety of the pseudomureine from Methanobacterium thermoautotrophicum. *Arch Microbiol* 121:271-275
- König H, Kandler O (1979b) N-acetylglucosaminuronic acid a constituent of the pseudomurein of the genus Methanobacterium. *Arch Microbiol* 123:295-299
- König H, Kandler O, Jensen M; Rietschel T (1983) The primary structure of the glycal moiety of pseudomurein from Methanobacterium thermoautotrophicum. *Hoppe-Seyler's Z Phys Chem* 364:627-636

- König H, Kralik R, Kandler O (1982) Structure and modifications of pseudomurein in Methanobacteriales. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C3 179-191
- König H, Nusser E, Stetter KO (1985) Glycogen in Methanolobus and Methanococcus. FEMS Microbiol Lett 28:265-269
- König H, Stetter KO (1982) Isolation and characterization of Methanolobus tindarius, sp. nov., a coccoïd methanogen growing only on methanol and methylamines. Zbl Bakt Hyg C3 478-490
- König H, Stetter KO (1986) Studies on Archaeobacterial S-layers. Syst Appl Microbiol 7:300-309
- Kneifel H, Stetter KO, Andreesen JR; Wiegel J, König H, Schoberth SM (1986) Distribution of polyamines in representative species of Archaeobacteria. Syst Appl Microbiol 7:241-245
- Kreisl P, Kandler O (1986) Chemical structure of the cell wall polymer of Methanosarcina. Syst Appl Microbiol 7:293-299
- Kushwaha SC, Kates M, Sprott GD, Smith ICP (1981a) Novel complex polar lipids from the methanogen Methanospirillum hungatei. Science 211:1163-1164
- Kushwaha SC, Kates M, Sprott GD, Smith ICP (1981b) Novel polar lipids from the methanogen Methanospirillum hungatei GP1. Biochim Biophys Acta 664:156-173
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Laine B, Sautière P, Spassky A, Rimsky S (1984) A DNA-binding protein from E. coli isolation, characterization and its relationship with protein H1 and B1. Biochim Biophys Res Commun 119:1147-1153
- Lake JA (1985) Evolving ribosome structure : domains in Archaeobacteria, Eubacteria, Eocytes, Eukaryotes. Ann Rev Biochem 54:507-530
- Lake JA, Clark MW, Henderson E, Fay SP, Oakes M, Scheinman A, Thornber JP, Mah RA (1985) Eubacteria, halobacteria and the origin of photosynthesis : the photocytes. Proc Nat Acad Sci 82:3716-3720
- Lake JA, Henderson E, Clark MW, Matheson AT (1982) Mapping evolution with ribosome structure : intralinear constancy and interlinear variation. Proc Natl Acad Sci 79:5948-5952
- Lake JA, Henderson E, Oakes M, Clark MW (1985) Eocytes : a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 81:3786-3790
- Langworthy TA (1977) Long-chain diglycerol tetraethers from Thermoplasma acidophilum. Biochim Biophys Acta 487:37-50
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. Syst Appl Microbiol 7:253-257

Langworthy TA, Tornabene TG, Holzer G (1982) Lipids of Archaeobacteria. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C3* 228-244

Lechner K, Wich G, Böck A (1985) The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene and flanking regions from Methanobacterium formicicum : the phylogenetic relationship between methanogenic and halophilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* 6:157-163

Leigh JA, Rinehart KL, Wolfe RS (1984) Structure of methanofuran, the carbon dioxide reduction factor of Methanobacterium thermoautotrophicum. *J Am Chem Soc* 106:3636-3640

Leigh JA, Rinehart KL, Wolfe RS (1985) Methanofuran (carbon dioxide reduction factor), a formyl carrier in methane production from carbon dioxide in Methanobacterium. *Biochemistry* 24:995-999

Leigh JA, Wolfe RS (1983) Carbon dioxide reduction factor and methanopterin, two coenzymes required for CO₂ reduction to methane by extracts of Methanobacterium. *J Biol Chem* 258:7536-7540

Le Ruyet P, Dubourguier HC, Albagnac G, Prensier G (1985) Characterization of Clostridium thermolacticum sp. nov., a hydrolytic thermophilic anaerobe producing high amounts of lactate. *Syst Appl Microbiol* 6:196-202

Liu Y, Boone DR, Sleat R, Mah RA (1985) Methanosarcina mazei LYC, a new methanogenic isolate which produces a disaggregating enzyme. *Appl Environ Microbiol* 49(3):608-613

