

Les halocines C8 et H4, composés antimicrobiens produits par des archées de milieux hypersalins

Manon Vandervennet

▶ **To cite this version:**

Manon Vandervennet. Les halocines C8 et H4, composés antimicrobiens produits par des archées de milieux hypersalins. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-03079886

HAL Id: hal-03079886
https://ephe.hal.science/hal-03079886

Submitted on 17 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté
par

VANDERVENNET MANON

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Les halocines C8 et H4, composés antimicrobiens produits par des archées de milieux hypersalins

Soutenu le 7 décembre 2020 devant le jury suivant :

Dr GUIGON Elodie – **Présidente**
Dr CARRE-MLOUKA Alyssa – **Tutrice scientifique**
Dr RENAUD-PAITRA Flore – **Tutrice pédagogique**
Dr LADRAM Ali – **Rapporteur**
Dr BECKER Hubert – **Examinateur**
Dr KISH Adrienne – **Examinatrice (co-tutrice scientifique)**

Mémoire préparé sous la direction de : Dr CARRE-MLOUKA Alyssa et Dr KISH Adrienne
Intitulé de la structure d'accueil : UMR 7245, Muséum national d'Histoire naturelle-CNRS, Paris
Directeur : Pr GRELLIER Philippe

et de Dr RENAUD-PAITRA Flore
Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR 9019, Institut Gustave Roussy, Villejuif
Directeur : Pr KANNOUCHE Patricia
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : " Génomes, Cancers et Thérapies "

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté
par

VANDERVENNET MANON

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Les halocines C8 et H4, composés antimicrobiens produits par des archées de milieux hypersalins

Soutenu le 7 décembre 2020 devant le jury suivant :

Dr GUIGON Elodie – **Présidente**
Dr CARRE-MLOUKA Alyssa – **Tutrice scientifique**
Dr RENAUD-PAITRA Flore – **Tutrice pédagogique**
Dr LADRAM Ali – **Rapporteur**
Dr BECKER Hubert – **Examinateur**
Dr KISH Adrienne – **Examinatrice (co-tutrice scientifique)**

Mémoire préparé sous la direction de : Dr CARRE-MLOUKA Alyssa et Dr KISH Adrienne
Intitulé de la structure d'accueil : UMR 7245, Muséum national d'Histoire naturelle-CNRS, Paris
Directeur : Pr GRELLIER Philippe

et de Dr RENAUD-PAITRA Flore
Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR 9019, Institut Gustave Roussy, Villejuif
Directeur : Pr KANNOUCHE Patricia
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : " Génomes, Cancers et Thérapies "

Remerciements

Jean, un immense merci. Merci de m'avoir recrutée au Muséum en 2006 et d'avoir eu confiance en moi malgré « mon jeune âge ». Merci pour cette confiance accordée tous les jours et qui m'a permis d'évoluer. Merci aussi pour ta patience à m'apprendre toutes les ficelles du métier mais aussi pour ta bienveillance. Et merci de m'avoir coaché pour le concours … et de m'avoir téléphoné juste avant l'épreuve. C'est grâce à toi que je suis la technicienne que je suis aujourd'hui. Le tandem que nous formions était une belle expérience professionnelle mais la relation amicale que nous avons gardée est encore plus belle. Je ne pourrais jamais assez te remercier d'être resté présent pendant ta retraite tant pour le mémoire qu'amicalement. Sans toi, ton soutien, ta motivation et ton aide, je n'aurais pas eu le courage de finir ce mémoire après cette « pause bébé ». Du fond du cœur, merci pour tout Jean.

Alyssa, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir proposé de passer ce diplôme. Travailler avec toi était agréable et je pense souvent avec nostalgie à notre « équipe archées ». J'appréciais également notre binôme bactério et je te remercie pour tes qualités humaines, ta gentillesse, ton soutien et ton réconfort à chaque moment de notre collaboration. Même si tu me manques, je te souhaite de belles choses dans ta nouvelle vie.

Hélène, les jours passés en ta compagnie sont inoubliables. Par ta bonne humeur, tu as su souder un groupe de collègues déjà proches. Travailler avec toi était enthousiasmant, motivant et agréable. Merci pour ta bonne humeur, ton sourire et ton amitié.

Carine, je n'ai pas assez de merci pour te remercier. Merci d'être une collègue disponible, bienveillante, patiente. Merci pour ton aide à de nombreuses manips et pour ta patience à tenter de purifier cette halocine H4 et avec toutes mes dialyses. Mais surtout merci d'avoir toujours eu un mot gentil et réconfortant les fois où ça n'allait pas, que ce soit professionnellement ou personnellement. Merci d'être là à chaque fois que j'ai besoin.

Alain, merci pour ta prévenance et ta gentillesse. Merci d'être un collègue si agréable, j'ai la chance de partager ton bureau et venir au travail et commencer la journée à tes côtés est un plaisir. Toujours prêt à aider, tu penses aux autres avant toi-même, merci pour cela, ainsi que pour nos bons moments au resto et nos texto-conversations si rigolotes.

Christine, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ton dévouement. Merci pour les fois où tu me remontes le moral. Merci aussi pour la confiance que tu me témoignes quand tu te confies et merci de ton écoute toujours bienveillante envers moi. Tu es avec Alain, Carine, Christophe, Alexandre et Cétaise mes piliers du 63.

Christophe, merci pour ta bonne humeur, tes blagues un peu sombres qui me font hurler (mais pas de rires), pour les discussions où on n'est absolument pas d'accord (et on ne le sera jamais). Même si je te traite de fou, tu es un super collègue et je te remercie pour ton aide pour nos manips, tu as recherché sans relâche cette halocine C8 et tu l'as trouvée.

Alexandre, merci d'être un si bon collègue de bureau. Merci pour ta bonne humeur (pas tout le temps !), merci pour nos conversations et merci aussi pour nos engueulades (même si tu sais m'énerver, ça fait du bien aussi !). Merci pour les cours de guitare et de chant (aïe), grâce à toi maintenant j'ose chanter (ma fille semble apprécier elle au moins !) et merci de toujours me dire « oui » quand j'ai besoin d'un service (sauf le café !).

Cétaise, merci pour ta gentillesse, ton soutien et toutes les belles choses que tu me fais partager. Ta force et ta joie de vivre forcent le respect. Merci d'être ma collègue.

Lionel, merci pour les bons moments, les déjeuners " salades, riz, faisselles au coulis de fruits rouges " que nous avons partagés et également les footings dans le jardin des plantes. Je garde un très bon souvenir de notre partage de bureau " derrière la cafèt " et te souhaite le meilleur dans ta nouvelle unité.

Soraya, merci pour ton aide précieuse pour nos manips de q-RT PCR et merci de ta patience, ta disponibilité et ta gentillesse.

Merci à tous mes collègues de MCAM, particulièrement **Séverine A**, assistante prévention, toujours prête à assurer notre sécurité, tu es une collègue plus que sympathique ; **Séverine Z, Marie-Lise, Arlette et Yanyan** pour votre gentillesse et votre motivation et **Brice** pour ta bonne humeur.

Merci à **Michel**, informaticien, pour ta bonne humeur et tes blagues ainsi que tes « tuyaux » informatiques. Bonne retraite à toi !

Merci **Alison** d'avoir partagé mon quotidien durant ta thèse**.** Merci pour ton aide et ta bonne humeur et ces bons moments partagés ensemble … comme le saut dans la Juine pour récupérer une balle de tennis !

Merci **Fadoua** pour ton sourire et ta gentillesse

Merci **Anaïs** pour ta bonne humeur, ton aide et pour les fermetures de la bactério toutes ces fois où je ne pouvais pas.

Merci **Adrienne** pour ta motivation et le suivi de la rédaction de mon mémoire, merci d'avoir accepté de seconder Alyssa. Merci pour notre collaboration scientifique " bactério ".

Merci aux membres de mon jury, Dr **Ali Ladram** d'avoir accepté d'être le rapporteur de mon mémoire et Dr **Hubert Becker** d'avoir accepté d'examiner mon travail. Merci au Dr Elodie **GUIGON** d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci Dr **Flore RENAUD-PAITRA**, ma tutrice pédagogique, pour vos conseils, votre présence et votre aide tout au long de ce parcours.

Merci aux directeurs de mon Unité, actuels et passés, Pr **Bernard BODO,** Pr **Philippe Grellier** et Pr **Sylvie Rebuffat**. Merci **Sylvie** de m'avoir recrutée avec Jean, de m'avoir accordée votre confiance que ce soit pour la bactério, pour le concours, pour le sujet archées ou pour le diplôme EPHE. Et un grand merci pour mes dossiers de carrière.

Merci **Nathal** pour m'avoir appris le travail de technicienne lors de mon apprentissage chez Merck. Merci de m'avoir donné envie de faire ce métier et merci pour tous ces bons moments de vacances au camping ou au fil de l'eau sur les barques. Merci **Noémie**, **Xav** et **Maëva** pour votre affection.

Alex, merci pour ton amour depuis toutes ces années et de m'avoir fait ta demande en mariage pour nos 10 ans. Merci pour cette merveille que nous avons fait et qui emplit nos cœurs de bonheur. Même si je t'ai crié dessus et reproché de ne pas m'aider à la rédaction de ce mémoire (surtout pendant le confinement où on se battait pour le PC), je te remercie de m'aider tous les jours à supporter les difficultés du quotidien. Merci d'être un mari aimant et un super Papa. **Eloïse**, mon rayon de soleil, ma pépite, juste merci d'être là. Je ne peux plus imaginer ma vie sans toi. Tu embellis ma vie.

Merci à mes fidèles amis, **Chris, Laurence**, **Jenni et Babass**. Merci pour nos repas, nos soirées, nos fous rires, nos discussions et d'être toujours là quand il faut. Un immense merci à mes deux meilleurs amis **Laurence** et **Chris** de faire partie de ma vie et d'avoir accepté d'être les témoins de mon mariage et les parrains d'Eloïse. Je garde précieusement en moi les excellents souvenirs de nos vacances de jeunesse. Merci **Jenni** d'être une amie chère à mon cœur.

Merci à ma famille, à mon frère **Florent** et à ma sœur **Claire** pour notre complicité et nos fous rires**.** Merci à **Susanne** et **Gaël** d'être de gentils neveux et des supers cousins. Merci **Papa** et **Maman** d'être toujours disponibles et présents pour nous. Merci **Papa** pour ta générosité et merci **Maman** pour ton infini patience et gentillesse. Merci **Mami** et **Papi** pour votre bienveillance et votre présence, et pour tous ces bons moments partagés depuis notre enfance. Un grand merci pour tous les travaux que vous nous avez aidés à réaliser dans la maison. Merci mon tonton préféré **Christian** et mes tata **Martine** et **Christine** pour ces agréables (et très drôles) moments familiaux. Merci à ma belle-famille, **Pascal**, **Sylvie**, **Ninie** et **Antho** d'être parfaite et toujours disponible pour nous aider et passer de beaux moments.

Enfin merci à mes adorables compagnons **Lumo**, **Tagada**, **Réglisse** et **Ouinou** d'embellir notre quotidien par leurs câlins, leurs ronrons, leurs farces et merci pour cette sérénité communicative. Merci à **Ouragan** d'être le meilleur des chevaux et de faire briller les yeux de mes deux amours.

Table des matières

Remerciements

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION 1

I. Les archées 1

1. Troisième domaine du vivant.....1

2.Habitats.....3

II. Milieux hypersalins et organismes halophiles.....5

1. Milieux hypersalins.....5

1.1. Environnements thalassohalins.....5
1.2. Environnements athalassohalins.....7

2. Organismes halophiles.....8

2.1. Eucaryotes halophiles 9
2.2. Bactéries halophiles.....9
2.3. Archées halophiles.....10
2.4. Diversité microbienne dans les environnements hypersalins 13

3. Adaptation des micro-organismes halophiles et halotolérants au sel.....14

3.1. Accumulation de chlorure de potassium.....14
3.2. Accumulation de composés osmoprotecteurs.....15
3.3. Adaptations des protéines halophiles 16
3.4. Exopolysaccharides et polyhydroalkanoates 18
3.5. Adaptations aux rayonnements UV.....18
3.6. Adaptations à la dessication.....18

4. Applications des organismes halophiles.....19

III. Peptides antimicrobiens.....22

1. Peptides antimicrobiens synthétisés par les eucaryotes 22

2. Peptides antimicrobiens synthétisés par les bactéries 22

2.1. Classification 23
2.2. Biosynthèse 24
2.3. Mécanismes d'action 25

3. Peptides antimicrobiens synthétisés par les archées : les archéocines 27

3.1. Sulfolobicines 27
3.2. Halocines 27
3.3. Interactions antimicrobiennes dans les environements hypersalins 31

IV. Projet de recherche 32

MATÉRIELS ET MÉTHODES 35

I. Méthodes de bactériologie 35

1. Souches archéennes et bactériennes 35

2. Milieux de culture 36

3. Cultures en milieu solide et en milieu liquide 36

4. Courbe de croissance 36

5. Tests antimicrobiens en milieu solide par diffusion sur gélose 36

5.1. Echantillons à tester 36
5.2. Gélose molle ensemencée 37

II. Méthodes de biologie moléculaire 37

1. Extraction cellulaire pour l'obtention d'ADNg 37

2. Amplification des fragments d'ADN par la réaction de polymérase en chaîne 37

3. Electrophorèse sur gel d'agarose 38

4. Clonage 38

4.1. Purification de l'ADN amplifié par PCR 38
4.2. Ligation 38
4.3. Préparation des cellules compétentes 39
4.4. Transformation des cellules d'*E. coli* DH5α 39
4.5. Extraction et purification de l'ADN plasmidique 40
4.6. Séquençage 40

5. Extraction d'ARN 40

6. Transcription inverse 41

7. RT-PCR quantitative ou RT-PCR en temps réel 42

III. Méthodes de biochimie.....44

1. Purification de l'halocine C8 44

1.1. Culture en milieu liquide 44
1.2. Culture en milieu solide 44

2. Purification de l'halocine H4 45

3. Dosage de protéines 45

4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS 46

4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS Tris-glycine 46
4.2. Coloration des gels.....46

5. Spectrométrie de masse 47

5.1. MALDI-TOF 47
5.2. Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse.....47

IV. Méthodes de bio-informatique.....48

1. Recherche et validation des amorces pour la PCR.....48

2. Recherche *in silico* de similarités de séquences 48

3. Analyses des séquences protéiques.....48

4. Alignements multiples 49

5. Arbre phylogénétique.....49

CHAPITRE 1 50

HalC8 est un peptide antimicrobien fréquemment rencontré chez les archées halophiles. ..50

I. Recherche *in silico* de similarités de séquences du gène *halC8* et du précurseur ProC8.....51

II. Analyse par amplification PCR du gène *halC8* 54

III. Alignement multiple et analyse phylogénétique de ProC8 55

IV. Rôle putatif des protéines codées par les gènes entourant *halC8* 61

V. Organisation génétique du groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse de HalC8.....62

VI. Expression de HalC8 et activité antimicrobienne.....65

VII. Purification de HalC8.....67

VIII. Résultats complémentaires : spectre d'activité de HalC8 68

IX. Discussion 69

CHAPITRE 2 73

HalH4 est une protéine antimicrobienne rencontrée chez quelques souches d'archées halophiles. 73

I. Analyse de similarités de séquences *in silico* et manuelle de ProH4 76

II. Alignement multiple et analyse phylogénétique de ProH4 77

III. Recherche par PCR du gène *halH4* 80

IV. Spectre d'activité antimicrobienne du surnageant de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411.....86

V. Recherche de l'activité antimicrobienne de HalH4 87

VI. Production, purification et caractérisation de HalH4 produite par *Hfx. mediterranei* DSM1411 89

VII. Discussion 93

CHAPITRE 3 97

Etude de l'expression des gènes *halC8* et *halH4* : mise au point des conditions de la RT-PCR quantitative 97

I. PCR quantitative de l'ADNc des gènes de références et de *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890 99

1. Gène de référence codant l'ARNr 16S chez *Nnm. altunense* JCM12890 99

2. Gène de référence codant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*gapdh*) chez *Nnm. altunense* JCM12890 100

3. Séquence de la région transcrite entre le gène codant l'ARNr 16S et le gène codant l'ARNr 23S (ITS1) chez *Nnm. altunense* JCM12890 101

4. Gène de référence codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*) chez *Nnm. altunense* JCM12890.....103

5. Gène de référence codant la protéine de réparation et de recombinaison de l'ADN RadA (*radA*) chez *Nnm. altunense* JCM12890.....104

6. Gène de référence codant la protéine ribosomique L10 (*rpl10*) chez *Nnm. altunense* JCM12890.....105

7. Gène d'intérêt *halC8* codant le précurseur de l'halocine C8 chez *Nnm. altunense* JCM12890.....106

II. PCR quantitative de l'ADNc des gènes de référence et de *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.....107

1. Gènes de référence *gapdh, rpoB, radA et rpl10* et séquence ITS1 chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.....107

2. Gène d'intérêt *halH4* codant le précurseur de l'halocine H4 chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.....110

III. Discussion.....111

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 113

BIBLIOGRAPHIE.....117

ANNEXES.....129

Annexe 1 : Milieux utilisés pour la culture des souches

Annexe 2 : Amorces utilisées lors de l'études de la biosynthèse des halocines C8 et H4

Annexe 3 : Amorces utilisées lors de la q-RT-PCR chez *Nnm. altunense* JCM12890

Annexe 4 : Amorces utilisées lors de q-RT-PCR chez *Hfx. mediterranei* DSM1411

Annexe 5 : Publication " Halocin C8: an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera: *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* et *Halobacterium* "

Liste des abréviations

aa : acides aminés
ABC : ATP-binding cassette, cassette liant l'ATP
ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNg : ADN génomique
ADP : adénosine diphosphate
AF : acide formique
Amorce F : amorce forward, amorce sens
Amorce R : amorce reverse, amorce anti sens
Amp^r : résistant à l'ampicilline
APS : persulfate d'ammonium
ARN : acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
Asp ARNt : aspartyl ARNt
ATCC : American type culture collection, collection américaine de micro-organismes
ATP : adénosine triphosphate
atpB : gène codant la sous unité β de l'ATP synthétase
A_w : activity water, activité de l'eau
BLAST : Basic local alignment search tool, outil de recherche d'alignements
BSA : bovine serum albumin, albumine de sérum bovin
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CMI : constante minimale inhibitrice
CPR : candidate phyla radiation
Cs : cycle seuil
CSI : signature d'insertion-délétion conservée
CSP : signature protéique conservée
°C : degré Celsius
Da : Dalton
DEPC : pyrocarbonate d'éthyle
DNase : désoxyribonucléase
dNTP : désoxynucléotide triphosphate
DPANN : *Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohalo-archaeota*
DO : densité optique
DSMZ : Deutsche sammlung von mikrooorganismen und zellkulturen, collection allemande de micro-organismes et de lignées cellulaires
DTT : dithiothréitol
E. coli : *Escherichia coli*

ef2 : gène codant le facteur d'élongation 2

EDTA : éthylène diamine tétra-acétate

EPS : exopolysaccharide

ESI : electrospray ionization, ionisation par électronébulisation

ESI-qQ TOF : ionisation par électronébulisation avec quadripôle couplé à un temps de vol

eV : électron volt

FPLC : fast protein liquid chromatography, chromatographie liquide rapide de protéine

gapdh : gène codant la glycéraldéhyde3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)

HalC8 : halocine C8

HalH4 : halocine H4

HalS8 : halocine S8

Har. : *Haloarcula*

Hbt. : *Halobacterium*

Hfx. : *Haloferax*

Hmu1 : halomucine 1

Hrr. : *Halorubrum*

Htg. : *Haloterrigena*

Hqr. : Haloquadratum

Indel : InsertionDeletion, insertion-délétion

IPTG : Isopropyle β-D-1-thiogalactopyranoside

ITS 1: internal transcribed spacer 1, région de l'ARNr située entre les gènes codant l'ARNr 16S et l'ARNr 23S

JCM : Japan collection of microorganisms, collection japonaise de micro-organismes

kb : kilobase

LB : lysogeny broth

LC-MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

L. halophilus : *Lentibacillus halophilus*

M : molaire

MALDI : matrix assisted laser desorption ionization, désorption-ionisation laser assistée par matrice

Man PTS : mannose phosphotransférase

MB : marine broth

MS : mass spectrometry, spectrométrie de masse

m/z : rapport masse sur charge

Nab. : *Natrialba*

NCBI : National center for biotechnology information

Nnm. : *Natrinema*

OmpF : outer membrane porin F, porine F

ORF : open reading frame, phase ouverte de lecture

ORL : oto-rhino-laryngologie

Pa : Pascal

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis, éléctrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAM : peptide/protéine antimicrobien
pb : paire de bases
PCR : polymerase chain reaction, réaction de polymérase en chaine
PDB : protein data bank
pH : potentiel hydrogène
PHA : polyhydroxyalcanoate
Pi : phosphate inorganique
PSU : petite sous unité
p/v : poids par volume
q-PCR : PCR quantitative ou PCR en temps réel
radA : gène codant la recombinase RadA
RNase : ribonucléase
rpm : rotation par minute
rpl10 : gène codant la protéine ribosomique L10
rpoB : gène codant la sous unité β de l'ARN polymérase
RT : reverse transcription, transcription inverse
S : Svedberg
S. ruber : *Salinibacter ruber*
SDS : sodium dodécyl sulfate
secY : gène codant le facteur de sécrétion SecY
SNF : surnageant filtré
SNFB : surnageant filtré bouilli
sp. : espèce non identifiée
spp. : toutes les espèces d'un genre
Sul : sulfolobicine
SW : sea water
TACK : *Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota*
TAE : Tris acetate EDTA
Tat : twin arginine translocation
Taq : *Thermus aquaticus*
TEMED : NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
TOF : time of flight, temps de vol
Tm : température de fusion
Tris : tris(hydroxyméthyle)-aminométhane
U : unité
UA : unité arbitraire
uma : unité de masse atomique
UV : ultraviolet
X-GAL : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

Symboles des acides aminés, d'après la commission IUPAC-IUB sur la nomenclature biochimique (1969)

IUPAC code	Code 3 lettres	Acide aminé	IUPAC code	Code 3 lettres	Acide aminé
A	Ala	Alanine	**N**	Asn	Asparagine
C	Cys	Cystéine	**P**	Pro	Proline
D	Asp	Acide aspartique	**Q**	Gln	Glutamine
E	Glu	Acide gluatamique	**R**	Arg	Arginine
F	Phe	Phénylalanine	**S**	Ser	Sérine
G	Gly	Glycine	**T**	Thr	Thréonine
H	His	Histidine	**V**	Val	Valine
I	Ile	Isoleucine	**W**	Trp	Tryptophane
K	Lys	Lysine	**X**	?	?
L	Leu	Leucine	**Y**	Tyr	Tyrosine
M	Met	Méthionine			

Symboles des bases des nucléotides, d'après la commission IUPAC-IUB sur la nomenclature biochimique (1970)

IUPAC code	Base	IUPAC code	Base
A	**Adénine**	W	A ou T
C	**Cytosine**	Y	C ou T
G	**Guanine**	B	C ou G ou T
T (U)	**Thymine (Uracile)**	D	A ou G ou T
K	G ou T	H	A ou C ou T
M	A ou C	V	A ou C ou G
R	A ou G	N	A ou C ou G ou T
S	G ou C		

Liste des figures

Figure 1. Phospholipides de la membrane cytoplasmique chez les archées, les bactéries et les eucaryotes. 1

Figure 2. Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant. 2

Figure 3. Nombre de séquences de génomes et d'espèces d'archées décrites au cours de la période 1997-2016 3

Figure 4. Localisation des environnements hypersalins : thalassohalins et athalassohalins. 6

Figure 5. Marais salants de Guérande, France. 7

Figure 6. Mer morte, entre Israël, la Jordanie et la Palestine. 7

Figure 7. Classification des organismes suivant la concentration en sels du milieu. 8

Figure 8. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de la petite sous-unité ribosomique 16S et 18S. 8

Figure 9. Classification des archées halophiles de la classe des *Halobacteria* (phylum *Euryarchaeota*). 11

Figure 10. Arbre phylogénétique mettant en évidence les liens entre les *Halobacteria*, les *Nanohaloarchaeota* et les méthanogènes de classe II 12

Figure 11. Profil taxonomique des communautés microbiennes en fonction de la salinité 13

Figure 12. Représentation schématique des transporteurs membranaires chez une archée halophile extrême, *Halobacterium* sp. NRC-1. 15

Figure 13. Exemples de quelques composés osmoprotecteurs. 16

Figure 14. Comparaison de la structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase d'une archée halophile, *Haloarcula marismortui* avec celle de la malate déshydrogénase d'une bactérie mésophile, *Bacillus anthracis* 17

Figure 15. Exemples de mécanisme d'action de bactériocines de bactéries à Gram positif et de microcines de bactéries à Gram négatif 26

Figure 16. Activité d'halocines entre différents genres d'archées et de bactéries halophiles. 31

Figure 17. Test antimicrobien en milieu solide par diffusion sur gélose. 37

Figure 18. Carte du plasmide pGEM®-T. 39

Figure 19. Schéma de la réaction de RT-PCR quantitative. 42

Figure 20. Courbe d'amplification obtenue lors d'une PCR quantitative. 43

Figure 21. Schéma présentant un spectromètre de masse MALDI-TOF. 47

Figure 22. Clivage et maturation du précurseur ProC8 codé par le gène *halC8* chez la souche *Natrinema* sp. AS 7092. 50

Figure 23. Organisation du groupe de gènes entourant le gène *halC8* chez la souche *Natrinema* sp. AS 7092. 51

Figure 24. Alignement multiple, obtenu à l'aide du programme ClustalW, de la séquence en acides aminés de HalC8. 56

Figure 25. Alignement multiple, obtenu à l'aide du programme ClustalW, de la séquence en acides aminés du peptide signal et de la protéine d'immunité HalI chez les souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*.....58

Figure 26. Arbre phylogénétique, obtenu par la méthode du " neighbour joining ", des séquences de HalC8.....60

Figure 27. Arbre phylogénétique, obtenu par la méthode du " neighbour joining ", des séquences de HalI.....61

Figure 28. Organisation génétique des gènes entourant *halC8* chez des espèces de *Natrinema* et *Haloterrigena*. 63

Figure 29. Test antimicrobien des surnageants de cultures bouillis et filtrés contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETD3. 66

Figure 30. Spectre MALDI-TOF de la fraction la plus active contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETD3. 67

Figure 31. Spectre ESI-qQ TOF de la fraction éluant à la 52ème min sur la colonne Zorbax 300 SB 18. 68

Figure 32. Clivage, maturation et séquence du précurseur ProH4 codé par le gène *halH4* chez la souche *Hfx. mediterranei* R4. 73

Figure 33. Expression du gène *halH4* pendant la croissance de *Hfx. mediterranei* R4. 74

Figure 34. Organisation des gènes entourant *halH4* (HFX_5264) sur le plasmide pHM300 chez la souche *Hfx. mediterranei* ATCC33500 75

Figure 35. Alignement multiple, obtenu à l'aide du programme Clustal W, de la séquence en acides aminés de ProH4 de *Hfx. mediterranei* R4 (ATCC33500) et des séquences identifiées par analyse *in silico*. 79

Figure 36. Arbre phylogénétique, obtenu par la méthode du " neighbour joining ", des séquences de ProH4 de *Hfx. mediterranei* R4 (ATCC33500) et des séquences issues de l'analyse *in silico* 79

Figure 37. Alignement multiple de la séquence nucléotidique des gènes *halH4* à l'aide du programme Multalin 81

Figure 38. Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons de *halH4* obtenus avec les amorces dégénérées halH4-F/halH4-R chez *Nnm. gari* JCM14663, *Nab. aegyptia* DSM13077, *Hrr*. *arcis* JCM13916 et *Hfx*. *mediterranei* DSM1411. 83

Figure 39. Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons de *halH4* obtenus avec les amorces dégénérées halH4-F/halH4-R chez différentes espèces d'archées halophiles. 85

Figure 40. Courbe de croissance de *Hfx. mediterranei* DSM1411 et halo d'inhibition du surnageant de culture contre la souche cible *Hfx. volcanii* DSM3757. 89

Figure 41. Effet de la dilution du surnageant de *Hfx. mediterranei* DSM1411 prélevé après 71 h de culture, sur le diamètre du halo d'inhibition de la souche cible *Hfx. volcanii* DSM3757.90

Figure 42. Effet de la concentration en sels du surnageant de *Hfx. mediterranei* DSM1411 prélevé après 71 h de culture, sur le diamètre du halo d'inhibition de la souche cible *Hfx. volcanii* DSM3757. 91

Figure 43. Chromatogramme sur une colonne Mono Q HR 5/5 du surnageant de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411 dans un tampon Tris-HCl 20mM pH 8,0 contenant 10 $g.L^{-1}$ NaCl. 92

Figure 44. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS) des fractions 20 à 27 collectées en sortie de la colonne Mono Q HR 5/5. 93

Figure 45. Courbe d'amplification du gène codant l'ARNr 16S chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces 16S-Na-F1/16S-Na-R1.....100

Figure 46. Courbe d'amplification du gène *gapdh* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces gapdh-Na-F8/gapdh-Na-R8. 101

Figure 47. Courbe de fusion des amplicons, obtenus après q-RT-PCR du gène *gapdh* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces gapdh-Na-F8/gapdh-Na-R8, en fonction de la température. 101

Figure 48. Courbe d'amplification du gène codant la région ITS1 chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces ITS1-Na-F1/ITS1-Na-R2.....102

Figure 49. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR de la séquence ITS1 chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces ITS1-Na-F1/ITS1-Na-R2, en fonction de la température. 102

Figure 50. Courbe d'amplification du gène *rpoB* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpoB-Na-F4/rpoB-Na-R4. 103

Figure 51. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène *rpoB* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpoB-Na-F4/rpoB-Na-R4, en fonction de la température. 104

Figure 52. Courbe d'amplification du gène *radA* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces radA-Na-F2/radA-Na-R2. 104

Figure 53. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène *radA* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces radA-Na-F2/radA-Na-R2, en fonction de la température. 105

Figure 54. Courbe d'amplification du gène *rpl10* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpl10-Na-F1/rpl10-Na-R1. 105

Figure 55. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène *rpl10* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpl10-Na-F1/rpl10-Na-R1, en fonction de la température. 106

Figure 56. Courbe d'amplification du gène d'intérêt *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces halC8-Na-F4/halC8-Na-R4. 106

Figure 57. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène d'intérêt *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890 amplifié avec les amorces halC8-Na-F4/halC8-Na-R4, en fonction de la température. 107

Figure 58. Test de spécificité des amorces gapdh-Hm-F3/gapdh-Hm-R3 s'hybridant au gène *gapdh* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411. 108

Figure 59. Test de spécificité des amorces ITS1-Hm-F2/ITS1-Hm-R2 s'hybridant à la séquence ITS1 chez *Hfx. mediterranei* DSM1411. 108

Figure 60. Test de spécificité des amorces rpoB-Hm-F/rpoB-Hm-R s'hybridant au gène *rpoB* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411. 109

Figure 61. Test de spécificité des amorces radA-Hm-F/radA-Hm-R s'hybridant au gène *radA* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411. 109

Figure 62. Test de spécificité des amorces rpl10-Hm-F/rpl10-Hm-R s'hybridant au gène *rpl10* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411. 110

Figure 63. Test de spécificité des amorces halH4-Hm-F1/halH4-Hm-R1 s'hybridant à *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411. 110

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification et exemples d'archées extrêmophiles 4

Tableau 2. Principales caractéristiques des halocines 28

Tableau 3. Nom, origine et conditions de culture des souches utilisées dans cette étude 35

Tableau 4. Recherche de similarités de séquences, à l'aide des algorithmes BLASTP ou TBLASTN, de la protéine d'immunité HalI et de HalC8 provenant de la souche *Natrinema* sp. AS7092. 53

Tableau 5. Origine des différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*, résultats des recherches in silico de similarités de séquences de *halC8* et de ProC8 et de l'amplification de *halC8* par PCR avec les amorces halC8-Imm-F/halC8-Imm-R. 55

Tableau 6. Amplification par PCR des gènes *halU* (amorces halU-F/halU-R), *halR* (amorces halR-F/halR-R), *halT2* (amorces haltT2-F/halT2-R) et *halT3* (amorces halT3-F/halT3-R) chez différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*. 64

Tableau 7. Activité antimicrobienne des surnageants bouillis et filtrés de cultures de différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* sur 3 souches cibles. 66

Tableau 8. Origine des souches et amplifications du gène *halH4* par PCR réalisées avec les amorces communes dégénérées (halH4-F/halH4-R) et les amorces spécifiques de *Hfx. mediterranei* ATCC30500 (halH4-Hmc-F/halH4-Hmc-R) sur des souches d'archées halophiles et 2 souches de bactéries halophiles extrêmes. 84

Tableau 9. Spectre d'activité du surnageant non chauffé de *Hfx. mediterranei* DSM1411 contre des souches cibles d'archées et de bactéries halophiles. 87

Tableau 10. Mesure des halos d'inhibition des surnageants et culots de cultures de différentes souches contre la souche cible *Hbt. salinarum* ETD5.....88

Tableau11. Récapitulatif de la détection du signal de fluorescence (cycle seuil) obtenu par q-RT-PCR pour les amorces s'hybridant aux gènes de référence et aux gènes d'intérêt *halC8* et *halH4*.....111

INTRODUCTION

I. Les archées

1. Troisième domaine du vivant

Dans les années 1970, les études menées par George Fox et Carl Woese, s'appuyant sur la comparaison de caractéristiques moléculaires afin de classifier l'ensemble des organismes vivants, ont bouleversé les notions fondamentales de la microbiologie moderne. En effet, les archées présentent une organisation cellulaire similaire à celle des bactéries et ont donc été, de ce fait, longtemps considérées comme des bactéries. Cependant, des études ont permis de distinguer deux ensembles distincts au sein des procaryotes. Cette classification est fondée sur l'étude de l'ARNr de la petite sous-unité (ARNr PSU) du ribosome (16S ou 18S) (Woese et al., 1975), un organite universellement présent chez tous les organismes vivants chez lesquels il occupe la même fonction : la traduction de L'ARNm en protéine (Woese et Fox, 1977). Le premier groupe de procaryotes, les eubactéries, regroupait alors la plupart des bactéries " classiques ". Le second groupe était composé de procaryotes anaérobies stricts capables de produire du méthane comme déchet de leur métabolisme (méthanogenèse). A cause de leur métabolisme singulier, supposé être très primitif sur la base de modèles de la composition de l'atmosphère terrestre ancienne (3-4 milliards d'années) et donc potentiellement présent chez les premières formes de vie, Woese et Fox baptisèrent ce groupe *Archaebacteria*. Le monde vivant fut alors divisé en trois domaines : les *Eubacteria*, les *Eucarya* et les *Archaebacteria*.

Dès le début, Woese pressentait que les méthanogènes n'étaient pas des bactéries " classiques " car ils présentaient des caractères singuliers comme, entre autres, une membrane constituée de lipides atypiques, avec du glycerol-1-phosphate, une liaison éther très stable et des chaînes d'isoprénoïdes au lieu du glycerol-3-phosphate, une liaison ester et des chaînes d'acides gras (Figure 1) (Woese et al., 1978).

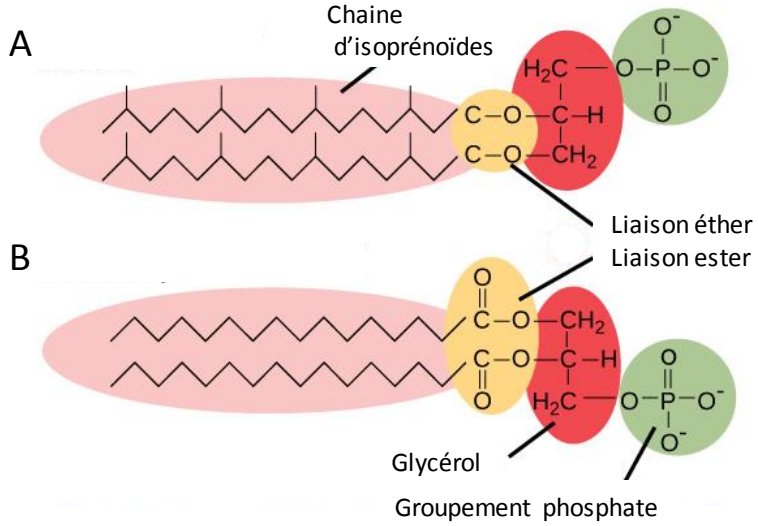


Figure 1. Phospholipides de la membrane cytoplasmique chez les archées (A), les bactéries et les eucaryotes (B).

Il poursuivit ses recherches sur ces " bactéries " et il put enrichir ce groupe de nouvelles lignées puis publier les premiers arbres universels racinés. Les trois domaines devinrent *Bacteria*, *Eucarya*, et *Archaea* (Woese et al., 1990). Dans ces premiers arbres seuls deux phyla d'archées figuraient, ceux des *Euryarcheota* et des *Crenarcheota* (Woese et al. 1990). Depuis la situation a bien changé. La figure 2 représente un arbre beaucoup plus diversifié que l'arbre universel présenté initialement par Woese en particulier grâce à l'utilisation actuelle des méthodes de métagénomique (Castelle et Banfield, 2018), qui ont permis la découverte de nombreuses archées et bactéries affiliées à de nouveaux taxons.

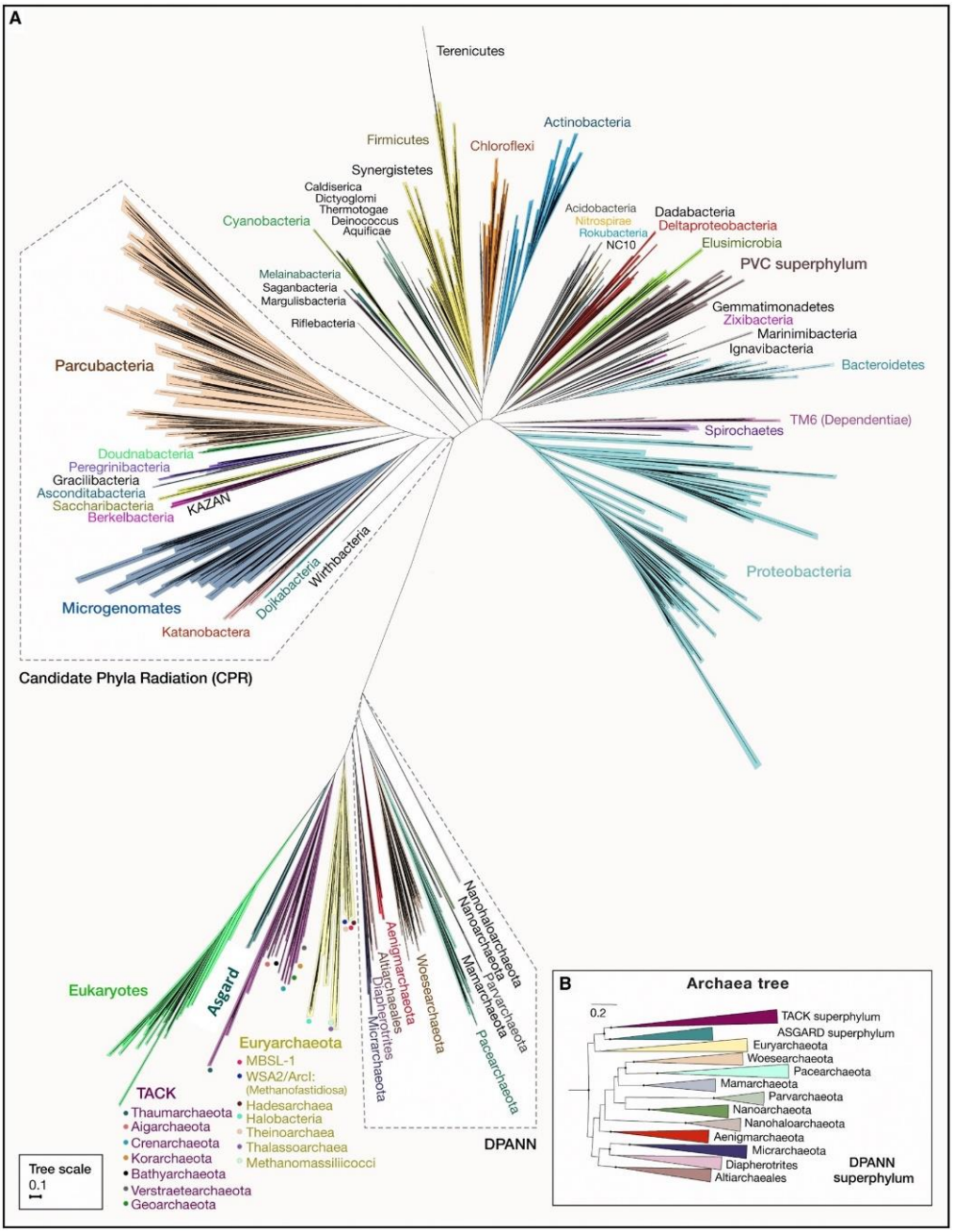


Figure 2. Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant.
L'échelle indique le nombre de substitution par site. **A**. Cet arbre dérive de celui proposé par Hug et al. en 2016, dans lequel ont été rajoutées chez les archées de nouvelles séquences

provenant du superphylum DPANN (*Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota,Nano-archaeota, Nanohaloarchaeota*, …). Cet arbre est basé sur la comparaison des séquences concaténées de 14 protéines ribosomiques. TACK : *Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota* … . Le superphylum Asgard (*Geidararchaeota, Heimdallarcheota, Helarchaeota, Lokiarchaeota, Odinarchaeota* et *Thorarcheota*) comprend des archées isolées principalement de sédiments profonds près d'évents hydrothermaux (MacLeod et al., 2019 ; Baker et al. ; 2020 ; Cai et al., 2020). CPR (candidate phyla radiation) représente un superphylum bactérien, récemment découvert, de bactéries non cultivables, le plus souvent symbiotiques et présentant un génome réduit (environ 1 Mb) (Brown et al. 2015 ; Méheust et al., 2019). **B**. Reconstruction de l'arbre comprenant uniquement les séquences d'archées. L'arbre montre l'organisation du superphylum DPANN. Castelle et Banfield, 2018.

Au cours des deux dernières décennies, les études sur les génomes d'archées n'ont cessé de s'amplifier et, en 2016, 1062 séquences de génomes d'archées ont été publiées dans les bases de données NCBI et 480 espèces d'archées ont été décrites (Figure 3). Fin 2019, le nombre de génomes d'archées dans la base de données GOLD s'élévait à 2855 (https://gold.jgi.doe.gov/).

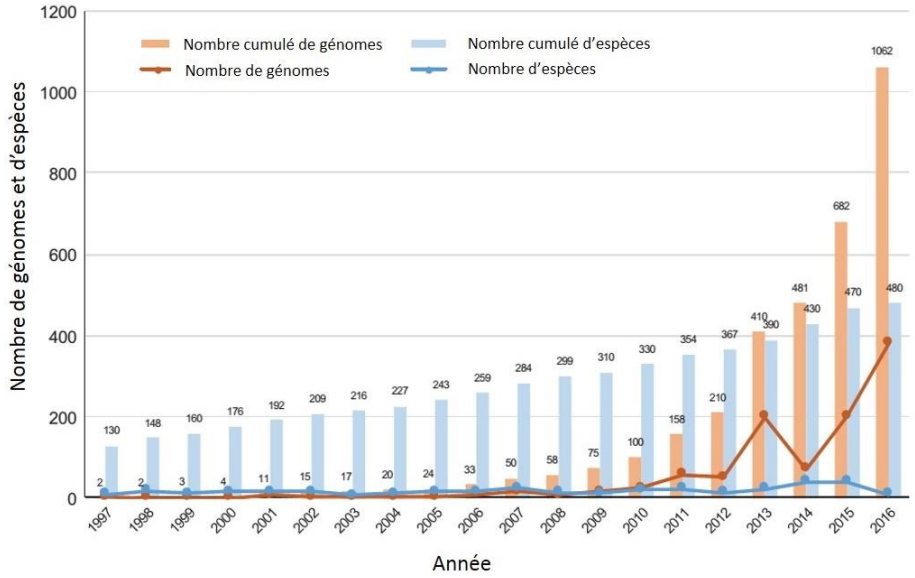


Figure 3. Nombre de séquences de génomes et d'espèces d'archées décrites au cours de la période 1997-2016.
Le tracé et l'histogramme orange indiquent respectivement le nombre annuel et cumulatif de séquences de génomes d'archées publiées dans les bases de données NCBI. Le tracé et l'histogramme bleu indiquent respectivement le nombre annuel et cumulatif d'espèces d'archées décrites (http://www.bacterio.net/). Adam et al., 2017.

2.Habitats

Les archées ont d'abord été retrouvées dans des environnements hostiles à la vie où les conditions physico-chimiques sont considérées comme extrêmes, c'est-à-dire où la survie de nombreuses espèces se trouverait menacée, et ont été surnommées, de ce fait, " extrêmophiles " (Cavicchioli, 2011). Les premières études ont d'ailleurs semblé les limiter à

ces environnements où sont enregistrées des températures extrêmes, des pressions exceptionnelles, une forte acidité ou au contraire une hyper alcalinité, une grande salinité (jusqu'à une concentration saturante en NaCl) ou encore des conditions d'anaérobiose ou de radiations (ionisantes ou UV). Bien qu'hostiles à la vie, ces environnements sont colonisés respectivement par des archées hyperthermophiles, psychrophiles (température inférieure à 15 °C), piézophiles (pression supérieure à 10 MPa), acidophiles extrêmes, alcalophiles extrêmes, halophiles extrêmes, méthanogènes et radiophiles (Rotschild et Mancinelli ; 2001 ; Cavicchioli, 2002 ; Chaban et al., 2006 ; Canganella et Wiegel, 2011 ; Coker, 2019) (Tableau 1).

Tableau 1. Classification et exemples d'archées extrêmophiles

Paramètres	Conditions	Organismes extremophiles	Exemples
Oxygène	anaérobiose strict	Méthanogènes	*Methanocaldococcus jannaschii, Methanopyrus kandleri*
pH	pH < 2	Acidophiles	*Picrophilus oshimae, Picrophilus torridus*
	pH > 9	Alcalophiles	*Natronobacterium gregoryi, Natrialba magadi*
Pression	> 10 MPa	Piezophiles	*Pyrococcus horikoshii , Pyrococcus yayanosii*
Radiations		Radiophiles	*Habobacterium* sp. NRC-1
Salinité	> 2,5 M NaCl	Halophiles extremes	*Halobacterium salinarum, Haloquadratum walsbyi*
Température	> 80 °C	Hyperthermophiles	*Methanopyrus kandlerii, Pyrolobus fumarii*
	< 15 °C	Psychrophiles	*Methanococcoides burtonii*

La plupart du temps, ces archées sont des polyextrêmophiles comme par exemple certaines espèces d'*Acidianus* et de *Sulfolobus* de la famille des *Sulfolobaceae* qui sont des acidophiles extrêmes et des hyperthermophiles (Stetter, 1996). La majorité des micro-organismes piézophiles isolés dans les profondeurs océaniques sont également psychrophiles (Margesin et Nogi, 2004).

Ce constat a conduit à populariser l'idée selon laquelle les archées sont des organismes restreints aux environnements extrêmes. Cependant le développement d'outils moléculaires permettant de s'affranchir de l'étape de culture et d'isolement, souvent critique pour la majorité des archées, a permis de mettre en évidence, dans les années 1990, la présence d'archées dans de nombreux milieux (DeLong, 1998). La diversité des micro-organismes d'un écosystème est ainsi étudiée en se basant sur des techniques de métagénomique *via* le séquençage de l'ADN codant les ARNr PSU. Ces techniques ont permis de retrouver des archées dans les eaux lacustres, dans les sols, au sein des plantes, des ciliés, de certaines denrées alimentaires et même dans les rizières, les tourbières et les réservoirs de pétrole (Chaban et al, 2006 ; Dridi et al ; 2011). Des archées sont également présentes chez les eucaryotes, comme dans le rumen des ruminants, sur la peau, dans la sphère ORL et le tube

digestif de nombreuses espèces (homme, arthropodes, …) (Moissl-Eichinger et al., 2018). L'archéome humain, composante archéenne du microbiome humain, est très spécifique suivant le site d'isolement. Au niveau du nez et du tractus gastrointestinal on retrouve principalement des méthanogènes (ordre des *Methanobacteriales* et des *Methanomassiliicoccales* (Gaci et al., 2014). Au niveau des poumons et des lavages bronchoalvéolaires, ce sont les archées du superphylum DPANN (Figure 2B, page 2) qui prédominent largement (*Woesearcheota* et des archées non identifiées du superphylum DPANN). Quant au niveau de la peau, ce sont majoritairement des *Aenigmarcheota* (DPANN) et des *Thaumarcheota* (Koskinen et al., 2017) (Figure 2, page 2).

A ce jour aucune archée pathogène stricte n'a été découverte ou décrite. Cependant, de nombreuses archées (Moissl-Eichinger et al., 2018) sont systématiquement retrouvées associées à certaines pathologies (Gaci et al., 2014 ; Lazar et al ; 2018), telles que l'allergie, l'obésité, les maladies parodontales ou les maladies inflammatoires de l'intestin.

II. Milieux hypersalins et organismes halophiles

1. Milieux hypersalins

Dans de nombreux environnements, les archées prédominent en termes de biomasse. C'est le cas notamment des eaux de surface en Antarctique où elles représentent 34 % de la masse procaryotique (DeLong et al., 1994) et des milieux hypersalins : milieux dont la concentration en NaCl est comprise entre 35 $g.L^{-1}$ soit 0,6 M (eau de mer) et 350 $g.L^{-1}$ soit 6,0 M (limite de solubilité du NaCl). Les environnements hypersalins, qu'ils soient d'origine naturelle (lacs salés, mers intérieures, mines de sels, sols) ou d'origine anthropique (marais salants côtiers, salines), sont très répandus sur notre planète (Oren, 2006a). Nous pouvons distinguer 2 catégories de milieux hypersalins : les environnements thalassohalins et les environnements athalassohalins.

1.1. Environnements thalassohalins

Ils ont pour origine l'eau de mer et présentent donc une composition ionique avec des proportions d'anions et de cations similaires mais avec une prédominance des ions Na^+ et Cl^-. Lors de l'évaporation de l'eau de mer, des modifications de la composition ionique sont observées en raison de la précipitation de gypse ($CaSO_4$, $2H_2O$) et d'autres minéraux ayant atteints leur seuil de solubilité. Le pH de ces environnements est neutre à légèrement alcalin, entre 7 et 8 (Oren, 2006a). Ils présentent souvent une coloration rose-rouge car ils abritent un grand nombre de micro-organismes halophiles contenant des pigments (Oren, 2002a). Les milieux thalassohalins (Figure 4) peuvent être d'origine naturelle : lacs intérieurs, comme le Grand Lac Salé à l'ouest des Etats-Unis dans l'Utah, des lagunes côtières comme la lagune de Madre entre le Texas et le Mexique, des bassins sous-marins profonds comme le bassin Orca

dans le golfe du Mexique, des sebkas (bassins à forte salinité occupant le fond d'une dépression et plus ou moins séparé d'un milieu marin, dans des régions arides) comme la sebkha d'Ezzemoul en Algérie.

Ils peuvent être également d'origine anthropique, c'est le cas des marais salants (ou salines) (Figure 4) qui sont constitués d'une série de bassins alimentés en eau de mer où le NaCl est progressivement concentré jusqu'à sa précipitation en sel, qui est récolté et commercialisé. A titre d'exemple on peut citer la saline de Sfax en Tunisie et les marais salants à Guérande en France (Figure 5).

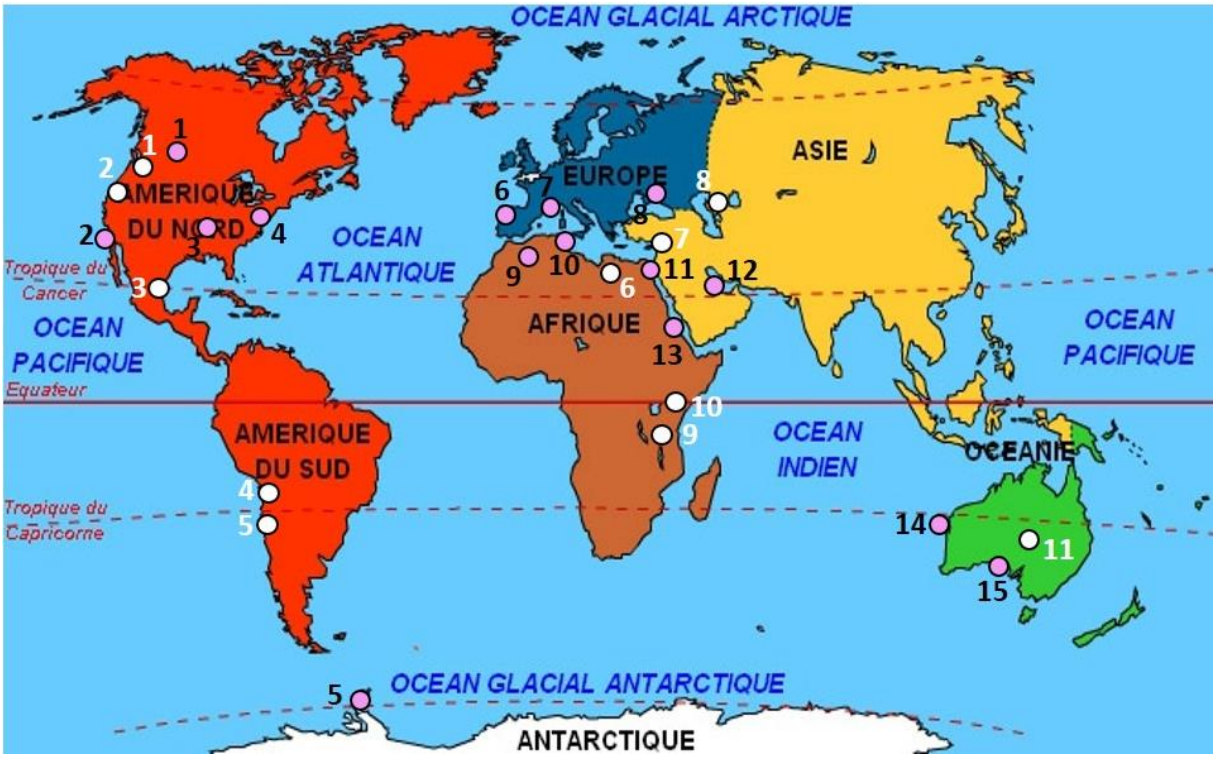


Figure 4. Localisation des environnements hypersalins : thalassohalins (●) athalassohalins (○). (●) Milieux thalassohalins : **(1)** Grand Lac Salé (Utah, USA) ; **(2)** Lagune Ojo de Liebre (Mexique) ; **(3)** Lagune Madre (Texas, USA) ; **(4)** Bassin Orca (Golfe du Mexique) ; **(5)** Lac Vanda (Antarctique) ; **(6)** Vallée de Alto Vinalopó, saline d'Alicante (Espagne) ; **(7)** Marais salants de Salin-de-Giraud (France) ; **(8)** Mer d'Azov (Ukraine) ; **(9)** Sebkha d'Ezzemoul (Algérie) ; **(10)** Saline de Sfax, Chott El-Jérid, (Tunisie) ; **(11)** Bassin Ras Mohammad (Egypte) ; **(12)** Golfe Persique (Iran) ; **(13)** Mer Rouge (Entre l'Afrique et le Moyen-Orient) ; **(14)** Baie Shark (Australie) et **(15)** Golfe Spencer, (Australie).

(○)Milieux athalassohalins : **(1)** Vallée de la mort (Californie, USA) ; **(2)** Lac Mono, lac Searles, et lac Big Soda (Ouest des USA) ; **(3)** Lac Texcoco (Mexique) ; **(4)** Salar d'Uyuni (Bolivie) ; **(5)** Salar d'Atacama (Chili) ; **(6)** Ouadi Natroun (Egypte) ; **(7)** Mer Morte (entre Israël, Jordanie et Palestine) ; **(8)** Mer Caspienne (Asie occidentale et Russie) ; **(9)** Lac Natron (Tanzanie) ; **(10)**, Lac Magadi (Kenya) et **(11)** Lac Eyre (Australie).



Figure 5. Marais salants de Guérande, France.
https://www.labaule-guerande.com/les-celebres-marais-salants-de-guerande.html

1.2. Environnements athalassohalins

Ils ont une composition ionique différente de celle de l'eau de mer car ils sont formés par l'évaporation des eaux de ruissellement ou d'eau de pluie sur des évaporites qui sont des environnements fossiles hypersalés (Oren, 2002a). C'est le cas des lacs alcalins caractérisés par l'absence des cations Ca^{2+} et Mg^{2+} mais qui sont riches en ions CO_3^{2-} et HCO_3^- (Oren, 2006a) comme par exemple le lac Eyre en Australie ou le lac Magadi au Kenya (Figure 4). L'exemple le plus connu de milieu athalassohalin est la Mer Morte (Figure 6), localisée entre Israël, la Jordanie et la Palestine. Cette dernière présente une concentration en sels de 340 $g.L^{-1}$ et un pH faiblement acide compris entre 5,8 et 6 (Oren 2006a, Oren, 2010a). Les eaux de la Mer Morte sont riches en cations Ca^{2+} (17,6 $g.L^{-1}$) et Mg^{2+} (44 $g.L^{-1}$) mais pauvres en K^+ (7,6 $g.L^{-1}$). Les anions Cl^-(223 $g.L^{-1}$) et Br^-(6,3 $g.L^{-1}$) y sont très largement majoritaires (Oren 2006a et Oren 2010a).



Figure 6. Mer morte, entre Israël, la Jordanie et la Palestine.
http://www.mer-morte.info/origines-mer-morte.html

2. Organismes halophiles

Les organismes halophiles, qui ont besoin de sels pour leur croissance, sont classés selon leur degré de dépendance en sels, de légers à extrêmes. Certains organismes ne sont pas halophiles mais halotolérants, ils sont cependant capables de se développer et/ou de tolérer des concentrations en sels assez élevées (DasSarma et DasSarma, 2017) (Figure 7).

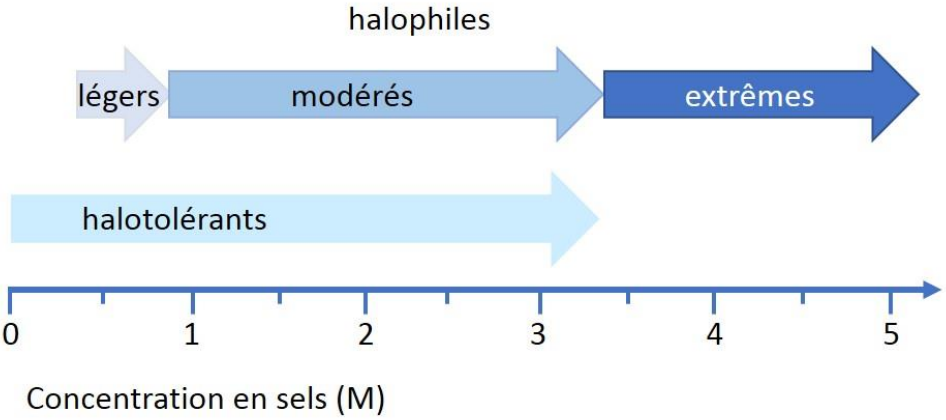


Figure 7. Classification des organismes suivant la concentration en sels du milieu.

Ces milieux hypersalins sont colonisés par des organismes dits halophiles, que nous retrouvons parmi les trois domaines du vivant (Figure 8).

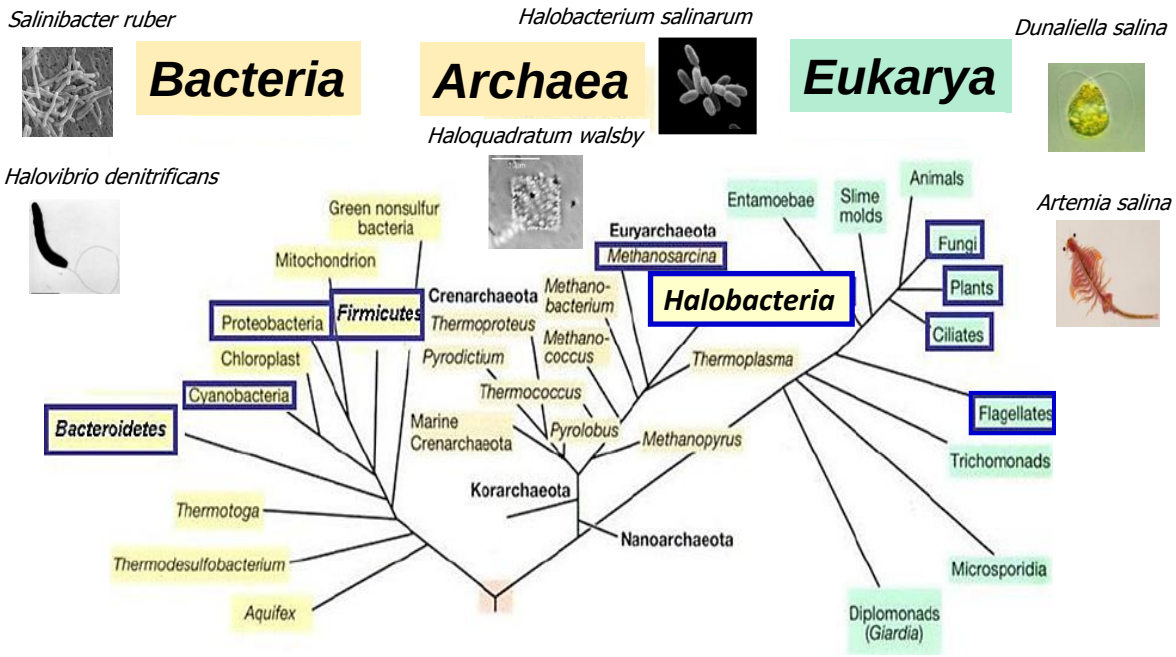


Figure 8. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de la petite sous-unité ribosomique 16S et 18S.
Les groupes incluant des organismes halophiles sont encadrés en bleu. D'après Oren 2008.

2.1. Eucaryotes halophiles

Dans le domaine des *Eucarya*, les organismes halophiles sont relativement rares. La plupart des eucaryotes halophiles sont des halophiles modérés ou halotolérants, mais quelques espèces halophiles extrêmes ont été identifiées (DasSarma et DasSarma, 2017), comme des champignons, des protistes et des algues qui nécessitent de fortes concentrations en sels pour vivre. Par exemple, *Debaryomyces hansenii* est une levure poussant en condition d'anaérobiose dans des salinités pouvant atteindre 263 $g.L^{-1}$ NaCl (Gunde-Cimerman et al., 2009). C'est également le cas du champignon *Trimmatostroma salinum* et de la levure noire *Hortaea werneckii* (Gunde-Cimerman et al., 2000) qui nécessitent des concentrations en sel élevées pouvant aller presque jusqu'à la saturation (300 $g.L^{-1}$ NaCl). La plupart des algues vertes halophiles sont des halophiles modérés ou halotolérants, comme *Dunaliella viridis*, *Dunaliella parva* ou *Asteromonas gracilis*. Seule *Dunaliella salina* est une espèce halophile extrême qui produit à des salinités élevées de grandes quantités d'un pigment d'intérêt, le β-carotène (DasSarma et DasSarma, 2017). De plus, cette algue planctonique peut se trouver, dans le Grand Lac Salé aux USA, à de très fortes concentrations pouvant aller jusqu'à 10000 cellules par mL (Oren, 2014). On retrouve également, dans les milieux hypersalins, des diatomées, telles que *Amphora coffeaformis*, généralement à des concentrations en sels aux environs de 120 $g.L^{-1}$, mais elles sont rarement abondantes (DasSarma et DasSarma, 2017). Des eucaryotes pluricellulaires ont également été retrouvés dans des environnements hypersalins modérés tels que des crustacés (*Artemia franciscana et Artemia salina*), des poissons *Tilapia*, des mouches comme *Ephydra hians* et *Ephydra gracilis*, des rotifères (*Bracionus angularis*), des vers plats (*Macrostomum* spp.), des copépodes (*Robertsonia salsa*) et des ostracodes (*Cyprideis torosa*). Des plantes telles que *Atriplex halimus* (ficoïde glaciale) et *Mesembryanthemum crystallinum* (arroche maritime) et des espèces de palétuviers dans les mangroves du genre *Laguncularia* peuvent également survivre dans des sols présentant une concentration en sels modérée (DasSarma et DasSarma, 2017).

2.2. Bactéries halophiles

Des bactéries halophiles ont été retrouvées dans les phyla *Bacteroïdetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* (classes des *Alphaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*). Des cyanobactéries représentent une partie importante du biotope des milieux hypersalins tels que les marais salants et le Grand lac salé aux Etats-Unis. Ces cyanobactéries sont halotolérantes légères comme *Agmenellum quadrupplicatum* qui tolère 0 à 100 $g.L^{-1}$ NaCl, cependant il existe des cyanobactéries halophiles extrêmes comme *Aphanothece halophytica* dont la croissance est possible entre 50 et 320 $g.L^{-1}$ NaCl (DasSarma et DasSarma, 2017). Dans le phylum des Firmicutes, la famille des *Bacillaceae* comprend des espèces halophiles obligatoires dont *Halobacillus halophilus* qui a été l'espèce la plus étudiée surtout en raison de ses mécanismes d'osmorégulation (Saum et Müller, 2008). On retrouve

également des halophiles dans la famille des *Halobacteroidaceae* (*Halobacteroides halobius*, *Orenia marismortui* et *Sporohalobacter lortetii*). Chez les *Gammaproteobacteria*, la famille des *Halomonadaceae* contient un grand nombre d'espèces halophiles modérées isolées de nombreux environnements hypersalins (genres *Chromohalobacter* et *Halomonas*) (DasSarma et DasSarma, 2017). Enfin, c'est dans le phylum des *Bacteroïdetes* que l'on trouve des halophiles extrêmes pigmentés ayant une croissance optimale de 200 à 300 $g.L^{-1}$ NaCl. Il s'agit de *Salisaeta longa* (Vaisman et Oren, 2009), de *Salinibacter ruber* (Antón et al., 2002), *Salinibacter iranicus* et *Salinibacter luteum* (Makhdoumi-Kakhki et al., 2012). Les bactéries du genre *Salinibacter* sont celles qui présentent le plus de caractères communs avec les archées de la classe des *Halobacteria* (Oren, 2013).

Il est important de noter que certaines bactéries halophiles sont poly-extrêmophiles telles que la bactérie anaérobie *Halothermotrix orenii* isolée d'un lac salin en Tunisie qui est halophile (200 $g.L^{-1}$ NaCl) et thermophile (68 °C) (Cayol et al., 1994), ou encore les bactéries *Natranaerobius thermophilus*, *Natranaerobius trueperi* et *Natronovirga wadinatrunensis* qui sont alcalophiles (pH 9.5 à 10.5) et halophiles (220 $g.L^{-1}$ NaCl), isolées des lacs alcalins hypersalés Oudi Natroum en Egypte (Mesbah et al., 2007 ; Mesbah et Wiegel, 2009).

2.3. Archées halophiles

Les archées halophiles ont été identifiées dans le phylum des *Euryarchaeota*, dans les classes *Halobacteria* majoritairement et *Methanomicrobia* (méthanogènes) pour quelques espèces, et dans le superphylum DPANN parmi les *Nanohaloarchaeota*. Parmi les *Euryarchaeota*, la classe des *Halobacteria* est presque exclusivement composée d'archées halophiles extrêmes. En effet, ces organismes requièrent une concentration saline supérieure ou égale à 190 $g.L^{-1}$ et ne peuvent croître en dessous de 100 $g.L^{-1}$ NaCl (DasSarma et DasSarma, 2017). Jusqu'en 2010, la phylogénie des *Halobacteria* était uniquement basée sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S. En 2010, une phylogénie de ces archées se basant sur les séquences du gène codant la sous unité β' de l'ARN polymérase a été réalisée (*rpoB*') (Minegishi et al., 2010). Puis, en 2011, une phylogénie multi locus utilisant la séquence de gènes codant 5 protéines de références (*atpB*, *ef2*, *radA*, *rpoB'* et *secY*) (Papke et al., 2011) a été introduite. Néanmoins la classe des *Halobacteria* ne comprenait toujours qu'un seul ordre les *Halobacteriales* et une seule famille les *Halobacteriaceae*. Dès 2015, L'augmentation des données issues du séquençage des génomes d'archées a permis l'analyse de 129 séquences de génomes et de l'identification de signatures protéiques conservées (CSPs) et de signatures d'insertions-délétions (Indel) conservées (CSIs). Ceci a permis de définir finalement trois ordres au sein de la classe *Halobacteria* : les *Halobacteriales*, les *Haloferacales* et les *Natrialbales*. L'ordre des *Halobacteriales* comprend trois familles : *Haloarculaceae*, *Halobacteriaceae* et *Halococcaceae*. L'ordre des *Haloferacales* présente deux familles, *Haloferaceae* et *Halorubraceae*, tandis que l'ordre des *Natrialbales* ne contient qu'une seule

famille, celle des *Natrialbaceae* (Figure 9) (Gupta et al., 2015 ; Gupta et al., 2016a et 2016b). Les génomes des archées identifiées de la classe des *Halobacteria* ont une taille variant de 2,4 à 5,3 Mb et la plupart est porteur d'un ou plusieurs plasmides dont la taille peut aller jusqu'à 830 kb. Leur pourcentage en GC est toujours élevé variant de 47 à 71 % (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/ Halobacteria).

En octobre 2019, la classe des *Halobacteria* comptait 66 genres dont 5 décrits en 2019 (Figure 9) et 276 espèces dont 16 nouvelles pour l'année 2019 (J Peduzzi, communication personnelle).

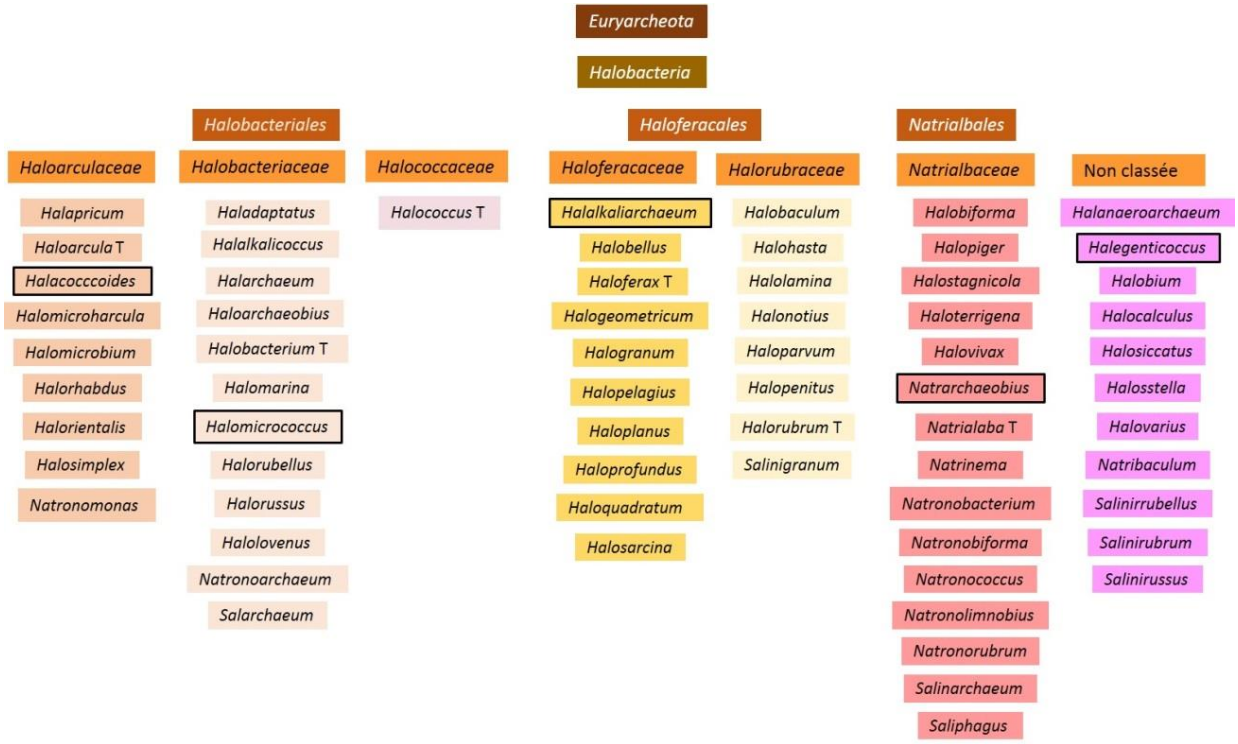


Figure 9. Classification des archées halophiles de la classe des *Halobacteria* (phylum *Euryarchaeota*).
T : genre servant à définir la famille. Les genres encadrés en noir ont été décrits en 2019.

Dans la classe des *Methanomicrobia*, les archées méthanogènes halophiles sont retrouvées dans la famille des *Methanocalculaceae* avec le genre *Methanocalculus* dont 6 espèces halotolérantes (Oren 2014), *Methanocalculus natronophilus* (Sorokin et al., 2015) pouvant croitre jusqu'à 195 $g.L^{-1}$ NaCl. Mais le plus grand nombre de représentants halophiles se retrouve dans la famille des *Methanosarcinaceae* (Oren, 2014), dans trois genres (sur sept) *Methanohalobium*, *Methanohalophilus* et *Methanosalsum*. L'archée méthanogène la plus halophile est *Methanohalobium evestigatum* Z-7303, isolée du lagon hypersalin Syvash en Ukraine, avec une croissance optimale à 250 $g.L^{-1}$ NaCl. De telles découvertes nous informent que la réaction de méthanogenèse peut avoir lieu à de très fortes concentrations salines, proche de la concentration de saturation en NaCl.

En 2012, une étude métagénomique de la communauté microbienne du lac hypersalé Tyrrell en Australie (250 $g.L^{-1}$ à > 330 $g.L^{-1}$ de sels) (Emerson et al., 2012), a révélé un nouveau groupe d'archées : les *Nanohaloarchaeota* (anciennement nommé *Nanohaloarchaea*), intégré d'abord dans le phylum des *Euryarchaeota* (Ghai et al., 2011 : Narasingarao et al., 2012), puis dans le superphylum DPANN (Rinke et al., 2013). Trois genres candidats furent alors décrits *Candidatus Haloredivivus* sp. G17, *Candidatus Nanosalina* et *Candidatus Nanosalinarum*. Depuis seuls 18 génomes ont été recensés dans plusieurs environnements hypersalins (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/Nanohaloarchaea), et un nouveau genre a été décrit, *Candidatus Nanopetramus* sp. SG9 (Crits-Christoph et al., 2016). Par opposition aux génomes des archées de la classe des *Halobacteria*, le génome des *Nanohaloarchaeota* est petit (0,4 à 1,4 Mb) et a un plus faible pourcentage en GC (39 à 55 %). Leurs cellules sont de petites tailles (0,6 µm) et sont dénuées de vésicules gazeuses. Leur génome présente un opéron d'ARNr en copie unique et des voies atypiques pour le métabolisme des glucides (Narasingarao et al., 2012). Très récemment, il a été montré que deux souches de candidat *Nanohaloarchaeum antarticus*, isolées dans 2 lacs en Antarctique, nécessitent la présence d'*Halorubrum lacusprofundi* de la famille des *Halorubraceae* pour croître (Hamm et al., 2019). C'est le premier exemple qui montre que les *Nanohaloarchaeota* pourraient être des symbiontes (partenaires les plus petits d'une symbiose), de la même manière à ce que l'on observe chez les *Nanoarchaeota* et *Pavarchaeota* du superphylum DPANN (Hamm et al., 2019). La position phylogénétique des *Nanohaloarcheota* reste cependant souvent débattue (Petitjean 2015, Rayman et al., 2015 ; Castelle et al., 2015). Une étude récente a montré que les *Halobacteria* du phylum des *Euryarcheota* et les *Nanohaloarchaeota du* superphylun DPANN représentent 2 lignées indépendantes d'halophiles extrêmes qui dérivent de 2 lignées distinctes de méthanogènes de classe II, respectivement les *Methanomicrobiales* et les *Methanocellales* (Aouad et al., 2018) (Figure 10).

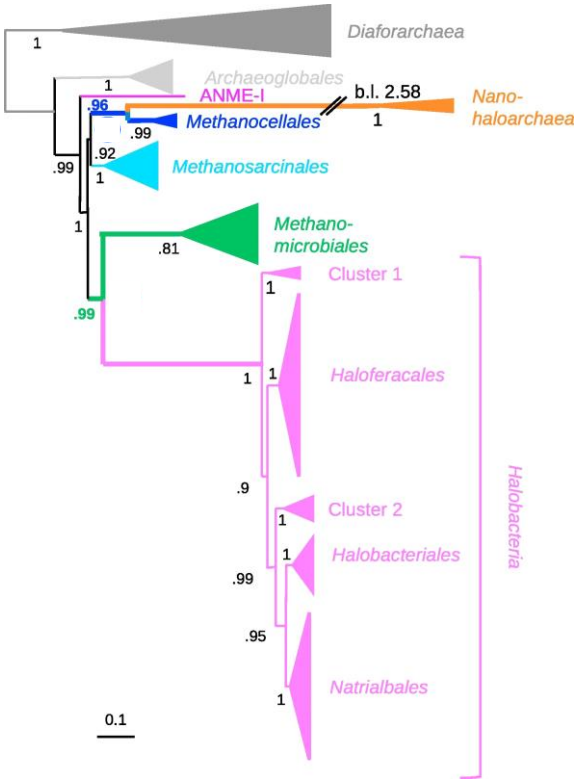


Figure 10. Arbre phylogénétique mettant en évidence les liens entre les *Halobacteria*, les *Nanohaloarchaeota* et les méthanogènes de classe II.
Les données analysées correspondent à 18 309 acides aminés provenant de 155 séquences. La barre d'échelle représente le nombre moyen de substitution par site. L'arbre consensus a été construit par une répétition de 100 échantillonnages et la proportion de boostrap est indiquée au-dessus des branches. La branche conduisant aux *Nanohaloarchaeota* a été raccourcie et sa longueur est indiquée par b.l. (Aouad et al, 2018).

2.4. Diversité microbienne dans les environnements hypersalins

Les milieux hypersalins sont colonisés par des espèces appartenant aux trois domaines du vivant, cependant les archées sont largement dominantes lorsque la concentration en NaCl augmente. En effet, un déplacement des communautés microbiennes des bactéries vers les archées se produit lorsque la concentration en NaCl dépasse 240 $g.L^{-1}$ (Ghai et al., 2011). La Figure 11 illustre la modification des communautés microbiennes en fonction du gradient de salinité. Des études de pyroséquencage du gène codant l'ARNr 16S ont été réalisées dans différents environnements : DCM3 (Mer Méditerranée) et les bassins SS19 et SS37 de la saline Santa Pola à Alicante (Espagne). Cette comparaison montre une diminution de la diversité microbienne lorsque la salinité augmente (Fernández et al, 2014). Dans le milieu DCM3 avec une salinité de 38 $g.L^{-1}$, il y existe une grande diversité et les bactéries du phylum des *Proteobacteria* domine largement (59 %), tandis qu'il existe très peu d'archées du phylum des *Euryarcheota* (5 %) (Ghai et., 2010). Dans le bassin SS19 de salinité intermédiaire (190 $g.L^{-1}$), les halophiles extrêmes dominent avec 46% d'Euryarcheota et 15 % de bactéries du phylum des *Bacteroïdetes*. Ce phénomène est accentué dans le bassin de cristallisation SS37 présentant une salinité de 370 $g.L^{-1}$. Ainsi dans ce bassin, les archées sont dominantes avec 88 % d'*Euryarcheota*, 2 % d'autres archées et 10 % de bactéries du phylum des *Bacteroïdetes*, principalement représentées par *Salinibacter ruber* (Ghai et al. 2011 ; Fernández et al, 2014).

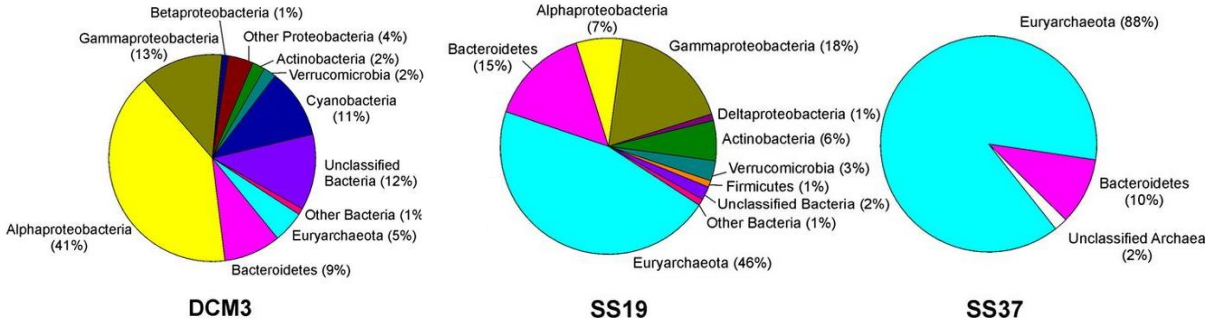


Figure 11. Profil taxonomique des communautés microbiennes en fonction de la salinité.
Les profils résultent d'études métagénomiques sur les séquences des gènes codant l'ARNr 16S. DCM3 correspond à l'eau de la Mer Méditerranée (salinité 38 $g.L^{-1}$). SS19 et SS37 correspondent à deux bassins de la saline de Santa Pola à Alicante (Espagne) présentant respectivement une salinité de 190 et 370 $g.L^{-1}$. Fernández et al., 2014.

3. Adaptation des micro-organismes halophiles et halotolérants au sel

Les organismes se développant dans des environnements hypersalins sont soumis à un fort stress osmotique. Pour obtenir un équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu environnant qui contient de fortes concentrations en Na^+, les organismes halophiles ont développé des stratégies conduisant à créer une forte pression osmotique intracellulaire tout en conservant une faible concentration en Na^+ à l'intérieur du cytoplasme (Gunde-Cimerman et al., 2018). Les deux stratégies d'osmorégulation consistent en l'accumulation dans le cytoplasme soit de chlorure de potassium KCl soit de solutés organiques osmorégulateurs, tels que des acides aminés, des polyalcools ou des sucres (Oren, 2006a).

3.1. Accumulation de chlorure de potassium

Cette stratégie également nommée " Salt-in "est énergétiquement la moins coûteuse (Oren, 2006a). Pourtant on ne la retrouve que chez les archées halophiles extrêmes de la classe des *Halobacteria* et quelques bactéries halophiles extrêmes de l'ordre des phyla *Firmicutes* (Oren, 2006b) ou *Bacteroïdetes* comme *S. ruber* (Oren et al., 2002a). Pour accumuler du chlorure de potassium dans le cytoplasme, plusieurs échanges membranaires sont nécessaires. Ils permettent l'accumulation de K^+, l'efflux de Na^+ et l'accumulation de Cl^-. Chez *Halobacterium salinarum*, il a été mesuré une concentration intracellulaire en K^+ de 340,7 $g.L^{-1}$ (4,57 M) lorsque la croissance est réalisée dans un milieu contenant 233,8 $g.L^{-1}$ (4 M) en Na^+ (Christian et Waltho, 1962). La Figure 12 présente les différents transporteurs membranaires et la chaîne respiratoire chez *Halobacterium* sp. NRC-1 (Ng et al., 2000 ; DasSarma et DasSarma, 2017 ; Gunde-Cinerman et al., 2018). L'énergie nécessaire pour ces flux ioniques provient du gradient de protons généré par la chaine respiratoire (Figure 12, voie 1), par le transporteur (K^+/H^+) KdpABC nécessitant l'hydrolyse de l'ATP (Figure 12, voie 2) et par la bactériorhodopsine (Figure 12, voie 4) activée par la lumière et couplée à une ATPase (Figure 12, voie 5). En plus du transporteur KdpABC, l'accumulation intracellulaire de K^+ est également réalisée grâce à un uniporteur TrkAH (figure 12, voie 7) dépendant du potentiel de membrane. Ce potentiel est de l'ordre de -125 mV avec une charge positive à l'extérieur et une charge négative à l'intérieur de la cellule (Michel et Oersterhelt, 1976) (Figure 12). L'exclusion de Na^+ est réalisé par le transporteur (Na^+/H^+) NhaC (Figure 12, voie 3) qui dépend de l'hydrolyse de l'ATP et par un symporteur (co-transporteur) Na^+/Cl^- (Figure 12, voie 8) dépendant du potentiel de membrane. L'afflux de K^+ dans le cytoplasme doit être compensé par une accumulation de Cl^-. Cet import d'ion Cl^- est réalisé par le symporteur Na^+/Cl^- et surtout par l'halorhodopsine (Figure 12, voie 6) qui est stimulée par l'énergie lumineuse (Kandori, 2015).

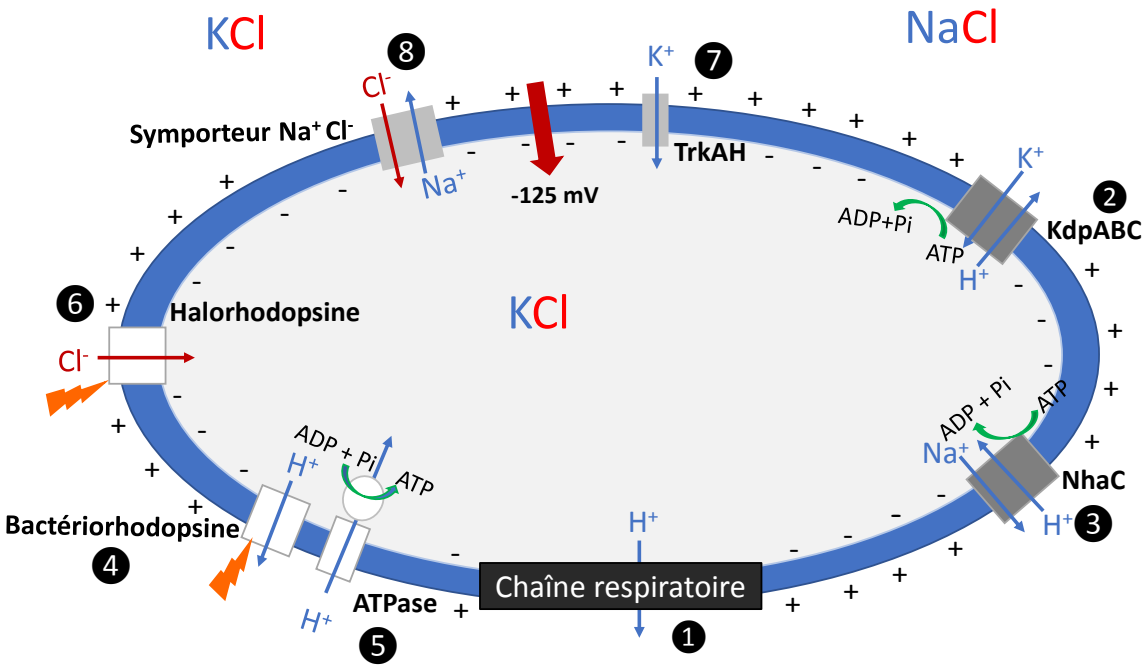


Figure 12. Représentation schématique des transporteurs membranaires chez une archée halophile extrême, *Halobacterium* sp. NRC-1.
La voie 1 correspond à la chaîne respiratoire responsable de l'efflux de protons. Les voies 2 et 3 en gris foncé représentent les transporteurs dépendants d'une source d'énergie chimique (ATP). Les voies 4 à 6 en blanc correspondent aux transporteurs dépendants d'une source d'énergie lumineuse (UV) et l'ATPase associée à la bactériorhodopsine. Les voies 7 et 8 en gris clair représentent les transporteurs dont l'action dépend du potentiel de membrane qui est figurée par une flèche rouge. Jean Peduzzi, communication personnelle.
ATP : Adénosine triphosphate, ADP : Adénosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique.

3.2. Accumulation de composés osmoprotecteurs

Cette stratégie d'adaptation osmotique, encore nommée " Salt out " ou "Low salt in " est retrouvée parmi les organismes halophiles des trois domaines du vivant : bactéries halophiles modérées ou halotolérantes, archées méthanogènes et micro-organismes eucaryotes (Oren, 2008 ; DasSarma et DasSarma, 2017). La concentration en Na^+ du milieu intracellulaire est maintenue à une plus faible concentration qu'à l'extérieur grâce aux transporteurs couplés Na^+/H^+. Ainsi lorsque la bactérie halophile *Halomonas elongata* est cultivée en présence de 198,7 $g.L^{-1}$ Na^+, sa concentration intracellulaire n'est que de 36,8 $g.L^{-1}$ Na^+(Oren, 2006a). Le maintien de l'équilibre osmotique à l'intérieur de la cellule est alors réalisé par l'import à partir du milieu extérieur de composés osmoprotecteurs, également nommés solutés compatibles, ou par synthèse endogène de ces composés (Ventosa et al., 1998). Cette stratégie est coûteuse en énergie et dépend de la nature du soluté. Elle nécessite

une ou plusieurs voies de biosynthèse et des pompes d'import localisées dans la membrane cytoplasmique (Oren, 2001).

Ces solutés sont des molécules organiques polaires, très solubles dans l'eau, généralement neutres à pH 7 et de faible poids moléculaire. Ils sont dits compatibles car même accumulés en forte concentration, dans le cytoplasme ils n'affectent pas la structure tridimensionnelle des protéines ni les réactions enzymatiques (Oren, 2008). Contrairement à la stratégie d'accumulation de KCl, cette stratégie permet aux organismes de tolérer facilement des variations de concentration saline (Ventosa et al., 1998). Lors d'une baisse de la concentration saline, les organismes utilisant cette stratégie vont diminuer la synthèse de ces composés ou arrêter leur import du milieu extérieur.

Les solutés utilisés peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol), ou des acides aminés (proline, acide glutamique, glutamine) et leurs dérivés (glycine bétaïne, ectoïne et ses dérivés (Roberts, 2005 ; Oren, 2006a) (Figure 13).

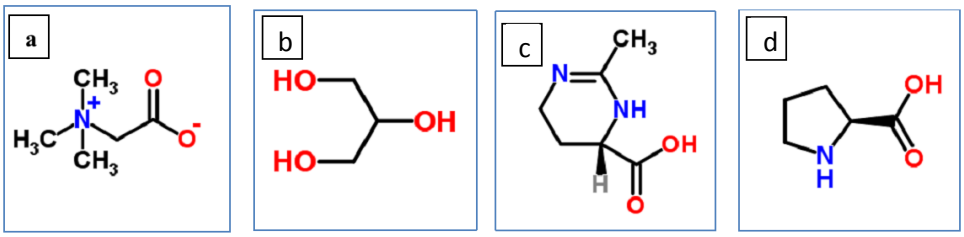


Figure 13. Exemples de quelques composés osmoprotecteurs.
a :glycine bétaïne, **b** : glycérol, **c** : ectoïne, **d** : L-proline.

Les composés osmoprotecteurs les plus fréquemment rencontrés chez de nombreux micro-organismes halophiles et halotolérants sont la glycine bétaïne et l'ectoïne, tandis que certains eucaryotes halophiles comme les algues et les champignons accumulent préférentiellement du glycérol (Oren, 2008 ; DasSarma et DasSarma, 2017). Chez *Dunaliella parva*, on estime que la concentration en glycérol intracellulaire est de 2,1 M lorsque cette algue verte est cultivée en présence de 85 $g.L^{-1}$ NaCl (Gunde-Cimerman et al., 2018).

La limite entre ces deux stratégies d'adaptation des organismes à la salinité, n'est pas toujours franche. Certains organismes combinent les 2 stratégies, ainsi chez certaines archées des ordres *Halobacteriales* et *Natrialbales* (*Natrialba magadi*, *Natronobacterium gregoryi*, *Natronococcus occultus* et *Natronomonas pharaonis*), il a été détecté en plus de l'accumulation de KCl, un composé osmoprotecteur, le 2-sulfotréhalose (Oren 2002b et 2006a).

3.3. Adaptations des protéines halophiles

La stratégie d'adaptation des micro-organismes halophiles extrêmes par accumulation de forte concentration intracellulaire de KCl (jusqu' à 300 $g.L^{-1}$) permet peu de flexibilité et

d'adaptabilité aux changements environnementaux. En effet, les enzymes et protéines structurales, adaptées aux fortes concentrations en NaCl dans le milieu, vont devenir instables et inactives si la salinité diminue dans l'environnement. Pour s'adapter à de fortes concentrations intracellulaires en KCl, les halophiles ont un protéome acide et moins hydrophobe que les organismes retrouvés dans des environnements non hypersalins. La composition en acides aminés des protéines halophiles présente donc un enrichissement en acides aminés acides (acide aspartique et acide glutamique) et en thréonine tandis qu'il y a une diminution des résidus basiques (lysine et arginine) (Paul et al., 2008 ; Ortega et al., 2015). Il en résulte que les protéines halophiles présentent un point isoélectrique acide avec une moyenne entre 4 et 5,5 (Paul et al., 2008 ; Ghai et al., 2011) Les acides aminés acides interagissent avec les ions K^+ et permettent ainsi l'accumulation de molécules d'eau et donc le repliement, la stabilité et la solubilité des protéines halophiles. Cette couche d'eau et de sels crée une enveloppe protectrice autour des protéines et empêche leur dénaturation (Madern et al. 2000 ; Mevarech et al. 2000).

La détermination de la structure cristallographique de protéines d'archées halophiles a permis de mieux appréhender les spécificités des protéines halophiles (Madern et al. 2000 ; DasSarma et DasSarma 2017). La figure 14 montre la comparaison entre la structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase de l'archée halophile extrême *Haloarcula marismortui*, avec celle de son homologue provenant d'une bactérie mésophile *Bacillus anthracis* (Pancsa et al., 2019). L'étude de la représentation de la surface de ces deux enzymes confirme une forte proportion d'acides aminés acides (en rouge) et une faible quantité d'acides aminés basiques (en bleu) chez l'enzyme de *Har*. *marismortui*. Par contre la structure tridimensionnelle de ces 2 enzymes est superposable.