Londei P, Altamura S (1986) Sensitivity of anaerobic sulphur-dependent Archaeobacteria to protein synthesis inhibitors. In : *Biology of anaerobic bacteria* : Dubourguier HC, Albagnac G, Montreuil J, Romond C, Sautiere P, Guillaume J (eds) Elsevier Science Publisher, Amsterdam 227-236

Macario AJL, Conway de Macario E (1982) The immunology of methanogens : a new development in microbial biotechnology. *Immunology* 3(10):279-284

Macario AJL, Conway de Macario E (1983) Antigenic fingerprinting of methanogenic bacteria with polyclonal antibody probes. *Syst Appl Microbiol* 4:451-458

Macario AJL, Conway de Macario E (1985) Antibodies for methanogenic biotechnology. *Biotechnology* 3(8):204-208

Mah RA (1980) Isolation and characterization of Methanococcus mazei. *Curr Microbiol* 3:321-326

Mah RA, Kuhn DA (1984) Transfer of the type species of the genus Methanococcus to the genus Methanosarcina, naming it Methanosarcina mazei (Barker 1936) comb. nov. et emend. and conservation of the genus Methanococcus (approved lists 1980) with Methanococcus vannielii (approved lists 1980) as the type species. *Int J Syst Bact* 34:263-265

- Mc Bride BC, Wolfe RS (1971) A new coenzyme of methyl transfer coenzyme M. *Biochemistry* 10:2317-2324
- Miller TL, Wolin MJ (1973) A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivation of obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985-987
- Miller TL, Wolin MJ (1985) Methanosphaera stadtmanniae (sic) gen. nov., sp. nov. : a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol* 141:116-122
- Morii H, Nishihara M, Koga Y (1983) Isolation, characterization and physiology of a new formate-assimilable methanogenic strain (A2) of Methanobrevibacter arboriphilus. *Agric Biol Chem* 4(12):2781-2789
- Morrisey JH (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117:307-310
- Nagle DP, Wolfe RS (1983) Component A of the methyl coenzyme M methylreductase system of Methanobacterium resolution into four components. *Proc Nat Acad Sci* 80:2151-2155
- Noll KM, Rinehart KL, Tanner RS, Wolfe RS (1986) Structure of component B (7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate) of the methylcoenzyme M methylreductase system of Methanobacterium thermoautotrophicum. *Proc Nat Acad Sci* 83:4238-4242
- Nozhevnikova AN, Chudina VI (1984) Morphology of the thermophilic acetate methane bacterium Methanothrix thermoacetophila sp. nov. *Microbiology* 53(5):618-624
- Ollivier BM, Lombardo A, Garcia JL (1984) Isolation and characterization of a new thermophilic Methanosarcina strain (Strain MP). *Ann Microbiol (Inst. Pasteur)* 135(2):187-198
- Ollivier BM, Mah RA, Garcia JL, Robinson R (1985) Isolation and characterization of Methanogenium aggregans sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 35:127-130
- Ollivier BM, Mah RA, Garcia JL, Boone DR (1986) Isolation and characterization of Methanogenium bourgense sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 36(2):297-301
- Ossmer R, Mund T, Hartzell PL, Konheiser U, Kohrong GW, Klein A, Wolfe RS, Gottschalk G, Mayer R (1986) Immunocytochemical localization of component C of the methyl reductase system in Methanococcus voltae and Methanobacterium thermoautotrophicum. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5789-5792
- Outcherlony O (1949) *Arkiv Kemi Min Geol* 26 B 14:1
- Patel GB (1984) Characterization and nutritional properties of Methanothrix concilii sp. nov., a mesophilic acetoclastic methanogen. *Can J Microbiol* 30(11):1383-1396

Patel GB, Roth LA, Van den Berg L, Clark DS (1976) Characterization of a strain of Methanospirillum hungatei. Can J Microbiol 22:1404-1410

Pellerin P, Gruson B, Prensier G, Albagnac G, Debeire P. Glycogen in Methanothrix. Arch Microbiol (in press)

Pfaltz A, Jaun B, Fassler A, Eschenmoser A, Jaenchen R, Gilles HH, Diekert G, Thauer RK (1982) Zur Kenntnis des Faktors F430 aus Methanogenen Bakterien : Struktur des Phorphinoiden Ligandsystems. Helv Chim Acta 65(3):828-864