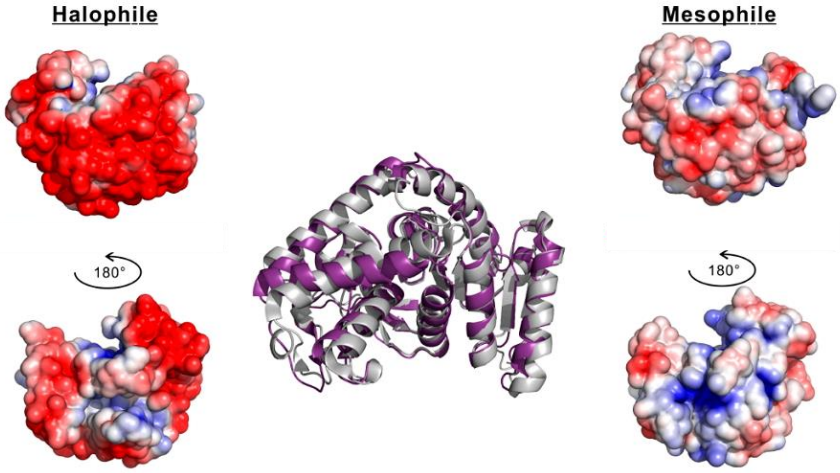


Figure 14. Comparaison de la structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase d'une archée halophile, *Haloarcula marismortui* (PDB :1DB3) avec celle de la malate déshydrogénase d'une bactérie mésophile, *Bacillus anthracis* (PDB :3TL2).
L'enzyme halophile est représenté en violet tandis que l'enzyme mésophile est représenté en gris dans la structure tridimensionnelle (centre de la figure). Dans la représentation des surfaces les acides aminés acides sont colorés en rouge tandis que les acides aminés basiques sont colorés en bleu. Pancsa et al., 2019.

3.4. Exopolysaccharides et polyhydroalkanoates

La plupart des archées halophiles produisent également des exopolysaccharides (EPS) pour résister aux fortes concentrations salines des milieux hypersalins. Ce sont des glucides de haut poids moléculaire excrétés dans le milieu environnant. Ils sont les principaux constituants des polymères extracellulaires retrouvés à la surface des archées mais aussi de certaines bactéries. Ces composés protègent les micro-organismes contre les diverses agressions du milieu telles que la salinité mais également les rayonnements UV, les basses températures, la dessication et la prédation (Poli et al., 2011).

Les archées halophiles synthétisent également des polyhydroxyalkanoates (PHA) qui sont des polyesters biodégradables composés d'acides gras hydroxylés stockés sous forme d'inclusions lipidiques dans le cytoplasme. Ces PHA sont insolubles dans l'eau et sont utilisés par la cellule chez les archées halophiles mais aussi chez des bactéries, comme stockage de carbone et d'énergie. Ces PHA sont produits en grandes quantités par les archées halophiles (Poli et al., 2011).

3.5. Adaptations aux rayonnements UV

Par ailleurs, certaines archées halophiles ont la capacité de se protéger et protègent essentiellement leur ADN des rayonnements UV grâce à la production de bactériorubérine qui est le caroténoïde le plus abondant chez les archées de la classe des *Halobacteria*. Il s'agit d'un isoprénoïde composé de 50 atomes de carbone responsables de la couleur rouge de la membrane (Rodrigo-Baños et al., 2015). La bactériorubérine contient 13 doubles liaisons conjuguées et 4 groupements hydroxyles. Cette molécule piège efficacement les radicaux libres et inactive l'oxygène singulet, permettant ainsi une protection des cellules des fortes intensités lumineuses et des expositions aux dérivés réactifs de l'oxygène (Mandelli et al., 2012). De plus, chez les archées halophiles on retrouve des gènes codant les enzymes de réparation de l'ADN comme chez les bactéries et les eucaryotes. Le fort pourcentage en GC (47-71 %) des génomes d'archées halophiles est également un facteur limitant les lésions de l'ADN comme la formation de dimères de thymine sous l'effet des UV. Une seule espèce de la classe des *Halobacteria* fait exception à ce fort pourcentage en GC, il s'agit *d'Haloquadratum walsbyi* qui présente un génome avec 46,9 % en GC (Bolhuis et al., 2006). Pour corriger les effets néfastes des UV sur son génome, celui-ci contient 4 copies du gène codant une photolyase, enzyme impliquée dans la réparation des dimères de pyrimidines (Bolhuis et al., 2006).

3.6. Adaptations à la dessication

Les milieux hypersalins sont caractérisés par une diminution de l'activité de l'eau (A_w) qui représente la disponibilité en eau pour les réactions biologiques dans un environnement donné (Grant, 2004). A_w est égale à 1 dans l'eau pure, mais diminue à 0,75 dans les

environnements hypersalins où se développent les archées halophiles extrêmes. Certains facteurs comme une concentration élevée en $MgCl_2$ peuvent encore diminuer la valeur de A_w en dessous de 0,70. *Hqr. walsbyi* qui est fréquemment rencontré dans les environnements hypersalins (Ghai et al., 2011 ; Fernández et al., 2014 ; Podell et al., 2014 ; Ventosa et al, 2014 ; Gómez-Villegas et al., 2018) présente une particularité lui permettant de résister à la dessication dans un environnement présentant une A_w de 0,709 (Stevenson et al., 2015). Dans le génome de la souche *Hqr. walsbyi* HBSQ001 isolée en Espagne (Burns et al., 2007), un gène codant pour une halomucine Hmu1 de 9195 acides aminés a été identifiée (Bolhuis et al., 2006). Cette protéine présente une organisation en domaines semblable à celle des mucines animales dont le rôle est de protéger les différents épithéliums de la dessication et d'autres agressions du milieu extérieur (Hollingsworth et Swanson, 2004 ; Lieleg et al., 2012). Cette halomucine présente des sites potentiels de glycosylation et de sulfatation qui contribueraient à la charge globale négative. En région N-terminale de Hmu1, on trouve un peptide signal de type Sec, ce qui indiquerait une translocation de Hmu1 vers le milieu extérieur à travers la membrane (Natale et al., 2008). Par des expériences d'immunomarquages de Hmu1 et une coloration au bleu de Nil A des granules de poly-β-hydroxybutyrate incluses dans les cellules d'*Hqr. walsbyi*, il a été montré que Hmu1 est effectivement localisée à l'extérieur des cellules formant une sorte de capsule aqueuse autour des cellules (Zenke et al., 2015).

4. Applications des organismes halophiles

Les récentes avancées concernant la physiologie, le métabolisme et les mécanismes d'adaptation des micro-organismes halophiles ont montré que ceux-ci produisent en réponse aux conditions environnementales toute une variété de composés pouvant présenter de potentielles utilisations en biotechnologie. Cependant, le nombre d'applications réellement utilisées est encore faible.

Dans la production de sel alimentaire, le microbiote des salines jouerait un rôle sur la qualité du sel mais le rôle précis des micro-organismes est encore indéterminé (Oren, 2010b). Par contre, les archées halophiles sont impliquées dans la fabrication d'aliments fermentés notamment en Asie, comme les sauces de poissons et les sauces soja. Pour diminuer le temps nécessaire à l'élaboration de ces sauces, le mélange aliments-sel peut être ensemencé par des cultures d'*Halobacterium* sp. SP1(1) (Akolkar et al ; 2010). D'autre part, les organismes halophiles produisent de nombreux métabolites intéressants pour l'industrie. Le β-carotène, pigment photoprotecteur chez les algues *Dunaliella*, est un produit dont la demande est très importante et dont la production est coûteuse. C'est pourquoi dès 1965, on a commencé à s'intéresser à la production de β-carotène par l'algue verte unicellulaire, *Dunaliella salina*. Certaines algues peuvent contenir plus de 10 % de β-carotène en poids sec. Jusqu'à maintenant, c'est le principal succès dans le domaine de la biotechnologie des organismes halophiles. Le β-carotène est utilisé comme additif alimentaire, comme colorant alimentaire,

ou encore comme anti-oxydant et comme précurseur de la vitamine A en cosmétologie (Oren, 2010b). Les algues *Dunaliella* produisent également de grandes quantités d'un soluté osmocompatible, le glycérol qui est utilisé comme additif cosmétique et alimentaire. En effet en conditions saturantes en NaCl, on peut obtenir une concentration intracellulaire de 6 à 7 M en glycérol. Cependant, contrairement au β-carotène, la production du glycérol par *Dunaliella* n'est pas vraiment rentable (Oren, 2010b). Les algues *Dunaliella* peuvent également servir de matière première pour la fabrication de biocarburants. En effet, une pyrolyse de leurs cellules produit une substance huileuse et la réaction étant exothermique, la production ne demande que l'énergie initiale pour démarrer le processus (Oren, 2010b). Les halophiles modérés ou halotolérants comme *Halomonas elongata* produisent comme nous l'avons vu précédemment des osmoprotecteurs pour réguler leur pression osmotique intracellulaire. L'un d'entre eux l'ectoïne est utilisée pour la stabilisation d'enzymes et d'acides nucléiques commerciaux (Oren, 2010b). Cette molécule est également utilisée, en raison de son action neutralisant les effets nocifs des UV-A, dans des produits cosmétiques dans la prévention du vieillissement prématuré de la peau (Becker et Whittmann, 2020).

Deux types de biopolymères produits par les micro-organismes halophiles présentent un intérêt potentiel. Ainsi, *Haloferax mediterranei* et les bactéries du genre *Halomonas* synthétisent de grandes quantités d'EPSs (exopolysaccharides) anioniques secrétés à l'extérieur de la cellule (Oren, 2010b). Ces différents EPSs sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme agents gélifiants ou émulsifiants et en cosmétologie (Oren, 2010b). Les PHAs (polyhydroxyalkanoates) sont accumulés à l'intérieur du cytoplasme en très grande quantité. *Hfx. mediterranei* peut ainsi produire des PHAs représentant jusqu'à 38 % de son poids sec lorsqu'elle est cultivée en présence de 150 $g.L^{-1}$ NaCl. (Oren, 2010b). La récupération de ces polymères est aisée, car il suffit de réaliser une lyse cellulaire en diminuant la concentration en sel du milieu. De plus, en raison de leur forte concentration en sel, les cultures ne risquent pas d'être contaminées par des micro-organismes non halophiles (Yin et al., 2015). Ces polyesters biodégradables et biocompatibles sont utilisés comme polymères pour la réalisation de matériaux d'emballages alimentaires biodégradables avec des propriétés similaires à ceux des plastiques issus de la pétrochimie. Ces procédés de fabrication sont utilisés dans différents pays (Oren, 2010b ; Torregrossa-Crespo et al., 2017), mais leur fabrication doit encore faire face à une forte concurrence de la part des plastiques traditionnels (Torregrossa-Crespo et al., 2017). Les PHAs sont également utilisés dans le domaine médical pour la production de matériaux résorbables (Poli et al., 2011).

Par ailleurs, les micro-organismes halophiles possèdent également de nombreuses applications dans le domaine environnemental. De nombreux secteurs industriels (industrie agro-alimentaire, industrie textile, industrie du cuir, industrie papetière) génèrent des eaux usées présentant une forte salinité ainsi que des agents toxiques, ayant un impact négatif sur l'environnement. Ces effluents salins sont souvent traités par des techniques physico-

chimiques, car la plupart des traitements biologiques sont inhibés par la forte concentration en NaCl. Les micro-organismes halophiles sont de bons candidats dans la bioremédiation de ces eaux usées industrielles (Castillo-Carvajal et al., 2014), en raison de leur activité métabolique lorsque la concentration en sel est élevée. Actuellement, des organismes halophiles utilisant des hydrocarbures comme source d'énergie participent à la dépollution biologique des déversements de pétrole dans la mer (Uratani et al., 2014). De plus, de nombreuses espèces d'archées halophiles sont capables de croître dans des milieux contenant différents solvants organiques, dont les composés halogénés. Des souches d'*Haloferax* et de *Natrialba* ont été décrites comme productrices de surfactants (Charlesworth et Burns, 2015). Ces produits qui vont permettre l'émulsion des hydrocarbures et favoriser leur dégradation par les archées halophiles (Djeridi et al., 2013 ; Khemili-Talbi et al., 2015). Des archées halophiles, comme *Hfx. mediterranei*, sont également utilisés dans l'élimination de nitrites et nitrates dans les bassins de salinité des marais salants (Oren, 2010b) ou dans des environnements salés pollués. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu. En aérobiose, les cellules vont utiliser les nitrates et nitrites comme source d'azote, tandis qu'en anaérobiose, une voie d'obtention d'énergie appelée dénitrification convertit les nitrates et nitrites en N^2 gazeux (DasSarma et DasSarma, 2015 ; Bonete et al., 2015). Enfin, la pollution par les métaux lourds représente un véritable problème environnemental en raison de leur toxicité élevée. La biosorption des métaux lourds par les micro-organismes halophiles représente une méthode de dépollution alternative aux moyens chimiques. Cette bioremédiation peut impliquer différents mécanismes, comme la séquestration extracellulaire des métaux à l'aides des EPS, la séquestration intracellulaire par des métallo chaperonnes ou par détoxification enzymatique (Voica et al., 2014).

D'autre part, les archées halophiles de la classe des *Halobacteria* produisent de nombreuses enzymes extracellulaires conservant leur activité dans des milieux hypersalins et pouvant ainsi présenter un intérêt potentiel (Oren, 2010b ; Amoozegar et al., 2017 ; Torregrosa-Crespo et al., 2017). Ainsi des protéases, dont on a vu précédemment le rôle dans la fabrication de produits fermentés, des amylases, des cellulases, des estérases, des lipases, des xylanases et chitinases halophiles ont été décrites, mais aucune utilisation à grande échelle n'est pour le moment développée, au contraire des enzymes isolées chez les hyperthermophiles ou les alcalophiles. Par ailleurs, en raison de leurs propriétés photochimiques, les bactériorhodopsines membranaires présentent des applications dans le domaine bioélectronique (Oren, 2010b). Ainsi, la bactériorhodopsine sous forme de morceau de membrane pourpre est préparée à partir d'*Hbt. salinarum* (Oren, 2010b). Les applications sont variées en holographie, dans des cellules photovoltaïques, la mémoire optique en informatique, la participation à la fabrication de rétine artificielle et plus récemment en tant qu'immunocapteur pour la détection de micro-organismes (Oren, 2002b et 2010b ; Li et al., 2018).

Les archées halophiles produisent des métabolites secondaires comme des dicétopipérazines (Charlesworth et Burns, 2015). Ces composés ont plusieurs activités, l'une d'entre elles étant d'avoir une influence sur le quorum sensing chez les bactéries. Le quorum sensing est un mode de communication chez les bactéries conduisant à la synthèse d'autoinducteurs permettant la régulation des populations microbiennes. Ces molécules pourraient être utilisées en thérapeutique contre certains pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*. Il a d'ailleurs été montré récemment que l'acide trans 4-(2-carboxy-vinyl) benzoïque présent dans des surnageants de *Natrinema versiforme* DSM16034 inhibait le quorum sensing et les biofilms de *P. aeruginosa* (Basaran et al., 2020). Des utilisations industrielles sont également envisagées en utilisant ces métabolites pour réduire la formation de biofilms, soit dans le domaine médical (cathéters) soit dans les chantiers navals pour l'entretien de la coque des bateaux (Charlesworth et Burns, 2015).

Enfin, des souches productrices de peptides antimicrobiens, les halocines (O'Connor et Shand, 2002), ont été testées dans l'industrie du cuir pour inhiber la croissance de souches halophiles dégradant les peaux (Birbir et al, 2004). Ces halocines, dans une recherche constante de nouvelles molécules antibiotiques pourraient faire l'objet d'études plus poussées, en particulier pour une éventuelle utilisation contre les souches bactériennes halotolérantes comme *P. aeruginosa*. Ces halocines qui font l'objet de mon projet de recherche sont décrites dans le prochain paragraphe.

III. Peptides antimicrobiens

Les peptides ou protéines antimicrobiens (PAMs) sont des substances naturelles principalement actives contre les bactéries, les virus et les champignons (Fan et al., 2016). D'origine variée, ils sont retrouvés dans les trois domaines du vivant (Rončević et al., 2019).

1. Peptides antimicrobiens synthétisés par les eucaryotes

Les PAMs des eucaryotes ou eucaryocines sont retrouvés chez de nombreux organismes : les mammifères ; les batraciens ; les insectes ; les protistes et les plantes (Andrä, et al., 2003 ; Bulet et al., 2004 ; Salas et al., 2015). Chez les animaux, ils sont considérés comme l'un des éléments clefs du système immunitaire inné (Ganz, 2003, Diamond et al., 2009). Ainsi, ces peptides contribuent à la protection de l'organisme contre un environnement riche en micro-organismes qui sont souvent pathogènes. Ils sont sécrétés par un grand nombre de tissus en contact direct avec les micro-organismes (Jenssen et al., 2006).

2. Peptides antimicrobiens synthétisés par les bactéries

Contrairement aux PAMs des organismes eucaryotes, de nombreux PAMs d'origine procaryote ne sont pas synthétisés par la voie ribosomique, voie normale de biosynthèse des protéines. Ces peptides résultent d'une synthèse utilisant des enzymes modulaires

multifonctionnelles, les peptides synthétases (Süssmuth et Mainz, 2017). Ces enzymes peuvent incorporer des acides aminés non protéinogènes et produisent des peptides allant jusqu'à une vingtaine d'acides aminés dont les structures sont très diverses (Süssmuth et Mainz, 2017).

2.1. Classification

La voie de biosynthèse ribosomique permet de synthétiser des peptides et protéines de plus grandes tailles modifiés ou non post-traductionnellement (Klaenhammer, 1993 ; Arnison et al, 2013). Il existe une grande diversité de PAMs, en termes de taille, de structure, d'organisation des voies de biosynthèse, de modes d'action et d'immunité, ce qui rend la classification des PAMs bactériens souvent compliquée. Globalement, il existe trois grandes familles de PAMs synthétisés selon la voie ribosomique. Les bactériocines ont, dans un premier temps, été définies comme étant des composés antimicrobiens produits par *Escherichia coli* avec un spectre d'activité étroit contre des souches bactériennes phylogénétiquement proches (Tagg et al., 1976). Cependant le terme bactériocine est maintenant plus restrictif, correspondant uniquement aux PAMs produits par les bactéries à Gram positif et plus particulièrement les bactéries lactiques (Klaenhammer, 1993 ; Cotter et al., 2005 ; Nishie et al, 2012). Les bactériocines présentent un large spectre d'activité contre plusieurs espèces de bactéries à Gram positif et parfois contre les bactéries à Gram négatif (Simons et al., 2020)

Les bactériocines sont actuellement subdivisées en 3 classes (Cotter et al., 2005 ; Rea et al. 2011). La classe I regroupe les lantibiotiques qui sont des petits peptides présentant d'importantes modifications post-traductionnelles (Cotter et al., 2005 ; Field et al., 2015). La classe II, correspondant aux peptides ne présentant pas de modifications post-traductionnelles, est divisée en plusieurs sous-classes. Elle contient les bactériocines de type pédiocine qui sont des peptides cationiques et hydrophobes (IIa) (Drider et al., 2006), les bactériocines composées de deux peptides (IIb) (Nissen-Meyer, et al., 2010), les bactériocines cycliques (IIc) (Perez et al., 2018) et les bactériocines sans peptide leader (IId) (Perez et al., 2018). Enfin, les bactériolysines qui constituaient antérieurement la classe III sont des protéines thermosensibles à activité enzymatique (Cotter et al, 2005 ; Rea et al 2011).

Chez les bactéries à Gram négatif on distingue les colicines qui sont des protéines synthétisées par *E. coli* (Rebuffat, 2011) et les microcines qui sont des peptides produits par les entérobactéries (Duquesne et al. 2007). Ces PAMs présentent le plus souvent un spectre étroit d'activité (Simons et al., 2020). Les colicines sont des protéines antimicrobiennes thermolabiles de masse moléculaire élevée (30-80 kDa) produites par de nombreuses souches d'*E. coli* (Cascales et al., 2007). Les colicines sont subdivisées en 2 sous-classes soit en fonction de leur mode d'action (de Zamaroczy et Nauleau, 2011) soit en fonction du mécanisme de reconnaissance utilisé par les colicines pour être internalisées dans les bactéries cibles

(Rebuffat et al., 2011 ; Kim et al., 2014). Les microcines sont des PAMs (< 10 kDa) synthétisés par des entérobactéries. Deux classes ont été définies. La classe I correspond aux peptides de masse moléculaires < 5 kDa présentant d'importantes modifications post-traductionnelles (Duquesne et al., 2007 ; Severinov et al, 2011), La classe II comprend des peptides de masse moléculaire variant de 5 à 9 kDa, ne présentant pas de modifications post-traductionnelles (classe IIa), ou présentant une modification post-traductionnelle sur la sérine C-terminale de ces microcines (classe IIb) (Duquesne et al., 2007, Vassiliadis et al, 2011).

2.2. Biosynthèse

Les groupes de gènes conduisant à la biosynthèse des PAMs sont localisés soit sur le chromosome, soit sur des plasmides et sont souvent associés à des éléments transposables. Les PAMs sont le plus souvent produits sous forme d'un précurseur inactif qui doit subir une maturation pour devenir actif. Cette étape se réalise en général lors de l'export du précurseur à travers la membrane de la bactérie productrice. L'organisation de ces groupes de gènes est plus ou moins complexe et présente une ou plusieurs unités de transcription. Certains groupes de gènes sont très simples, comme celui aboutissant à la synthèse des colicines qui ne comprennent que 1 à 3 gènes (Cascales et al., 2007 ; de Zamorczy et Nauleau, 2011), tandis que celui conduisant à la biosynthèse du lantibiotique le plus connu, la nisine, comporte 11 gènes (Asaduzzaman et Sonomoto, 2009). Les groupes de gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines et des microcines, comprennent au minimum : un gène codant le précurseur du PAM, un gène codant la protéine d'immunité localisée dans la membrane, qui va protéger la souche productrice de l'activité de son propre composé antimicrobien et un ou plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans la maturation et l'export du PAM. Parmi ces protéines, un transporteur ABC (ATP-binding cassette) est souvent associé à une protéine accessoire chez les microcines et les bactériocines de classes I et II (Ennahar et al., 2000 ; Fimland et al., 2005 ; Duquesne et al., 2007 ; Asaduzzaman et Sonomoto, 2009). Ce transporteur ABC présente en région N-terminale une activité protéasique qui réalise le clivage du précurseur aboutissant ainsi à la forme active du PAM (Håvarstein et al., 1995). Parfois, ces protéines d'export jouent un rôle complémentaire dans l'immunité de la souche productrice, agissant alors comme des pompes d'efflux (Du et al., 2018). Bien que l'export *via* un transporteur ABC soit le plus fréquemment rencontré chez les bactériocines des classes I et II et les microcines, il existe en particulier chez les bactériocines de classe II des peptides utilisant la voie générale de sécrétion Sec pour leur export sous forme non structurée vers le milieu extracellulaire (Cintas et al., 1997, Natale et al., 2008). Chez les colicines, le groupe de gènes se termine par un gène codant une protéine de lyse ou de relargage dont le rôle va être de lyser la cellule productrice et de libérer la colicine dans le milieu extracellulaire (Cascales et al., 2007).

Chez les bactériocines de classe I ainsi que chez certaines bactériocines de classe IIa, le groupe de gène peut présenter également des gènes impliqués dans une régulation à deux composants qui permet une autorégulation par le quorum sensing (de Ruyter et al., 1996 ; Ennahar et al., 2000). Enfin, chez les PAMs qui présentent d'importantes modifications post-traductionnelles comme les lantibiotiques, les bactériocines de classe IIc et les microcines des classes I et IIb, le groupe de gène comporte plusieurs gènes codant des enzymes de modification post-traductionnelle présentant des activités variées : cyclisation ; déshydratation ; déshydrogénation ; hydrolyse de liaison peptidique ; méthylation (Asaduzzaman et Sonomoto, 2009 ; Severinov et al, 2011 ; Vassiliadis et al., 2011, Perez, et al., 2018). Ces modifications post-traductionnelles permettent à ces peptides d'adopter des structures originales responsables de leur activité antimicrobienne.

2.3. Mécanismes d'action

De nombreux PAMs synthétisés par voie ribosomique possèdent un caractère cationique et hydrophobe qui leur permet d'interagir avec la membrane cytoplasmique et d'en perturber les propriétés. Cependant, les mécanismes d'action de ces composés ne se limitent pas toujours à la perturbation de la membrane cytoplasmique et sont généralement plus complexes. Ces antimicrobiens peuvent donc interagir soit avec la membrane cytoplasmique soit au niveau intracellulaire en interagissant avec des cibles spécifiques. Dans tous les cas, la première interaction de ces PAMs avec la cellule cible a lieu au niveau de la paroi (bactérie à Gram positif) ou de la membrane externe (bactérie à Gram négatif).

En ce qui concerne le premier mécanisme d'action au niveau de la paroi, on peut citer le cas de la nisine, un lantibiotique bien connu pour son utilisation dans la préservation des aliments (Field et al., 2015). La nisine interagit avec le lipide II, un précurseur de la paroi, ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, et/ou à la formation de pores à travers la membrane cytoplasmique (Cotter et al., 2013 ; Simons et al, 2020) (Figure 15A). Dans tous les cas, la formation de pores au niveau de la membrane entraîne une fuite d'ions ou d'autres composés conduisant à la mort cellulaire. Les bactériocines de classe II ont également la capacité de former des pores en s'insérant dans la membrane cytoplasmique (Nissen-Meyer 2009 ; Nissen-Meyer 2010 ; Perez et al., 2018 ; Simons et al. 2020). Certaines bactériocines de la classe IIa comme la lactococcine A interagissent au niveau de la membrane cytoplasmique avec des composants de la mannose phosphotransférase (Man PTS) (Figure 15A) ce qui conduit également à la formation de pores (Cotter et al, 2013 ; Simons et al. 2020). Une microcine de classe IIb, la microcine E492 est également impliquée dans la formation de pores impliquant des composants de la Man-PTS, mais avant de se retrouver au niveau de la membrane cytoplasmique, cette microcine doit d'abord interagir au niveau de la membrane externe avec des récepteurs lui permettant de se retrouver au niveau de l'espace périplasmique (Duquesne et al ; 2007). La formation de pores est également le mécanisme d'action d'une des deux classes de colicines, qui comme la microcine E492, doivent au

préalable interagir avec des récepteurs au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Kim et al., 2014 ; Hahn-Löbmann et al., 2019).

Le second mécanisme d'action des PAMs implique l'inhibition d'une cible intracellulaire. C'est le cas des microcines de la classe I qui présentent de fortes modifications post-traductionnelles. Ainsi la microcine B17 interagit avec l'ADN gyrase, la microcine C7 inhibe l'aspartyl-ARNt synthétase, tandis que la microcine J25 inhibe l'ARN polymérase (Duquesne et al, 2007) (Figure 15B). Par ailleurs, la microcine H47 (classe IIb) cible l'ATP synthase (Duquesne et al., 2007). La seconde classe des colicines inhibent les souches cibles par une activité nucléasique, portée par la région C-terminale cytotoxique de la colicine, ciblant 3 types d'acides nucléiques : l'ADN, certains ARNt et l'ARN16S (Cascales et al, 2007 ; de Zamaroczy et Nauleau, 2011).

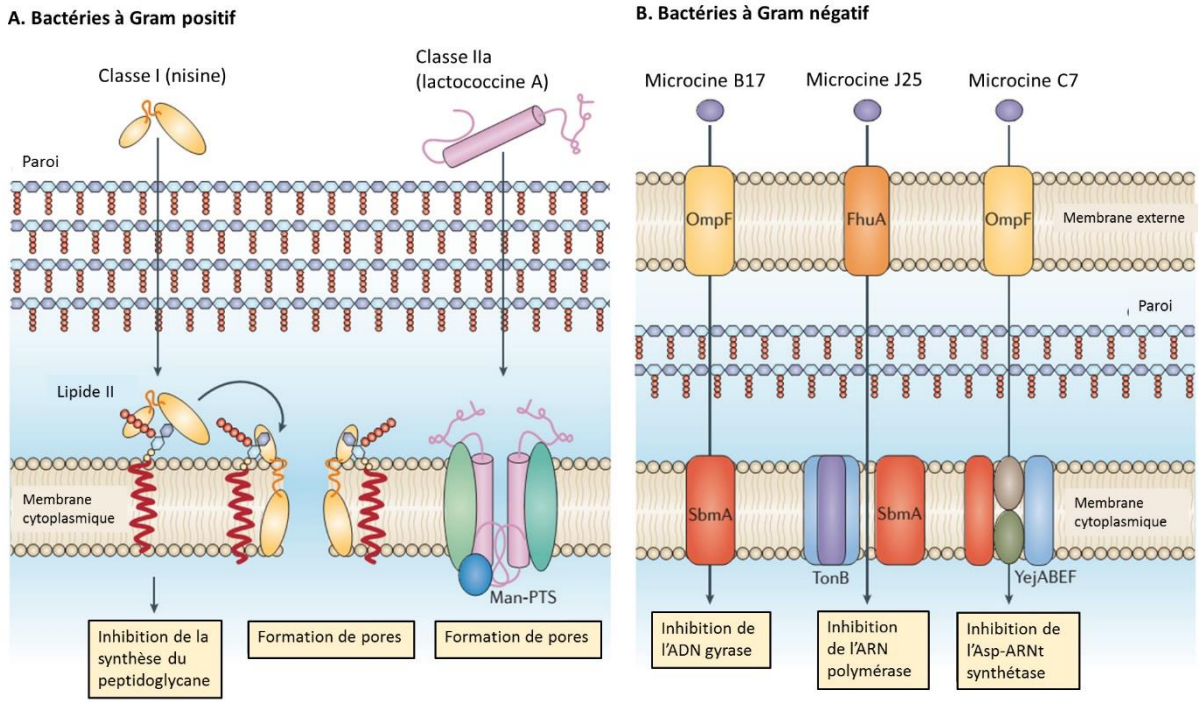


Figure 15. Exemples de mécanisme d'action de bactériocines de bactéries à Gram positif (A) et de microcines de bactéries à Gram négatif (B).
A. Des bactériocines de classe I (nisine) inhibent le lipide II entraînant la formation de pores et/ou l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane, constituant majeur de la paroi. Des bactériocines de la classe IIa, comme la lactococcine A forment également des pores pour tuer les bactéries cibles, en interagissant avec la mannose phosphotransférase (Man-PTS). **B.** Les microcines qui inhibent les bactéries à Gram négatif, doivent d'abord être transportées à travers les membranes externes et internes pour ensuite interférer avec l'ADN, l'ARN et le métabolisme des protéines. Elles inhibent des cibles intracellulaires comme l'ADN gyrase, l'ARN polymérase ou l'aspartyl-ARNt synthétase. OmpF et FhuA correspondent respectivement à une porine et à un récepteur au ferrichrome. Les protéines SbmA, TonB et le complexe YejABEF localisés dans la membrane interne servent à l'import des microcines dans le cytoplasme. D'après Cotter et al., 2013.

3. Peptides antimicrobiens synthétisés par les archées : les archéocines

Contrairement aux peptides antimicrobiens produits par les eucaryotes et les bactéries qui ont été largement étudiés depuis des décennies, les archéocines ont été découvertes seulement dans les années 1980 et ont été peu étudiées depuis. La première archéocine a été décrite pour la première fois en 1982 (Rodríguez-Valera et al., 1982). Chez les archées halophiles du phylum des *Euryarcheota* et de la classe des *Halobacteria*, elles sont nommées halocines. Par la suite, d'autres archéocines ont été découvertes chez les archées du phylum des *Crenarchaeota*, de l'ordre des *Sulfolobales,* elles ont été nommées sulfolobicines (Prangishvili et al., 2000).

3.1. Sulfolobicines

Les sulfolobicines sont produits par des archées hyperthermophiles, aérobies et acidophiles du genre *Sulfolobus*. L'activité antimicrobienne des sulfolobicines est principalement associée aux cellules car elles sont produites dans des vésicules membranaires (Prangishvili et al., 2000. Les vésicules membranaires de *Sulfolobus. acidocaldarius* DSM639 ont été purifiées et une activité antimicrobienne est associée à deux protéines SulA et SulB codées par deux gènes adjacents (Ellen et al., 2011 ; Besse et al., 2015). Les sulfolobicines ont un spectre d'activité étroit, dirigé contre des souches phylogénétiquement proches. Leur mode d'action serait impliqué dans le blocage de la croissance cellulaire plutôt que dans la lyse cellulaire (Prangishvili et al., 2000).

3.2. Halocines

La production d'halocines est une caractéristique très répandue chez les archées halophiles (Rodríguez-Valera et al., 1982 ; Meseguer at al., 1986 ; Torreblanca et al., 1994), mais elles peuvent également être produites par certaines bactéries halophiles (Atanasova et al., 2013). On rencontre comme dans le cas des bactériocines, un problème de nomenclature, halocine signifiant PAMs produits par des micro-organismes halophiles. Seules des halocines d'archées ont été isolées jusqu'à maintenant. Les halocines peuvent être soit des peptides soit des protéines. Actuellement 17 halocines ont été identifiées, la plupart du temps partiellement et dans certains cas la souche productrice n'a même pas été identifiée. Cependant, on peut remarquer que de nombreuses halocines ont été isolées à partir de souches du genre *Haloferax*. (Tableau 2). Pour certaines de ces halocines, la stabilité à une température élevée (thermostabilité) a été étudiée ainsi que la conservation de leur activité en diminuant la concentration en sels et leur spectre d'activité. Cependant, à partir des données de la littérature, il est difficile de comparer le spectre d'activité des différentes halocines, car les souches cibles, les niveaux de purification des halocines et les tests antimicrobiens diffèrent suivant les études. On considère qu'une halocine est thermosensible lorsqu'elle perd son activité après un traitement de 10 min à 60 °C et qu'elle est thermostable lorsqu'elle conserve

son activité après un traitement de 10 min à 80 °C (Tableau 2). Les halocines considérées comme stables en absence de sels sont celles qui conservent leur activité dans l'eau (Tableau 2).

Tableau 2. Principales caractéristiques des halocines
Les données de ce tableau proviennent de Shand et Levya, 2007 ; Pašić et al., 2008 ; Kavitha et al., 2011 ; Karthikeyan et al., 2013 ; Kumar et Tiwari, 2017a et 2017b ; Mazguene et al., 2018 ; Ghanmi et al., 2020.

Halocine	Souche productrice	Lieu	Masse moléculaire (kDa)	Stabilité en absence de sel	Thermostabilité
A4 (U1)	archée halophile TuA4	Tunisie	7,435	oui	oui
C8[a]	*Natrinema* sp. AS7092	Chine	7,4	oui	oui
H1	*Haloferax mediterranei* M2a	Espagne	31	non	non
H2	archée halophile GLA22	Espagne	ND	ND	ND
H3	archée halophile GAA12	Espagne	ND	ND	ND
H4[a]	*Haloferax mediterranei* R4	Espagne	34,9	non	non
H5	archée halophile MA220	Espagne	ND	ND	ND
H6/H7	*Haloferax. gibbonsii* Ma2.39	Espagne	3	oui	oui
H17	*Haloferax* sp. SWI17	Algérie	30	ND	ND
HA1	*Haloferax larsenii* HA1	Inde	14	non	oui
HA3	*Haloferax larsenii* HA3	Inde	13	non	oui
KPS1	*Haloferax volcanii* KPS1	Inde	ND	non	oui
R1	*Halobacterium salinarum* GN101	Mexique	3,8	oui	oui
S8[a]	archée halophile S8a	Etats-Unis	3,6	oui	oui
	Halobacterium salinarum ETD5	Tunisie	8,589	ND[b]	ND[b]
S14	*Halobacterium salinarum* ETD5	Tunisie	14	ND[b]	ND[b]
Sech7a	*Haloferax mediterranei* Sech7a	Slovénie	10,7	non	oui
SH10	*Natrinema sp* . BTSH10	Inde	ND	ND	ND

a : halocine dont les séquences protéiques et nucléotidiques sont connues, b : non déterminé car la souche produit 2 halocines
ND : non déterminé

Comme nous pouvons le voir dans le tableau 2, il existe 2 catégories d'halocines. Celles dont la masse moléculaire est ≤ 10 kDa sont thermostables et leur activité antimicrobienne persiste en milieu faiblement salin. Celles dont la masse moléculaire est proche de 30 kDa sont thermolabiles et leur structure tridimensionnelle nécessite une forte concentration en sels. Les halocines HA1 et HA3 de masse moléculaire de 13-14 kDa ont des propriétés intermédiaires (thermostabilité, mais instabilité en absence de sels). Les halocines C8 (Li et al., 2003, Besse et al, 2017), H4/H1 (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1985 ; Platas et al., 2002), H6 (Torreblanca et al., 1989), HA1 (Kumar et Tiwari, 2017a, HA3 (Kumar et Tiwari, 2017b), S8 (Price et Shand, 2000, Ghanmi et al., 2020) et Sech7a (Pašić et al., 2008), ont été purifiées à partir de surnageants de culture. Seules trois halocines ont été caractérisées au niveau de leurs séquences protéiques et nucléotidiques : l'halocine C8 (Sun et al., 2005), l'halocine H4 (Cheung et al., 1997) et l'halocine S8 (Price et Shand, 2000).

L'halocine C8 (HalC8) est produite par la souche de *Natrinema* sp. AS7092 préalablement nommée *Halobacterium* sp. AS7092, isolée du lac salé Chaidan en Chine (Li et al. 2003). HalC8 est sensible à l'activité de la protéinase K mais pas à celle de la trypsine,

résistante à la chaleur après un traitement d'1 h à 100 °C. HalC8 conserve son activité après un stockage pendant 1 an à 4 °C. Son activité est indépendante de la présence de NaCl (Tableau 2). HalC8 est également capable de résister à l'action de solvants organiques comme l'acétonitrile, l'éthanol, l'isopropanol et le méthanol (Li et al., 2003). HalC8 est donc un peptide extrêmement stable. Après séquençage par la méthode d'Edman des 15 résidus N-terminaux de HalC8, deux amorces nucléotidiques dégénérées ont permis d'amplifier par PCR un fragment de 44 pb puis de générer une sonde ARN grâce à l'ARN polymérase T7. Cette sonde s'hybride avec un fragment de restriction par *Bam*H1 de 6,3 kb du génome de la souche AS7092. Le séquençage de ce fragment a permis de montrer que HalC8 est codée par le gène *halC8* de 849 pb (Sun et al., 2005). La comparaison de la traduction du gène *halC8* avec la séquence en acides aminés N-terminale de HalC8 montre que cette halocine est un peptide de 76 acides aminés avec une masse moléculaire de 7441,63 Da et qu'elle est donc synthétisée sous forme d'un précurseur de 283 acides aminés (Sun et al., 2005). Une halocine A4, encore nommée U1 produite par une souche non identifiée TuA4 a été isolée d'une saline en Tunisie (Shand et Levya, 2007). Sa masse moléculaire est de 7435 Da et elle présente des caractéristiques physico-chimiques proches de celles de HalC8 (Tableau 2). Sa séquence N-terminale montre une forte identité avec celle de HalC8. Il est donc fort possible que l'halocine A4 soit un variant de HalC8 (Besse et al., 2015).

L'halocine H4 (HalH4) est la première halocine ayant été caractérisée (Rodríguez-Valera et al., 1982). Elle a été purifiée à partir de la souche de *Hfx*. *mediterranei* R4, préalablement identifiée comme *Halobacterium mediterranei* R4 (Rodríguez-Valera et al., 1983), isolée dans la saline d'Alicante en Espagne (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1985). L'activité de HalH4 est sensible à l'activité de la protéase de *Streptomyces griseus* et disparaît totalement après un traitement de 30 min à 80 °C, ou si la concentration en sel est inférieure à 50 $g.L^{-1}$ (Tableau 2) (O'Connor et Shand, 2002). Après purification de HalH4, la séquence N-terminale des 10 premiers acides aminés a été déterminée et une digestion par la trypsine a été réalisée. La séquence N-terminale et la séquence de 2 peptides trypsiques ont été utilisées pour dessiner des amorces dégénérées (Cheung et al., 1997). Un fragment de 150 pb a été amplifié, puis utilisé pour sonder une banque plasmidique. Le gène *halH4* code le précurseur ProH4 de 359 résidus qui conduit à une halocine mature de 313 résidus avec une masse moléculaire de 34,9 kDa (Cheung et al., 1997). L'halocine H1 présente des caractéristiques physico-chimiques proches de celle de HalH4 (Tableau 2). De plus, il n'existe pas d'inhibition croisée entre ces 2 halocines (Rodríguez-Valera et al., 1982) ce qui laisse donc supposer que ce sont une seule et même halocine (Besse et al., 2015).

L'halocine S8 (HalS8) est produite par une archée halophile extrême S8a non identifiée, isolée du Grand Lac Salé aux Etats-Unis (Price et Shand, 2000). L'activité de HalS8 est indépendante de la concentration en sel, thermorésistante (1 h à 94 °C) et résiste aux solvants organiques, donc cette halocine est particulièrement stable (Tableau 2) (Price et Shand, 2000 ;

O'Connor et Shand, 2002). La séquence de 36 résidus en position N-terminale de HalS8 a été déterminée (Price et Shand, 2000). A partir de cette séquence, 2 amorces nucléotidiques dégénérées de 17 et 20 pb ont permis de cribler une digestion du génome de la souche S8a. Le gène *halS8* est porté par un fragment *Pst*I/*Eco*RV de 2873 pb qui a été séquencé. Le gène *halS8* n'est pas localisé sur le chromosome mais sur un mégaplasmide d'environ 200 kb (Price et Shand, 2000). D'une masse moléculaire de 3,58 kDa, HalS8 de 36 résidus, résulterait d'un double clivage d'un précurseur de 33,9 kDa (311 acides aminés) dans les régions N- et C-terminales (Price et Shand, 2000). Récemment, une seconde forme de HalS8 a été isolée à partir d'*Hbt. salinarum* ETD5 isolée à partir de la saline de Sfax (Ghanmi et al., 2020). Le gène *halS8* a été amplifiée avec des amorces dessinées à partir de la séquence du gène *halS8* chez la souche S8a. Après clonage et séquençage de l'amplicon, la séquence du gène *halS8* de 936 pb et la séquence N-terminale de HalS8 ont été déterminées (Ghanmi et al., 2020). Dérivant du précurseur de 33,9 kDa, cette halocine S8 possède une masse moléculaire de 8,6 kDa. Cette seconde forme de HalS8 possède la même séquence N-terminale que celle produite par la souche S8a, mais n'est pas clivée en région C-terminale. Il s'agit donc d'une halocine de 81 acides aminés possédant 8 résidus de cystéine qui pourraient être impliqués dans la formation de 4 ponts disulfure (Ghanmi et al, 2020). Par ailleurs, une halocine R1 est produite par la souche d'*Hbt. salinarum* GN101 isolée de la saline de Guerrero Negro au Mexique. Cette halocine présente les mêmes caractéristiques physico-chimiques que celles de HalS8 (Tableau 2, page 28) et une séquence N-terminale très proche de celle de HalS8 (OConnor et Shand, 2002). Une analyse du génome d'*Hbt. salinarum* sp. GN101 révèle, sur un mégaplasmide de 283 kb, un gène codant HalS8. Cette observation montre que les halocines S8 et R1 sont fortement apparentées et pourraient être codées par un seul et même gène ou par des copies multiples de ce gène (Besse et al, 2015).

La production d'halocines dépend de la croissance de leur souche productrice. Pour la plupart des halocines, le maximum d'activité est observé entre la fin de la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire (Platas et al., 1996 ; Kavitha et al., 2011 ; Besse et al., 2015 ; Mazguene et al., 2018). Seules les halocines HA1, HA3 et Sech7a ont une activité maximum observée lors de la phase exponentielle de croissance (Pašić et al., 2008, Kumar et al., 2016, Kumar et Tiwari, 2017b).

Le mode d'action des halocines est beaucoup moins étudié que celui des autres PAMs. Il n'a été étudié que pour les halocines C8, H1, H4, H6/H7 et Sech7a. L'halocine H6/H7 agit sur la membrane de la souche cible *Halobacterium halobium* par inhibition de l'échangeur Na^+/H^+, indispensable pour le maintien de la pression osmotique intracellulaire chez la souche cible (Meseguer et al, 1995). Les quatre autres halocines entraînent des modifications morphologiques de la membrane avec perturbation de la perméabilité membranaire conduisant à la lyse des cellules (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1986 ; Li et al, 2003 ; Shand et Levya, 2007 ; Pašić et al., 2008).

3.3. Interactions antimicrobiennes dans les environements hypersalins

Une étude a été menée sur l'activité antimicrobienne de souches provenant de différents milieux hypersalins à travers le monde (Atanasova et al., 2012). Cet échantillon comprend 68 souches d'archées halophiles de la classe des *Halobacteria* et 22 souches de bactéries halophiles modérées des genres *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Pontibacillus*, *Rhodovibrio*, *Salicola*, *Salinivibrio* et *Salisaeta* (Atanasova et al., 2013). Quarante pourcents des souches produisent une activité antimicrobienne, donc au moins une halocine. Cent quarante-quatre activités antimicrobiennes ont été détectées entre des souches appartenant à des genres différents tant chez les archées que chez les bactéries halophiles (Figure 16). De nombreuses interactions ont été détectées entre des micro-organismes de genres différents et appartenant à des environnements hypersalins éloignés.

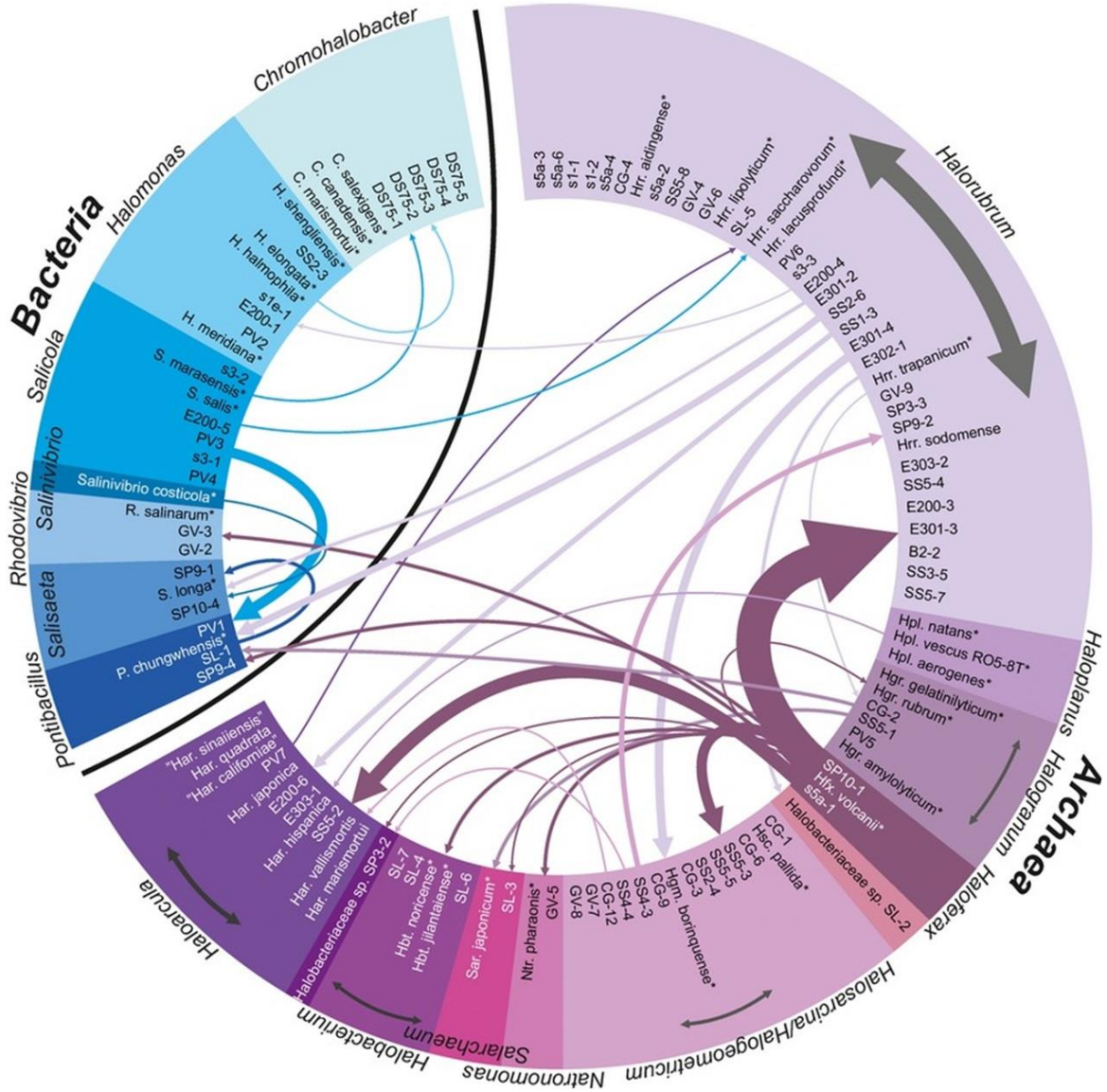


Figure 16. Activité d'halocines entre différents genres d'archées et de bactéries halophiles. Les 90 souches utilisées dans cette étude ont été identifiées sur la base de la séquence de leur ARNr 16S. Les souches types utilisées dans l'analyse phylogénétique sont marquées par un

astérisque. Les archées et les bactéries sont séparées par un espace blanc et un arc de cercle noir. Les souches appartenant à un même genre sont regroupées dans des secteurs colorés en nuance de bleu pour les bactéries et en nuances de violet pour les archées. Les 2 souches d'*Halobacteriaceae* sp. SL-2 et SP3-2 dont le genre n'a pas été identifié sont regroupés dans un même secteur. Les souches des genres *Halosarcina* and *Halogeometricum* sont regroupées dans un même secteur en raison de leur parenté phylogénétique. Les flèches indiquent la production d'halocine produite par un genre et active sur un autre genre. L'épaisseur de la flèche indique le niveau de production de l'halocine (Atanasova et al. 2013).

Chez les bactéries, des activités antimicrobiennes sont observées chez *Halomonas*, *Pontibacillus*, *Salicola* et *Salinivibrio costicola*. Ces activités sont dirigées contre des bactéries halophiles (*Chromohalobacter*, *Pontibacillus*, *Rhodovibrio* et *Salisaeta*) à l'exception de la souche de *Salicola* sp. s3-1 qui présente une activité interdomaine contre une archée halophile *Halorubrum* sp. s1-2. L'activité antimicrobienne produite par la souche de *Salicola* sp. s3-1 est diminuée par un traitement à la protéinase K, ce qui implique une activité de type halocine. Des activités antimicrobiennes interdomaines sont également observées entre des archées halophiles (*Halorubrum*, *Haloferax*, *Halogranum*) et des souches de bactéries halophiles des genres *Halomonas*, *Pontibacillus*, *Rhodovibrio* et *Salisaeta* (Figure 16) (Atanasova et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats montrent que les activités antimicrobiennes dans les environnements hypersalins peuvent provenir de souches d'archées halophiles mais aussi de bactéries halophiles. De plus, les principales activités observées sont dirigées contre des souches provenant de sites éloignés, ce qui semble indiquer que la production d'halocines ne conférerait pas un avantage écologique par rapport aux autres souches au sein d'un même écosystème (Kis-Papo et Oren, 2000 ; Atanasova et al., 2013).

IV. Projet de recherche

La présence d'archées dans de nombreux milieux et leur dominance dans les milieux hypersalins nous amène à nous interroger sur les facteurs leur conférant la faculté à coloniser un écosystème. Chez la plupart des bactéries, la production de PAMs joue un rôle dans les compétitions microbiennes (Riley et Gordon, 1999 ; Riley, 2011) surtout lors de carences nutritionnelles ou de stress abiotique (Cornforth et Foster, 2013).

Un certain nombre de questions peuvent alors se poser, en ce qui concerne les halocines produites par les archées surtout que les études sur ces antimicrobiens sont limitées. Il semble que les halocines soient produites par un grand nombre de souches d'archées halophiles (Meseguer et al., 1986 ; Torreblanca et al., 1994, Kis-Papo et Oren, 2000 ; Atanasova et al., 2013). Cependant, les halocines auraient un rôle négligeable dans la dynamique des communautés d'archées halophiles et dans le contrôle de la biodiversité des micro-organismes colonisant les milieux hypersalins (Kis-Papo et Oren, 2000 ; Atanasova et al., 2013). De plus, si de nombreuses souches produisent une halocine, pourquoi jusqu'à maintenant peu d'halocines ont été isolées et caractérisées ?

L'équipe, dans laquelle j'ai été intégrée pour mener ce projet de recherche travaille depuis longtemps sur les composés antimicrobiens bactériens et a commencé des recherches sur les halocines depuis quelques années. Comme nous venons de le voir précédemment, seulement une quinzaine d'halocines ont été décrites, généralement de manière peu approfondie, chez les archées halophiles. Mon projet a concerné HalC8 et HalH4 car leurs séquences protéiques et nucléotidiques sont connues (Cheung et al., 1997 ; Sun et al., 2005), mais leurs voies de biosynthèse sont encore inconnues. Des études antérieures ont révélé que le gène *halC8* était transcrit chez d'autres souches d'archées appartenant toutes au genre *Natrinema* (Imadalou-Idres et al., 2013 ; Meknaci et al., 2014 ; Quadri et al., 2016).

Notre premier objectif était d'étudier la répartition de la biosynthèse de HalC8 chez des archées halophiles dans différents milieux hypersalins et de déterminer si seules les souches d'archées du genre *Natrinema* produisaient cette halocine. Par la suite, nous avons effectué les mêmes recherches pour HalH4, pour déterminer si cette halocine était produite par d'autres souches d'archées halophiles que celle de l'espèce *Hfx. mediterranei*.

Chez les bactéries, les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des PAMs (gènes codant le précurseur, la protéine d'immunité, les protéines impliquées dans l'export, la régulation ou les modifications post-traductionnelles) sont généralement regroupés sur un même locus génétique (Kleerebezen, 2004). Un groupe de gènes pourrait être impliqué dans la production de HalC8. En effet, cinq gènes codant des protéines aux fonctions putatives ont été identifiés en amont et en aval du gène *halC8* (Mei et al., 2006). Dans le cas de HalH4, seul le gène *halH4* a été décrit dans la littérature (Cheung et al., 1997), bien que l'étude du génome montre qu'il existe des phases ouvertes de lecture présentes à proximité de *halH4* codant des protéines inconnues et des transporteurs ABC (Besse et al., 2015).

Notre deuxième objectif était, dans un premier temps, d'étudier l'expression des transcrits de *halC8* et *halH4* par q-RT-PCR en fonction de différents paramètres biotiques et abiotiques, puis de déterminer, dans un second temps, si les gènes adjacents à *halC8* et *halH4* pouvaient être impliqués dans la biosynthèse de ces halocines.

Notre **troisième objectif** était de préciser le mode d'action de ces deux halocines. HalC8 altérerait la membrane des cellules sensibles d'*Halorubrum saccharovorum* (Li et al., 2003), tandis qu'il a été montré que HalH4 agit sur la membrane des souches sensibles en perturbant la perméabilité membranaire (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1985 ; O'Connor et Shand, 2002). Néanmoins, on ne connait pas comment ces halocines interagissent avec leurs cellules cibles. Pour cela, il est nécessaire de purifier ces deux halocines afin d'observer ensuite en microscopie l'intégrité de la structure des cellules de souches sensibles exposées à ces halocines et d'identifier une éventuelle atteinte de la membrane, une cible classique pour les composés antimicrobiens.

L’ensemble de ce projet de recherche avait pour but d’éclaircir la voie de biosynthèse et le mode d’action de HalC8 et HalH4 au sein des milieux hypersalins. Le choix du modèle d’étude porte un double intérêt, puisqu’il concerne à la fois des milieux extrêmes susceptibles de révéler des adaptations originales des organismes colonisateurs, mais également le troisième domaine de la vie pour lequel de nombreux mécanismes restent encore inexplorés. Ce projet vise à accroître les connaissances encore très parcellaires sur les substances antimicrobiennes produites par les archées.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Méthodes de bactériologie

1. Souches archéennes et bactériennes

Pour ce projet, des souches isolées d'Algérie, de Tunisie et des souches provenant des collections internationales DSMZ (https://www.dsmz.de/collection/catalogue) et JCM (https://jcm.brc.riken.jp/en/catalogue_e) ont été utilisées (Tableau 3).

Tableau 3. Nom, origine et conditions de culture des souches utilisées dans cette étude Les milieux de culture (LB, MB, M53, M352 et SW25 sont décrits dans l'annexe 1.

Souches	Origine	Culture
Archées halophiles		
Haloarcula argentinensis DSM12282	Saline de Chica, Argentine	M372, 37 °C
Haloarcula sebkhae SWO25 (SO25)	Sebkha d'Ouargla, Algérie	M372, 37 °C
Haloarcula vallismortis DSM3756	Désert de la vallée de la mort, USA	M372, 37 °C
Halobacterium salinarum DSM3754	Cuir salé	M372, 37 °C
Halobacterium salinarum ETD5	Saline de Sfax, Tunisie	M372, 37 °C
Haloferax alexandrinus DSM27206	Saline El-Mallahet Alexandrie, Egypte	M372, 37 °C
Haloferax gibbonsii DSM4427	Saline d'Alicante, Espagne	M372, 37 °C
Haloferax mediterranei DSM1411	Saline d'Alicante, Espagne	M372, 37 °C
Haloferax prahovense DSM18310	Lac salé Telega Prahova, Roumanie	M372, 37 °C
Haloferax volcanii DSM3757	Sédiments de la mer morte, Israel	M372, 37 °C
Halorubrum arcis DSM23454	Lac salé Ayakekum Tibet, Chine	M372, 37 °C
Halorubrum chaoviator ETD3	Saline de Sfax, Tunisie	M372, 37 °C
Halorubrum chaoviator ETR14	Saline de Sfax, Tunisie	M372, 37 °C
Halorubrum tebenquichense SS1R14	Sédiments de la saline de Sfax, Tunisie	M372, 37 °C
Halorubrum tebenquichense SS1R21	Sédiments de la saline de Sfax, Tunisie	M372, 37 °C
Haloterrigena hispanica DSM18328	Lac salé Fuente de Piedra, Espagne	M372, 37 °C
Haloterrigena jeotgali DSM18794	Crevette fermentée (Jeotgal), Corée du Sud	M372, 37 °C
Haloterrigena limicola JCM13563	Lac salé Aibi, Chine	M372, 37 °C
Haloterrigena longa JCM13562	Lac salé Aibi, Chine	M372, 37 °C
Haloterrigena saccharevitans JCM12889	Lac salé Aibi, Chine	M372, 37 °C
Haloterrigena salina JCM13891	Lac salé Xilinhot, Mongolie	M372, 37 °C
Haloterrigena thermotolerans DSM11552	Saline de Cabo Rojo, Porto Rico	M372, 37 °C
Haloterrigena thermotolerans SS1R12	Sédiments de la saline de Sfax, Tunisie	M372, 37 °C
Haloterrigena turkmenica DSM5511	Sol salé, Turkmenistan	M372, 37 °C
Natrialba aegyptia DSM13077	Sol salé Aswan, Egypte	M372, 37 °C
Natrialba taiwanensis DSM12281	Sel, Taiwan	M372, 37 °C
Natrinema altunense JCM12890	Lac salé Ayakekum Tibet, Chine	M372, 37 °C
Natrinema ejinorense DSM18194	Lac salé d'Ejinor, Mongolie	M372, 37 °C
Natrinema gari JCM14663	Sauce de poisson, Thaïlande	M372, 37 °C
Natrinema pallidum DSM15623	Morue salée	M372, 37 °C
Natrinema pellirubrum DSM15624	Cuir salé	M372, 37 °C
Natrinema salaciae DSM25055	Lac profond Medee, Mer Méditérannée Italie	M372, 37 °C
Natrinema sp. SSI9	Saline d'Ichekaben, Algérie	M372, 37 °C
Natrinema sp. SWI15	Saline d'Ichekaben, Algérie	M372, 37 °C
Natrinema versiforme DSM16034	Lac salé Aibi, Chine	M372, 37 °C
Bactéries halophiles		
Halomonas sabkhae DSM19122	Sebkha d'Ezzemoul, Algérie	MB + 8%NaCl, 40 °C
Lentibacillus halophilus DSM19123	Sauce de poisson, Thaïlande	M372, 30 °C
Nesterenkonia halophila DSM16378	Sol salé, Chine	M53+10% MgCl2, 28 °C
Oceanobacillus kapialis DSM23158	Sol salé, Chine	M53+10% MgCl2, 28 °C
Salinibacter ruber DSM13855	Saline de Majorque, Espagne	SW25, 37 °C
Salinicoccus siamensis DSM21576	Pâte de crevettes fermentée, Thaïlande	M372, 28 °C
Bactérie pour clonage		
Escherichia coli DH5α		LB, 37 °C

2. Milieux de culture

Des milieux reflétant les concentrations molaires en sels retrouvées dans les milieux hypersalins ont été utilisés pour la culture des archées et bactéries halophiles (Annexe 1), pour que leurs cellules ne soient pas lysées sous l'effet de la pression osmotique.

De l'agar (Conda), utilisé pour son niveau élevé de pureté, est ajouté dans les milieux liquides à raison de 20 ou 15 $g.L^{-1}$ lors de la réalisation de milieux gélosés, et à raison de 8 $g.L^{-1}$ pour les géloses molles.

3. Cultures en milieu solide et en milieu liquide

Les ensemencements en milieu solide sur boîtes de Pétri contenant un milieu adéquat gélosé (Tableau 3) ont été réalisés à partir de souches conservées au congélateur à -80 °C en présence de 15 % de glycérol. Pour les archées, nécessitant un temps d'incubation de 7 à 14 jours en moyenne, les boîtes ont été placées dans des sachets pour éviter la déshydratation des géloses contenant de fortes concentrations en sels.

Pour les cultures en milieu liquide, un volume de 10 mL du milieu nutritif adapté a été ensemencé à partir d'une colonie prélevée sur une boîte de Pétri. Cette préculture a ensuite été utilisée pour ensemencer des cultures de plus grand volume, pour obtenir une $DO_{600\ nm}$ = 0,1.

4. Courbe de croissance

La croissance bactérienne de la souche de *Hfx. mediterranei* DSM1411 et celle de la souche *Natrinema altunense* JCM12890 ont été étudiées en milieu liquide. De façon à rechercher le maximum de l'activité antimicrobienne produite lors de la croissance de *Hfx. mediterranei* DSM1411, la $DO_{600\ nm}$ d'une culture de 100 mL en milieu M372 a été mesurée après 4 h, 5,5 h, 23,25 h, 30,5 h, 49 h, 54,5 h, 71 h, 78,5 h, 95,5h et 100,5 h. Parallèlement, les surnageants aux temps 30,5 h, 54,5 h, 71 h, 78,5 h, 95,5 h et 100,5 h ont été prélevés, filtrés sur des membranes de 0,22 µm (Sartorius) pour éliminer d'éventuelles cellules bactériennes ou virus puis dilués avec du milieu M372 au 1/4 et au $1/16^{e}$ afin de tester leur activité antimicrobienne à l'aide d'un test par diffusion sur gélose.

5. Tests antimicrobiens en milieu solide par diffusion sur gélose

5.1. Echantillons à tester

Les cultures (20 mL) ont été testés en fin de phase exponentielle soit à une $DO_{600\ nm}$ comprise entre 0,9 et 1,3 pour *Nnm. altunense* JCM12890 et entre 5 et 5,5 pour *Hfx. mediterranei* DSM1411. Dix mL de culture ont également été centrifugés à 12000 *g* pendant 5 min à 4 °C. Les surnageants obtenus ont été filtrés sur des membrane de 0,22 µm.

5.2. Gélose molle ensemencée

La souche cible a été inoculée dans 10 mL de gélose en surfusion M372 ou SW25 à 8 $g.L^{-1}$ d'agar à une $DO_{600\ nm}$ finale de 0,001 ou 0,01, puis coulée à la surface d'une gélose de 20 mL à 15 $g.L^{-1}$ d'agar. Après solidification de la gélose molle, des puits ont été réalisés stérilement pour le dépôt des échantillons à tester (50 ou 100 µL). Les boites ont été incubées entre 5 et 21 jours à 37 ou 45 °C suivant la souche cible, dans des sachets hermétiquement fermés. Après l'apparition d'un tapis, une action inhibitrice sur la souche cible se traduit par la présence d'un halo d'inhibition dans la croissance de la souche incluse dans la gélose molle (Figure 17). Les halos d'inhibition sont mesurés en mm.

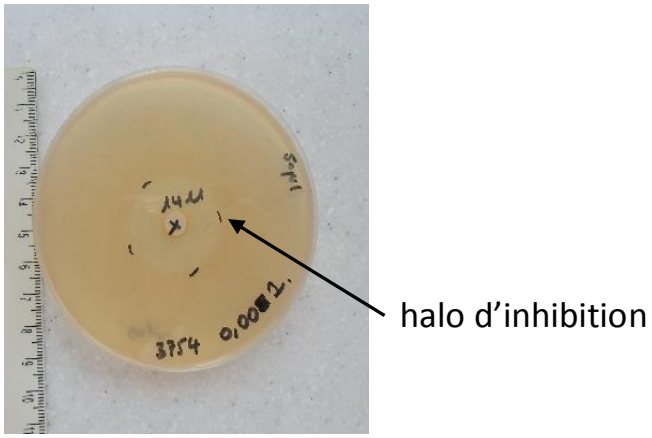


Figure 17. Test antimicrobien en milieu solide par diffusion sur gélose.
Un extrait de *Hfx. mediterranei* DSM1411 (50 µL) a été déposé dans un puits sur une gélose molle ensemencée par la souche cible, *Hbt. salinarum* DSM3754.

II. Méthodes de biologie moléculaire

1. Extraction cellulaire pour l'obtention d'ADNg

Une méthode spécifique pour les archées halophiles a été utilisée (Pfeiffer, 2009). Un mL de culture fraîche en phase exponentielle ou en début de phase stationnaire a été centrifugé pendant 1 min à 12000 *g* pendant 1 min à 4 °C. Le surnageant a été jeté et 400 µL d'eau MilliQ® ont été ajouté au culot, mélangé doucement par plusieurs pipetages successifs. Enfin les DNases ont été inactivées en chauffant la solution d'ADN à 70 °C pendant 10 min.

2. Amplification des fragments d'ADN par la réaction de polymérase en chaîne

Les différentes amorces utilisées pour amplifier les gènes impliqués dans la biosynthèse de HalC8 et HalH4 figurent dans l'annexe 2. Les amorces ont été choisies puis analysées et validées par les programmes Primer3 Plus et OligoAnalyzer (voir paragraphe IV, page 48). Les différentes amorces utilisées lors de cette étude ont été synthétisées par Eurofins Genomics.

Pour chaque réaction de polymérase en chaîne (PCR), 1 µL de l'ADN à amplifier a été mis en présence de 1 µL d'amorce F 10 µM, 1 µL d'amorce R 10 µM, 1 µL d'une solution de dNTPs (10 mM chacun) (Promega), 0,25 µL de polymérase Taq (VWR, 5 U/µL) et 2,5 µL de tampon Extra 10X $MgCl_2$ 25 mM (VWR) dans un volume final de 25 µL d'eau MilliQ®. Le mélange réactionnel a été chauffé à 95 °C pendant 5 min avant de subir 30 cycles d'amplification comprenant : une phase de dénaturation à 95 °C pendant 30 s ; suivie de la phase d'hybridation des amorces avec l'ADN pendant 30 s à des températures variant de 52 à 64 °C en fonction des températures de fusion des amorces utilisées ; puis d'une phase d'élongation à 72 °C variant de 30 s à 5 min en fonction de la taille du fragment à amplifier (1 min/kb). La réaction a été terminée par une incubation des échantillons à 72 °C pendant 7 min afin de terminer les élongations des fragments. Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Veriti (AB Applied Biosystems) ou GenePro™ (Bioer Technology).

3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier la taille des fragments d'ADN obtenus après amplification par PCR, 5 µL de chacun des échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose en présence de tampon de charge 1X (Ozyme). Le gel d'agarose 1 % (p/v) (Qbiogene, MP Biochemicals) a été préparé dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acétate, 1 mM EDTA, pH 8,0) contenant 2 µL d'un agent intercalant (Gelred®) (Biotium, VWR) qui permet de suivre la migration de l'ADN. La migration a été réalisée sous 90 V, dans du tampon TAE 1X. Les fragments d'ADN, ont été visualisés sous UV (E-Box, Vilber Lourmat) et leur taille a été comparée à celles du marqueur Exact Ladder DNA Premix 2 log (Ozyme), présentant des tailles de 100 pb à 10 kb.

4. Clonage

4.1. Purification de l'ADN amplifié par PCR

Après visualisation sur gel d'agarose, les produits d'amplification obtenus ont été purifiés sur colonne à l'aide du kit " PCR Clean-up " (Macherey-Nagel™) et ensuite quantifiés à l'aide du spectrophotomètre Nanovue (GE Healthcare). Ces fragments ont été insérés dans un plasmide vecteur lors du clonage.

4.2. Ligation

Le plasmide vecteur pGEM®-T est un plasmide ne nécessitant pas d'étape préalable de digestion par des enzymes de restriction, car il est fourni sous forme linéaire dans le kit " pGEM®-T Easy Vector System " (Promega) (Figure 18). Les inserts purifiés ont été ligaturés dans ce plasmide à raison de 50 ng de vecteur, 1 µL d'ADN ligase T4 (Promega), 5 µL de tampon de ligation 2X (Promega) et une quantité d'insert calculée à l'aide de la formule suivante :

$$insert\ (ng) = \frac{vecteur\ (ng) x\ taille\ insert\ (kb)}{taille\ vecteur\ (kb)} x \frac{[insert]}{[vecteur]}$$

La taille du vecteur est de 3 kb, et en général on souhaite un rapport molaire insert/vecteur de 3/1. Le mélange réactionnel a été incubé à 4 °C pendant une nuit.

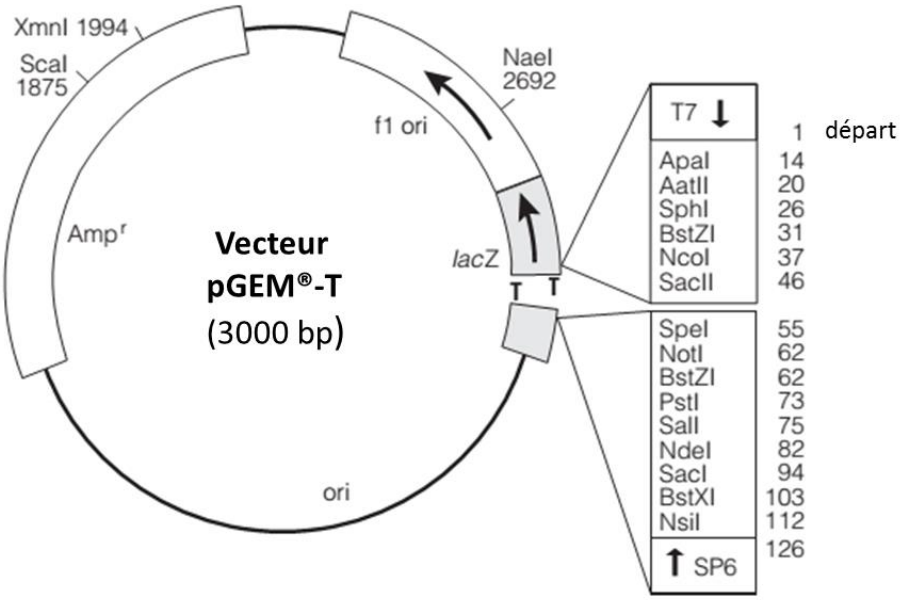


Figure 18. Carte du plasmide pGEM®-T (Promega).
Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline, ori : origine de réplication, f1 : phage f1, *lacZ* : gène codant la β-galactosidase, T7 : site d'initiation de la transcription par ARN polymérase T7, SP6 : site d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase SP6.

4.3. Préparation des cellules compétentes

Deux cent µL d'une préculture de la souche *E. coli* DH5α ont été inoculés dans 50 mL de LB. La culture a été incubée à 37 °C avec une agitation de 200 rpm et lorsqu'elle a atteint une DO $_{600\ nm}$ comprise entre 0,2 et 0,3, la culture a été placée dans la glace (4 °C). Les cellules ont été transférées dans des tubes Falcon™ préalablement refroidis puis centrifugées pendant 15 min à 4000 *g* à 4 °C. Les culots obtenus ont été remis délicatement en suspension dans 50 mL de $CaCl_2$ 0,1 M, ce qui a pour action de fragiliser la paroi cellulaire, à 4 °C pendant 30 min avant d'être à nouveau centrifugés (15 min 4000 *g* à 4 °C). Pour terminer, le culot a été remis en suspension dans 500 µL de $CaCl_2$ 0,1 M à 4 °C, additionné de 10 % de glycérol, puis des aliquotes de 50 µL de cellules ont été conservées au congélateur à -80 °C.

4.4. Transformation des cellules d'*E. coli* DH5α

Les cellules compétentes obtenues précédemment ont été décongelées dans de la glace (50 µL) et 3 µL des mélanges de ligation y ont été ajoutés et incubés pendant 10 min dans de la glace avant de subir un choc thermique à 42 °C pendant 45 s et d'être placés à nouveau dans de la glace pendant 2 min. Cette étape permet aux cellules compétentes

d'intégrer les plasmides vecteurs. Neuf cent cinquante µL de LB ont été ajoutés et ce mélange a été incubé 1 h 30 à 37 °C (200 rpm). Les échantillons ont été centrifugés 5 min à 13000 *g* et le culot, remis en suspension dans 100 µL de LB, a été ensemencé en totalité par étalement à la surface de boîtes de LB gélosé contenant de l'ampicilline (100 $\mu g.mL^{-1}$) qui permet la sélection des colonies contenant le vecteur pGEM®-T, de l'IPTG (0,5 mM) et du X-Gal (80 $\mu g.mL^{-1}$). L'IPTG induit la transcription de la β-galactosidase permettant de cliver le X-Gal, ce qui conduit à une colonie de couleur bleue. Les colonies obtenues sur les boîtes de Pétri peuvent être soit bleues si le gène *lacZ* n'a pas été inactivé par l'insertion d'un insert, soit blanches si l'insert a été inséré à l'intérieur de *lacZ*. Les clones d'intérêt sont donc contenus dans les colonies blanches et celles-ci ont donc été repiquées sur des boîtes de LB-ampicilline-IPTG-X-Gal.

4.5. Extraction et purification de l'ADN plasmidique

Les clones sélectionnés sur les boites de Pétri (colonies blanches) ont été utilisés pour ensemencer des cultures en LB supplémenté en ampicilline (100 $\mu g.mL^{-1}$) pendant 12 h à 37 °C. Après centrifugation 5 min à 13000 *g*, le culot de 2 mL de ces cultures a été traité pour extraire l'ADN plasmidique à l'aide du " Plasmid Miniprep kit " sur colonne (Qiagen), suivant le protocole fournit par le fabricant. Une PCR a été réalisée, pour vérifier que nos inserts étaient bien présents dans nos vecteurs, avec les amorces universelles M13-F/M13-R (Annexe 2), qui sont des amorces s'hybridant au niveau du gène *lacZ*. Un contrôle positif a été réalisé à partir de l'ADN purifié d'un clone d'une colonie bleue et un contrôle négatif en remplaçant l'ADN plasmidique par de l'eau.

4.6. Séquençage

Cinquante à 100 ng d'échantillons purifiés et validés ont été envoyés à Eurofins Genomics pour séquençage par la méthode de Sanger.

5. Extraction d'ARN

Une culture de 80 mL de *Nnm. altunense* JCM12890 en fin de phase exponentielle ($DO_{600\,nm}$ = 1,2) ou de 25 mL de *Hfx mediterranei* DSM1411 en fin de phase exponentielle ($DO_{600\,nm}$ = 5) a été centrifugée pendant 15 min à 8000 *g*. Un mL de TRIzol™ (Ambion, Life Biotechnologies, Thermo Fisher Scientific) a été ajouté au culot cellulaire et les cellules lysées par plusieurs pipetages. Le TRIzol™ est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidinium qui solubilise le matériel biologique et dénature les protéines. Après une incubation de 5 min du mélange de TRIzol™/cellules, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés puis le tube vigoureusement agité pendant 15 s et incubé 2 min à température ambiante. L'ajout de chloroforme engendre une séparation de phases dans laquelle les protéines sont contenues dans la phase organique, l'ADN à l'interphase et l'ARN est contenu dans la phase supérieure aqueuse. Après centrifugation de l'échantillon à 12000

g pendant 15 min à 4 °C, la phase aqueuse contenant l'ARN a été prélevée puis transvasée dans un nouveau tube. Cinq cent µL d'isopropanol 100 % ont été ajoutés afin de précipiter l'ARN contenu dans l'échantillon. Après une incubation de 10 min à température ambiante et une centrifugation à 12000 *g* pendant 10 min à 4 °C, le culot d'ARN a été lavé avec 1 mL d'éthanol 75 % (v/v). Après une centrifugation à 7500 *g* pendant 5 min à 4 °C, le surnageant a été jeté et le nouveau culot a été séché pendant 5 min. L'ARN a ensuite été resuspendu dans 25 µL d'eau MilliQ® contenant 0,1 % de pyrocarbonate de d'éthyle (DEPC) et incubé à 55-60 °C pendant 10 min afin d'inhiber les RNases, il sera conservé à -20 °C. L'ARN extrait est quantifié par mesure de la $DO_{260\,nm}$ à l'aide du spectrophotomètre Nanovue. Après quantification, la solution d'ARN a été incubée en présence de DNase (1 U pour 5 µg d'ARN extrait) (Promega), 1 µL de tampon de DNAse 10X, et d'H_2O-DEPC pour un volume final de 10 µL. Le mélange réactionnel a été incubé 1 h 30 à 37 °C. La réaction a été arrêtée par l'ajout de la solution DNAse STOP (1 µL /µL de DNAse) et incubée 10 min à 65 °C. L'échantillon d'ARN traité aux DNAses a ensuite été mis en présence de 500 µL d'éthanol 70 % (v/v) avant d'être mélangé puis transféré sur une colonne du " PureLink® RNA Mini kit " (Ambion, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Afin de vérifier l'absence d'ADNg résiduel, une PCR a été réalisée en utilisant les amorces amplifiant le gène codant l'ARNr 16S (ARNr 16S-F/ARNr 16S-R) (Annexe 2). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1 % (p/v) d'UltraPure™ agarose dépourvu de DNases (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) préparé dans du tampon TAE 1X. Les échantillons d'ARN ont été quantifiés en mesurant la $DO_{260\,nm}$ et leur qualité a été appréciée par le calcul des rapports $DO_{260\,nm}/DO_{280\,nm}$ et $DO_{260\,nm}/DO_{230\,nm}$. Les échantillons ont été conservés au congélateur à -80 °C.

6. Transcription inverse

La transcription inverse conduit à la synthèse d'ADN complémentaire à partir d'un brin d'ARN et d'une ADN polymérase ARN-dépendante ou transcriptase inverse. La réaction a été réalisée en présence de 150 ng, 300 ng ou 500 ng d'ARN, 1 µL d'un mélange de dNTPs 10 mM (VWR), 0,4 µL de mélange d'amorces aléatoires (hexamères) à 500 $\mu g.mL^{-1}$ (Random primers, Promega), et d'H_2O-DEPC pour un volume final de 12 µL. Le mélange a été chauffé à 65 °C pendant 5 min, puis placé rapidement dans de la glace. Après une brève centrifugation du mélange, 4 µL de tampon (first strand 5X, Invitrogen) et 2 µL d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen), ont été ajoutés, mélangés délicatement puis incubés 2 min à 25 °C. Ensuite, 200 U de transcriptase inverse (SuperScript™ II, Invitrogen) ont été ajoutées au mélange réactionnel qui a été délicatement mélangé par plusieurs aspirations/refoulements à l'aide d'une micropipette avant d'être incubé 10 min à 25 °C puis 50 min à 42 °C. Enfin, la réaction a été arrêtée en chauffant le mélange 15 min à 70 °C. Les ADNc ont été conservés à -20 °C et ont été utilisés pour vérifier la transcription du gène codant l'ARNr 16S spécifique des archées par PCR en utilisant les amorces ARNr 16S-F/ARNr 16S-R

(Annexe 2). Deux contrôles ont été réalisés, l'un sans ARN (contrôle négatif de transcription inverse), l'autre avec 500 ng d'ARN sans la transcriptase inverse.

Les 3 quantités d'ARN (150, 300 ou 500 ng) ont permis d'obtenir des quantités d'ADNc exploitables pour poursuivre nos essais de PCR quantitative. Par la suite, une quantité d'ARN de 500 ng a donc été utilisée pour la transcription inverse.

7. RT-PCR quantitative ou RT-PCR en temps réel

La PCR quantitative (q-PCR) permet de mesurer la quantité initiale d'ADNc et donc d'ARN de nos échantillons. La matrice de cette PCR est l'ADNc obtenu suite à la transcription inverse de nos extraits d'ARN. Les fragments d'ADN synthétisés (amplicons) sont détectés en continu, en temps réel, grâce à la fluorescence qu'ils émettent. En effet, un fluorophore se fixant à l'ADN double brin, le SYBR® Green a été utilisé dans le milieu réactionnel. Ainsi, le complexe ADN double brin/SYBR® green absorbe la lumière bleue (λmax = 497 nm) et va émettre la lumière verte (λmax = 520 nm). Lors de la PCR, la fluorescence émise est directement liée à la quantité d'amplicons synthétisés (Figure 19).

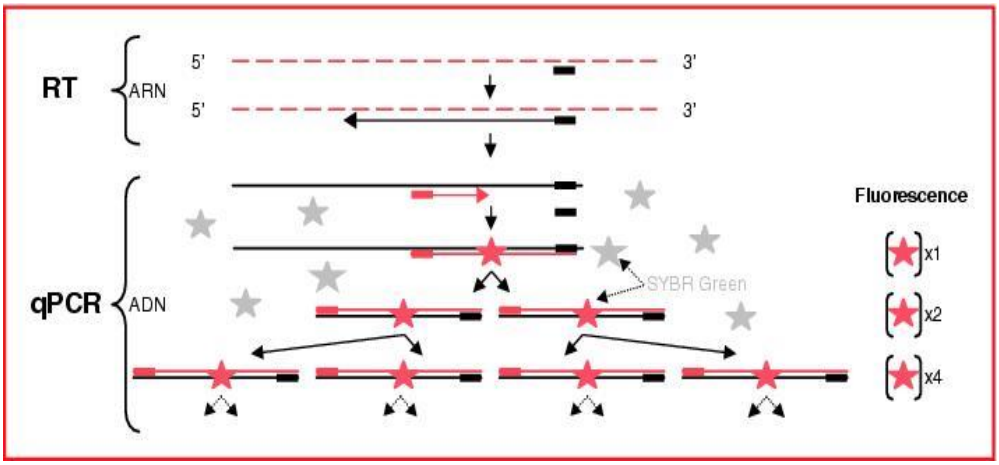


Figure 19. Schéma de la réaction de RT-PCR quantitative.
Le fluorophore SYBR®Green libre (gris) émet de la fluorescence lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin (rouge). Gerlier et al., 2007.

La PCR quantitative se décompose en trois phases. La première phase correspond au bruit de fond : la quantité de fragment amplifié double à chaque cycle mais la fluorescence générée n'est pas suffisante et n'est pas supérieure au bruit de fond. La deuxième phase montre une croissance exponentielle de l'intensité de fluorescence. La dernière phase est une phase de plateau : certains réactifs (amorces et la polymérase Taq) deviennent limitants et le système ne permet plus une amplification exponentielle (Figure 20).

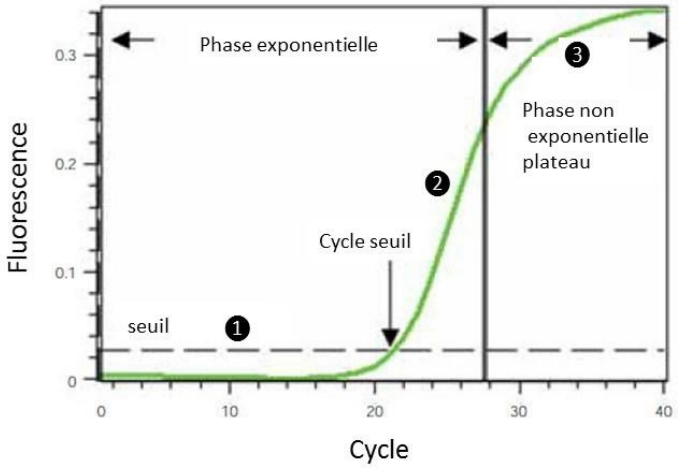


Figure 20. Courbe d'amplification obtenue lors d'une PCR quantitative.
Le signal de fluorescence est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. ❶ représente la partie de la phase exponentielle où le signal de fluorescence est inférieur au bruit de fond. ❷ représente la phase exponentielle où l'intensité de fluorescence double à chaque cycle. ❸ représente la phase où l'intensité de fluorescence n'est plus exponentielle puis le plateau. https://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr

Il est recommandé d'inclure au minimum trois gènes de référence encore nommés " gènes de ménage " pour avoir une analyse précise des résultats de q-RT-PCR (Vandesompele *et al.,* 2002 ; Bustin *et al.,* 2009). Un gène de référence est un gène qui est exprimé de manière stable dans la cellule. L'expression constitutive de ce gène permet de s'affranchir des variations des quantités d'ADNc synthétisées, par comparaison de l'expression du gène d'intérêt par rapport à l'expression des gènes de référence. La mise au point de la spécificité des amorces s'effectue donc avec au minimum 4 gènes de référence pour ensuite conserver les 3 meilleurs pour tester l'efficacité des amorces (Bustin et al., 2009). Il en sera de même pour les 2 gènes d'intérêt *halC8* et *halH4*.

Pour chaque réaction de q-PCR, 4 µL d'échantillon d'ADNc dilué au 1/10 (quantité 50 ng) dans de l'H_2O MilliQ®-DEPC ont été mis en présence de 2 µL d'amorces sens (F) et antisens (R) à 2,5 µM chacune, 2 µL de SYBR™ Green PCR Master Mix 5X (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) et 2 µL d'H20 MilliQ®, dans des capillaires de 20 µL (Roche Life Science). Après une brève centrifugation, ils ont été placés dans le thermocycleur LightCycler® 2.0 (Roche Life Science). Chaque réaction a été réalisée en double.

Le mélange réactionnel a été chauffé à 95 °C pendant 10 min puis 45 cycles d'amplification ont été programmés. Chaque cycle comprend : une phase de dénaturation à 95 °C pendant 10 s ; une phase d'hybridation des amorces avec l'ADNc entre 60 °C et 64 °C suivant la séquence des amorces, pendant 5 s, puis une phase d'élongation à 72 °C pendant 10 s. Après ces 45 cycles, le mélange réactionnel a été incubé à 65 °C pendant 15 s. Les amplicons obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (p/v) pour

contrôler la spécificité des amorces. Les résultats ont été analysés avec le logiciel LightCycler® software 4.1 (Roche Life Science).

III. Méthodes de biochimie

1. Purification de l'halocine C8

1.1. Culture en milieu liquide

Le surnageant de 8 L de culture de *Natrinema* sp. SWI15 dans du M372 en début de phase stationnaire ($DO_{600\ nm}$ = 1,5-1,9), obtenu après une centrifugation de 30 min à 8000 *g*, a été chauffé à 100 °C pendant 10 min. Le surnageant a été concentré par une étape d'extraction en phase solide sur une cartouche contenant une phase stationnaire apolaire. Des fractions de 2 L de surnageant ont été chargées à un débit de 15 $mL.min^{-1}$ sur une cartouche C8 SepPak® 35cc (Waters) pré-équilibrée avec un solvant polaire, l'acétonitrile (ACN) 10 % (v/v) dans de l'eau MilliQ®. Après un lavage de la cartouche avec ACN 10 % (v/v) dans de l'eau MilliQ®, plusieurs étapes d'élutions ont été réalisées successivement avec 600 mL d'ACN 20, 60, 80 % dans de l'eau MilliQ®(v/v) et 100 % avec un suivi de l'absorbance à 226 nm. L'ACN a été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous une pression réduite (Buchi). Les fractions ont été lyophilisées puis remises en suspension dans 10 mL d'ACN 80 % dans de l'eau MilliQ®(v/v) et enfin testées contre *Halorubrum. chaoviator* ETD3 par la méthode de diffusion sur gélose pour détecter une activité antimicrobienne. Le solvant seul est également déposé sur le test afin de vérifier qu'il n'est pas responsable de l'activité antimicrobienne que l'on observe. Deux cents µL de la fraction présentant la plus forte activité ont été fractionnés par CLHP sur une colonne à polarité de phase inversée, Uptisphere® C4 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm, 300 Å, Interchim). La colonne a été éluée par un gradient de 0 à 80 % (v/v) d'ACN dans de l'eau MilliQ® en 20 min avec un débit d'1 $mL.min^{-1}$, puis une élution isocratique à 80 % d'ACN dans de l'eau MilliQ®(v/v) pendant 5 min. L'élution a été suivie en mesurant l'absorbance à 226 nm. Quarante fractions de 500 µL ont été collectées entre 5 et 25 min puis concentrées sous vide à l'aide d'un SpeedVac® (Savant) puis solubilisées dans 50 µL d'ACN 80 % dans de l'eau MilliQ®(v/v). Dix µL de chaque fraction ont été testés contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETD3 par la méthode de diffusion sur gélose pour détecter une activité antimicrobienne. La fraction présentant la plus forte activité a été à nouveau fractionnée par CLHP sur la même colonne Uptisphère® C4 dans les mêmes conditions que précédemment. Le pic majoritaire a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) sur un spectrophotomètre Voyager DE Pro (AB-Sciex).

1.2. Culture en milieu solide

Une autre méthode de purification a également été utilisée pour purifier HalC8. En effet, cette halocine avait déjà été purifiée à partir d'un milieu gélosé par Meknaci et al. (2014). La souche de *Nnm*. *altunense* JCM12890 a été choisie car sa croissance en milieu solide est

plus importante que celle de *Natrinema* sp. SWI15. Trois cent vingt millilitres de M372 gélosés ont été ensemencés avec une culture liquide pour obtenir une DO_{600nm} finale de 0,1. Seize boîtes de Pétri ont été coulées et incubées pendant 14 jours à 37 °C. Les géloses ont ensuite été découpées en petit morceaux qui ont été incubés pendant 4 h dans du méthanol de façon à ce que tous les morceaux soient complètement immergés. Le solvant a été évaporé avec un évaporateur rotatif sous une pression réduite (Buchi), puis solubilisé dans H_2O MilliQ® contenant 0,1 % d'acide formique (AF) et extrait par du butanol. La phase butanolique a été évaporée sous une pression réduite et solubilisée dans 50 mL AF 0,1 % (v/v) puis chargée sur une cartouche C8 Sep-Pak® 35cc (Waters) pré-équilibrée avec ACN 10 % dans de l'eau MilliQ® (v/v), puis éluée avec 600 mL d'ACN 80 % dans de l'eau MilliQ® (v/v). Cette fraction a été évaporée, solubilisée dans 500µL d'ACN 80 % dans de l'eau MilliQ® (v/v) et analysée par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS).

2. Purification de l'halocine H4

Le surnageant de 250 mL d'une culture en milieu liquide M372 de *Hfx*. *mediterranei* DSM1411 de 72 h a été dialysé à 4 °C à l'aide de membranes SPECTRA/POR™ (Spectrum Medical) de seuil de rétention de 12 à 14 kDa successivement contre NaCl 100 $g.L^{-1}$ pendant 6 h puis 50 $g.L^{-1}$ pendant 15 h et enfin Tris HCl 20 mM pH 8,0 NaCl 10 $g.L^{-1}$ pendant 24 h avec deux changements du milieu de dialyse (le premier 4 h après le début, le second 8 h après). Une colonne échangeuse d'anions MonoQ® HR5/5 (5 x 50 mm) (GE Healthcare, Life Science) a été conditionnée par passage de 5 mL de de tampon Tris-HCl 20mM pH 8,0 puis lavée par 10 mL de tampon Tris-HCl 20mM pH 8,0, 1,5 M NaCl. Le dialysat (360 mL) a alors été chargé pendant une nuit sur la colonne MonoQ® HR5/5 pré-équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,0 à l'aide d'un appareil de chromatographie liquide (FPLC) ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Life Sciences). Un gradient de 0 à 1 M de NaCl dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,0 pendant 50 min a été utilisé pour l'élution des composés, avec un débit de 1$mL.min^{-1}$. Les protéines ont été détectées en suivant la DO à 214 et 280 nm et des fractions de 2 mL ont été collectées automatiquement.

3. Dosage de protéines

Le dosage de protéines a été réalisé à l'aide de la méthode de Bradford. Une gamme étalon a été réalisée en utilisant une solution stock d'albumine de sérum bovin (BSA) à 2000 $\mu g.mL^{-1}$. Deux mL de réactif de Bradford (kit Pierce, Fisher Scientific) ont été ajoutés à 100 µL d'échantillon à doser ou de BSA (gamme de concentration de 0 à 2000 $\mu g.mL^{-1}$). Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (WPA, Biochrom® Ltd).

4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS Tris-glycine

Le gel de séparation à 10 % de polyacrylamide a été préparé en mélangeant extemporanément 1,7 mL d'une solution 30 % acrylamide/bis-acrylamide 29/1 (p/v) (Sigma), 1,3 mL de tampon Tris-Hcl 1,5 M pH 8,8, 1,9 mL d'eau MilliQ®, 50 µL de SDS 10 % (p/v), 50 µL d'APS 10 % (p/v) (Sigma) et 2µL de TEMED (Sigma). Le gel a été coulé entre deux plaques de verre jusqu'à environ 1,5 cm du bord supérieur et recouvert d'isobutanol saturé d'eau pour obtenir une surface plane. Après polymérisation, l'isobutanol a été éliminé de la surface du gel et rincé à l'eau milliQ® avant de couler le gel de concentration au-dessus. Le gel de concentration à 5 % de polyacrylamide a été préparé en mélangeant extemporanément 170 µL d'une solution 30 % acrylamide/bis-acrylamide 29/1 (p/v), 130 µL de tampon Tris-HCl 1 M pH 6,8, 680 µL d'eau MilliQ®, 10 µL de SDS 10 % (p/v), 10µL d'APS 10 % (p/v) et 1µL de TEMED. Avant polymérisation, un peigne en téflon a été inséré entre les plaques de verre pour former les puits permettant le dépôt des échantillons.