Pfaltz A, Livingston DA, Jaun B, Diekert G, Thauer RK, Eschenmoser A (1985) Zur Kenntnis des Faktors F430 aus methanogenen Bakterien : über die Natur der Isolierungs-Artefakte von F430, ein Beitrag zur Chemie von F430 und zur konformationellen stereochemie der Ligandperipherie von hydroporphinoiden Nickel (II)-Komplexen. Helv Chim Acta 68:1338-1358

Pol A, Van der Drift C, Vogels GD (1982) Corrinoids from Methanosarcina barkeri : structure of the ligand. Biochim Biophys Res Commun 108:731-737

Prevot AR (1980) Nouvel essai de classification des bactéries méthanogènes. Cr Acad Sci, Paris, ser D 290:1253-1255

Reynolds E (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208-212

Rivard CJ, Henson JM, Thomas MV, Smith PH (1983) Isolation and characterization of Methanogenium paynteri sp. nov. a mesophilic methanogen isolated from marine sediments. Appl Environ Microbiol 46(2):484-490

Rivard CJ, Smith PH (1982) Isolation and characterization of a thermophilic marine methanogenic bacterium, Methanogenium thermophilicum sp. nov. Int J Syst Bacteriol 32(4):430-446

Robinson RW (1986) Life cycles in the methanogenic Archaeobacterium Methanosarcina mazei. Appl Environ Microbiol 52:17-27

Romesser JA, Wolfe RS (1982) Coupling of methyl coenzyme reduction with carbon dioxide reduction to methane by extracts of Methanobacterium thermoautotrophicum. J Bacteriol 152:840-847

Romesser JA, Wolfe RS (1982) CDR factor, a new coenzyme required for carbon dioxide reduction to methane by extracts of Methanobacterium. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C3 271-276

Romesser JA, Wolfe RS, Mayer F, Spiess E, Walther-Mauruschat (1979) Methanogenium, a new genus of marine methanogenic bacteria, and characterization of Methanogenium cariaci sp. nov. and Methanogenium marisnigri sp. nov. Arch Microbiol 121:147-153

Rose CS, Pirt SJ (1981) Conversion of glucose to fatty acids and methane : roles of two mycoplasma agents. J Bacteriol 147:248-254

- Roth J, Bendayan M, Carlemalm E, Villinger W, Garavito M (1981) Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J Histochem Cytochem* 29:663-671
- Rouvière PE, Escalante-Semerena JC, Wolfe RS (1985) Component A2 of the methylcoenzyme M methylreductase system from Methanobacterium thermoautotrophicum. *J Bacteriol* 162:61-66
- Samain E, Dubourguier HC, Albagnac G (1984) Isolation and characterization of Desulfobulbus elongatus sp. nov. from a mesophilic industrial digester. *Syst Appl Microbiol* 5:391-401
- Schallenberg J, Thomm M, Stetter KO, Moes M, Truss M, Allmansberger R, Bokranz M, Muth E, Klein A (1986) Analysis of functionally related gene groups in methanogenic bacteria. In : *Biology of anaerobic bacteria* : Dubourguier HC, Sautière P, Guillaume J (eds) Elsevier Science Publisher Amsterdam 200-206 (in press).
- Scherer P, Kneifel H (1983) Distribution of polyamines in methanogenic bacteria. *J Bacteriol* 154:1315-1322
- Schmid K, Thomm M, Laminet A, Laue FG, Kessler C, Stetter KD, Schmitt R (1984) Three new restriction endonucleases Mae I, Mae II and Mae III from Methanococcus aeolicus. *Nucleic Acids Res* 12(6):2619-2628
- Schönheit P, Thauer RK (1980) L-alanine, a product of cell wall synthesis in Methanobacterium thermoautotrophicum. *FEMS Microbiol Lett* 9:77-80
- Shapiro S, Wolfe RS (1980) Methyl coenzyme M, an intermediate in methanogenic dissimilation of C1 compounds by Methanosarcina barkeri. *J Bacteriol* 141:728-734
- Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method for preparing gold probes for multiple labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* 38:87-93
- Sowers KR, Baron SF, Ferry JG (1984) Methanosarcina acetivorans sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 47(5):971-978
- Sowers KR, Ferry JG (1983) Isolation and characterization of a methylotrophic marine methanogen, Methanococcoides methylutens gen. nov., sp. no. *Appl Environ Microbiol* 45(2):684-690
- Sowers KR, Johnson JL, Ferry JG (1984) Phylogenetic relationships among the methylotrophic methane producing bacteria and emendation of the family Methanosarcinaceae. *Int J Syst Bacteriol* 34:444-450
- Sprott GD, Colvin JR, Mc Kellar RC (1979) Spheroplasts of Methanospirillum hungatei formed upon treatment with dithiothreitol. *Can J Microbiol* 25:730-738