Avant de déposer les échantillons, ceux-ci ont été précipités de façon à éviter les interférences produites par des concentrations salines élevées lors de la migration électrophorétique. Afin de précipiter les protéines contenues dans les échantillons protéiques dosés précédemment selon la méthode de Bradford, chaque échantillon (1 mL) a été traité avec de l'acétone 100 % (8 mL) et de l'acide trichloroacétique 100 % (1 mL), puis conservés une heure à -20 °C. Ils ont ensuite été centrifugés à 11500 *g* pendant 15 min à 4 °C. Les culots ont été repris dans 20 µL de tampon Tris 20mM ph 8,8 et 5 µL de tampon de charge (Tris 80 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1 % (p/v), glycérol 7 % (v/v), bleu de bromophénol 0,1 % (v/v), DTT 40 mM, pH 8,8). Les protéines ont été dénaturées par incubation à 100 °C pendant 10 min puis 10 µg de protéines ont été déposés (volume de 10 à 20 µL selon les échantillons) dans les puits du gel.

La migration des échantillons a été réalisée avec un appareil Mini-Protean® Tetra vertical (Biorad) sous 90 V pendant 2 h dans du tampon Tris-glycine (1,92 mM, 25mM Tris, 0,1 % SDS (p/v), pH 8,3). La masse moléculaire des échantillons a été estimée à l'aide du marqueur PageRuler™ unstained broad range Ladder (Thermo Scientific).

4.2. Coloration des gels

Le gel a été placé pendant une nuit dans une solution de coloration composée de 40 % d'éthanol (v/v), 7 % d'acide acétique (v/v), 0,0025 % (p/v) de bleu de Coomassie (Brillant Blue R, Sigma) sous agitation douce. Le gel a ensuite été décoloré dans plusieurs bains successifs de solution de décoloration (40 % éthanol (v/v) et 7 % acide acétique (v/v). Lorsque les bandes sont apparues, le gel a été rincé à l'eau milliQ®. Les bandes protéiques ont été visualisées à l'aide d'un système Fusion FX-7 (Vilbert Lourmat).

5. Spectrométrie de masse

5.1. MALDI-TOF

Cette méthode est basée sur la désorption et l'ionisation des molécules d'un échantillon sous vide à l'aide d'un laser. Les particules sont désorbées d'une matrice cristallisée contenant l'échantillon à analyser ayant été déposé sur une plaque inerte, puis les particules sont accélérées dans un champ électrique. Les ions vont être séparés en fonction du temps mis pour traverser l'analyseur à temps de vol (TOF). Ce temps est proportionnel à la masse (m) et la charge (z) de chaque ion. Par définition, le MALDI-TOF est une spectrométrie de masse à ionisation douce, ce qui signifie que la charge des molécules produites est généralement de 1. L'appareil utilisé était un spectrophotomètre Voyager-DE™ Pro (Aplied Biosystems, AB-Sciex). L'échantillon a été co-cristallisé avec une matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique puis déposé sur une plaque en inox (Figure21).

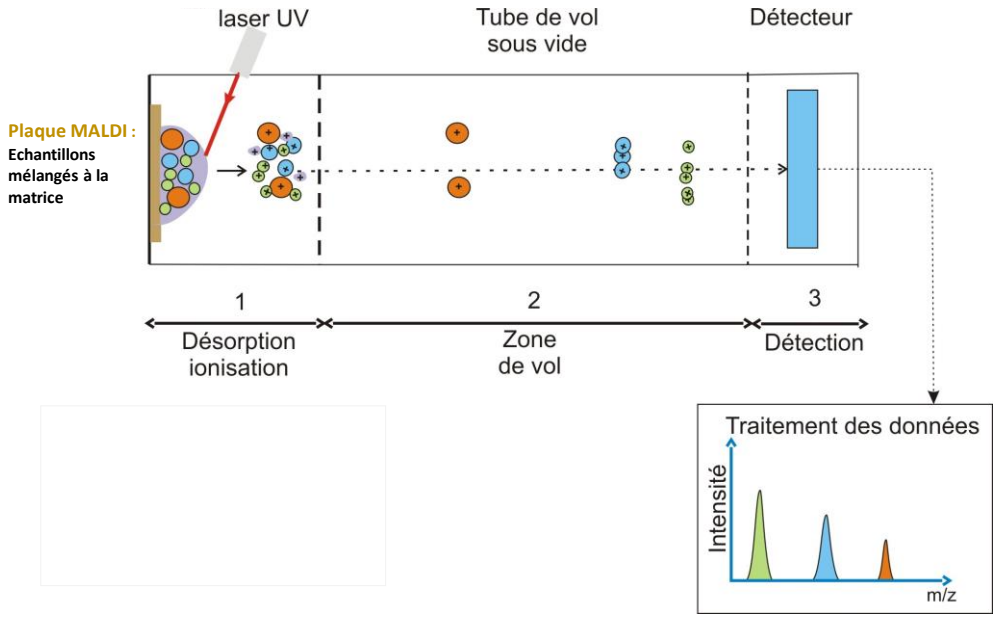


Figure 21. Schéma présentant un spectromètre de masse MALDI-TOF.
Sous l'effet d'un laser les molécules d'un échantillon co-cristallisés avec une matrice sont désorbées et ionisées. Elles sont ensuite séparées en fonction de leur rapport *m*/*z* puis visualisées au niveau du détecteur. http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/ressources/microbiologie/identification-de-micro-organismes-par-spectrometrie-de-masse-maldi-tof-ms

5.2. Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

Cette technique permet d'utiliser la chromatographie de partage sur colonne de phase inverse puis d'identifier et d'analyser tous les composants sortant de la colonne par un couplage avec un spectromètre de masse. Une chaine Ultimate 3000 micro-CLHP (Thermo Scientific) a été utilisée avec une colonne Zorbax 300 SB C18 (1mm x 150 mm, 3,5 µm, 300 Å) (Agilent Technologies) couplée un spectromètre de masse. Il s'agit d'un spectromètre par

ionisation par électronébulisation QSTAR PULSAR (Applied Biosystem) hybride constitué d'un quadripôle couplé à un temps de vol (ESI-qQ TOF). Après injection de l'échantillon (2 µL) sur la colonne, celle-ci est éluée par un gradient de 0 à 80 % ACN (v/v) dans 0,1 % AF en 60 min avec un débit de 40 $\mu L.min^{-1}$. Les composés sortant de la colonne ont été détectés à 226 nm et la source ESI a été utilisée en mode positif avec une tension de pulvérisation de 100eV.

IV. Méthodes de bio-informatique

1. Recherche et validation des amorces pour la PCR

Les différentes amorces utilisées lors de cette étude ont été analysées et validées par les programmes Primer3 Plus (https://primer3plus.com/) (Untergasser et al., 2012) et OligoAnalyzer (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer). Ces programmes permettent de déterminer la température de fusion (Tm) de chaque amorce, la probabilité de structure en épingle à cheveux, les dimères et les hétérodimères des amorces.

2. Recherche *in silico* de similarités de séquences

La présence de *halC8* et *halH4* et des protéines ProC8 et ProH4 a été recherchée parmi la base de données GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) en utilisant les algorithmes BLASTN, BLASTP (Altschul et al., 1990 ; Zhang et al., 2000) et TBLASTN (Gertz et al., 2006). BLASTN compare des séquences nucléotidiques entre elles. BLASTP compare des séquences protéiques entre elles, tandis que TBLASTN compare une séquence protéique contre une base de données de séquences nucléotidiques traduites en séquences protéiques. Les paramètres par défauts ont été utilisés pour les 3 algorithmes ainsi que la matrice BLOSUM 62 (Henikoff et Henikoff, 1992) pour les algorithmes BLASTP et TBLASTN. Le score va permettre d'évaluer la pertinence des résultats. Les scores obtenus sont égaux ou inférieurs à celui de la séquence d'intérêt et résultent des identités en acides aminés entre les 2 séquences mais également du taux de recouvrement des séquences comparées. Pour HalH4, les séquences de la base de données GenBank correspondent à la souche *Hfx. mediterranei* ATCC33500, et pas à la souche *Hfx. mediterranei* DSM1411 utilisée dans nos expériences au laboratoire. Ces 2 souches sont identiques à la souche isolée de la saline d'Alicante *Hfx. mediterranei* R4, qui a été déposée dans la collection américaine sous le numéro ATCC33500 et dans la collection européenne sous le numéro DSM1411.

3. Analyses des séquences protéiques

La recherche de phases ouvertes de lecture a été réalisée à l'aide du programme ORF finder (https://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html).

La recherche d'une séquence de peptide signal, qui permet l'adressage d'un peptide ou d'une protéine dans un compartiment cellulaire chez les archées a été réalisée par le programme signalP 5.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Armenteros et al., 2019 ;

Nielsen et al., 2019). Les structures secondaires des précurseurs ProC8 et ProH4 ont été recherchées avec le programme JPRED (http:// www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4) (Drozdetskiy et al., 2015).

La recherche de domaines conservés dans la séquence des protéines a été réalisée à l'aide du programme CDART (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi) (Geer et al., 2002), dans la base de données Pfam (https://pfam.xfam.org/) (El-Gebali et al., 2019) et dans la base de données de classification des familles de protéines InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/UniProt/Entry) (Mitchell et al., 2019). La recherche d'hélices transmembranaires a été réalisée à l'aide du programme TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) (Krogh et al., 2001).

4. Alignements multiples

Les alignements multiples des séquences nucléotidiques ont été générés grâce au logiciel Multalin (Corpet, 1988) (http///multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) en utilisant la matrice DNA-5-0. Les alignements multiples de séquences protéiques ont été réalisés grâce au logiciel ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) en utilisant les matrices Blosum62 et PAM250 (Dayhoff, et al., 1978). Les valeurs de pénalités pour un espace sont celles associées par défaut aux matrices.

5. Arbre phylogénétique

Les arbres phylogénétiques ont été réalisées grâce au programme Phylogeny avec une analyse à la carte (Dereeper et al., 2008) (https://www.phylogeny.fr/). Les alignements multiples ont été réalisés avec le logiciel Clustal W, les alignements multiples ont été affinés à l'aide du logiciel Gblocks (Castresana, 2000). Les arbres ont été construits par la méthode du " Neighbour joining " (Gascuel, 1997) avec un rééchantillonnage des données de 1000 et ont été dessinés à l'aide du logiciel TreeDyn (Chevenet, et al., 2006).

CHAPITRE 1

HalC8 est un peptide antimicrobien fréquemment rencontré chez les archées halophiles.

Comme nous l'avons vu précédemment, HalC8 est un peptide antimicrobien de 7,4 kDa produit par la souche *Natrinema* sp. AS7092 isolée du lac salé Chaidan en Chine (Li et al., 2003). Le gène *halC8* code un précurseur de 283 acides aminés nommée ProC8 (Figure 22). Ce dernier, après clivage puis maturation, *via* un mécanisme inconnu à ce jour, libère le peptide mature actif HalC8. Une protéine d'immunité HalI de 17,7 kDa, protégeant la souche productrice contre l'activité de HalC8, est également libérée, ainsi qu'un peptide signal de 40 acides aminés. Ce dernier possède, en région N-terminale, une séquence consensus typique d'un signal de sécrétion de type Tat (Twin arginine translocation) (Sun et al., 2005). La voie Tat permet la translocation de peptides et de protéines repliés à travers la membrane cytoplasmique, *via* la reconnaissance d'un motif Arg-Arg (Palmer et Berks, 2012).

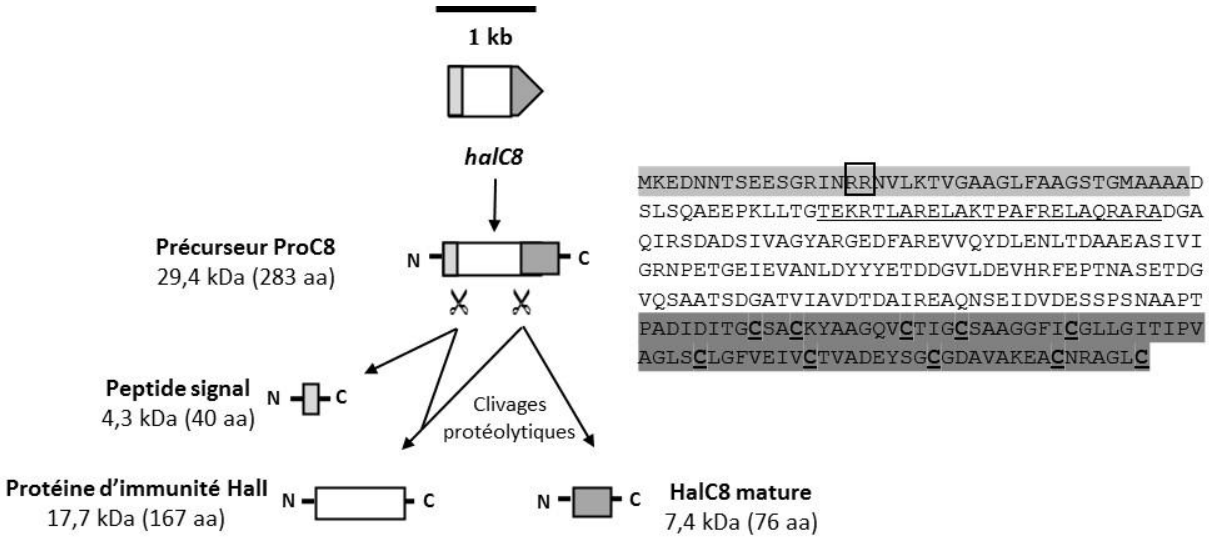


Figure 22. Clivage et maturation du précurseur ProC8 codé par le gène *halC8* chez la souche *Natrinema* sp. AS 7092.
ProC8 est constitué en partie N-terminale par un peptide signal, surligné en gris clair, comprenant une séquence Tat caractérisée par le motif Arg-Arg (entouré), puis par HalHI dont la région hélice1-boucle-hélice2 essentielle pour l'immunité est soulignée. Enfin, en partie C-terminale, la séquence de HalC8 mature est surlignée en gris foncé et les résidus de cystéine sont en gras et soulignés. D'après Besse et al., 2015.

Le précurseur ProC8 présente une structure originale puisque pour la première fois, la protéine d'immunité et le peptide antimicrobien sont codés par un seul et même gène *halC8.* Chez la plupart des PAMs de procaryotes, les bactériocines de la classe II des bactéries à Gram positif, les colicines à activité nucléasique et les microcines de classe 2 des bactéries à Gram

négatif, la protéine d'immunité et le peptide antimicrobien sont codés par différents gènes (Cascales et al., 2007 ; Oppegård et al., 2007 ; Vassiliadis et al., 2011 ; Perez et al., 2018).

Un groupe de gènes (Figure 23) pourrait être impliqué dans la production de HalC8. En effet, cinq gènes codant des protéines aux fonctions putatives de régulation et d'export ont été identifiés en amont et en aval du gène *halC8* (Mei et al., 2006). Cette organisation génétique n'a jamais été décrite précédemment pour une halocine, mais seulement dans la production de bactériocines, de colicines et de microcines (Cascales et al., 2007 ; Duquesne et al.,2007 ; Diep et al., 2009 ; Kuipers et al., 2011). En amont de *halC8*, on trouve le gène *halR*, qui possède des identités de séquence avec des gènes codant un régulateur transcriptionnel et le gène *halU,* qui code une protéine transmembranaire dont la fonction est inconnue (Mei et al., 2006). En aval de *halC8*, les gènes *halT1*, *halT2* et *halT3* codent des protéines qui pourraient être impliquées dans l'export de HalC8 *via* un système de transporteur ABC (Mei et al., 2006).

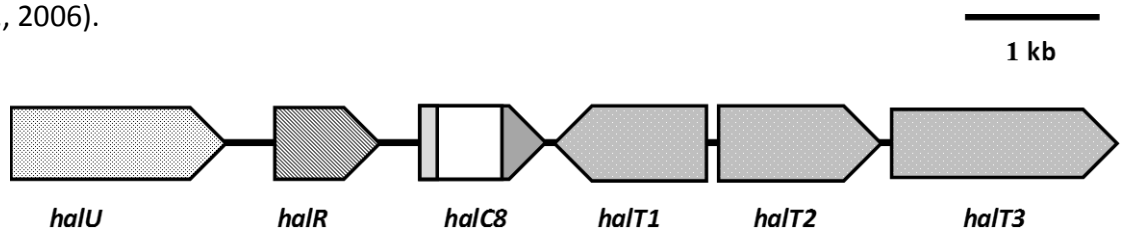


Figure 23. Organisation du groupe de gènes entourant le gène *halC8* chez la souche *Natrinema* sp. AS 7092 (GenBank, numéro d'accession DQ137141).
Le nom des gènes est écrit en dessous du gène. Le gène *halU* code une protéine dont la fonction est inconnue, *halR* code un putatif régulateur transcriptionnel, *halT1, halT2* et *halT3* coderaient des protéines impliquées dans l'export de HalC8.

De précédentes études ont montré que HalC8 était également produite par des souches d'archées d'origine algérienne de l'ordre des *Natrialbales* et de la famille des *Natrialbaceae*, appartenant toutes au genre *Natrinema* (Imadalou-Idres et al., 2013 ; Meknaci et al., 2014 ; Besse et al., 2015 ; Quadri et al., 2016).

Il nous a alors semblé intéressant d'étudier la présence du gène *halC8* codant ProC8 chez des archées halophiles dans différents milieux hypersalins et de déterminer si seules les archées du genre *Natrinema* produisaient cette halocine.

I. Recherche *in silico* de similarités de séquences du gène *halC8* et du précurseur ProC8

Afin de découvrir quelles souches produisent HalC8, des analyses *in silico* de recherche de similarités de séquences dans la base de données GenBank ont été réalisées, en utilisant soit la séquence nucléotidique de *halC8* (GenBank, numéro d'accession DQ137141) soit la

séquence en acides aminés du précurseur ProC8 (GenBank, numéro d'accession AAQ82548) provenant de la souche de *Natrinema* sp. AS7092.

En utilisant l'algorithme BLASTN, qui compare des séquences nucléotidiques entre elles, on observe que les souches de *Nnm. altunense* JCM12890, *Natrinema salaciae* DSM25055, *Natrinema* sp. SWI15, *Haloterrigena thermotolerans* DSM11552 et *Haloterrigena turkmenica* DSM5511 possèdent un gène *halC8* complet de 880 pb codant le précurseur ProC8.

Pour compléter l'étude, les algorithmes BLASTP et TBLASTN ont été utilisés à partir de la séquence en acides aminés du précurseur ProC8. Plusieurs précurseurs ProC8 ont été identifiés chez les genres *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax*, *Halobacterium* et 2 souches non affiliées (J07HX5 et J07HB67) isolées du lac Tyrrell en Australie (Podell et al., 2013). La séquence de ProC8 pouvant se subdiviser en 3 régions bien distinctes (peptide signal, HalI, et HalC8, Figure 22, page 50), des recherches *in silico* ont été à nouveau réalisées soit avec la séquence d'HalI soit avec la séquence de HalC8. Les résultats obtenus (Tableau 4) montrent qu'il existe clairement deux groupes de séquences. Les séquences issues des genres *Natrinema* et *Haloterrigena* présentent des similarités pour les séquences HalI et HalC8 (Tableau 4). Ces 2 genres phylogénétiquement très proches appartiennent à la famille des *Natrialbaceae* (Gupta et al., 2015). Par contre, les souches des genres *Haloferax* et *Halobacterium* présentent uniquement de fortes similarités de séquences pour HalC8, mais aucune pour HalI (Tableau 4). Ces deux derniers genres appartiennent respectivement aux familles des *Haloferaceae* et *Halobacteriaceae* (Gupta et al., 2016a).

Une nouvelle analyse de recherche de similarités *in silico* a été réalisée au cours de la rédaction de ce mémoire et a permis d'identifier de nouvelles séquences HalC8. Ainsi des séquences HalC8 avec un précurseur ProC8 d'une taille proche de celle de ProC8 provenant de la souche *Natrinema* sp. AS7092 (283 résidus) et la présence de 10 résidus de cystéine dans la séquence de HalC8 (Figure 22, page 50) ont été trouvées chez d'autres espèces d'archées de la classe des *Halobacteria*. Ainsi, une séquence HalC8 a été identifiée chez *Halococcus salifodinae* DSM8989 (GenBank numéro d'accession WP_161606962), *Halopiger goleimassiliensis* IIHH3 (GenBank numéro d'accession WP_049926653), *Halorussus amylolyticus* YC93 (GenBank numéro d'accession WP_132057731), *Halorussus salinus* YJ-37-H (GenBank numéro d'accession WP_135852295), *Halostella pelagica* DL-M4 (GenBank numéro d'accession WP_138798054), *Natronorubrum sediminis* CGMCC 1.8981 (GenBank numéro d'accession WP_175459731). De même on retrouve HalC8 chez des archées n'appartenant pas à la classe des *Halobacteria* : *Archaeoglobus fulgidus* VC-16 (GenBank numéro d'accession AAB89672), *Methanosarcina* sp. WWM596 (GenBank numéro d'accession WP_052722646) et *Methanosarcina mazei* ZM-15 (GenBank numéro d'accession WP_163645616). L'identification de ces nouvelles séquences étant récente, elles n'apparaitront pas dans la suite de l'étude.

Tableau 4. Recherche de similarités de séquences, à l'aide des algorithmes BLASTP ou TBLASTN, de la protéine d'immunité HalI et de HalC8 provenant de la souche *Natrinema* sp. AS7092.

Souche	Numéro d'accession	HalI			HalC8		
		score	Identité (%)	taux de recouvrement (%)	score	Identité (%)	taux de recouvrement (%)
Natrinema sp. AS7092	**AAQ82548**		**100**	**100**		**100**	**100**
Précurseur halocine C8[a] [*Natrinema* sp. SWI15]	AII25935	404	97	100	154	100	100
Précurseur halocine C8[a] [*Nnm. altunense* JCM12890]	ELY84479	343	99	87	153	100	100
Précurseur halocine C8[a] [*Natrinema* sp. SSI9]	AII25940	308	74	100	115	70	100
Précurseur halocine C8[a] [*Htg. salina* JCM13891]	ELZ21917	269	78	83	143	91	100
Précurseur halocine C8[a] [*Nnm. pellirubrum* JCM15624]	ELY70477	206	56	98	127	80	98
Gène hypothétique[b] [*Natrinema* sp. J7-2]	CP003412	184	85	53	142	95	100
Précurseur halocine C8[a] [*Nnm. gari* JCM14663]	WP_008456182	101	86	27	137	92	100
Protéine hypothétique[a] [*Htg. thermotolerans* DSM11552]	ELZ16389	81.6	41	65	65,5	49	98
Halocine C8 (TBD)[a] [*Hfx. gibbonsii* ATCC33959]	WP_004975848	ND	ND	ND	85,9	58	93
Halocine C8 (TBD)[a] [*Hfx. lucentense* DSM 14919]	WP_004064530	ND	ND	ND	85,9	58	93
Halocine C8 (TBD)[a] [*Hfx. alexandrinus* JCM10717]	ELZ89596	ND	ND	ND	85,9	58	93
Halocine C8 (TBD)[a] [*Hfx. volcanii* DS2]	ELY31431	ND	ND	ND	85,9	58	93
Gène hypothétique[b] [*Hfx. gibbonsii* ARA6]	CP011947	ND	ND	ND	85,5	58	93
Gène hypothétique, plasmide pHV4[b] [*Hfx. volcanii* DS2]	CP001955	ND	ND	ND	85,5	58	93
Gène hypothétique, mégaplasmide 2[b] [*Halobacterium* sp. GN101]	EU080936	ND	ND	ND	69,7	50	97
Protéine hypothétique J07HB67_00644[a] [archaéon halophilique J07HB67]	ERH11636	ND	ND	ND	57,8	41	97
Protéine hypothétique[a] [*Hfx. larsenii* JCM13917]	WP_007541953	ND	ND	ND	63,9	47	97
Protéine hypothétique[a] [*Hbt. salinarum* R1]	WP_012289233	52	33	41	52	38	98
Gène hypothétique, plasmide pNRC200[b] [*Hbt.* sp. NRC-1]	AE004437	52	33	41	43,5	40	96
Protéine hypothétique J07HX5_02037[a] [archaéon halophilique J07HX5]	ERG89865	ND	ND	ND	60,8	47	94

[a] BLASTP, [b] TBLASTN, ND : non détécté

II. Analyse par amplification PCR du gène *halC8*

Les analyses *in silico* ont révélé que *halC8* est bien conservé dans sa totalité au sein des génomes de *Natrinema* et d'*Haloterrigena.* Pour confirmer que *halC8* est une caractéristique constamment retrouvée parmi ces deux genres, nous avons analysé par amplification PCR les souches disponibles dans notre collection, commerciales ou non. Ainsi, deux couples d'amorces spécifiques ont été utilisés (Annexe 2), le premier amplifie une séquence complète de *halC8* (halC8-F/halC8-R) tandis que le second amplifie une séquence incomplète de *halC8* codant une large région HalI-HalC8 (halC8-Imm-F/halC8-Imm-R).

Avec le premier couple d'amorces (halC8-F/halC8-R) des amplicons de 1058 pb ont été obtenus chez les souches de *Nnm*. *altunense* JCM12890, *Nnm*. *ejinorense* DSM18194, *Nnm*. *salaciae* DSM25055, *Htg*. *jeotgali* DSM18794, *Htg*. *salina* JCM13891, *Htg*. *thermotolerans* DSM11552 et *Htg*. *turkmenica* DSM5511. Après clonage, les amplicons ont été séquencés puis les séquences nucléotidiques traduites. Pour *Nnm*. *altunense* JCM12890 la séquence de ProC8 obtenue lors de cette étude (KX382973) est identique à celle déposée dans GenBank (ELY84479). Par contre chez *Htg*. *salina* et *Htg*. *thermotolerans* les séquences de ProC8 obtenues lors de cette étude diffèrent de celles déposées dans GenBank. Ainsi, les séquences obtenues lors de cette étude sont nommées *Htg*. *salina*1 (KX382979) et *Htg*. *thermotolerans*1 (KX382978), tandis que *Htg*. *salina*2 (ELZ21917) et *Htg*. *thermotolerans*2 (WP_006648340) correspondent aux séquences issues de GenBank.

Avec le second couple d'amorces (halC8-Imm-F/halC8-Imm-R) des amplicons de 651 pb ont été obtenus avec toutes les souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* testées (Tableau 5). Ainsi, des amplifications du gène *halC8* ont été obtenues notamment chez *Nnm. ejinorense* DSM18194, *Nnm*. *pallidum* DSM15623, *Nnm. versiforme* DSM16034, *Htg*. *hispanica* DSM18328, *Htg*. *jeotgali* DSM18794, *Htg. limicola* JCM13563, *Htg*. *longa* JCM13562 et *Htg*. *saccharevitans* JCM12889, pour lesquelles l'analyse *in silico* de similarités de séquences ne révélait pas la présence de *halC8* ou de ProC8. (Tableau 5).

Le tableau 5 présente l'origine des différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* testées lors de cette étude et récapitule les résultats obtenus par la recherche *in silico* de similarités de séquences de ProC8 dans GenBank et les résultats des amplifications par PCR de *halC8* avec les amorces halC8-Imm-F/halC8-Imm-R.

Tableau 5. Origine des différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*, résultats des recherches *in silico* de similarités de séquences de *halC8* et ProC8 et de l'amplification de *halC8* par PCR avec les amorces halC8-Imm-F/halC8-Imm-R.

Souches	Origine	*halC8* et ProC8 *(in silico)*	*halC8* (PCR)
Htg. hispanica DSM18328	Espagne	-	+
Htg. jeotgali DSM18794	Corée	-	+
Htg. limicola JCM13563	Chine	-	+
Htg. longa JCM13562	Chine	-	+
Htg. saccharevitans JCM12889	Chine	-	+
Htg. salina JCM13891	Mongolie	+	+
Htg. thermotolerans DSM11552	Porto Rico	+	+
Htg. turkmenica DSM5511	Turkménistan	+	+
Nnm. altunense JCM12890	Chine	+	+
Nnm. ejinorense DSM18194	Mongolie	-	+
Nnm. gari JCM14663	Thaïlande	+	+
Nnm. pallidum DSM15623	Morue salée	-	+
Nnm. pellirubrum DSM15624	Cuir	+	+
Nnm. salaciae DSM25055	Italie	+	+
Nnm. versiforme DSM16034	Chine	-	+
Natrinema sp. SSI9	Algérie	+	+
Natrinema sp. SWI15	Algérie	+	+

Les recherches de similarités de séquences à partir de la base de données GenBank et les amplifications par PCR ont mis en évidence la présence du gène *halC8* parmi toutes les souches testées des genres *Natrinema* et d'*Haloterrigena*.

III. Alignement multiple et analyse phylogénétique de ProC8

A partir des souches identifiées lors de la recherche *in silico* de similarités de séquence du précurseur ProC8 et des amplifications par PCR de *halC8*, des alignements multiples des séquences de HalC8 et de la région peptide signal-HalI ont été réalisés à l'aide du programme Clustal W (Thompson et al., 1994). Pour HalC8, la séquence de l'halocine A4, isolée à partir d'une souche halophile TuA4 non identifiée (Shang et Levya, 2007) a été rajoutée en raison de l'homologie de sa séquence avec celle de HalC8 provenant de *Natrinema* sp. AS7092. L'alignement réalisé à partir des séquences en acides aminés de HalC8, provenant de souches de *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* et *Halobacterium*, montre une très forte similarité de séquences (Figure 24). Chez les séquences de HalC8 complètes, on remarque que la position de 10 résidus de cystéines est conservée, cet acide aminé pouvant être impliqué dans la formation de pont disulfure.



Figure 24. Alignement multiple, obtenu à l'aide du programme ClustalW, de la séquence en acides aminés de HalC8.

* Séquences identifiées lors de l'analyse *in silico* (GenBank), † séquences déterminées lors de cette étude. Les séquences de *Htg*. *hispanica*, *Nnm. pallidum* et *Nnm. versiforme* sont incomplètes car elles ont été obtenues avec les amorces (halC8-Imm-F/halC8-Imm-R) qui permettent seulement d'obtenir une amplification partielle de *halC8*. La séquence de l'halocine A4 provient de la souche TuA4 (Shand et Levya, 2007).

A chaque position, un surlignage noir indique les résidus présents dans toutes les séquences. Un surlignage gris indique les résidus présents dans une majorité des séquences ou appartement à une même catégorie, c'est-à-dire : acides aminés hydroxylés (S, T), aliphatiques (A, G, I, L, P, V), aromatiques (F, Y, W), acides (D, E) ou basiques (H, K, R).

L'alignement de la séquence N-terminale comprenant le peptide signal et HalI a été réalisée uniquement avec des séquences isolées chez des souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*. Celui-ci (Figure 25) montre un peptide signal avec une forte homologie de séquence. On retrouve le double motif d'arginine du signal Tat en position 16-17 chez toutes les séquences complètes et le triplet d'alanine localisé juste avant le site de clivage se retrouve chez pratiquement toutes les séquences complètes. Les régions de structure secondaire définies par Mei et al. (2008) sont également retrouvées dans les séquences de HalI (Figure 25), en particulier le motif hélice1-boucle-hélice 2 dont le rôle est essentiel à la fonction d'immunité de HalI vis-à-vis de HalC8. (Mei et al., 2008). Les hélices 3 et 4 de HalI sont également conservées chez toutes les séquences, mais ces 2 hélices ne semblent pas avoir de rôle dans la propriété d'immunité. (Mei et al., 2008).

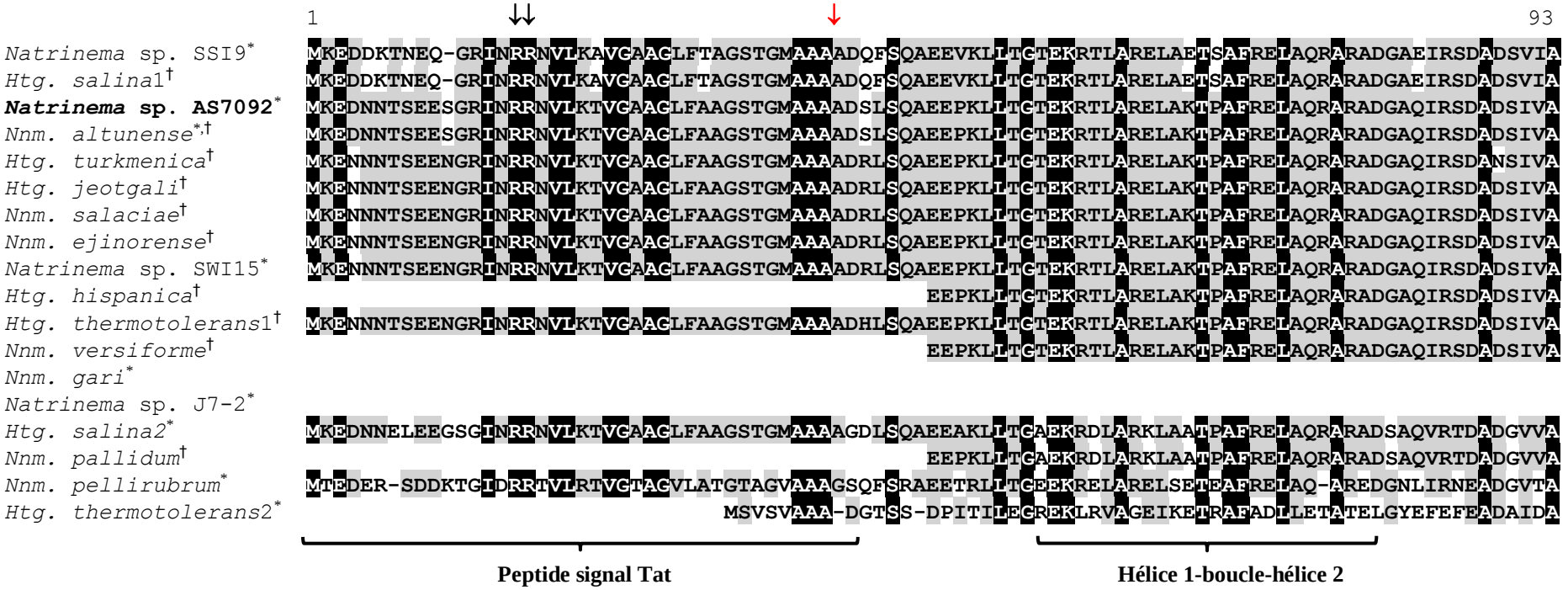


Figure 25. Alignement multiple, obtenu à l'aide du programme ClustalW, de la séquence en acides aminés du peptide signal et de la protéine d'immunité HalI chez les souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*.

* Séquences identifiées lors de l'analyse *in silico* (GenBank), † séquences déterminées lors de cette étude. Les séquences de *Htg*. *hispanica*, *Nnm. pallidum* et *Nnm. versiforme* sont incomplètes car elles ont été obtenues avec des amorces (halC8-Imm-F/halC8-Imm-R) qui permettent seulement d'obtenir une amplification partielle de *halC8*.

Les flèches noires indiquent le motif arginine-arginine caractéristique du peptide. La flèche rouge indique le site de clivage du peptide signal. Le peptide signal et les éléments de structure secondaire sont indiqués en dessous des séquences.

A chaque position, un surlignage noir indique les résidus présents dans toutes les séquences. Un surlignage gris indique les résidus présents dans une majorité des séquences ou appartement à une même catégorie, c'est-à-dire : acides aminés hydroxylés (S, T), aliphatiques (A, G, I, L, P, V), aromatiques (F, Y, W), acides (D, E) ou basiques (H, K, R).

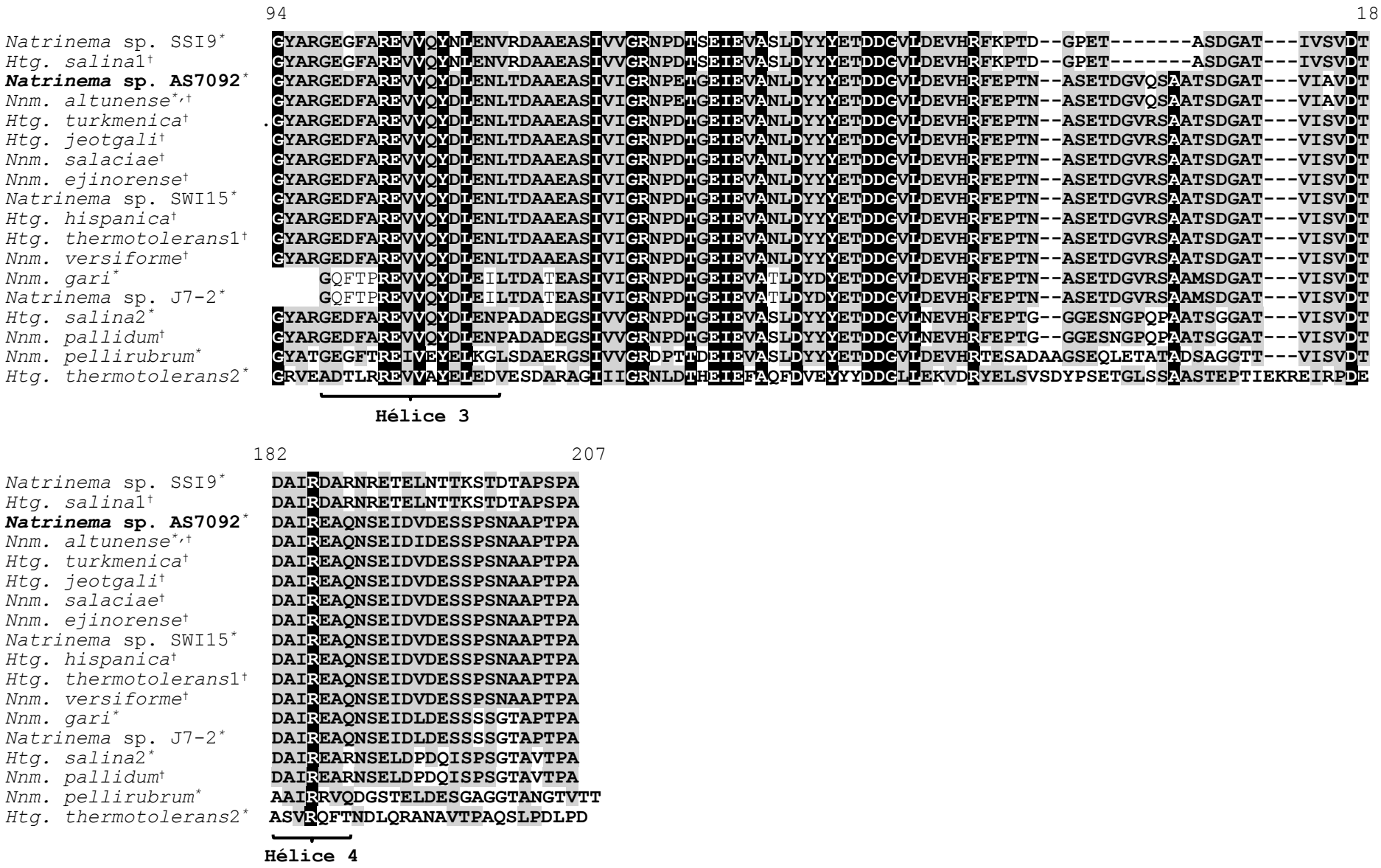


Figure 25 (suite)

A partir des alignements multiples de séquences, des arbres phylogénétiques ont été construits pour HalC8 et HalI. L'arbre phylogénétique correspondant aux séquences de HalC8 montre clairement l'existence de 2 clades (Figure 26). Le clade I est composé uniquement des séquences provenant des souches d'*Halobacterium*, *Hfx. larsenii* et *Htg*. *thermotolerans*2. Le clade II comprend les différentes séquences issues des souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* et comporte un sous clade comprenant les souches d'*Haloferax* à l'exception de celle de *Hfx. larsenii*. On remarque que les 2 séquences d'*Htg*. *salina* 1 et 2 appartiennent au clade II. Par contre, pour les séquences d'*Htg*. *thermotolerans*, celle d'*Htg*. *thermotolerans*1 appartient au clade II avec toutes autres séquences d'*Haloterrigena*, tandis que celle d'*Htg*. *thermotolerans2* se retrouve dans le clade I (Figure 26).

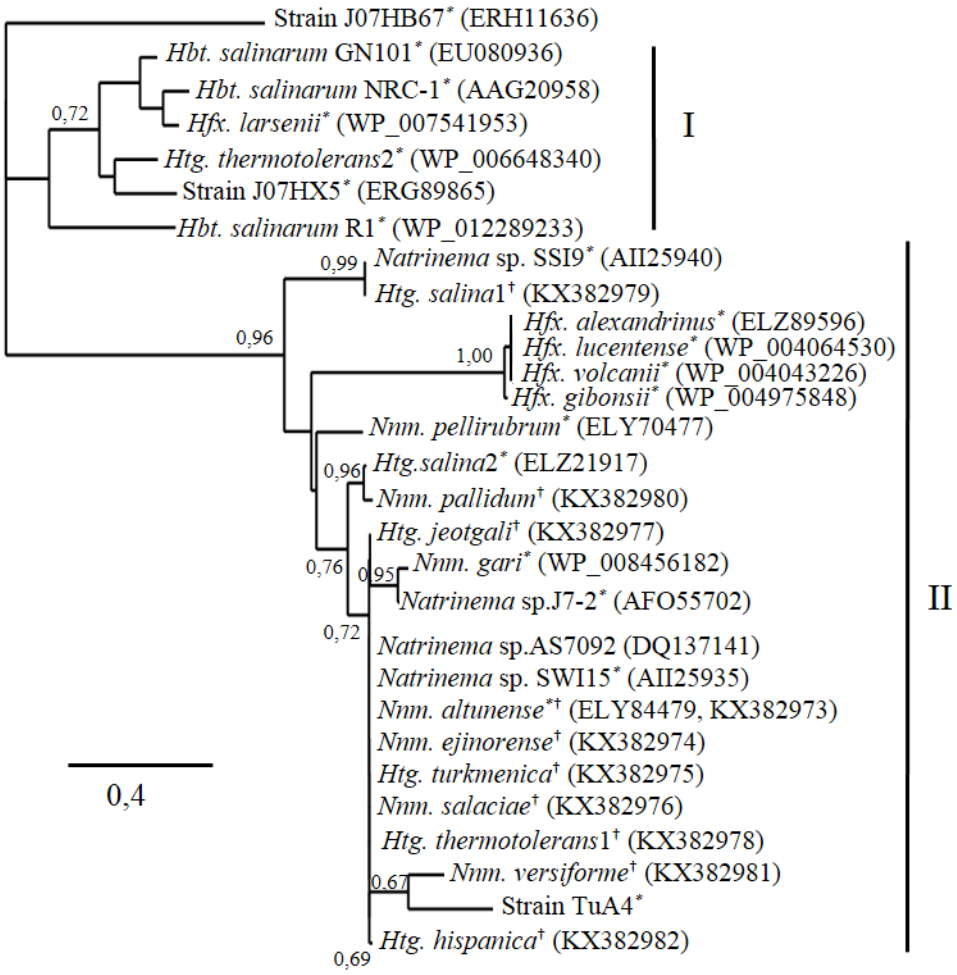
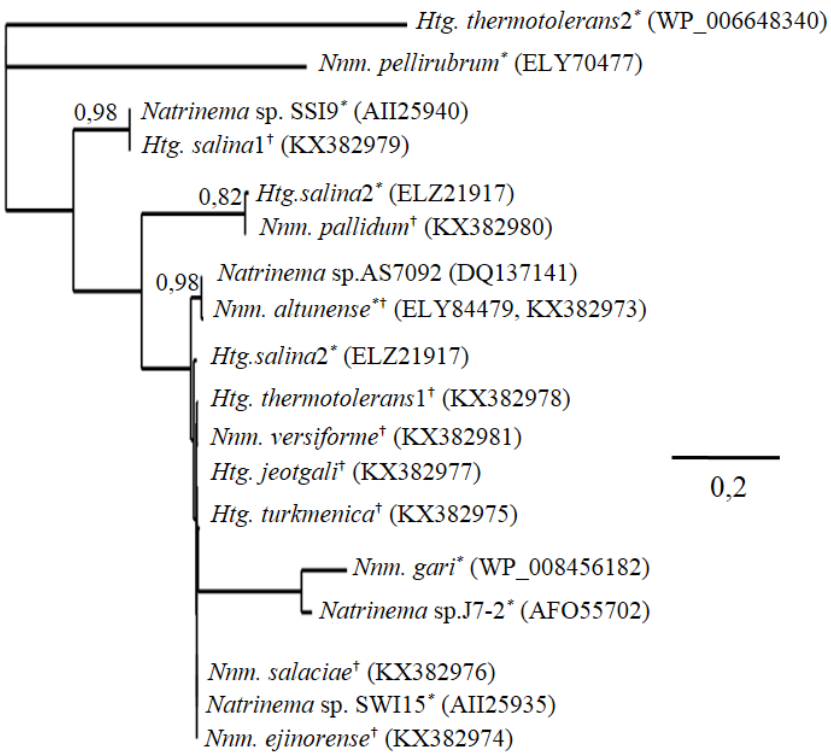


Figure 26. Arbre phylogénétique, obtenu par la méthode du " neighbour joining ", des séquences de HalC8.
L'échelle indique le nombre de substitution par site. * Séquences identifiées lors de la recherche *in silico* de similarités de séquences (GenBank), † séquences déterminées lors de cette étude. Les numéros d'accession des séquences sont indiqués entre parenthèses. L'arbre consensus a été construit par une répétition de 1000 échantillonnage et la proportion de boostrap supérieure à 60 % est indiquée au-dessus des branches.

L'arbre construit à partir de l'alignement des séquences d'HalI chez les souches provenant des différentes espèces de *Natrinema* et d'*Haloterrigena* (Figure 27) montre une très grande proximité des différentes séquences avec des fortes valeurs de bootstrap (> 82 %), à l'exception de la séquence provenant d'*Htg. thermotolerans*2 qui est la séquence la plus distante. Ceci confirme la divergence observée entre les 2 séquences d'*Htg*. *thermotolerans* (Figures 26 et 27).



igure 27. Arbre phylogénétique, obtenu par la méthode du " neighbour joining ", des séquences de HalI.
L'échelle indique le nombre de substitution par site. * Séquences identifiées lors de la recherche *in silico* de similarités de séquences (GenBank), † séquences déterminées lors de cette étude. Les numéros d'accession des séquences sont indiqués entre parenthèses. L'arbre consensus a été construit par une répétition de 1000 échantillonnage et la proportion de boostrap supérieure à 60 % est indiquée au-dessus des branches.

IV. Rôle putatif des protéines codées par les gènes entourant *halC8*

Nous avons vu qu'un groupe de gènes codant 5 protéines pourrait être impliqué dans la production de HalC8 chez *Natrinema* sp. AS7092 (Figure 23, page 51) (Mei et al., 2006). Avant de chercher si cette organisation est retrouvée chez toutes les souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*, une réévaluation du rôle des protéines codées par les gènes entourant *halC8* a été réalisé en recherchant d'éventuel domaines connus.

Le gène *halU* situé en amont de *halC8* code la protéine HalU de 534 résidus (UniProt numéro d'accession Q45FP0). Le programme TMHMM montre que HalU présente 12 hélices

transmembranaires délimitant 5 boucles extracellulaires et 7 boucles localisées dans le cytoplasme. Bien qu'aucun domaine ne soit identifié par le programme CDART dans les bases de données Pfam et InterPro, cette protéine appartiendrait à la super famille des facilitateurs (données UniProt) qui assurent l'import et l'export de différents composés de petite taille (Law et al., 2008). Cette famille de transporteurs est universellement présente dans les 3 domaines du vivant (Pao et al., 1998), certains étant impliqués dans la réponse au stress.

HalR est une protéine de 269 résidus (UniProt numéro d'accession Q4L1M4) homologue aux régulateurs transcriptionnels chez les archées halophiles. Elle possède entre les résidus 26 et 67 un domaine hélice-tour-hélice (HTH) liant l'ADN. Les régulateurs à domaine de liaison à l'ADN de type HTH sont avec les régulateurs à domaine de liaison de l'ADN de type RHH (ruban-hélice-hélice) l'un des deux groupes majoritaires de régulateurs transcriptionnels chez les archées mais aussi chez les bactéries (Aravind et al., 2005).

HalT1 dont le gène forme une unité de transcription dont le sens est opposé à celui des autres gènes (Figure 23, page 51) est une protéine de 322 résidus (UniProt numéro d'accession Q4LM3) présentant 6 hélices transmembranaires délimitant 3 boucles cytoplasmiques et 2 boucles dirigées vers le milieu extérieur. Elle présente entre les résidus 2 et 279 les caractéristiques des transporteurs de la famille AI-2E (autoinducer 2exporter). Chez les bactéries, ces protéines participent à l'efflux d'autoinducteurs du quorum sensing et peuvent être impliquées dans la formation de biofilm (Rettner et Saier Jr, 2010). HalT2 est une protéine périplasmique de 359 résidus (UniProt numéro d'accession Q45FN9) qui constituerait un des éléments du complexe transporteur ABC. Enfin, HalT3 est une protéine de 550 résidus (UniProt numéro d'accession Q45FN8) présentant 10 hélices transmembranaires. Elle présente deux domaines de transporteurs ABC de type 1 qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour permettre le transport de molécules (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Chez HalT3, ces domaines sont localisés dans les régions 91-299 et 391-550. Ces 2 régions présentent respectivement 5 et 4 hélices transmembranaires et 2 boucles cytoplasmiques (domaine de fixation du nucléotide ou NBD). Les domaines NBD se comportent comme une ATPase avec un site de liaison de l'ATP, localisée dans la seconde boucle cytoplasmique. Par contre aucun domaine à activité protéasique, responsable du clivage du précurseur, n'est retrouvé dans la région N-terminale de HalT3.

V. Organisation génétique du groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse de HalC8

Nous savons que le gène *hal C8* est retrouvé chez toutes les espèces des genres *Natrinema* et *Haloterrigena*. Nous avons alors recherché si le groupe de gènes qui a été décrit chez *Natrinema* sp. AS7092 se retrouvait chez ces 2 genres. Les phases ouvertes de lecture ont alors été étudiées pour les souches de *Natrinema* et *Haloterrigina* dont le génome est connu

et assemblé, afin de déterminer si les autres gènes *halU, halR, halT1, halT2* et *halT3* potentiellement impliqués dans la production de HalC8 sont également conservés.

Chez *Nnm. altunense*, *Nnm. pellirubrum, Nnm. gari, Natrinema* sp. J7-2, l'organisation génétique des gènes en amont et en aval de *halC8* présente de fortes similitudes avec celle observée chez *Natrinema* sp.AS7092 (Figure 28). Les gènes *halU*, *halR*, *halC8*, *halT1*, *halT2* et *halT3* sont retrouvés à l'exception de *halR* chez *Nnm*. *gari* et *Natrinema* sp. J7-2. D'autres gènes codant des protéines de type transporteurs ABC sont retrouvés en amont du groupe de gènes impliquées dans la biosynthèse de HalC8, chez *Nnm. altunense*, *Nnm. gari*, *Nnm. pellirubrum* et *Natrinema* sp. J7-2. Chez *Htg*. *salina*2 seuls *halU*, *halR*, *halC8* et *halT1* (Figure 28) ont été retrouvés. Cependant, chez cette souche, en amont du groupe de gènes, on observe 2 gènes similaire à *halT2* et *halT3*, codant 2 protéines impliquées dans le transport (ELZ21924 et ELZ 21923). Ces gènes pourraient jouer le rôle de *halT2* et *halT3* chez *Htg*. *salina*2, mais dans ce cas, les gènes codant des protéines impliquées dans le transport de HalC8 seraient situés dans 2 régions distinctes du groupe de gènes (Figure 28). La souche *Htg. thermotolerans*2 possède une organisation génétique très différente de celle observée chez *Natrinema* sp. AS7092 (Figure 28). Les gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3* sont absents. Cependant, des gènes codant des protéines transmembranaires (ELZ16388, ELZ16390 et ELZ16391) et des gènes codant des protéines de type transporteurs ABC (ELZ16392 et ELZ16393) ainsi qu'un gène impliqué dans la régulation similaire à *halR* (ELZ16394) ont été identifiés.

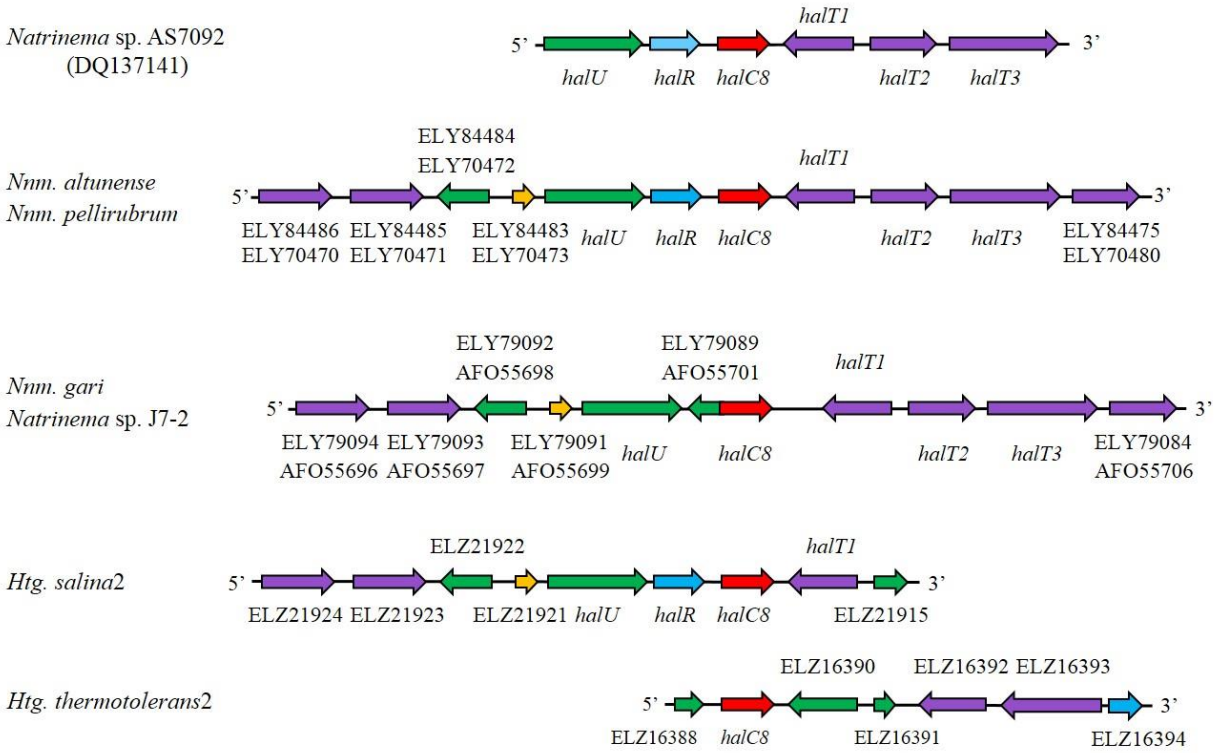


Figure 28. Organisation génétique des gènes entourant *halC8* chez des espèces de *Natrinema* et *Haloterrigena*.
Le nom des gènes et leur numéro d'accession sont indiqués en dessus ou en dessous des gènes. Les gènes *halC8* sont représentés par une flèche rouge, les gènes codant un régulateur

transcriptionnel sont représentés par une flèche bleue, les gènes codant des protéines de type transporteur ABC sont représentés par une flèche violette, les gènes codant une protéine dont la fonction est inconnue sont représentés par une flèche verte et les gènes impliqués dans la compétence sont représentés par une flèche jaune.

Pour les autres souches d'*Halobacterium* et les souches d'*Haloferax*, on ne retrouve pas les gènes rencontrés à proximité de *halC8* dans le groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse de HalC8 chez *Natrinema* sp. AS7092.

Afin de savoir, si les autres souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* possédant *halC8* (Tableau 5, page 55), présentent une organisation génétique conservée, des amorces spécifiques (Annexe 2) ont été dessinées pour amplifier *halU* (amorce halU-F/halU-R), *halR* (amorce halR-F/halR-R), *halT1* (amorces halT1-F/halT1-R), *halT2* (amorce haltT2-F/halT2-R) et *halT3* (amorces halT3-F/halT3-R). Ces amorces ont été choisies en se basant sur l'alignement des séquences des différents gènes chez *Natrinema* sp. AS7092, *Nnm. altunense* JCM12890, *Nnm. gari* DSM14663, *Natrinema* sp. J7-2, *Nnm. pellirubrum* DSM15624 et *Htg. salina* JCM13891 (Figure 28). La souche de *Nnm*. *altunense* JCM12890 nous a servi de souche référence pour valider ces différents couples d'amorces. Chez cette souche, aucune amplification n'a été obtenue pour le gène *halT1*. Les résultats concernant les amplifications des 4 autres gènes *halU*, *halR*, *halT2* et *HalT3* sont portés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Amplification par PCR des gènes *halU* (amorces halU-F/halU-R), *halR* (amorces halR-F/halR-R), *halT2* (amorces haltT2-F/halT2-R) et *halT3* (amorces halT3-F/halT3-R) chez différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*.

Souches	Amplification des gènes par PCR			
	halU	*halR*	*halT2*	*halT3*
Htg. hispanica DSM18328	-	-	+	+
Htg. jeogali DSM18794	-	-	+	+
Htg. limicola JCM13563	+	-	+	+
Htg. longa JCM13562	+	-	+	+
Htg. saccharevitans JCM12889	-	-	+	-
Htg. salina JCM13891	+	+	+	+
Htg. thermotoleran s DSM11552	+	-	+	+
Htg. turkmenica DSM5511	+	+	+	+
Nnm. altunense JCM12890*	+	+	+	+
Nnm. ejinorense DSM18194	+	-	+	+
Nnm. gari JCM14663	-	-	+	+
Nnm. pallidum DSM15623	+	-	+	+
Nnm. pellirubrum DSM15624	+	+	+	+
Nnm. salaciae DSM25055	-	-	+	+
Nnm. versiforme DSM16034	+	-	+	+
Natrinema sp. SWI15	-	-	+	+

* souche ayant servi à valider les amorces

L'amplification par PCR de *halU*, *halR*, *halT2* et *halT3* montre seulement la présence de ces 4 gènes chez *Nnm*. *altunense* JCM12890 (souche référence), *Nnm*. *pellirubrum* DSM15624, *Htg*. *salina* JCM13891 et *Htg*. *turkmenica* DSM5511. Chez les 3 premières souches, l'organisation génétique du groupe de gènes était connue (Figure 28, page 63) et donc ce résultat était attendu. Chez la souche d'*Htg*. *turkmenica* DSM5551 l'amplification de *halU*, *halR*, *halT2* et *halT3* n'implique pas que ces gènes soient à proximité de *halC8*, comme c'est d'ailleurs le cas chez *Htg*. *salina*2 et *Htg*. *thermotolerans*2 (Figure 28, page 63). Le gène *halU* qui code une protéine transmembranaire, a été amplifié chez toutes les souches à l'exception de *Nnm. gari* JCM14663, *Nnm. salaciae* DSM25055, *Natrinema* sp. SWI15, *Htg. hispanica* DSM18328, *Htg. Jeotgali* DSM18791 et *Htg. saccharevitans* JCM12889. L'absence d'amplicons chez ces souches n'entraine pas nécessairement que le gène *halU* n'existe pas chez ces souches, d'ailleurs dans le groupe de gènes entourant *halC8*, on retrouve *halU* chez *Nnm. gari* JCM14663 (Figure 28, page 63). Le gène *halR* n'est que très rarement amplifié, on le retrouve uniquement chez les 4 souches où les 4 gènes *halU*, *halR*, *halT2* et *halT3* ont été amplifiés. Les gènes *halT2* et *halT3* qui codent des protéines probablement impliquées dans le transport sont retrouvés chez la totalité des souches testées à l'exception de *Htg. saccherivitans* JCM12889, où *halT3* n'a pas pu être amplifié.

Contrairement à *halR,* les gènes *halU*, *halT2* et *halT3* ont été amplifiés chez de nombreuses souches des genres *Natrinema* et *Haloterrigena* (Tableau 6).

VI. Expression de HalC8 et activité antimicrobienne

La plupart des souches de *Natrinema* et d'*Haloterrigena* à notre disposition présente en plus du gène codant le précurseur ProC8, des gènes codant un régulateur et des gènes codant des protéines qui pourraient être impliquées dans l'export de HalC8 vers le milieu extérieur (Figure 28, page 63 ; Tableau 6 page 64). De façon à vérifier que *halC8* est bien transcrit, l'ARN de ces souches a été extrait en fin de croissance exponentielle (Besse et al, 2015) puis analysé après RT-PCR avec le couple d'amorces préalablement utilisé (halC8-Imm-F/halC8-Imm-R). En parallèle, des tests antimicrobiens, par la méthode de diffusion en milieu gélosé, ont été réalisés pour détecter une activité liée à la production de HalC8. Chez toutes les souches testées, un ADNc donc une rétrotranscription de *halC8* a été détecté.

Pour déterminer si ces souches produisent effectivement au moins une molécule antimicrobienne, des surnageants de culture en fin de phase exponentielle ont été récupérés pour toutes les souches de *Natrinema* et d'*Haloterrigena*. Il est connu que HalC8 est un peptide résistant au traitement par la chaleur (Li et al., 2003), c'est pourquoi les surnageants avant d'être déposés dans des boites de Pétri ont été portés à ébullition et filtrés. L'ébullition permet d'éliminer une activité liée à la production éventuelle d'une deuxième halocine de masse moléculaire élevée. La filtration (0,22 µm) permet d'éliminer une éventuelle activité

d'origine virale. Trois souches cibles ont été utilisées : *Hrr. chaoviator* ETR14, *Hbt*. *salinarum* DSM3754 et *Hrr*. *chaoviator* ETD3 (Tableau 7). La souche d'*Hrr*. *chaoviator* ETD3 se révèle la plus sensible permettant la détection d'une activité antimicrobienne chez toutes les souches testées.

Tableau 7. Activité antimicrobienne des surnageants bouillis et filtrés de cultures de différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* sur 3 souches cibles.

Souche	Halo d'inhibition en mm sur 3 souches cibles		
	Hrr.chaoviator ETR14	*Hbt. salinarum* DSM 3754	*Hrr. chaoviator* ETD3
Htg. hispanica DSM18328	0	0	17
Htg. jeotgali DSM18794	0	0	15
Htg. limicola JCM13553	0	0	30
Htg. longa JCM13552	0	13	32
Htg. saccharevitans JCM12889	0	0	29
Htg. salina JCM13891	24	25	37
Htg. thermotolerans DSM11552	0	0	42
Htg. turkmenica DSM5511	0	0	30
Ntm. altunense JCM12890	26	44	53
Nnm. ejinorense DSM18194	0	15	24
Nnm. gari JCM14663	0	28	30
Nnm. pallidum DSM 15623	19	16	31
Nnm. pellirubrum DSM15624	0	16	21
Nnm. salaciae DSM25055	19	35	45
Nnm. versiforme DSM16034	24	27	46
Natrinema sp. SSI9	20	27	40
Natrinema sp. SWI15	24	20	30

La figure 29 illustre l'activité antimicrobienne en milieu gélosé contre la souche cible d'*Hrr*. *chaoviator* ETD3 de différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*.

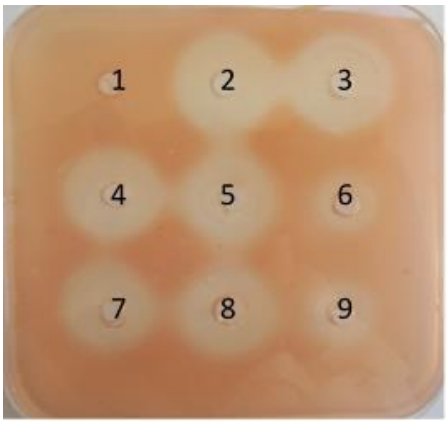


Figure 29. Test antimicrobien des surnageants de cultures bouillis et filtrés contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETD3.
1 : Milieu de culture M372, 2 : *Nnm*. *pallidum* DSM15623, 3 : *Htg*. *limicola* JCM13563, 4 : *Htg*. *salina* JCM13891, 5 : *Nnm*. *ejinorense* DSM18194, 6 : *Htg*. *jeotgali* DSM18794, 7 : *Htg*. *turkmenica* DSM5511, 8 : *Natrinema* sp. SWI15, 9 : *Htg*. *hispanica* DSM18328.

VII. Purification de HalC8

Pour confirmer que l'activité antimicrobienne thermorésistante sur les souches *Hrr. chaoviator* ETD3, ETR14 et *Hbt. salinarum* DSM3754 est due à la production de HalC8, le peptide mature a été recherché dans des cultures de *Natrinema* SWI15 et *Nnm. altunense* JCM12890. Ces souches ont été choisies en raison de leur forte activité antimicrobienne, notamment sur la souche cible *Hrr. chaoviator* ETD3 (Tableau 7, page 66). Pour commencer nous avons fractionné le surnageant d'une culture liquide de *Natrinema* sp. SWI15 sur une cartouche Sep-Pak® C8. La fraction éluant à 80 % d'ACN, présentant l'activité antimicrobienne la plus élevée a été fractionnée par CLHP en phase inverse sur une colonne Uptisphere® C4. Les fractions obtenues ont été testées sur *Hrr. chaoviator* ETD3 et la fraction présentant la plus forte activité a été à nouveau fractionnée sur la même colonne. L'activité antimicrobienne contre *Hrr chaoviator* ETD3 a été testée avec les fractions du pic majoritaire éluant entre 16 et 17 min. Les fractions présentant une activité antimicrobienne ont été analysées en spectrométrie MALDI-TOF. Un ion $[M+H]^+$ à m/z de 7443,91 Da a été détecté (Figure 30). La masse mesurée correspond approximativement à la masse théorique d'après la séquence en acides aminés de HalC8 (7441,63 Da).

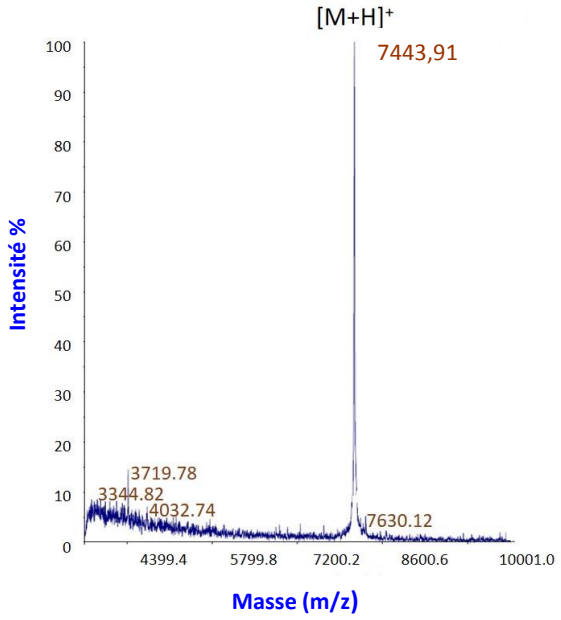


Figure 30. Spectre MALDI-TOF de la fraction la plus active contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETD3.
Cette fraction a été obtenue après chromatographie sur colonne Uptisphere® C4 d'une fraction purifiée à partir du surnageant d'une culture liquide de la souche *Natrinema* sp. SWI15.

Ce résultat s'étant révélé non reproductible, nous avons tenté une autre méthode de purification en utilisant la souche de *Nnm. altunense* JCM12890 cultivée en milieu solide (Meknaci et al., 2014). HalC8 a été isolée à partir des boîtes de Pétri par extraction méthanolique des protéines et peptides de la gélose. Ensuite, la fraction active éluée d'une

cartouche de Sep-Pak® C8 à 80 % ACN a été analysée par LC-MS avec un spectromètre de masse ESI-qQ-TOF. Cette méthode permet de détecter précisément dans l'échantillon la masse recherchée. A la sortie du chromatographe à la 52ème min, 2 pics ont été détectés sur le spectromètre de masse. Le premier présente un *m/z* de 1487,3526 et correspond à l'ion $[M+5H]^{5+}$ et le second présente un *m/z* de 1858,9384 et correspond à un ion $[M+4H]^{4+}$ (Figure 31). Ces rapports m/z ont permis de déterminer une masse de 7431,752 ± 0,011 Da. La masse mesurée en ESI-qQ TOF révèle donc la perte de 10 Da par rapport à la masse théorique calculée avec 10 cystéines (7441,63 Da). Ce résultat montre clairement que les 10 résidus de cystéine retrouvés en position conservée dans les différentes séquences de HalC8 (Figure 24, page 56) sont en fait impliqués dans la formation de 5 ponts disulfure, chacune des 10 cystéines perdant un hydrogène lors de la formation des 5 ponts disulfure.

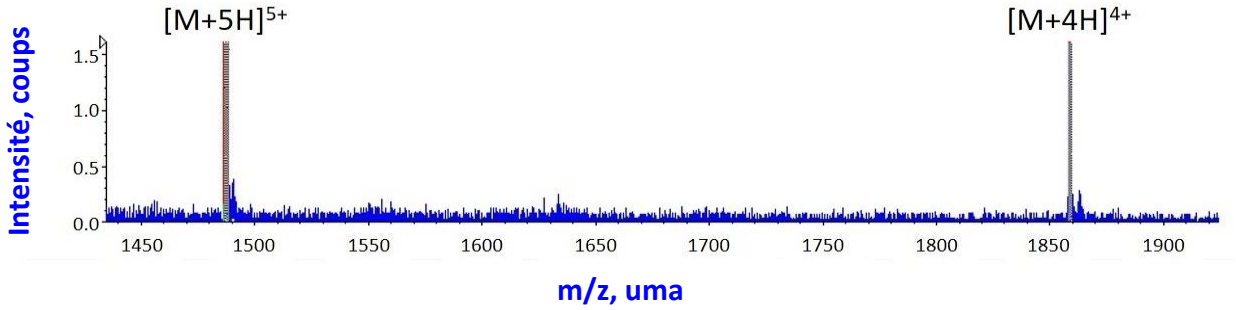


Figure 31. Spectre ESI-qQ TOF de la fraction éluant à la 52ème min sur la colonne Zorbax 300 SB 18.
L'extrait injecté sur la colonne provient de la purification d'une culture en phase solide de *Nnm. altunense* JCM12890 purifiée sur cartouche de de Sep-Pak® C8.

VIII. Résultats complémentaires : spectre d'activité de HalC8

Les résultats obtenus lors de l'isolement de HalC8 chez *Natrinema* sp. AS7092 (Li et al., 2003) montrent que cette halocine possède un large spectre d'activité sur de nombreuses archées halophiles comme *Haloarcula hispanica* ATCC33960, *Hbt*. *salinarum* ATCC33170, *Halococcus morrhuae* DSM1309, *Hfx denitrificans* ATCC35960, *Hfx. gibbonsii* ATCC33959, *Hfx. volcanii* ATCC 29605, *Hrr. sacccharovorum* ATCC29252, *Hrr. trapanicum* JCM9743 et *Htg. turkmenica* DSM5511. Aucune activité n'avait été détectée contre la souche de *Nnm. versiforme* JCM10478, ce qui s'explique par la présence de la protéine d'immunité HalI chez cette souche (Tableau 5 page 55 ; Figure 25, pages 58-59). HalC8 présente également une activité contre des archées alcalophiles comme *Natrialba magadii* NCMB2190, *Natronobacterium gregoryi* NCMB32189 et *Natronomas pharaonis* DSM2160 (Li et al., 2003).

Pour savoir si le spectre d'activité de HalC8 est restreint aux archées halophiles, nous avons testé des surnageant de culture bouilli et filtré de *Nnm. altunense* JCM12890 et *Natrinema* sp. SWI15 contre deux souches de bactéries halophiles extrêmes, comme *S. ruber*

DSM13855 (Antón et al., 2002) abondante dans les milieux hypersalins (Antón et al., 2008 ; Fernández et al., 2014 ; Ventosa et al., 2014) et *Lentibacillus halophilus* DSM19123 (Tanasupawat et al., 2006), et quatre souches de bactéries halophiles modérées, comme *Halomonas sabkhae* DSM19122 (Kharroub et al., 2208), *Nesterenkonia halophila* DSM16378 (Li et al., 2008), *Oceanobacillus kapialis* DSM23158 (Namwong et al., 2009) et *Salinicoccus siamensis* DSM21576 (Pakdeeto et al., 2007). Les surnageants de *Nnm*. *altunense* DSM12890 et *Natrinema* sp. SWI15 présentent une activité antimicrobienne contre *S. ruber* DSM13855 avec des halos d'inhibition, respectivement de 25 et 15 mm. *S. ruber* est l'une des seules bactéries halophiles extrêmes dont l'adaptation à la salinité implique, comme chez les archées halophiles extrêmes, une accumulation intracellulaire de KCl et son protéome est extrêmement acide (Oren 2013).

Afin de vérifier si cette activité est réellement due à HalC8, des tests antimicrobiens devront être de nouveau réalisés contre *S. ruber* en utilisant HalC8 purifiée.

IX. Discussion

Dans l'introduction, nous avons vu qu'il existait peu de données concernant la biosynthèse et la production d'halocine chez les différentes espèces d'archées halophiles. HalC8 est synthétisée sous forme d'un précurseur ProC8 comprenant 3 régions, un peptide signal Tat, une protéine d'immunité HalI et l'halocine mature. Des analyses de recherches de similarités de séquences du précurseur ProC8 montrent que celui-ci est retrouvé chez les genres *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* et *Halobacterium* (Tableau 4, page 53). Notre récente recherche de similarités de séquences *in silico* a montré que la séquence de HalC8 était également retrouvée chez d'autres genres d'archées halophiles de la classe des *Halobacteria* comme *Halococcus*, *Halopiger*, *Halorussus*, *Halostella* et *Natronorubrum*. Ainsi HalC8 serait retrouvée chez des genres appartenant aux 3 ordres des *Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales,* avec une large représentation des archées de la famille des *Natrialbaceae* (*Natrinema*, *Haloterrigena*, mais aussi *Halopiger* et *Natronorubrum*). HalC8 est également retrouvée chez des souches d'archées méthanogènes anaérobies du genre *Methanosarcina* appartenant à la classe des *Methanomicrobia* et à la famille des *Methanosarcinaceae*. Les espèces du genre *Methanosarcina* sont des halophiles faibles dont la croissance nécessite 3 à 60 $g.L^{-1}$ NaCl (Sowers et al., 1993). De même, une séquence de HalC8 est également retrouvée chez plusieurs souches d'*Archeoglobus fulgidus* appartenant à la classe des *Archaeoglobi* et à la famille des *Archaeaglobaceae*. Les archées du genre *Archaeoglobus* se retrouve dans les évents hydrothermaux et les gisements pétroliers. Elles sont hyperthermophiles, sulfato-réductrices et très faiblement halophiles avec un optimum de croissance à 20 $g.L^{-1}$ NaCl (Klenk et al, 1997 ; Birkeland et al, 2017). Toutes les archées possédant un gène *halC8* appartiennent aux classes des *Halobacteria, Methanomicrobia* et

Archaeoglobi qui se répartissent dans un même cluster du phylum des *Euryarchaeota* (Hug et al, 2016 ; Baker et al 2020). Nos résultats montrent également une vaste distribution de HalC8 chez des archées d'origine géographique très diverse (Algérie, Asie, Australie, Europe, Porto-Rico et USA) et de lieux d'isolement variés (aliments fermentés, fosse abyssale, lacs salé, mines, salines et sols). Nos résultats sur la large distribution de HalC8 parmi les archées ont été confirmés par la recherche de systèmes toxiques dans les génomes d'archées (Marakova et al. 2019).

Chez les souches des genres *Natrinema* et *Haloterrigena*, deux genres phylogénétiquement très proches, les séquences de la région N-terminale du précurseur ProC8, contenant la protéine d'immunité HalI et de la région C-terminale, correspondant à HalC8, sont extrêmement conservées. Chez les souches d'*Haloferax* et d'*Halobacterium*, seule la région C-terminale présente une conservation au niveau de la séquence en acides aminés de HalC8. Par contre, la région N-terminale présente une variabilité de séquence qui ne nous permet pas de retrouver la protéine d'immunité HalI typique de celle observée chez les souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* (Figure 25, pages 58-59).

Des amplifications par PCR de *halC8* ont permis de confirmer que ce gène est systématiquement retrouvé chez toutes les souches testées de *Natrinema* et *Haloterrigena* (Tableau 5, page 55). HalC8 a été isolée pour la première fois dans le lac salé Chaidan en Chine (Li et al.2003, puis chez différentes souches de *Natrinema* originaires d'Algérie (Imadalou-Idres et al., 13 ; Meknaci et al., 2014 ; Besse et al., 2015 ; Quadri et al., 2016). Une analyse phylogénétique basée sur les séquences en acides aminés de HalC8 des différentes souches a révélé que ces différentes séquences de HalC8 appartiennent à deux clades distincts (figure 26, page 60).

Chez la souche de *Natrinema* sp. AS7092 où l'halocine a été isolée pour la première fois, le gène *halC8* est entouré de gènes aux fonctions putatives (Figure 23, page 51). Chez les souches *Nnm altunense* JCM12890, *Nnm gari* JCM14663, *Natrinema* sp. J7-2, *Nnm pellirubrum* DSM15634 et *Htg salina* JCM13891, les gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3,* putativement impliqués dans les mécanismes d'export et de régulation de HalC8 ont également été retrouvés, avec une organisation similaire à celle de *Natrinema* sp.AS7092 (Figure 28, page 63). Chez les autres souches de *Natrinema* et *Haloterrigena*, nous n'avons pas pu prouver la présence de ces gènes car les génomes sont incomplets. Des amplifications par PCR ont permis de détecter *halU*, *halT2* et *halT3* dans de nombreuses souches testées de *Natrinema* et *Haloterrigena* (Tableau 6, page 64), sans pouvoir prouver que ces gènes soient proches de *halC8*. Ces gènes pourraient jouer un rôle dans la biosynthèse et la régulation de HalC8. Le gène *halU* codant une protéine transmembranaire, a été largement retrouvé chez différentes espèces de *Natrinema* et *Haloterrigena*, mais jusqu'à présent le rôle de HalU dans la biosynthèse de HalC8 est toujours inconnu. Par contre, le gène *halR,* qui pourrait être impliqué

dans la régulation transcriptionnelle de HalC8, n'est que très rarement amplifié chez les différentes souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* (*Nnm*. *altunense* JCM12890, *Nnm pellirubrum* DSM15624, *Htg. salina* JCM12889 et *Htg*. *turkmenica* DSM5511). Ceci implique que soit la séquence nucléotidique de *halR* est peu conservée, soit qu'un autre mécanisme de régulation pourrait exister chez les autres souches testées. Chez les différentes espèces de *Natrinema* et *Haloterrigena*, HalT2/HalT3 pourrait constituer un transporteur ABC et sa protéine accessoire que l'on retrouve dans l'export de nombreux peptides antimicrobiens en particulier les microcines (Duquesne et al., 2007 ; Vassiliadis et al, 2011). Les transporteurs ABC sont présents dans les trois domaines d'organismes vivants (Higgins, 1992) et il a été identifié de nombreux transporteurs de ce type dans les génomes des archées halophiles. Par contre, contrairement à certains transporteurs ABC, on ne retrouve pas en région N-terminale de HalT3, un domaine protéasique (Franke et al., 1999). Ceci implique nécessairement que la maturation de ProC8 ne serait pas réalisée lors de son export vers le milieu extérieur. Enfin, l'implication de HalT1, dont le gène est localisé sur une unité de transcription en sens inverse à celle contenant *halT2* et *halT3*, dans l'export de HalC8 reste à démontrer.

Toutes les souches de *Natrinema* et d'*Haloterrigena* testées expriment *halC8* et montrent une activité antimicrobienne importante contre les souches cibles, probablement due à HalC8. En outre, HalC8 présente un large spectre d'activité sur les archées halophiles extrêmes (Li et al., 2003) ainsi que sur *S. ruber*, une bactérie halophile extrême. On observe ainsi pour HalC8, une activité antimicrobienne interdomaine, phénomène rarement observé (Atanasova et al., 2013). Par ailleurs, il a été montré dans une précédente étude que parmi les souches isolées de la saline d'Ichekaben en Algérie, la souche *Natrinema* sp. SWI15 présente une activité antimicrobienne contre la souche *Natrinema* sp. SSI9, et vice-versa (Imadalou-Idres et al., 2013). Nos recherches *in silico* de similarités de séquences ont montré que ces 2 souches possédaient un gène codant ProC8, mais qu'il y avait néanmoins 15 substitutions d'acides aminés au niveau de la séquence de HalC8 (Figure 24, page 56). Si l'on compare leurs séquences de HalI (Figure 25, pages 58-59), la région hélice 1-boucle-hélice2, impliquée dans l'interaction de HalI avec HalC8 est bien conservée, mais on observe 7 gaps dans la séquence de HalI chez *Natrinema* sp. SSI9 et 9 substitutions d'acides aminés dans la région C-terminale de HalI. Cette région ne semble pas spécialement impliquée dans l'immunité de HalI (Mei et al., 2008) mais pourrait en ce qui concerne HalC8 chez les souches *Natrinema* sp. SSI9 et *Natrinema* sp. SWI15 expliquer leurs activités croisées. Par ailleurs, ces 2 souches de *Natrinema* appartiennent à 2 clades différents, tels que démontré par notre analyse phylogénétique, aussi bien pour HalC8 que pour HalI (Figures 26 et 27, pages 60-61). Enfin, on observe que les séquences en acides aminés de HalI-HalC8 de *Natrinema* sp. SSI9 et de *Htg*. *salina*1 JCM13891 sont totalement identiques (Figures 24, page 56 ; Figure 25, pages 58-59), ce qui voudrait dire que la souche *Natrinema* sp. SSI9 pourrait en fait être affiliée à l'espèce *Htg*. *salina*, mais des études taxonomiques plus poussées seraient nécessaires pour conclure.

La purification de HalC8 à partir de *Nnm*. *altunense* JCM 12890 a permis de mesurer la masse exacte de l'halocine secrétée. Cette masse, différant de 10 Da de la masse calculée à partir de la séquence en acides aminés, montre que les 10 résidus de cystéine qui se trouvent à des positions conservées dans la séquence de HalC8 (Figure 24, page 56) sont impliqués dans la formation de 5 ponts disulfure. Un tel nombre de ponts disulfures dans un peptide de 76 résidus explique sa très grande stabilité, sa résistance à la chaleur (1 h à 100 °C) et la conservation de son activité antimicrobienne lorsque la concentration en NaCl du milieu diminue (Li et al., 2003).

La majorité des résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l'objet d'une publication intitulée « Halocin C8, an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera *Natrinema , Haloterrigena* , *Haloferax* and *Halobacterium* » dans la revue Extremophiles (Annexe 5).

CHAPITRE 2

HalH4 est une protéine antimicrobienne rencontrée chez quelques souches d'archées halophiles.

HalH4 est une protéine à activité antimicrobienne purifiée à partir de la souche de *Hfx. mediterranei* R4 (ATCC33500) isolée en Espagne dans la saline d'Alicante (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1985). Comme HalC8 et HalS8, HalH4 est biosynthétisée sous forme d'un précurseur. En effet, le gène *halH4*, localisé sur le mégaplasmide pHM300 de 322 kb, code un précurseur ProH4 de 39,6 kDa (Figure 32) (Cheung et al., 1997). Le précurseur ProH4 présente en partie N-terminale un peptide signal très long de 46 acides aminés contenant dans sa région N-terminale fortement cationique un doublet d'arginine caractéristique de la voie de sécrétion Tat. Après clivage du précurseur (Figure 32), l'halocine mature est une protéine de 34,9 kDa (Cheung et al., 1997), dont la cible primaire serait la membrane (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1996).

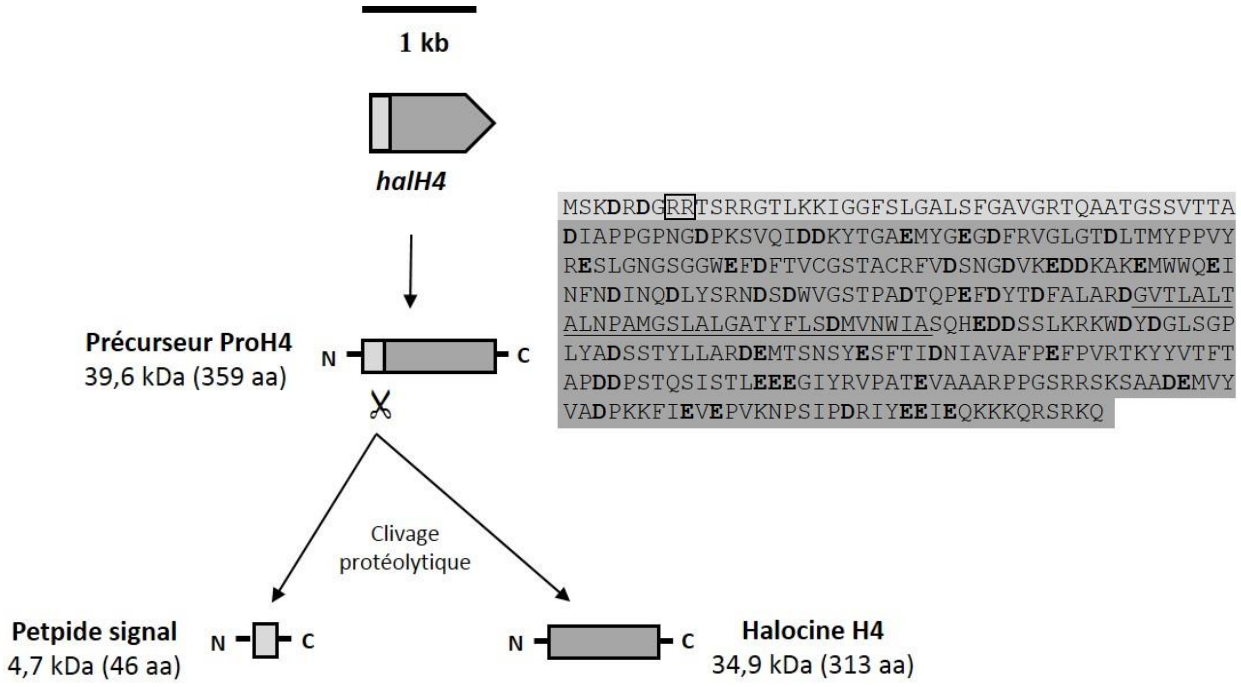


Figure 32. Clivage, maturation et séquence du précurseur ProH4 codé par le gène *halH4* chez la souche *Hfx. mediterranei* R4.
ProH4 est constitué en partie N-terminale par un peptide signal présentant une séquence Tat avec un motif Arg-Arg (entouré), puis par HalH4. Le peptide signal est surligné en gris clair et HalH4 est surligné en gris foncé. Les acides aminés acides (Asp et Glu) sont en caractères gras. La séquence soulignée correspondant à la région hydrophobe localisée à l'intérieur de la séquence de HalH4. D'après Besse et al. 2015.

HalH4 comporte un fort taux d'acides aminés chargés négativement, un faible taux de lysine et d'arginine, un taux élevé de résidus sérine, alanine, proline, glycine (Figure 32) et possède un point isoélectrique calculé de 4,39. Ce sont des caractéristiques de protéines halophiles (Paul et al. 2008 ; Anwar et Chauchan, 2012). Cependant, contrairement aux autres protéines halophiles caractérisées par un faible taux d'acides aminés hydrophobes (Paul et al., 2008), HalH4 possède une région hydrophobe de 32 acides aminés localisée entre les résidus 178 et 220 dans la séquence de ProH4 et au total 43,1 % d'acides aminés hydrophobes (Figure 32). HalH4 est produite pendant la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1985 ; Cheung et al., 1997).

Une étude a montré que HalH4 serait régulée post-transcriptionnellement car il n'y a pas de corrélation entre le taux de transcrit mesuré par transfert Northern de *halH4* et l'activité de HalH4 (Figure 33) (Cheung et al, 1997). Lors de cette étude le taux de transcription de *halH4* est exprimé par rapport à celui de l'*ARNs 7S* qui est transcrit constitutivement. On constate qu'il y a deux pics de transcription de *halH4*, le premier correspond au pic d'activité antimicrobienne de HalH4 et le second correspond au début de la phase stationnaire. Par ailleurs, le taux de transcription reste significatif bien après la diminution de l'activité antimicrobienne (Cheung et al., 1997).

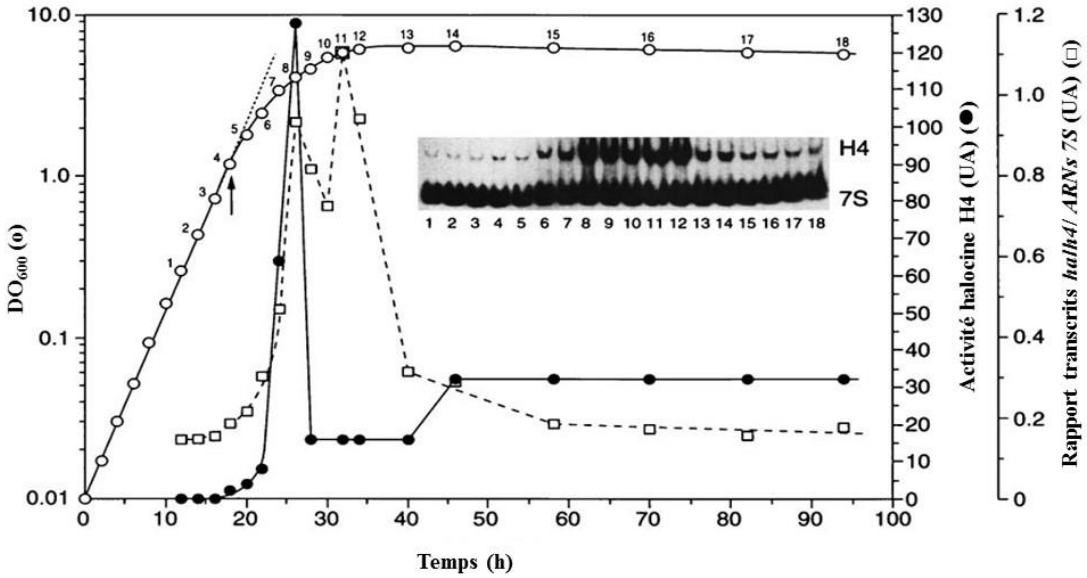


Figure 33. Expression du gène *halH4* pendant la croissance de*Hfx. mediterranei* R4.
(○) : courbe de croissance, (●) : activité antimicrobienne de l'halocine, (□) : rapport taux de transcription *halH4*/*ARNs 7S*. La flèche indique le début de l'activité antimicrobienne de l'halocine. L'encart représente une autoradiographie du transfert par Northern avec des sondes radioactives marquées au ^{32}P spécifiques de *halH4* et *ARNs 7S*. Les 18 points correspondent aux 18 prélèvements visibles sur la courbe de croissance. UA : unité arbitraire. D'après Cheung et al., 1997.

Ce résultat a été confirmé par une étude du transcriptome du chromosome et des réplicons extrachromosomiques de *Hfx*. *mediterranei* à l'aide de puces à ADN. Il a ainsi été montré que la transcription de *halH4* est 5,3 fois plus importante au début de la phase stationnaire qu'au milieu de la phase exponentielle de croissance (Liu et al., 2013b). Comme *halH4*, la plupart des gènes localisés sur le mégaplasmide pHM300 présente une régulation positive à l'entrée de la phase stationnaire (Liu et al 2013a). L'ensemble de ces résultats suggère qu'en plus de son activité antimicrobienne, HalH4 pourrait avoir une autre activité, en particulier lors de la phase stationnaire. D'ailleurs, il a été montré récemment que HalH4 serait impliquée dans des mécanismes de compétence (capacité à intégrer de l'ADN extracellulaire) et d'absorption de l'ADN (Chen et al., 2019).

D'autre part, Naor et al. (2012, 2013) ont montré qu'un mutant où *halH4* était délété et qu'une souche hybride de *Hfx*. *mediterranei* ayant perdu son plasmide pHM300, conservent leur capacité à inhiber la croissance d'archées halophiles comme *Hbt. halobium* et *Hfx. volcanii*. La souche de *Hfx. mediterranei* R4 produirait donc en plus de HalH4 d'autres composés antimicrobiens.

En ce qui concerne le cluster de gènes conduisant à la biosynthèse de HalH4, seul le gène *halH4* a été décrit (Cheung et al., 1997). L'étude de la séquence nucléotidique du plasmide pHM300 chez *Hfx*. *mediterranei* ATCC33500 (GenBank, numéro d'accession : NC_017943) montre qu'il existe des phases ouvertes de lecture présentes à proximité de *halH4* (Besse et al., 2015). On remarque en aval de *halh4* (*HFX_5264*) plusieurs gènes (*HFX_5266 à HFX_5270*) codant des protéines qui sont des composants de transporteurs ABC et donc qui pourraient être impliquées dans l'export de HalH4 (Figure 34) (Besse et al., 2015). Trois gènes (*HFX_5262, HFX_5263* et *HFX_5265*) à proximité de *halH4*, codent des protéines aux fonctions inconnues (Besse et al., 2015).

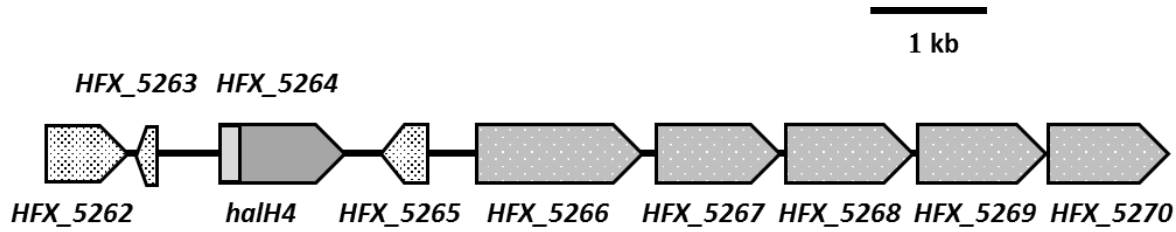


Figure 34. Organisation des gènes entourant *halH4* (HFX_5264) sur le plasmide pHM300 chez la souche *Hfx. mediterranei* ATCC33500. (GenBank, numéro d'accession NC_017943).
Les gènes *HFX_5262*, *HFX_5263* et *HFX_5265* codent des protéines dont la fonction est inconnue, tandis que les gènes *HFX_5266* à *HFX_5270* codent des protéines qui pourraient être impliquées dans l'export de HalH4.