Sprott GD, Shaw KM, Jarrell KF (1983) Isolation and chemical composition of the cytoplasmic membrane of the archaebacterium Methanospirillum hungatei. J Biol Chem 258:4026-4031

Stackebrandt E, Seewaldt E, Ludwig W, Scheifer KH, Huser BA (1982) The phylogenetic position of Methanotherix soehngenii. Elucidated by a modified technique of sequencing oligonucleotides from 16S rRNA. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C3 90-100

Stadtman TC, Barker HA (1951) Studies on the methane fermentation X A new formate decomposing bacterium Methanococcus vannielii. J Bacteriol 62:269-280

Stetter KO, Thomm M, Winter J, Wildgruber G, Huber H, Zillig W, Janecovic D, König H, Palm P, Wunderl S (1981) Methanothermus fervidus sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an icelandic hot spring. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C2 166-178

Tanner RS, Wolfe RS (1982) Nutrient requirements of Methanomicrobium mobile. Ann Soc Microbiol Abst Annu Meet p. 109

Taylor CD, Wolfe RS (1974) Structure and methylation of coenzyme M. J Biol Chem 249:4879-4885

Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. Ann. Rev Biochem 53:749-770

Thomas I (1983) Les coenzymes spécifiques des bactéries méthanogènes. Identification et dosage en C.L.H.P. Mémoire de D.E.A. U.S.T.L. LILLE I

Thomm M, Hönig H, Thies G, Stetter KO (1982) Methanococcus thermolithotrophicus, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. Arch Microbiol 132(1):47-50

Tornabene TG, Langworthy TA, Holzer G, Oro J (1979) Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidophilic "archaebacteria". J Molec Evol 13:73-83

Touzel JP, Albagnac G (1983) Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC3. FEMS Microbiol Lett 16:241-265

Touzel JP, Petroff D, Albagnac G (1985) Isolation and characterization of a new thermophilic Methanosarcina, the strain CHT1 55. Syst Appl Microbiol 6:66-71

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350-4354

Tu J, Prangishuilli D, Huber H, Wildgruber G, Zillig W, Stetter KO (1982) Taxonomic relations between archaebacteria including 6 novel genera examined by cross hybridization of DNAs and 16S rRNA. J Molec Evol 18:109-114

Tzeng SF, Bryant MP, Wolfe RS (1975b) Factor 420-dependent pyridine nucleotide-linked formate metabolism of Methanobacterium ruminantium. J Bacteriol 121:192-196

Tzeng SF, Wolfe RS, Bryant MP (1975a) Factor 420-dependent pyridine nucleotide-linked hydrogenase system of Methanobacterium ruminantium. J Bacteriol 121:184-191

Van Beelen P, Geerts WJ, Pol A, Vogels GD (1983) Quantification of coenzymes and related compounds from methanogenic bacteria by high performance liquid chromatography. Anal Biochem 131:285-290

Van Beelen P, Labro JFA, Keltjens JT, Geerts WJ, Vogels GD, Laarhoven WH, Guyt W, Haasnoot CAG (1984a) Derivatives of methanopterin, a coenzyme involved in methanogenesis. Eur J Biochem 139:359-365

Van Beelen P, Stassen APM, Bosch JWG, Vogels GD, Guyt W, Haasnoot CAG (1984b) Elucidation of the structure of methanopterin, a coenzyme from Methanobacterium thermoautotrophicum using two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. Eur J Biochem 138:563-571

Van Bruggen JJA, Zwark KB, Hermans JGF, Van Hove EM, Stumm CK, Vogel GD (1986) Isolation and characterization of Methanoplanus endosymbiosus sp. nov., an endosymbiont of the marine sapropelic ciliate Metopus contortus Quennerstedt. Arch Microbiol 144:367-374

Van der Meijden P, Heythuysen HJ, Sliepenbeek HT, Houwen FP, Van der Drift C, Vogels GD (1983) Activation and inactivation of methanol : 2 mercaptoethanesulfonic acid methyltransferase from Methanosarcina barkeri. J Bacteriol 153:6-11