Cependant, une étude des protéines codées par ces gènes montre que HFX_5262 (GenBank numéro d'accession WP_004056476) est une protéine de 235 acides aminés avec 5

hélices transmembranaires et une longue boucle cytoplasmique de 48 résidus. Cette protéine est retrouvée chez quelques espèces de la classe des *Halobacteria*. Le peptide HFX_5263 de 60 acides aminés (GenBank numéro d'accession WP_004056475) ne présente pas de peptide signal de type Tat ou Sec. Par contre, il est retrouvé avec de fortes identités sur la totalité de sa séquence (> 40%) chez de très nombreuses espèces d'archées halophiles. Il semble donc que ce peptide ne soit pas directement lié à la biosynthèse de ProH4. Enfin, le gène *HFX_5265* orienté en sens opposé à celui de *halH4* code le peptide HFX_5265 de 135 acides aminés (GenBank numéro d'accession WP_014732704). Ce peptide est caractérisé par un peptide signal de 20 résidus clivé par une signal peptidase de type II ou LspA (Lipoprotein signal protease) (Pugsley, 1993). Ce peptide est très peu souvent retrouvé chez les archées halophiles (J. Peduzzi, communications personnelles).

Dans le chapitre précédent, il a été montré que la séquence de HalC8, dont le gène est localisé sur le chromosome, était distribuée chez toutes les espèces des genres *Natrinema* et *Haloterrigena* mais également chez plusieurs autres espèces d'archées halophiles, méthanogènes ou hyperthermophiles. Nous avons cherché à savoir si c'était le cas également pour HalH4. Cette halocine de 313 résidus, dont le gène est localisé sur un mégaplasmide, est-elle uniquement rencontrée chez *Hfx. mediterranei* ou est-elle répartie chez d'autres genres d'archées halophiles ?

I. Analyse de similarités de séquences *in silico* et manuelle de ProH4

A partir de la séquence en acides aminés de ProH4 (359 acides aminés) déterminée à la fois par des approches protéiques et nucléotidiques (Cheung et al., 1997) (GenBank numéro d'accession AAB58316), des protéines présentant des similarités de séquence avec le précurseur ProH4 ont été recherchées dans la base de données GenBank. L'algorithme BLASTP utilisé soit avec la matrice PAM 250 soit avec la matrice BLOSUM 62 conduit à un faible nombre de résultats. On retrouve avec un score de 736 la séquence correspondant à ProH4 de 359 acides aminés provenant du plasmide pHM300 (GenBank numéro d'accession, AFK21096). La seule différence consiste en une substitution déjà connue (Asp-Glu en position 171) par rapport à la séquence précédemment décrite (Cheung et al., 1997). Une autre séquence de 289 acides aminés provenant du plasmide HMPLAS2 de *Hfx*. *mediterranei* ATCC33500, (GenBank, numéro d'accession AHZ24316) mais avec un score plus faible (598) est également retrouvée. Lorsque nous analysons cette entrée GenBank très peu documentée, nous nous apercevons que la séquence commence par MYGEGD dont la méthionine est localisée en position 71 de ProH4 (Figure 32, page 73). Cette séquence a été générée par annotation automatique et n'a pas été validée manuellement. Nous trouvons également 4 autres séquences provenant de *Nnm gari* JCM14663 (score 318, 279 acides aminés, GenBank numéro d'accession WP_008458115), *Halorubrum arcis* JCM13916 (score

316, 282 acides aminés, GenBank numéro accession WP_049897369), *Natrialba aegyptia* DSM13077 (score 304, 278 acides aminés, GenBank numéro d'accession WP_006667423) et enfin avec un score beaucoup plus faible de 130, *Haloterrigena jeotgali* A29 (341 acides aminés, GenBank numéro d'accession WP_136396896). Les séquences de *Nnm. gari* JCM14663, *Hrr. arcis* JCM13916 et *Nab. aegyptia* DSM13077 sont bien plus courtes que celle du précurseur ProH4 (359 résidus). Si on observe la séquence de ces 3 protéines, elles commencent toutes par la séquence MYGEGD. Ces 3 séquences ont donc été annotées automatiquement en se basant sur la séquence tronquée de ProH4 (GenBank, numéro d'accession AHZ24316).

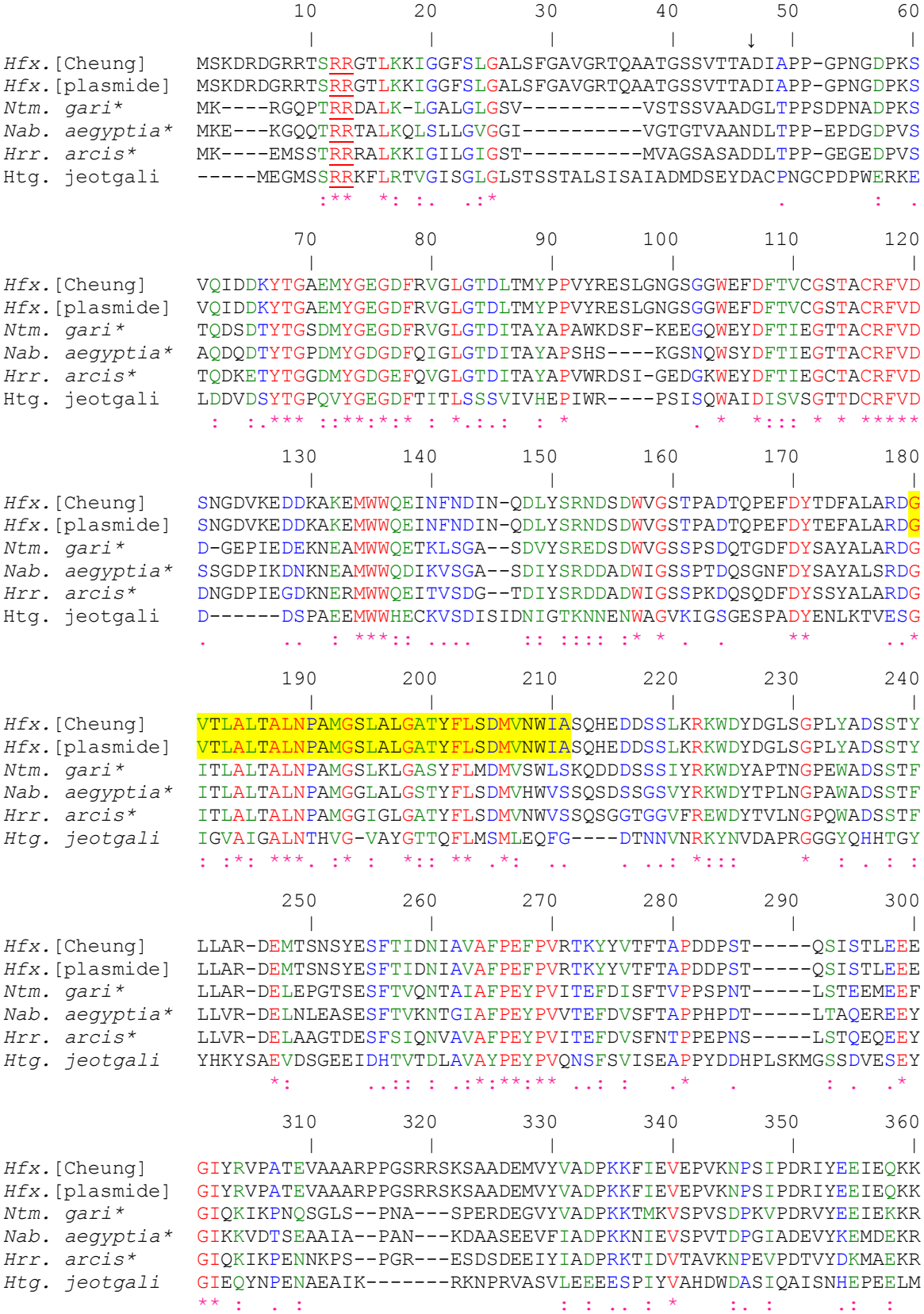
Une analyse manuelle a donc été réalisée sur les séquences nucléotidiques codant ProH4 tronquée (GenBank, numéro d'accession AOLO01000001 positions 305101-306601). A l'aide du logiciel ORF Finder la séquence de ProH4 de 359 résidus a été retrouvée dans la séquence GenBank AHZ24316. La même démarche a été renouvelée chez *Nnm. gari* JCM14663 (GenBank, numéro d'accession AOIJ01000063, nucléotides 184501-185941), *Hrr. arcis* JCM13916 (GenBank numéro d'accession AOJJ01000013, nucléotides 23641-25501) et *Nab. aegyptia* DSM13077 (GenBank numéro d'accession AOIP01000056, nucléotides 83221-85141). La recherche de phase de lecture ouverte conduit à ProH4 de 335 acides aminés chez *Nnm. gari* JCM14663, de 338 acides aminés chez *Hrr. arcis* JCM13916 et de 353 acides aminés chez *Nab. aegyptia* DSM13077. Ces séquences présentent des identités de séquences en acides aminés (entre 51,1 et 49,3%) avec ProH4 de *Hfx. mediterranei* R4 (ATCC33500). La séquence de *Htg. jeotgali* A29 présente seulement une identité de séquences en acides aminés de 26,85% avec celle de ProH4 de *Hfx. mediterranei* ATCC33500.

Les analyses par BlastN à partir de la séquence nucléotidique de 1265 pb codant ProH4 (GenBank numéro d'accession U16389) révèlent qu'en plus du plasmide pHM300 (GenBank, numéro d'accession CP001870), le gène *halH4* est également retrouvé sur les plasmides pHME322 (GenBank numéro d'accession, CP039141) et HMPLAS2 (GenBank numéro d'accession CP007553) qui sont tous des plasmides d'environ 320 kb présents chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500.

II. Alignement multiple et analyse phylogénétique de ProH4

A partir des séquences des souches identifiées lors des recherches décrites précédemment, un alignement multiple des séquences de ProH4 a été réalisé à l'aide du programme Clustal W (Thompson et al., 1994). L'alignement multiple des séquences ProH4 montre une très forte identité de séquences chez les souches de *Hfx. mediterranei* ATCC33500, *Nnm. gari* JCM14663, *Hrr. arcis* JCM13916 *et Nab. aegyptia* DSM13077 (Figure 35) avec de moins bonnes identités au niveau du peptide signal. Cependant on retrouve chez toutes les séquences le double motif d'arginine en position 12-13, caractéristique d'un peptide signal Tat, et un site de clivage du précurseur, dont la nature des acides aminés en positions -

3 et -1 avant le site de clivage, est compatible avec la règle de von Heijne (von Heijne, 1986 ; Nielsen et al., 1997). La séquence issue d'*Htg. jeotgali* A29 montre de plus faibles identités de séquences avec des régions d'insertions ou de délétions spécifiques à cette souche (Figure 35).



```
                      368
                       |
Hfx.[Cheung]      KQRSRKQ
Hfx.[plasmide]    KQRSRKQ
Ntm. gari*        EELYI
Nab. aegyptia*    EGLELE
Hrr. arcis*       EDLELRA
Htg. jeotgali     NKYDYLNW
                  :
```

Figure 35. Alignement multiple, obtenu à l'aide du programme Clustal W, de la séquence en acides aminés de ProH4 de *Hfx. mediterranei* R4 (ATCC33500) et des séquences identifiées par analyse *in silico*.
Hfx. [Cheung] correspond à la séquence décrite par Cheung et al. (1997) (GenBank numéro d'accession AAB58316). *Hfx.* [plasmide] correspond à la séquence ProH4 issue de *halH4* localisé sur le mégaplasmide pHM300 (GenBank numéro d'accession AFK21096). * Séquences de *Nnm. gari* JCM14663, *Hrr. arcis* JCM13916, *Nab. aegyptia* DSM13077 qui ont été corrigées manuellement. *Htg*. *jeotgali* correspond à la séquence de la protéine inconnue chez *Htg*. *jeotgali* A29 (GenBank numéro d'accession WP_136396896). Le motif arginine-arginine caractéristique du peptide signal Tat (positions 12-13) est souligné. La flèche indique le site de clivage du précurseur ProH4 chez *Hfx. mediterranei*. La séquence surlignée en jaune correspond à la région hydrophobe de ProH4 chez *Hfx. mediterranei* (Cheung et al., 1997). * acide aminé présent chez toutes les séquences, : acides aminés aux propriétés fortement semblables, . acides aminés aux propriétés faiblement semblables.

A partir des alignements multiples, un arbre phylogénétique a été construit à l'aide du programme Phylogeny (Dereeper et al., 2008). Cet arbre phylogénétique (Figure36) montre un groupe composé des séquences provenant des souches de *Nab. aegyptia* DSM13077, *Hrr. arcis* JCM13916 et *Nnm. gari* JCM14663 et de l'autre côté les 2 séquences de *Hfx. mediterranei*. Clairement, ces 2 clades sont reliés comme le montre les hautes valeurs de boostrap. Par contre la séquence d'*Htg*. *jeotgali* A29 est plus éloignée des autres séquences de ProH4.

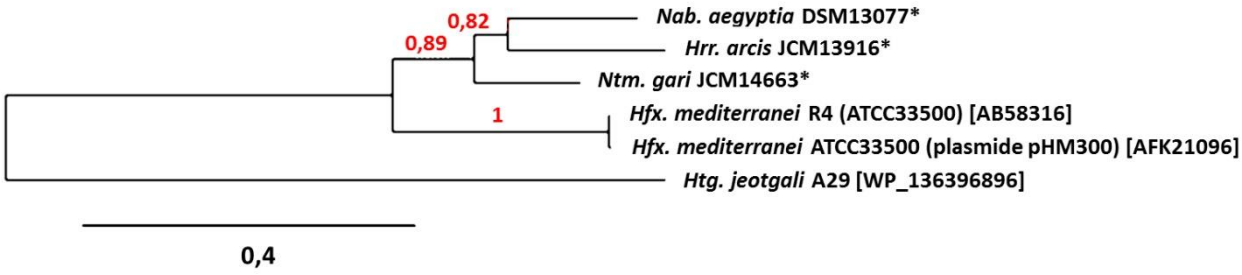


Figure 36. Arbre phylogénétique, obtenu par la méthode du " neighbour joining ", des séquences de ProH4 de *Hfx. mediterranei* ATCC33500 et des séquences issues de l'analyse *in silico*.
L'échelle indique le nombre de substitution par site. * Séquences de *Nnm. gari* JCM14663, *Hrr. arcis* JCM13916 et *Nab. aegyptia* DSM13077 qui ont été corrigées manuellement. Les numéros d'accession des séquences sont indiqués entre parenthèses, sauf en ce qui concerne les 3 séquences obtenues manuellement. L'arbre consensus a été construit par une répétition de 1000 échantillonnages et la proportion de boostrap est indiquée au-dessus des branches.

III. Recherche par PCR du gène *halH4*

Lorsque cette recherche a été réalisée, la séquence nucléotidique codant la protéine hypothétique chez *Htg. jeotgali* A29 (GenBank numéro d'accession CP031303) n'existait pas puisqu'elle n'a été déposée dans la base de données GenBank qu'en avril 2019, c'est pourquoi, elle n'apparaît pas dans la suite de cette étude. Les premières amplifications par PCR avec les amorces halH4-Hm-F/halH4-Hm-R (Annexe 2) chez *Hfx. mediterranei* DSM1411 et les 3 souches identifiées par l'analyse *in silico* ont permis d'obtenir un amplicon uniquement chez *Hfx. mediterranei* DSM1411. Un alignement multiple des séquences nucléotidiques a été réalisé à l'aide du programme Multalin (Figure 37). On observe que pour les souches *Nnm*. *gari* JCM14663, *Hrr*. *arcis* JCM13916, *Nab*. *aegyptia* DSM13077, plusieurs substitutions existent au niveau du couple d'amorces halH4-Hm-F/halH4-Hm-R (Figure 37, amorces surlignées en jaune) qui avaient été choisies sur la base de la séquence de *halH4* chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500. Ces substitutions peuvent expliquer nos premiers résultats négatifs. Afin de choisir de nouvelles amorces susceptibles d'être utilisées pour amplifier par PCR le gène *halH4* chez un plus grand nombre de souches, nous avons utilisé l'alignement multiple pour définir des amorces encadrant une région qui semble mieux conservée (positions 333 à 845) (Figure 37, surlignage gris foncé). Ces amorces dégénérées (halH4-F/halH4-R) (Annexe 2) ont été utilisées pour les amplifications par PCR d'une région interne de *halH4* chez les souches de *Hfx. mediterranei* DSM1411, *Nnm*. *gari* JCM14663, *Hrr*. *arcis* JCM13916 et *Nab*. *aegyptia* DSM13077

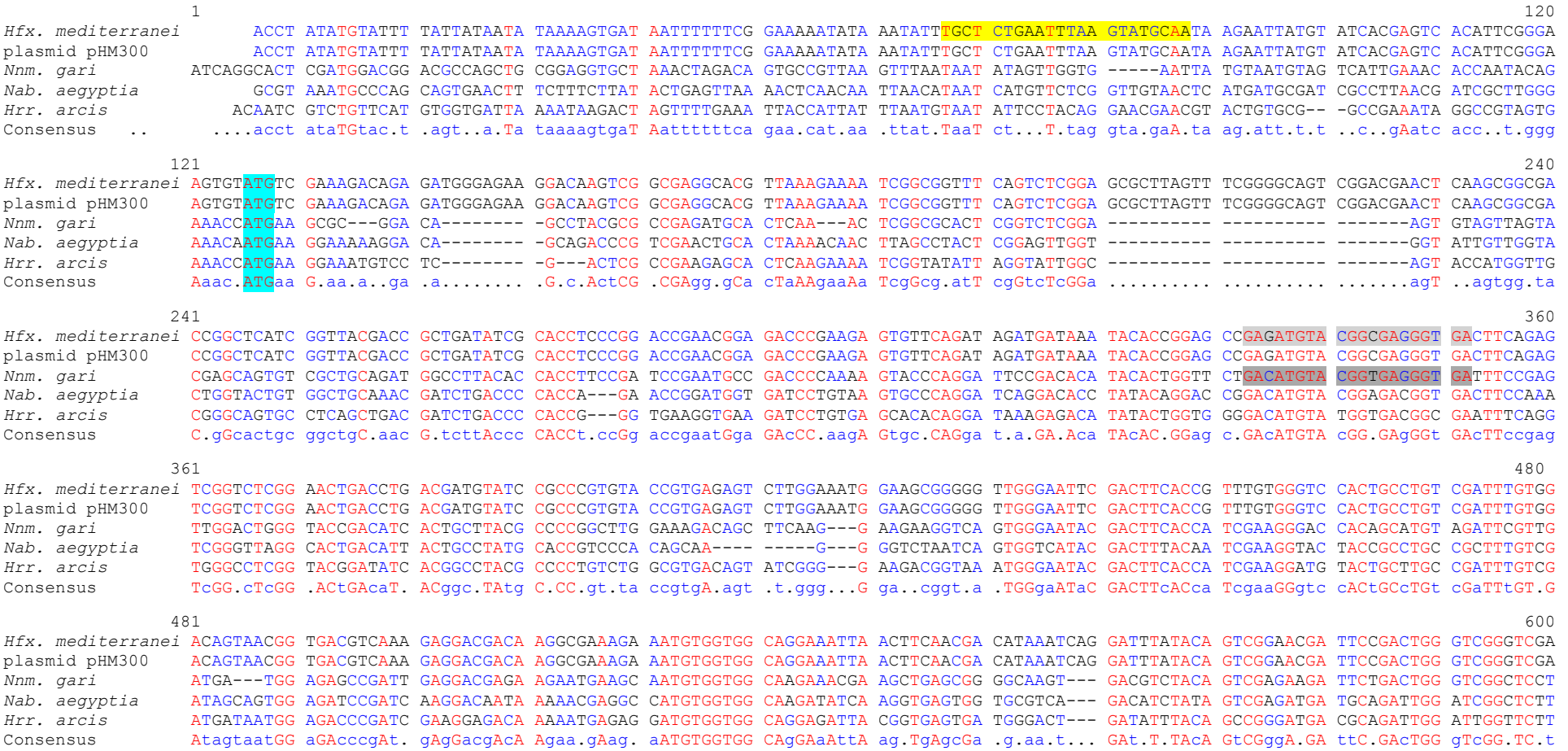


Figure 37. Alignement multiple de la séquence nucléotidique des gènes *halH4* à l'aide du programme Multalin (Corpet, 1988).
Les séquences proviennent de GenBank avec les numéros d'accession suivant : *Hfx. mediterranei* ATCC33500 (U16389), plasmide pHM300 (NC_017943), *Nnm. gari* JCM14663 (AOIJ01000063), *Nab. aegyptia* DSM13077 (AOIP01000056) et *Hrr. arcis* JCM13916 (AOJJ01000013).
Surlignage bleu : codons d'initiation et de terminaison pour les différents gènes *halH4*.
Surlignage jaune : séquences des amorces (halH4-Hm-F/halH4-Hm-R) permettant l'amplification de la séquence complète de *halH4* chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500 (Cheung *et al*, 1997).
Surlignage gris foncé : séquences d'amorces dégénérées (halH4-F/halH4-R) communes à *Hfx. mediterranei* DSM1411, *Nnm. gari* JCM14663, *Nab. aegyptia* DSM13077 et *Hrr. arcis* JCM13916 et permettant l'amplification de *halH4* chez différentes espèces à notre disposition au laboratoire.
Surlignage gris clair : séquences des amorces spécifiques (halH4-Hmc-F/halH4-Hmc-R) permettant l'amplification d'une séquence interne à *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.



Figure 37 (suite).

Après purification, les amplicons obtenus avec les amorces dégénérées halH4-F/halH4-R ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour les espèces *Nnm. gari* JCM14663, *Nab. aegyptia* DSM13077 et *Hrr. arcis* JCM13916, une bande intense est observée juste au-dessus de la bande de 500 pb comme attendu (Figure 38). Pour l'amplicon correspondant à *Hfx*. *mediterranei* DSM1411, une bande de plus faible intensité est également observée avec ces amorces dégénérées halH4-F/halH4-R, ainsi que d'autres bandes non spécifiques de faible intensité.

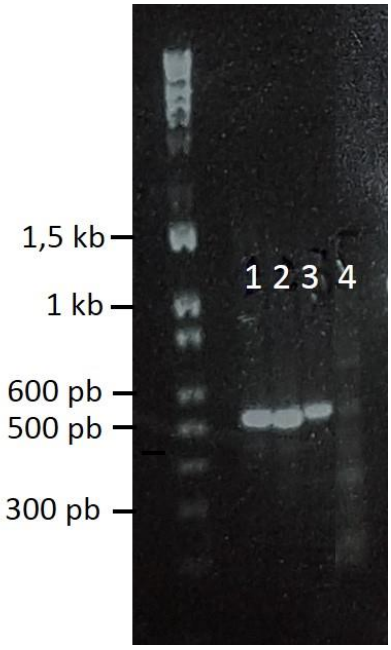


Figure 38. Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons de *halH4* obtenus avec les amorces dégénérées halH4-F/halH4-R chez *Nnm. gari* JCM14663, *Nab. aegyptia* DSM13077, *Hrr*. *arcis* JCM13916 et *Hfx*. *mediterranei* DSM1411.
A gauche, le dépôt correspondant au marqueur Exact Ladder®DNA PreMix 2 Log (Ozyme).
1 : *Nnm*. *gari* JCM14663, 2 : *Nab. aegyptia* DSM13077, 3 : *Hrr*. *arcis* JCM13916 et 4 : *Hfx*. *mediterranei* DSM1411.

Ces résultats (Figures 37 et 38) indiquent que le gène *halH4* est également retrouvé chez *Nnm*. *gari* JCM14663, *Nab. aegyptia* DSM13077 et *Hrr*. *arcis* JCM13916. Précédemment, nous avons vu que sur le plasmide pHM300 chez la souche *Hfx. mediterranei* ATCC33500 (Figure 33, page 74), il existait plusieurs gènes codant des protéines dont la fonction est inconnue ainsi que différents gènes pouvant être impliqués dans l'export de HalH4. Le génome de *Nnm*. *gari* JCM14663 (contig 63, GenBank numéro d'accession AOIJ01000063) a été exploré autour de *halH4* (GenBank numéro d'accession C486_17390). On ne retrouve aucun des gènes observés à proximité de *halH4* chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500, par contre on observe en amont du gène codant ProH4, un gène codant une transposase TCE33 (GenBank numéro d'accession ELY77234). De la même manière le génome de *Nab. aegyptia* DSM13077 a été étudié (contig 56, GenBank numéro d'accession AOIP01000056). A proximité de *halH4* (GenBank numéro d'accession C480_20224), on trouve en amont, adjacent à *halH4*, un gène codant une transposase ISH1 (GenBank numéro d'accession ELY99630). Enfin, dans le génome

d'*Hrr*. *arcis* JCM13916 (contig 13, GenBank numéro d'accession NZ_AOJJ01000013), on retrouve à côté du gène codant ProH4 (GenBank numéro d'accession WP_049897369) un gène codant un peptide de 135 acides aminés (GenBank numéro d'accession WP_152420060) présentant des identités de séquence avec le peptide HFX_5265 de *Hfx. mediterranei* ATCC33500. Comme chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500, les 2 gènes sont en orientation opposée chez *Hrr arcis* JCM13916. En amont de *halH4*, on observe également un gène codant une transposase à domaine catalytique DDE de type 1 (GenBank numéro d'accession WP_152420065).

Ayant obtenu peu de résultats lors de l'analyse *in silico* à partir de la séquence du précurseur ProH4, des amplicons d'une partie conservée de *halH4* ont été recherchés par amplification par PCR, avec les amorces dégénérées halH4-F/halH4-R (Annexe 2), chez différentes souches d'archées halophiles et deux souches de bactéries halophiles extrêmes, *S. ruber* DSM13855 et *L. halophilus* DSM19123 (Tableau 8). Chaque réaction a été réalisée 4 fois de manière indépendante pour chacune des souches étudiées. Chez certaines souches, les résultats n'ont pas été reproductibles, c'est-à-dire que parfois un amplicon de taille compatible à celle attendue a été obtenu et parfois nous n'avons pas observé d'amplification.

Tableau 8. Origine des souches et amplifications du gène *halH4* par PCR réalisées avec les amorces communes dégénérées (halH4-F/halH4-R) et les amorces spécifiques de *Hfx. mediterranei* ATCC30500 (halH4-Hmc-F/halH4-Hmc-R) sur des souches d'archées halophiles et 2 souches de bactéries halophiles extrêmes.

Souches	**Origine**	**Amorces**	
		halH4-F/halH-R	halH4-Hmc-F/halH4-Hmc-R
Haloarcula argentinensis DSM12282	Argentine	-	-
Haloarcula sekhae SWO25	Algérie	-	-
Haloarcula vallismortis DSM3756	Etats Unis	-	-
Hbt. salinarum DSM3754	Cuir	±	±
Hfx. alexandrinus DSM27206	Egypte	-	-
Hfx. gibbonsii DSM4427	Espagne	-	-
Hfx. mediterranei DSM1411	Espagne	+	+
Hfx. prahovense DSM18310	Roumanie	-	-
Hfx. volcanii DSM3757	Mer morte	-	±
Hrr. arcis DSM23454	Tibet	+	-
Hrr. tebenquichense SS1R14	Tunisie	-	-
Htg. salina JCM13891	Mongolie	-	-
Htg. thermotolerans DSM11552	Porto Rico	-	-
Htg. turkmenica DSM5511	Turkménistan	-	-
Nab. aegyptia DSM13077	Egypte	+	+
Nab. taiwanensis DSM12281	Taiwan	±	-
Nnm. altunense JCM12890	Chine	-	-
Nnm. gari JCM14663	Thaïlande	+	-
Nnm. pellirubrum DSM15624	Cuir	-	-
Natrinema sp. SWI15	Algérie	+	-
Lentibacillus halophilus DSM19123	Thaïlande	-	-
Salinibacter ruber DSM13855	Espagne	-	-

+ : amplification de *halH4* , - : pas d'amplification, ± : résultats non reproductibles

Comme attendu, des amplicons ont été obtenus avec les amorces dégénérées halH4-F/halH4-R à partir de *Hfx. mediterranei* DSM1411, *Nnm*. *gari* JCM14663, *Hrr*. *arcis* JCM13916 et *Nab*. *aegyptia* DSM13077 (Tableau 8, 3ème colonne) (Figure 39). La souche de *Natrinema* sp. SWI15 présente également une amplification de *halH4* (Tableau 8) (Figure 39). Chez plusieurs souches, dont *Hrr. arcis* JCM13916, plusieurs bandes sont obtenues (Figure 39). Ces différentes bandes démontrent que chez ces souches l'amplification n'est pas spécifique, certainement en raison de la dégénérescence des amorces. Chez les souches *Hbt. salinarum* DSM3754 et *Nab. taiwanensis* DSM12281, les résultats ne sont pas reproductibles (Tableau 8, 3ème colonne). Des amorces spécifiques (halH4-Hmc-F/halH4-Hmc-R) de *Hfx. mediterranei* ATCC33500 (Figure 37, pages 81 et 82, surlignage gris clair,) (Annexe 2) ont également été utilisées. (Tableau 8, 4ème colonne). Les résultats obtenus avec ces amorces spécifiques halH4-Hmc-F/halH4-Hmc-R sont présentés dans le tableau 8 (4ème colonne). Seules les souches *Hfx. mediterranei* DSM1411 (contrôle positif) et. *Nab*. *aegyptia* DSM13077 présentent une amplification de *halH4*. Comme précédemment, avec les amorces communes dégénérées, des résultats non reproductibles ont été obtenus chez *Hbt. salinarum* DSM3754 et *Hfx. volcanii* DSM3757 (Tableau 8, 4ème colonne).

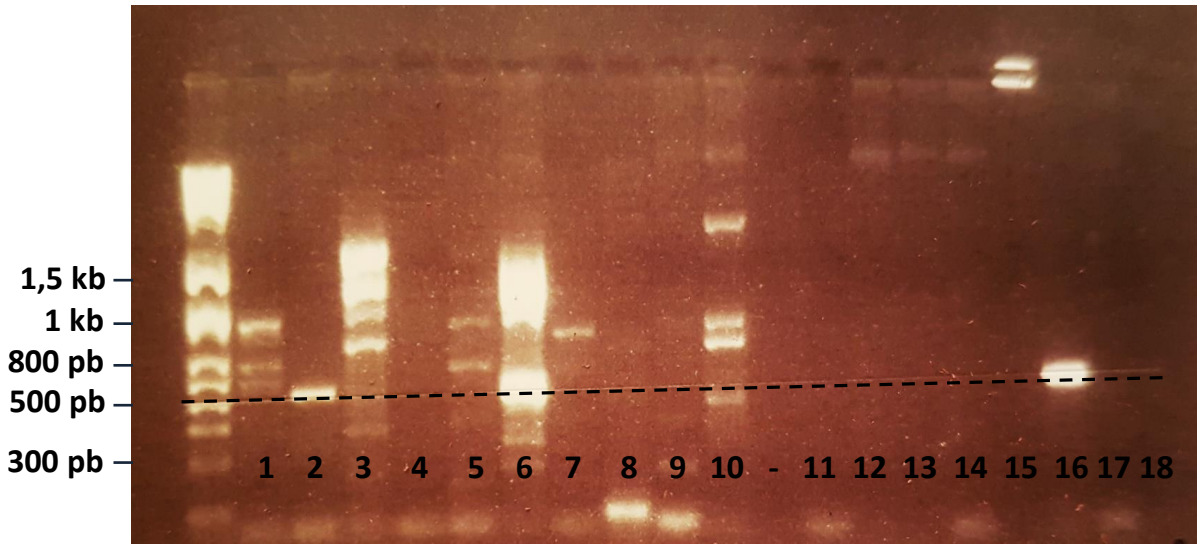


Figure 39. Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons de *halH4* obtenus avec les amorces dégénérées halH4-F/halH4-R chez différentes espèces d'archées halophiles. A gauche, le dépôt correspond au marqueur Exact Ladder®DNA PreMix 2 Log (Ozyme).
1 : *Hrr. tebenquichense* SS1R14, 2 : *Natrinema* sp. SWI15, 3 : *Haloarcula vallismortis* DSM3756, 4 : *Hfx. alexandrinus* DSM27206, 5 : *Hfx. gibbonsii* DSM4427, 6 : *Hrr. arcis* DSM23454 (JCM13916), 7 : *Hfx. prahovense* DSM18310, 8 : *Hfx. volcanii* DSM3757, 9 : *Haloarcula sebkhae* SWO25, 10 : *Hfx. mediterranei* DSM1411, 11 : *Nnm. pellirubrum* DSM15624, 12 : *Haloarcula argentinensis* DSM12282, 13 : *Nnm. altunense* JCM12890, 14 : *Htg. thermotolerans* DSM11552, 15 : *Htg. turkmenica* DSM5511, 16 : *Nab. aegyptia* DSM13077, 17 : *Htg. salina* JCM13891 et 18 : *Nab. taiwanensis* DSM12281. La ligne en tireté est tracée entre la bande de 500 pb du marqueur et l'amplicon de *Nab. aegyptia* pour corriger une vitesse de migration des amplicons non homogène.

Les différentes amorces que nous avons choisies ne nous permettent pas de conclure, ni de poursuivre nos études notamment sur la présence de *halH4* chez d'autres espèces d'archées halophiles, à l'exception de la souche de *Natrinema* sp. SWI15 qui présente une bande correspondant à la taille attendue de 512 pb.

A la suite des amplifications par PCR donnant des résultats positifs, la purification des amplicons ne nous a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes pour pouvoir cloner et séquencer ces amplicons.

Comme nous avons rencontré des difficultés avec les analyses d'amplification par PCR, une potentielle activité antimicrobienne a été recherchée chez certaines souches d'archées halophiles possédant ou non un gène *halH4*. Avant de mettre au point un test d'activité antimicrobienne correspondant à HalH4, une recherche de souches cibles a été menée à l'aide du surnageant de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411.

IV. Spectre d'activité antimicrobienne du surnageant de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411

Pour déterminer le spectre d'activité liée au surnageant de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411, contenant HalH4, des tests antimicrobiens, par la méthode de diffusion en milieu gélosé ont été réalisés. Le surnageant non chauffé de *Hfx mediterranei* a été testé contre de nombreuses souches d'archées halophiles, deux souches de bactéries halophiles extrêmes, comme *S. ruber* DSM13855 (Antón et al., 2002) abondante dans les milieux hypersalins et *L. halophilus* DSM19123 (Tanasupawat et al., 2006) et quatre souches de bactéries halophiles modérées, comme *Halomonas sabkhae* DSM19122 (Kharroub et al., 2208), *Nesterenkonia halophila* DSM16378 (Li et al., 2008), *Oceanobacillus kapialis* DSM23158 (Namwong et al., 2009) et *Salinicoccus siamensis* DSM21576 (Pakdeeto et al., 2007). Les résultats obtenus montrent que le surnageant de *Hfx. mediterranei* DSM1411 présente un large spectre d'activité contre de nombreuses archées halophiles (Tableau 9). En revanche, le surnageant de *Hfx. mediterranei* DSM1411 ne présente aucune activité antimicrobienne contre les bactéries halophiles testées (Tableau 9).

Tableau 9. Spectre d'activité du surnageant non chauffé de *Hfx. mediterranei* DSM1411 contre des souches cibles d'archées et de bactéries halophiles.

Souches cibles	Activité du surnageant d'*Hfx mediterranei* DSM1411
Har. argentinensis DSM12282	+
Har. hispanica SSI7	-
Har. marismortui DSM3752	-
Har. quadrata DSM11927	+
Har. vallismortis DSM3756	+
Hbt. salinarum DSM3754	+
Hbt. salinarum ETD5	+
Htg. turkmenica DSM5511	+
Hrr. chaoviator ETD3	+
Hrr. chaoviator ETR14	++
Hfx. volcanii DSM3757	+
Nnm. altunense JCM12890	+
Nnm. ejinorense DSM18194	-
Nnm. pallidum DSM15623	+
Nnm. pellirubrum DSM15624	+
Natrinema sp. SWI15	-
Halomonas sabkhae DSM19122	-
Lentibacillus halophilus DSM19123	-
Nesterenkonia halophila DSM16378	-
Oceanobacillus kapialis DSM23158	-
Salinicoccus siamensis DSM21576	-
Salinibacter ruber DSM13855	-

Diamètres (mm) du halo d'inhibion (HI) :
HI : ++ = ≥ 50 mm ; + = 15 ≤ HI < 50 mm ; - = pas d'halo d'inhibition

V. Recherche de l'activité antimicrobienne de HalH4

Les tests antimicrobiens chez les archées halophiles sont longs et difficiles. En effet, une à 2 semaines sont nécessaires pour obtenir un tapis exploitable sur la gélose. Suite à la détermination du spectre d'activité, nous avons observé que les souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hfx. volcanii* DSM3757 présentent un tapis de croissance homogène, en 5 à 8 jours. Cette croissance est plus rapide que pour la plupart des autres souches sensibles d'archées halophiles. Sur ces deux souches cibles, les surnageants de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411 forment de beaux halos d'inhibition. La souche *Hrr. chaoviator* ETR14 présente la plus forte sensibilité (Tableau 9), cependant sa croissance est beaucoup plus difficile, et le tapis obtenu est moins homogène que pour les 2 autres souches. C'est pourquoi, *Hfx. volcanii* DSM3757 et *Hbt. salinarum* ETD5 ont été les 2 souches cibles utilisées par la suite.

Les tests antimicrobiens ont été réalisés avec des surnageants de cultures des souches susceptibles de produire HalH4 ou chez d'autres espèces d'*Haloferax* et *Natrialba*, dont une

espèce *Nab. aegyptia* DSM13077 a montré qu'elle pouvait potentiellement produire HalH4. Pour déterminer si ces souches produisent effectivement une activité antimicrobienne, des surnageants de culture en fin de phase exponentielle ont été récupérés pour *Hfx. mediterranei* DSM1411*, Hfx. alexandrinus* DSM27206, *Hfx. gibbonsii* DSM4427, *Hfx. prahovense* DSM18310, *Hrr. arcis* DSM23454, *Nab. aegyptia* DSM13077, *Nab. taiwanensis* DSM12281 et *Nnm. gari* JCM14663.

La détection d'une activité antimicrobienne liée à HalH4 est plus compliquée que pour HalC8. En effet, HalH4 étant thermosensible, les surnageants de culture ont été traités 10 min à 100 °C. Ils sont également filtrés (0,22 µm) pour éliminer une possible activité virale. L'activité antimicrobienne a également été recherchée dans les culots cellulaires, cette fraction pouvant contenir de l'halocine associée aux membranes. Contrairement à ce qui a été observé avec HalC8, c'est donc un test indirect puisque l'on associe une perte d'activité après chauffage à la présence d'une halocine thermosensible comme HalH4. La souche cible d'*Hbt. salinarum* ETD5 s'est finalement révélée la plus efficace pour détecter une activité antimicrobienne chez plusieurs des souches cibles testées. Les cultures des souches *Hfx. mediterranei* DSM1411 (contrôle positif), *Nab. aegyptia* DSM13077 et *Nnm. gari* JCM14663, présentent une activité qui disparaît après un traitement à la chaleur (Tableau 10). Cette activité est retrouvée dans leur surnageant filtré, à l'exception de *Nnm. gari* JCM14663. Etonnamment, Pour *Hfx. alexandrinus* DSM27206 et *Natrinema* sp. SWI15, on observe une activité dans le surnageant de culture, le surnageant filtré et le surnageant chauffé (Tableau 10). *Nab. aegyptia* DSM13077 est la seule souche dont le culot présente une très forte activité, qui disparaît après chauffage pendant 10 min à 100 °C (Tableau 10). En ce qui concerne la souche *Hrr. arcis* JCM13916 qui possède un gène putatif *halH4*, nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour la cultiver, ce qui explique que lors de notre étude la présence d'activité antimicrobienne, cette souche n'a pas pu être testée.

Tableau 10. Mesure des halos d'inhibition des surnageants et culots de cultures de différentes souches contre la souche cible *Hbt. salinarum* ETD5.

	Halo d'inhibition (mm) sur la souche cible *Hbt. salinarum* ETD5				
Souches productrices	Culture	Surnageant filtré	Surnageant filtré 10' 100 °C	Culot	Culot 10' 100 °C
Hfx. mediterranei DSM1411	30	15	-	-	-
Hfx. alexandrinus DSM27206	25	13	12	-	-
Hrr. arcis DSM23454	-	ND	ND	ND	ND
Nab. aegyptia DSM13077	25	14	-	30	-
Nnm. gari JCM14663	30	-	-	-	-
Natrinema sp. SWI15	30	16	14	-	-

ND : non déterminé, - : pas d'halo d'inhibition

VI. Production, purification et caractérisation de HalH4 produite par *Hfx. mediterranei* DSM1411

Le mode d'action et la cible moléculaire de HalH4 sont inconnus même si elle semble interagir dans un premier temps avec la membrane (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1986). C'est pourquoi nous envisagions de purifier HalH4 par plusieurs approches : protéine native obtenue par différentes étapes de chromatographies réalisées à partir du culot ou du surnageant de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411; protéine recombinante (étiquetée ou non). Malheureusement, nous n'avons pu utiliser la seconde approche, car les essais réalisés dans l'équipe sur la surexpression de HalC8 et HalS8 chez *Hfx. volcanii* H98 (Besse, 2016 ; Ghanmi , 2016) n'ont pas été concluants. Donc, seule la purification de HalH4 par des méthodes classiques a été entreprise. L'activité antimicrobienne de HalH4 étant dépendante d'une concentration élevée en NaCl (O'Connor et Shand, 2002), les différentes étapes de chromatographies envisagées sont délicates en raison de cette présence de sels. Avant de commencer la purification de HalH4, nous devons rechercher les conditions optimales de production de celle-ci. Au cours de la croissance en milieu liquide de la souche productrice de *Hfx*. *mediterranei* DSM1411, plusieurs prélèvements de culture ont été effectués à différents temps et l'activité antimicrobienne des différents prélèvements a été testée sur la souche cible *Hfx*. *volcanii* DSM3757, ensemencée en milieu gélosé (Figure 40).

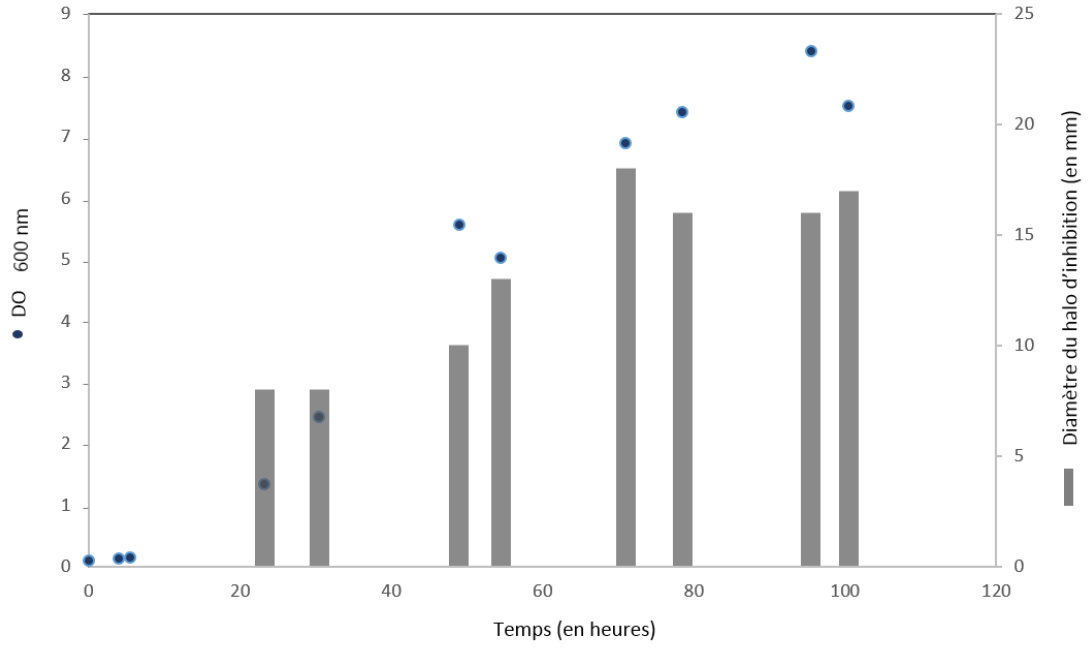


Figure 40. Courbe de croissance de *Hfx. mediterranei* DSM1411 et halo d'inhibition du surnageant de culture contre la souche cible *Hfx. volcanii* DSM3757.

On retrouve comme pour la plupart des halocines, une production maximale en fin de phase de croissance. Après avoir identifié le moment où la production de HalH4 est maximale, c'est-à-dire après 71 h de culture (Figure 40), la stabilité de l'activité antimicrobienne du surnageant a été testée après différentes dilutions dans du milieu de culture M372 de façon à ne pas modifier la concentration en sels (Figure 41).

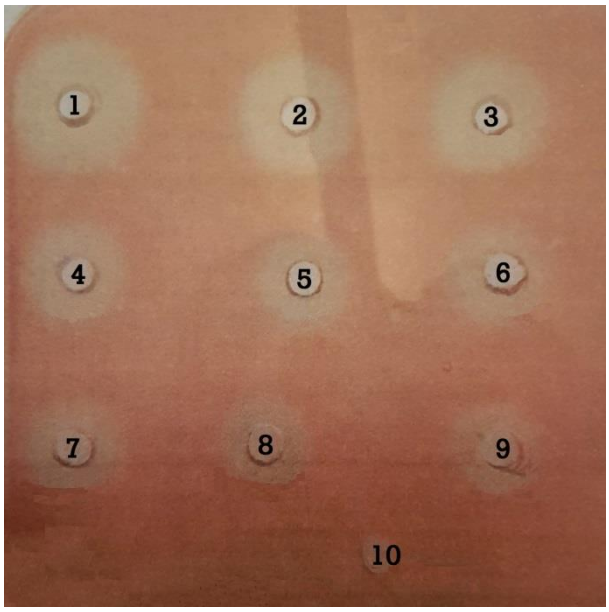


Figure 41. Effet de la dilution du surnageant de *Hfx. mediterranei* DSM1411 prélevé après 71 h de culture, sur le diamètre du halo d'inhibition de la souche cible *Hfx. volcanii* DSM3757.
1 : surnageant filtré, 2 : dilution au 1/4, 3 : dilution au 1/5, 4 : dilution au 1/10, 5 : dilution au 1/15, 6 : dilution au 1/20, 7 : dilution au 1/25, 8 : dilution au 1/30, 9 : dilution au 1/40. Les dilutions sont du surnageant filtré dilué dans du milieu de culture M372. 10 : surnageant filtré et chauffage pendant 10 min à 100 °C.

Comme attendu, le surnageant filtré et chauffé 10 min à 100°C perd totalement son activité, prouvant la présence de HalH4 dans le surnageant de culture de *Hfx*. *mediterranei* DSM1411. Les différentes dilutions du surnageant filtré entraine une diminution du diamètre du halo d'inhibition, mais l'activité reste encore détectable après une dilution 40 fois du surnageant.

Nous avons ensuite essayé de voir l'effet de la concentration en NaCl sur l'activité de nos échantillons. Contrairement aux halocines peptidiques comme HalC8 ou HalS8, HalH4 voit son activité diminuer lorsque la concentration en sels baisse, en raison de la déstabilisation de sa structure tridimensionnelle. Dans le but de trouver pour la purification de HalH4 un éluant avec une concentration en sels compatible avec l'activité antimicrobienne de HalH4, l'activité du surnageant filtré en présence de différentes concentrations de NaCl allant de 100 $g.L^{-1}$ à 5 $g.L^{-1}$ a été testée. Après de nombreux essais, une activité est détectée dans des échantillons contenant seulement 5 $g.L^{-1}$ NaCl (Figure 42).