Verrier D, Morfaux JN, Albagnac G, Touzel JP (1982) The french programme on methane fermentation. Biomass 2:17-28

Vogels GD, Keltjens JT, Hutten TJ, Van der Drift C (1982) Coenzymes of methanogenic bacteria. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C3, 258-264

Weimer PJ, Zeikus JG (1978) One carbon metabolism in methanogenic bacteria cellular characterization and growth of Methanosarcina barkeri. Arch Microbiol 119:49-57

Whitman WB (1985) Methanogenic bacteria. In : Woese CR, Wolfe RS (ed) The Bacteria, Vol 8 : Archaeobacteria, pp 1-84. New York, Academic Press

Whitman WB, Shieh J, Sohn S, Caras DS, Premachandran U (1986) Isolation and characterization of 22 mesophilic methanococci. Syst Appl Microbiol 7:235-240

Whitman WB, Wolfe RS (1980) Presence of nickel in factor F430 from Methanobacterium bryantii. Biochem Biophys Res Commun 92(4):1196-1201

- Wildgruber G, Thomm M, König H, Ober K, Ricchiuto T, Stetter KO (1982) Methanoplanus limicola, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the Methanoplanaceae. Arch Microbiol 132(1):31-36
- Winter J, Lerp C, Zabel HP, Wildenauer FX, König H, Schindler F (1984) Methanobacterium wolfei sp. nov. a new tungsten-requiring, thermophilic, autotrophic methanogen. Syst Appl Microbiol 5:457-466
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the procaryotic domain the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA 74(11):5088-5090
- Woese CR, Olsen GJ (1986) Archaeobacterial phylogeny : perspectives on the urkingdoms. Syst Appl Microbiol 7:161-177
- Woese CR, Wolfe RS (1985) Archaeobacteria epilogue. In : The bacteria Vol 8 : Archaeobacteria New York, Academic Press
- Wolfe RS (1985) Unusual coenzymes of methanogenesis. Trends in Biochem Sci 10:396-399
- Yang D, Kaine BP, Woese CR (1985) The phylogeny of Archaeobacteria. Syst Appl Microbiol 6:251-256
- Zabel HP, König H, Winter J (1984) Isolation and characterization of a new coccoid methanogen Methanogenium tatii sp. nov. from a solfataric field on Mount Tatio. Arch Microbiol 137(4):308-315
- Zabel HP, König H, Winter J (1985) Emended description of Methanogenium thermophilicum Rivard and Smith, and assignment of new isolates to this species. Syst Appl Microbiol 6:72-78
- Zanetta JP, Breckenbridge WC, Vincendon G (1972) Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. J Chromato 69:291-304
- Zehnder AJB, Wuhrmann K (1977) Physiology of a Methanobacterium strain AZ. Arch Microbiol 111:199-205
- Zeikus JG (1983) Metabolism of one carbon compounds by chemotrophic anaerobes. Adv Microbiol Physiol 24:215-299
- Zeikus JG, Henning DL (1975) Methanobacterium arbophilicum sp. nov., an obligate anaerobe isolated from wetwood of living trees. J Microbiol Serol 41:543-552
- Zeikus JG, Wolfe RS (1972) Methanobacterium thermoautotrophicus sp. nov., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. J Bacteriol 109:707-713
- Zhilina TN (1983) New obligate halophilic methane-producing bacterium. Microbiol 52(2):268-274
- Zhilina TN, Ilarionov SA (1984) Characteristics of formate assimilating methane bacteria and description of Methanobacterium thermoformicum sp. nov. Microbiol 53(5):647-651

Zhilina TN, Zavarzin GA (1979) Comparative cytology of Methanosarcina and description of Methanosarcina vacuolata sp. nov. Microbiol 48(2):279-285

Zillig W, Schnabel R, Tu J (1982) The phylogeny of archaebacteria, including novel anaerobic thermoacidophiles in the light of RNA polymerase structure. Naturwissenschaften 69:197-204

Zinder SH, Mah RA (1979) Isolation and characterization of a thermophilic strain of Methanosarcina unable to use H₂/CO₂ for methanogenesis. Appl Environ Microbiol 38:5996-6008

Zinder SH, Sowers KR, Ferry JG (1985) Methanosarcina thermophila sp. nov., a thermophilic acetotrophic, methane-producing bacterium. Int J Syst Bacteriol 522-523