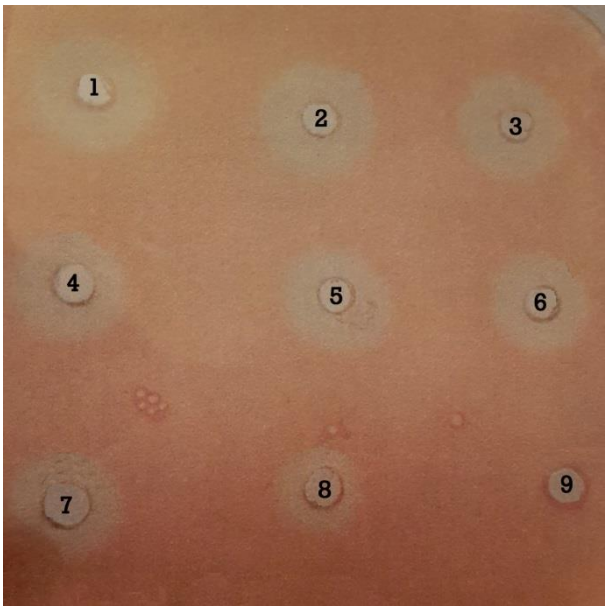


Figure 42. Effet de la concentration en sels du surnageant de *Hfx. mediterranei* DSM1411 prélevé après 71 h de culture, sur le diamètre du halo d'inhibition de la souche cible *Hfx. volcanii* DSM3757.
1 : surnageant filtré, 2 : surnageant filtré 100 $g.L^{-1}$ NaCl, 3 : surnageant filtré 50 $g.L^{-1}$ NaCl, 4 : surnageant filtré 25 $g.L^{-1}$ NaCl, 5 : surnageant filtré 20 $g.L^{-1}$ NaCl, 6 : surnageant filtré 17 $g.L^{-1}$ NaCl, 7 : surnageant filtré 10 $g.L^{-1}$ NaCl, 8 : surnageant filtré 5 $g.L^{-1}$ NaCl, 9 : surnageant filtré et chauffage pendant 10 min à 100 °C.

Ce dernier résultat nous montre que l'on peut travailler avec des surnageants filtrés à des concentrations en NaCl qui deviennent compatibles avec une purification sur colonne. Peu de techniques chromatographiques peuvent néanmoins être utilisées, cependant HalH4 étant une protéine présentant un pI très acide (4,39), une étape de chromatographie échangeuse d'ions peut être envisagée. Une colonne échangeuse d'anions, Mono Q HR 5/5 a été utilisée avec une chaine FPLC. Le surnageant a été dialysé en plusieurs étapes successives de façon à obtenir le surnageant dans un tampon Tris-Hcl 20 mM pH 8,0 contenant 10 $g.L^{-1}$ NaCl. Trois cent soixante mL de surnageant dialysé, correspondant à 250 mL de surnageant récupéré à partir de la culture, ont été chargés pendant une nuit sur la colonne Mono Q HR 5/5. Un gradient de 0 à 1 M NaCl dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,0 a été utilisé pour éluer les composés de la colonne (Figure 43). Les protéines ont été détectées en suivant la DO à 214 et à 280 nm.

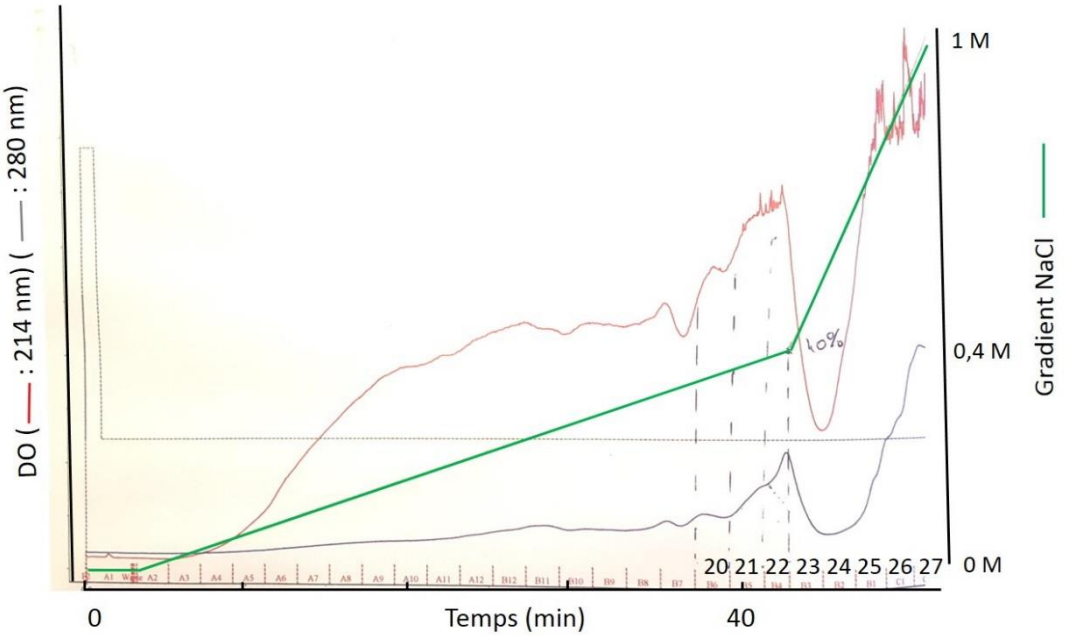


Figure 43. Chromatogramme sur une colonne Mono Q HR 5/5 du surnageant de culture de *Hfx. mediterranei* DSM1411 dans un tampon Tris-HCl 20mM pH 8,0 contenant 10 $g.L^{-1}$ NaCl. Un gradient de 0 à 1 M NaCl dans le tampon Tris-HCl 20mM pH 8,0 a été utilisé pour l'élution de la colonne avec un débit de 1$mL.min^{-1}$. Des fractions de 2 mL ont été recueillies automatiquement et l'activité antimicrobienne a été testée dans les factions 20 à 27. Les protéines ont été détectées par mesure de la DO à 214 et 280 nm.

Les fractions 20 à 27, à l'exception de la fraction 23 qui a montré une absence de protéines lors du dosage de Bradford, ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS). Dans les fractions 20 et 21, éluées de la colonne aux alentours de 40 min, nous observons une bande majoritaire de 15 kDa mais aussi une bande de plus faible intensité d'environ 30 kDa compatible avec la masse moléculaire de HalH4 (Figure 44). D'ailleurs cette masse est proche de celle de 28 kDa obtenue par la même méthode lors de la purification d'HalH4 à partir de *Hfx. mediterranei* R4 (Meseguer et Rodríguez-Valera, 1985). Cependant, les tests antimicrobiens des fractions 20 à 27 ne permettent pas de détecter un halo d'inhibition sur la souche cible d'*Hbt*. *salinarum* ETD5. Nous avons renouvelé plusieurs fois la chromatographie échangeuse d'anions, mais aucune activité antimicrobienne contre *Hbt*. *salinarum* ETD5 n'a pu être détectée dans les fractions collectées en sortie de la colonne.

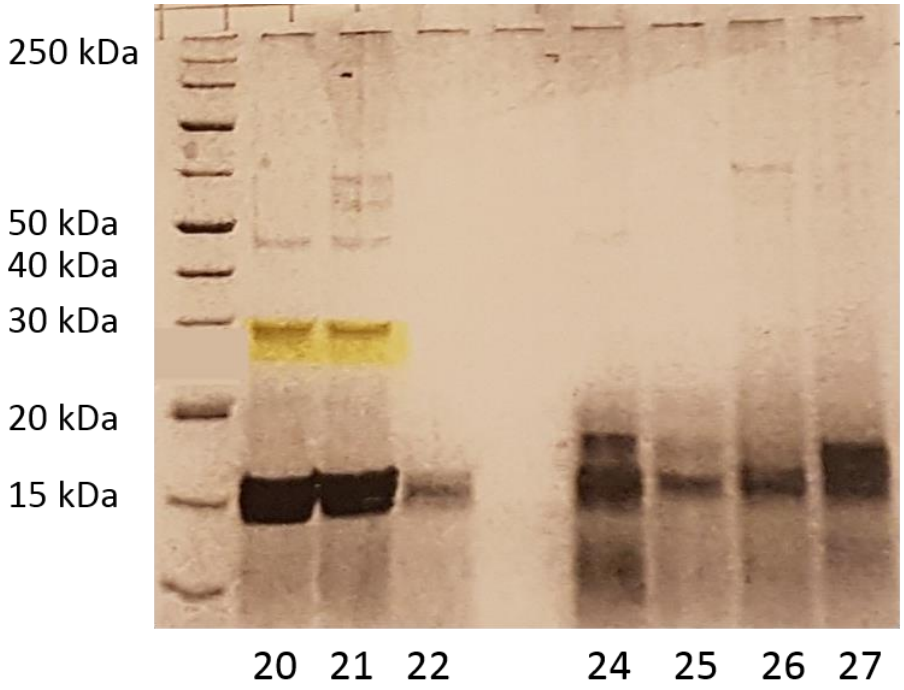


Figure 44. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS) des fractions 20 à 27 collectées en sortie de la colonne Mono Q HR 5/5.
A gauche, le dépôt correspond au marqueur PageRuler^{TM} unstained broad range protein Ladder (Thermofisher Scientific). La fraction 23 n'a pas été déposée, car sa concentration en protéine par dosage de Bradford est nulle. Une bande majoritaire de 15 kDa est présente dans toutes les fractions, tandis qu'une bande de 30 kDa, compatible avec HalH4, est observée dans les fractions 20 et 21.

VII. Discussion

HalH4 a été la première halocine décrite (Rodríguez-Valera et al., 1982). Comme HalC8, elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur ProH4. Ce dernier possède en partie N-terminale un peptide signal avec une séquence Tat impliqué dans sa translocation à travers la membrane. Le peptide signal est anormalement long, avec 46 résidus. Contrairement à HalC8 qui est un peptide de 76 acides aminés, HalH4 est une protéine de 313 acides aminés. Au contraire de *halC8,* le gène *halH4* ne code pas une protéine d'immunité. Chez les bactériocines des bactéries à Gram positif ou les microcines d'*E. coli*, le gène codant la protéine d'immunité, quand il existe, est toujours localisé à côté du gène codant le peptide antimicrobien ou son précurseur et dans une même unité de transcription (Johnsen et al., 2004 ; Fimland et al., 2005 ; Duquesne et al., 2007). Dans le groupe de gènes situés à proximité de *halH4* sur le mégaplasmide pHM300 chez *Hfx. mediterranei* (Figure 34, page 75) il n'existe aucun gène adjacent à *halH4* dans une même unité de transcription. Cependant, en aval de *halH4*, et dans la même orientation que *halH4*, on observe 5 gènes codant des protéines qui pourraient être impliquées dans l'export de HalH4 *via* un transporteur ABC. Pour *Hfx. mediterranei*, on peut imaginer un mécanisme similaire à celui observé chez les microcines de classe I, où l'immunité est assurée par des protéines d'export présentes dans le groupe de gènes (Duquesne et al.,

2007). L'analyse de l'environnement de *halH4* chez *Nab. aegyptia* DSM13077 et *Nnm*. *gari* JCM14663, ne permet pas de retrouver un gène codant pour une protéine d'immunité ni pour des transporteurs ABC. Dans ces deux souches, on ne peut donc pas faire d'hypothèses sur le mécanisme de sécrétion de HalH4. Chez *Hrr*. *arcis* JCM13916 on retrouve dans une orientation opposée à *halH4* comme chez *Hfx mediterranei* ATCC33500, un gène codant un peptide de 14,5 kDa présentant des identités de séquence avec le peptide HFX_5265 chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500. Ce peptide qui est très rarement rencontré dans les génomes d'archées halophiles, pourrait donc jouer un rôle dans la biosynthèse de HalH4 chez *Hfx mediterranei* ATCC33500 et *Hrr. arcis* JCM13916. Cependant son rôle est pour le moment encore inconnu. La localisation chromosomique ou plasmidique de *halH4*, chez les 3 souches *Nab. aegyptia* DSM13077*, Nnm*. *gari* JCM14663 et *Hrr. arcis* JCM13916 , n'est pas connue car les génomes n'ont pas été assemblés. Chez ces 3 souches, on retrouve à proximité de *halH4*, un gène codant une transposase, ce qui pourrait suggérer une acquisition de *halH4* par transfert horizontal de gène. Cependant, chez ces 3 souches l'absence à proximité de *halH4* de gènes codant au moins un transporteur ABC permettant l'export et l'immunité, n'est pas compatible avec le transfert d'un gène *halH4* fonctionnel. Une meilleure compréhension du mode de biosynthèse de HalH4 chez *Hfx*. *mediterranei* DSM1411 serait nécessaire pour connaitre les gènes impliqués réellement dans cette biosynthèse.

Des analyses *in silico* réalisées avec la séquence en acides aminés de ProH4, complétées par des recherches de phases ouvertes de lecture, montre que ProH4 est retrouvé chez *Nab. aegyptia* DSM13077, *Nnm gari* JCM14663, *Hrr. arcis* JCM13916 et avec un score beaucoup plus faible chez *Htg. jeotgali* A29. Chez ces 4 souches, la séquence de ProH4 présente une forte similarité de séquences (Figure 35, pages 78 et 79) avec celle de *Hfx. mediterranei* ATCC33500 mais avec de moins bonnes identités au niveau du peptide signal, à l'exception du double motif d'arginine présents chez toutes les séquences. De plus, la région hydrophobe localisée dans la séquence de *Hfx. mediterranei* ATCC33500 est retrouvée chez *Nab. aegyptia* DSM13077, *Nnm gari* JCM14663, *Hrr. arcis* JCM13916 et *Htg. jeotgali* DSM18794 (Figure 35, page 78 et 79). L'analyse phylogénique montre que la séquence trouvée chez *Htg. jeotgali* A29 ne semble pas apparentée aux autres séquences de ProH4 (Figure 36, page 79). L'arbre montre également qu'il existe 2 clades, d'un côté les séquences de ProH4 de *Hfx. mediterranei*, et d'un autre côté les trois séquences de ProH4 issues de *Nab. aegyptia* DSM13077, *Nnm gari* JCM14663 et *Hrr. arcis* JCM13916. Des amplifications par PCR de *halh4* ont permis de confirmer la présence de ce gène chez *Nab aegyptia* DSM13077, *Nnm gari* JCM14663 et *Hrr arcis* DSM 23454 (JCM13916). Nous avons également amplifié ce gène chez *Natrinema* sp. SWI15. Chez cette souche, un amplicon a été obtenue seulement avec les amorces communes dégénérées, il est probable que cette souche pourrait produire ProH4 comparable à celui de *Nab. aegyptia* DSM13077, *Nnm gari* JCM14663 et *Hrr. arcis* JCM13916.

Pour les souches de *Hfx. alexandrinus* DSM27206 et *Natrinema* sp. SWI15 qui possèdent potentiellement HalC8 (Tableau 4, page 53) en plus de HalH4, l'activité antimicrobienne de HalH4 ne peut donc pas être mise en évidence, car après chauffage, l'activité due à HalC8 thermostable est toujours détectable (Tableau 10, page 88). Il est compliqué d'observer une activité antimicrobienne due à HalH4, car le test antimicrobien est un test indirect, nécessitant la perte de l'activité après une étape de chauffage du surnageant. Seules *Hfx. mediterranei* DSM1411 et *Nab. aegyptia* DSM13077 montrent une activité antimicrobienne thermosensible contre la souche cible, retrouvée dans la culture et le surnageant (Tableau 10, page 88). Chez *Nab. aegyptia* DSM 13077, l'activité est également observée au niveau du culot, ce qui pourrait signifier qu'une partie de HalH4 est associée à la membrane. Enfin, chez *Nnm gari* JCM14663 l'activité est retrouvée uniquement dans la culture et perdue lors de la filtration du surnageant. L'activité observée dans la culture chez *Nnm. gari* JCM14663 ne proviendrait donc pas de HalH4, mais serait plutôt d'origine virale.

Nous avons trouvé deux souches possédant les gènes *halH4* et *halC8* donc susceptibles de produire 2 halocines. Cette production par une même souche de 2 halocines différentes a été également montrée chez *Hbt. salinarum* ETD5 qui produit HalS8 et une nouvelle halocine HalS14 (Ghanmi et al. 2020). Il est possible que la souche de *Hfx. mediterranei* DSM1411 produise également deux halocines. En effet, un mutant où *halH4* a été délété conserve une activité antimicrobienne (Naor et al., 2013). Ceci laisse à penser que *Hfx. mediterranei* DSM1411 produit une seconde halocine. Cependant, contrairement aux souches de *Hfx. alexandrinus* DSM27206 et *Natrinema* sp. SWI15, la seconde halocine produite par *Hfx. mediterranei* DSM1411, serait comme HalH4, une halocine thermolabile, car toute l'activité disparaît lors du chauffage du surnageant. Chez les bactéries, cette situation est retrouvée chez les bactériocines de classe IIb qui produisent deux peptides agissant soit en synergie soit de façon additive (Nissen-Meyer et al., 2010). Il en est de même chez *E. coli* où des souches peuvent produire plusieurs colicines ou plusieurs microcines (Gordon et O'Brien, 2006, Vasssiadis et al., 2010). Il serait intéressant de savoir, si chez les souches productrices de 2 halocines, celles-ci présentent une activité additive ou synergique. Pour cela, il faudrait purifier les deux halocines provenant d'une même souche et réaliser des tests en milieu gélosé, de façon à observer ou non une action synergique des 2 halocines. Il est également possible d'envisager que les 2 halocines ne soient pas produites en même temps, mais dans des conditions environnementales différentes. De plus la production de 2 halocines dans une souche est coûteuse énergétiquement, donc cela procure probablement un certain avantage à la souche productrice.

La purification de HalH4 à partir de *Hfx*. *mediterranei* DSM1411 ne nous a pas permis d'obtenir des fractions actives en sortie de chromatographie échangeuse d'anions. Cependant, par SDS-PAGE une masse compatible avec celle de HalH4 est détectée dans deux fractions. Le fait que HalH4 soit une protéine instable en dehors d'un milieu hypersalin rend

sa purification et la détection de son activité antimicrobienne délicates. Pour mener à bien la purification de HalH4, il serait nécessaire d'utiliser d'autres méthodes chromatographiques, cependant l'utilisation de colonnes à polarité de phase inversée est impossible car nous sommes en présence d'une protéine qui resterait adsorbée sur ce type de support. Par ailleurs, il subsiste le problème de concentration du surnageant de culture. Nos derniers essais de purification en concentrant le surnageant par lyophilisation puis en séparant les composés par chromatographie d'exclusion sont encourageants et pourraient permettre de purifier des quantités significatives de HalH4. Mais ces manipulations n'ont pas encore pu être menées à bien pour l'instant.

CHAPITRE 3

Etude de l'expression des gènes *halC8* et *halH4* : mise au point des conditions de la RT-PCR quantitative

Pour en connaître davantage sur le rôle de HalC8 et HalH4, en particulier sur leur activité antimicrobienne, une étude de l'expression transcriptionnelle des gènes *halC8* et *halH4* a été entreprise. Chez les bactéries lactiques, la production des bactériocines peut être soit augmentée soit diminuée en réponse à des conditions de stress (Quadri et al., 2002 ; Liu et al., 2006 ; Şimşek et al., 2009 ; Chanos et Mygind, 2016 ; Turgis et al., 2016). Dans les milieux hypersalins, de nombreux facteurs peuvent varier et entraîner un stress pour les micro-organismes. La concentration en sels peut varier de manière importante en fonction des épisodes de sécheresse ou de pluie. De même la température peut être très élevée dans les lacs salés des déserts ou au contraire très basse dans les eaux profondes. Par ailleurs, les interactions au sein des communautés microbiennes peuvent engendrer un stress provenant soit de la compétition pour les nutriments, soit de la production de composés toxiques, comme par exemple des halocines. Ainsi, des variations de caractères abiotiques (salinité, température, pH, …) et biotiques (compétition avec des souches d'archées halophiles produisant ou non une halocine) seront envisagées pour voir leur influence sur l'expression des gènes *halC8* et *halH4*.

Dans le chapitre 1 nous avons vu qu'un groupe de gènes pourrait être impliqué dans la production de HalC8. En effet, on retrouve en amont de *halC8*, le gène *halU* codant une protéine transmembranaire qui pourrait servir au transport de différents composés. Il serait donc nécessaire de vérifier que ce gène est bien impliqué dans la biosynthèse de HalC8. Le gène *halR* code un régulateur transcriptionnel. En aval de *halC8*, les gènes *halT2* et *halT3* codent des protéines probablement impliquées dans l'export de HalC8 *via* un système de transporteur ABC. Quant au gène *halT1*, qui se trouve dans une unité de transcription spécifique, il pourrait coder un transporteur d'autoinducteur du quorum sensing, et son rôle dans la biosynthèse de HalC8 reste énigmatique. Une étude de l'expression de ces différents gènes pourrait nous révéler s'il existe une co-régulation des gènes entourant *halC8*. Les gènes *halU, halR* et *halC8* ne sont pas co-transcrits et donc ne font pas partie d'une seule unité de transcription (Besse 2016). Cependant, une co-régulation de ces gènes, au cours de la phase de croissance, pourrait exister.

Par ailleurs, nous ne savons pas quels gènes sont impliqués dans de la biosynthèse de HalH4. Il a été montré que *halH4* est encore transcrit après le maximum de l'activité antimicrobienne et que HalH4 serait impliquée dans des mécanismes de compétence et d'absorption de l'ADN (Chen et al., 2019). Une étude de l'expression de *halH4* en modifiant les conditions de culture de la souche de *Hfx. mediterranei* pourrait nous en apprendre plus.

Enfin, nous souhaitions étudier la compétition entre deux souches productrices d'une halocine. Pour cela il sera nécessaire d'étudier l'expression de *halC8* lorsque le milieu de culture contient HalH4 et inversement, c'est-à-dire étudier l'expression de *halH4* lorsque le milieu de culture contient HalC8. Ces études seront menées préférentiellement par des expériences de co-cultures plutôt que par addition dans le milieu de culture de HalH4 ou de HalC8 purifiées à partir de cultures respectivement de *Hfx. mediterranei* DSM1411 ou de *Nnm. altunense* JCM12890. En effet, nous avons vu précédemment que l'obtention d'halocine purifiée en quantité suffisante est très compliquée.

Pour répondre à toutes ces questions, la méthode de PCR quantitative à partir d'ARN rétrotranscrit est la plus adaptée. Pour une interprétation convenable des résultats obtenus, les niveaux d'expression du gène d'intérêt seront normalisés par rapport à l'expression de gènes de référence exprimés de manière stable. La q-RT-PCR implique une longue phase de mise au point durant laquelle il faut vérifier la spécificité et l'efficacité de couples d'amorces s'hybridant au gène d'intérêt ainsi qu'aux gènes de référence, ceci chez *Nnm*. *altunense* JCM12890 et chez *Hfx*. *mediterranei* DSM1411 produisant respectivement HalC8 et HalH4. L'exactitude des résultats de q-RT-PCR nécessite une normalisation précise de la transcription. En effet, selon les conditions expérimentales et l'organisme étudié, le niveau basal de transcription des gènes de référence peut varier (Rebouças et al., 2013).

Il n'existe pas de gènes de référence universels, puisque l'expression des différents gènes dans les cellules varie suivant les espèces et des facteurs propres aux cellules. En ce qui concerne notre étude, le génome complet des 2 souches *Nnm*. *altunense* JCM12890 et *Hfx*. *mediterranei* ATCC33500 sont disponibles, mais le plus important c'est de connaître le transcriptome. L'analyse du transcriptome de *Hfx mediterranei* a été réalisée au milieu de la phase exponentielle de croissance et au début de la phase stationnaire (Liu et al., 2013b). Parmi les 3863 gènes putatifs contenus dans le génome (chromosome et réplicons extrachromosomiques), à peu près la moitié est exprimée différemment pendant la phase stationnaire. (Liu et al., 2013b). Pour le choix des gènes de référence, on peut considérer que 2 gènes peuvent dans la plupart des cas être utilisés. Il s'agit du gène codant l'ARNr 16S ou 18S, et celui codant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*gapdh*) (Kozera et Rapacz, 2013). Quatre autres gènes impliqués dans la transcription, la traduction ou la réparation de l'ADN, ont été choisis, de façon à sélectionner ensuite les 3 meilleurs (Bustin et al., 2009). Il s'agit : du gène codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*) ; la protéine ribosomique L10 (*rpl10*) ; la protéine RadA de réparation de l'ADN (*radA*) et la séquence de la région transcrite entre le gène codant l'ARNr 16S et le gène codant l'ARNr 23S ou ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1).

Plusieurs couples d'amorces spécifiques des gènes de référence et d'intérêt ont été testés. La liste des différents couples d'amorces figure dans les annexes 3 et 4. Le choix des amorces est compliqué car l'ADN des archées de la classe des *Halobacteria* est particulièrement riche en bases G et C (64,5 % pour *Nnm*. *altunense* et 57,9 % pour le plasmide pHM300 de *Hfx*. *mediterranei*). Il en résulte qu'il existe une forte probabilité que nos amorces s'hybrident entre elles (monomère ou dimère) ou prennent une conformation en épingle à cheveu. De plus, l'efficacité de la q-RT-PCR est meilleure si la taille des amplicons est petite (50-150 pb).

I. PCR quantitative de l'ADNc des gènes de références et de *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890

Avant de présenter nos résultats, il convient de rappeler les différents résultats qui vont permettre de valider la spécificité d'un couple d'amorces. Tout d'abord, il est nécessaire que les courbes de fluorescence des échantillons RT+ (en présence de transcriptase inverse) apparaissent au minimum 10 cycles avant l'apparition des courbes des échantillons RT- (en absence de transcriptase inverse). Théoriquement on ne devrait pas avoir de courbes RT-, mais elles correspondent aux amplifications dues à des traces d'ADNg contenu dans la préparation d'ARN. Ceci permet donc d'apprécier également la qualité de l'extraction de l'ARN. Ensuite, les courbes où la matrice d'ARN est remplacée par de l'eau (RTH20) doivent apparaitre après le 32ème cycle d'amplification. Enfin, à l'issue de la réaction d'amplification, il faut vérifier la présence d'un seul produit de PCR. Pour cela une courbe de fusion a été réalisée permettant de déterminer la température de dénaturation (Tm) du produit. Si l'échantillon d'ARN au départ est homogène, on doit observer un seul pic. Par contre, la courbe de fusion peut révéler une contamination par des dimères d'amorces ou plusieurs pics de Tm, ce qui traduit une hybridation des amorces à plusieurs endroits de l'ARN (Wilhem et Pingoud, 2003).

1. Gène de référence codant l'ARNr 16S chez *Nnm. altunense* JCM12890

Nous commençons par rechercher des couples d'amorces pour le gène de référence le plus courant c'est-à-dire le gène codant l'ARNr 16S. Deux couples d'amorces (Annexe 3) ont été choisies puis analysées et validées par les programmes Primer3 Plus et OligoAnalyzer. La quantité d'échantillon au départ est tellement importante que la détection de notre ADNc est immédiate et la valeur du cycle seuil (Cs) ou CP n'apparaît pas dans l'afficheur de l'appareil (Figure 45).

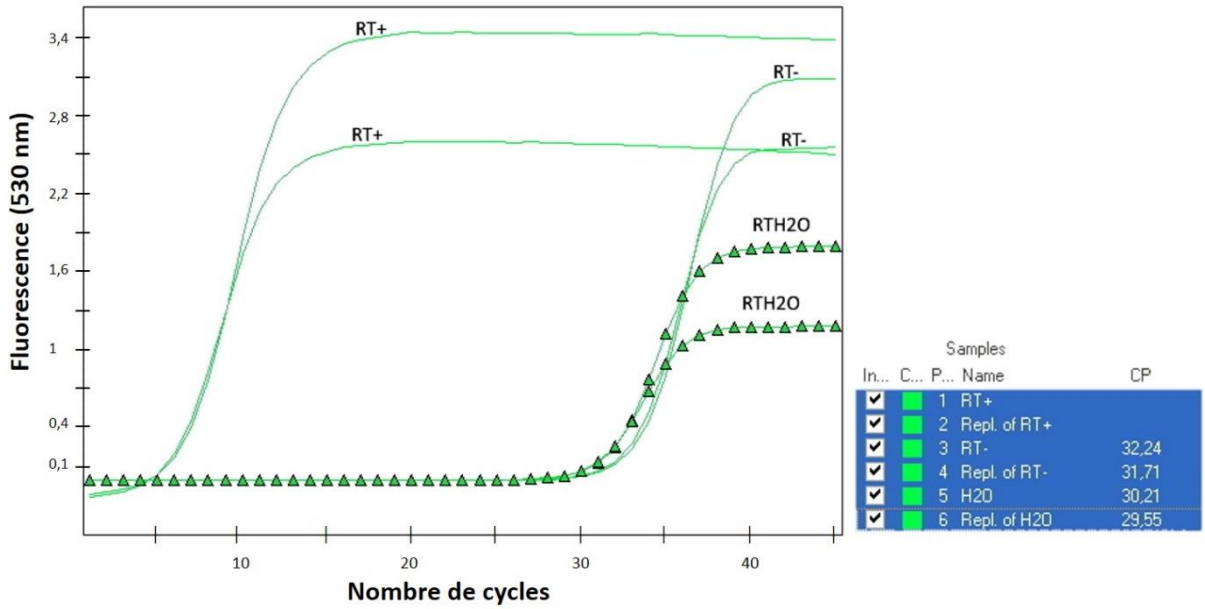


Figure 45. Courbe d'amplification du gène codant l'ARNr 16S chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces 16S-Na-F1/16S-Na-R1.
Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN. L'encart sur fond bleu présente les résultats présentés par le thermocycleur.

Comme le gène *halC8* ne sera présent dans les cellules d'archée qu'en faible quantité, le gène codant l'ARNr 16S ne peut donc pas être utilisé comme gène de référence.

2. Gène de référence codant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*gapdh*) chez *Nnm. altunense* JCM12890

Pour l'étude de ce gène 9 couples d'amorces ont été testés (Annexe 3). Nous avons testé ces amorces malgré une probabilité non négligeable de création de monomère, de dimère ou de structure en épingle à cheveux.

Malgré de multiples tentatives d'optimisation en faisant varier notamment la température d'hybridation de 60 à 64 °C, aucun des 9 couples n'a donné de résultats satisfaisants. Soit le seuil de référence de nos échantillons (RT+) était trop proche de nos contrôles négatifs de rétrotranscription (RT-) et de RTH20 (Figure 46), soit nos amorces se fixaient entre elles préférentiellement à notre ADNc, c'est pourquoi nous observions un Tm en amont de celui attendu pour nos échantillons (Figure 47).

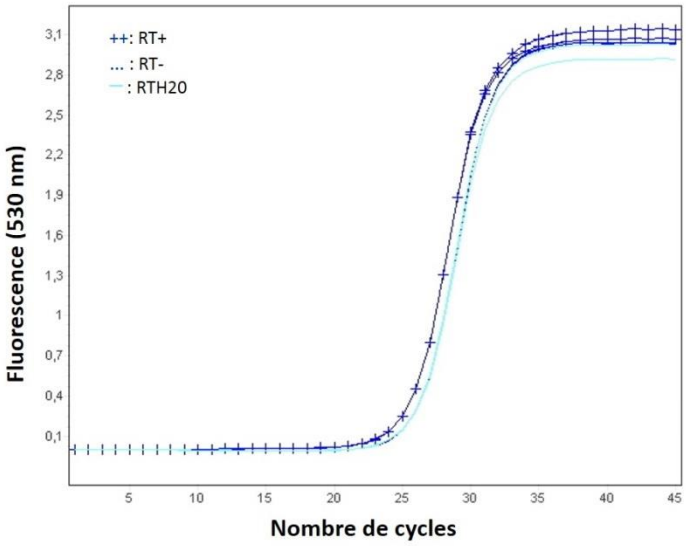


Figure 46. Courbe d'amplification du gène *gapdh* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces gapdh-Na-F8/gapdh-Na-R8.
Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN.

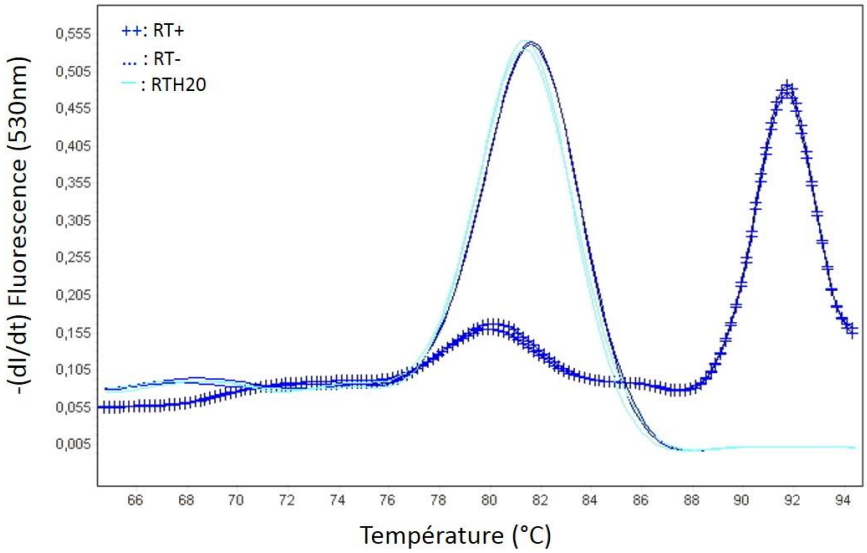


Figure 47. Courbe de fusion des amplicons, obtenus après q-RT-PCR du gène *gapdh* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces gapdh-Na-F8/gapdh-Na-R8, en fonction de la température.

3. Séquence de la région transcrite entre le gène codant l'ARNr 16S et le gène codant l'ARNr 23S (ITS1) chez *Nnm. altunense* JCM12890

Pour l'étude de la séquence de cette région transcrite 2 couples d'amorces ont été testés (Annexe 3). Le couple d'amorces ITS1-Na-F1/ITS1-Na-R2, à une température d'hybridation de 60 °C, nous a donné des résultats encourageants pour la suite. Le signal de fluorescence de l'échantillon RT+ (Cs de 23,25 et 23,34) a bien été détecté 10 cycles avant le signal de fluorescence du contrôle RT- (Cs de 34,44 et 33,33). Le signal de fluorescence de

l'échantillon RT- est dû à la faible quantité d'ADNg qui reste dans l'échantillon et dont l'amplification est assez importante après 33 cycles d'amplification (Figure 48). De plus, le signal de fluorescence de l'échantillon contenant de l'eau à la place de la matrice d'ARN a bien été détecté après le trente-deuxième cycle (Figure 48). Enfin, même si nos amorces ont tendance à se fixer entre elles, ce que nous pouvons voir dans les contrôles, elles se fixent préférentiellement à notre ADNc en présence de celui-ci (RT+), c'est pourquoi nous observons un seul pic de température pour les échantillons (Figure 49).

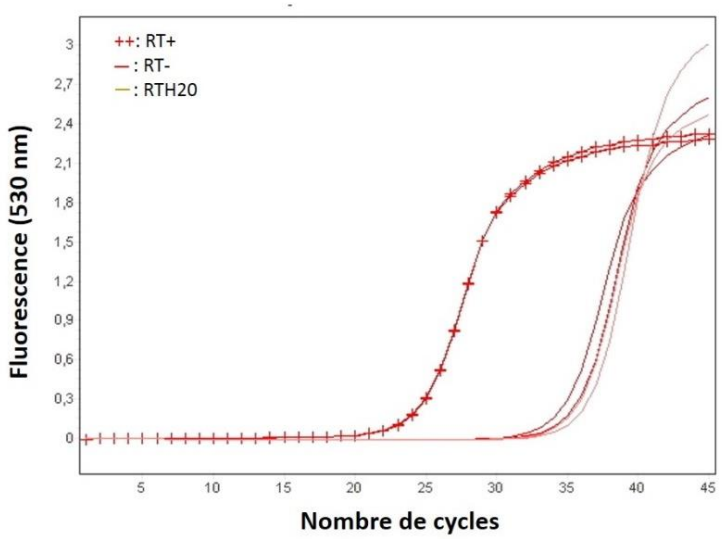


Figure 48. Courbe d'amplification du gène codant la région ITS1 chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces ITS1-Na-F1/ITS1-Na-R2.
Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN.

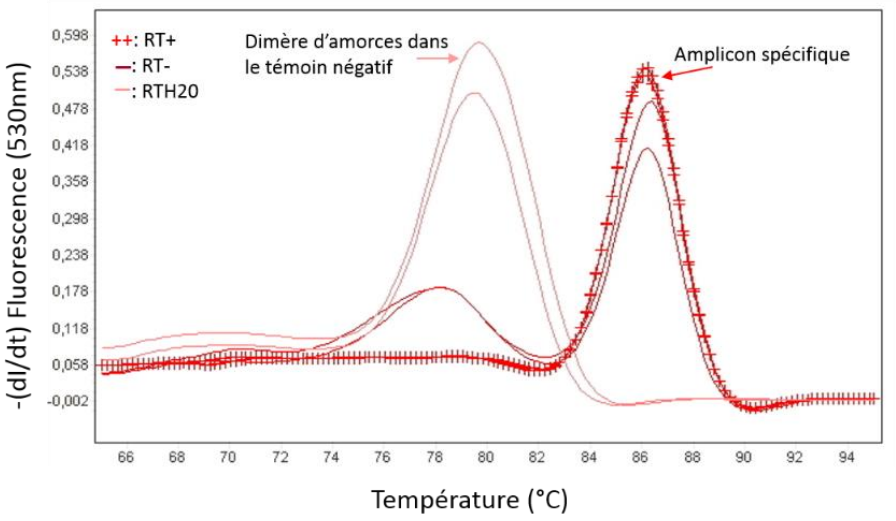


Figure 49. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR de la séquence ITS1 chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces ITS1-Na-F1/ITS1-Na-R2, en fonction de la température.

4. Gène de référence codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*) chez *Nnm. altunense* JCM12890

Pour l'étude du gène *rpoB*, 4 couples d'amorces ont été testés, après analyse et validation (Annexe 3). Le couple d'amorces rpoB-Na-F4/rpoB-Na-R4 a montré des courbes de résultats intéressantes, à une température d'hybridation de 60 °C. Nous avons bien obtenu 10 cycles d'écart entre le cycle de détection du signal de fluorescence de l'échantillon RT+ (Cs de 24,21 et 24,44) et celui du contrôle RT- (Cs de 35,79 et 33,97). Le signal de fluorescence de l'échantillon contenant H_2O a bien été détecté après le trente-deuxième cycle, ainsi que pour l'échantillon contrôle de rétrotranscription RT^0 (contrôle réalisé en l'absence d'ADN, mais en présence d'enzyme) (Figure 50). Nos amorces s'apparient entre elles dans les échantillons de contrôle mais ce n'est pas le cas dans nos échantillons RT^+ et RT^- (Figure 51).

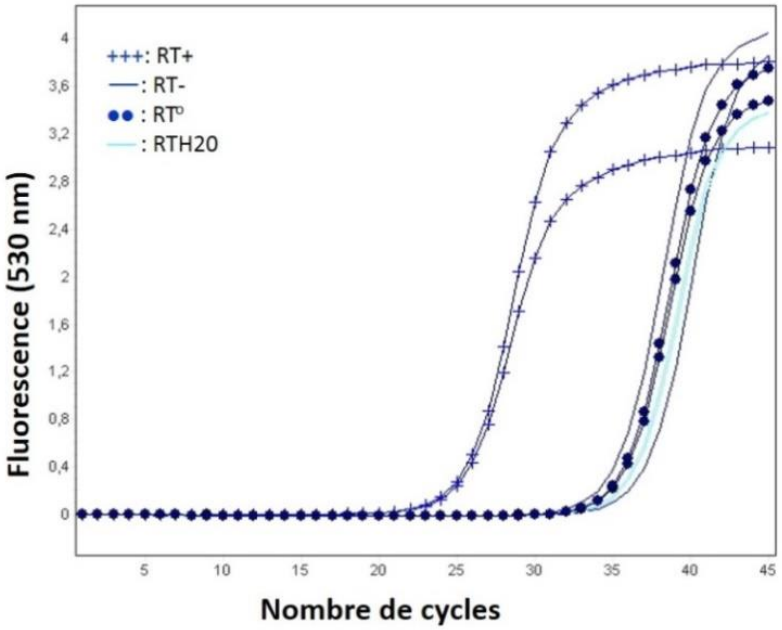


Figure 50. Courbe d'amplification du gène *rpoB* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpoB-Na-F4/rpoB-Na-R4.
Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN ; R° contrôle sans ARN mais en présence de transcriptase inverse.

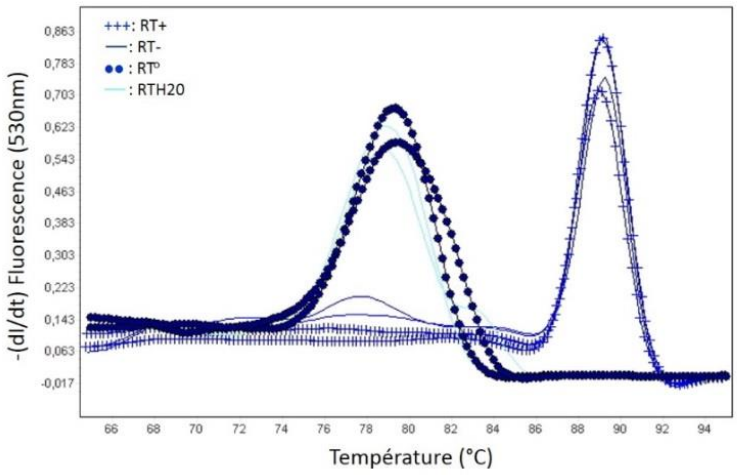


Figure 51. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène *rpoB* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpoB-Na-F4/rpoB-Na-R4, en fonction de la température.

5. Gène de référence codant la protéine de réparation et de recombinaison de l'ADN RadA (*radA*) chez *Nnm. altunense* JCM12890

Pour l'étude de ce gène 3 couples d'amorces ont été testés, après analyse et validation (Annexe 3). Le couple d'amorces radA-Na-F2/radA-Na-R2 a été sélectionné pour la suite de notre étude, avec une température d'hybridation de 64 °C. Dix cycles séparent le signal de détection de fluorescence de nos échantillons RT+ (Cs de 23,85 et 23,87) et RT- (Cs de 33,68 et 34,88). Nos contrôles RT^0 (Cs de34,59 et 35,14) et RTH20 (Cs de 33,52 et 35,91) présentent un signal détecté à partir du trente troisième cycle (Figure 52).

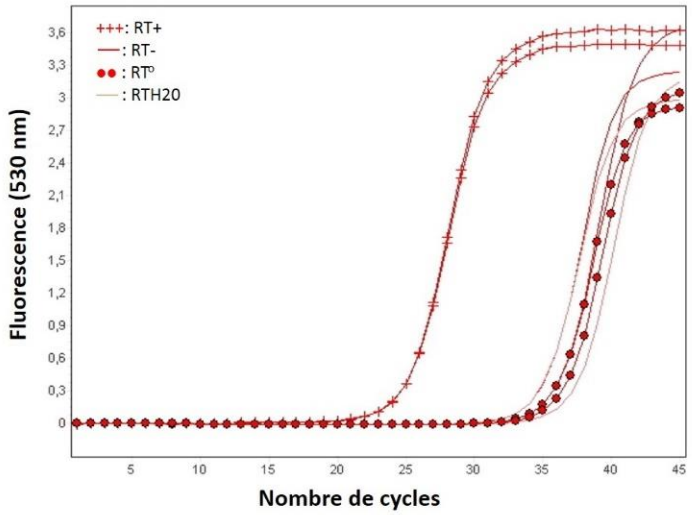


Figure 52. Courbe d'amplification du gène *radA* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces radA-Na-F2/radA-Na-R2.
Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN ; R° contrôle sans ARN mais en présence de transcriptase inverse.

Nos amorces se fixent très bien à notre matrice ADNc dans nos échantillons RT+ et à notre ADNg résiduel dans nos échantillons RT-, elles s'associent entre elles dans les échantillons de contrôle (Figure 53).

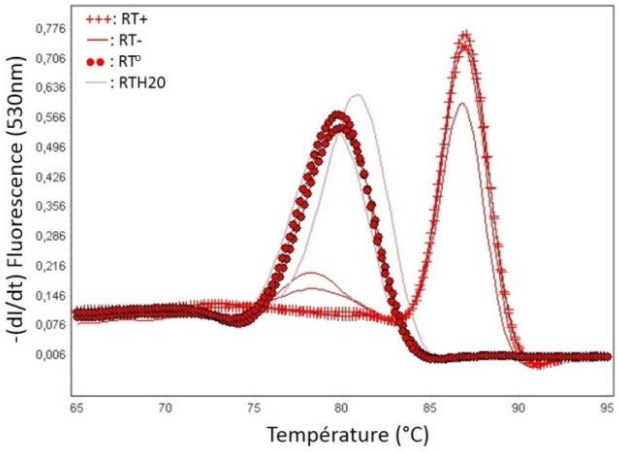


Figure 53. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène *radA* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces radA-Na-F2/radA-Na-R2, en fonction de la température.

6. Gène de référence codant la protéine ribosomique L10 (*rpl10*) chez *Nnm. altunense* JCM12890

Deux couples d'amorces ont été testés pour ce gène (Annexe 3). Le couple d'amorces rpl10-Na-F1/rpl10-Na-R1, utilisé à une température d'hybridation de 60 °C, donne de bons résultats. En effet, il y a bien 10 cycles d'écart entre le cycle de détection du signal de fluorescence des échantillons RT+ (Cs de 20,52 et 20,67) et celui des échantillons RT- (Cs de 32 ,17 et 32,59), et le contrôle de RTH2O présente un signal de fluorescence détecté au 32-33^{e} cycle (Figure 54).

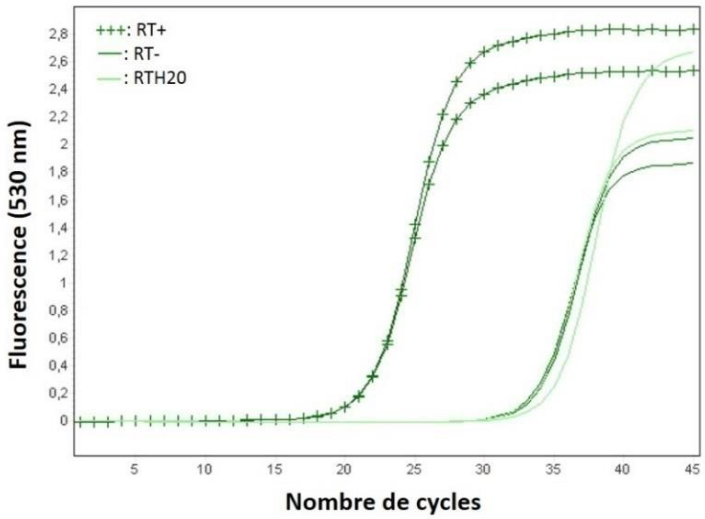


Figure 54. Courbe d'amplification du gène *rpl10* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpl10-Na-F1/rpl10-Na-R1.
Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN.

Les amorces Rpl10-F1/Rpl10-R1 s'apparient préférentiellement à notre ADNc dans nos échantillons RT+, mais elles s'apparient entre elles mais aussi à notre ADNg résiduel dans les échantillons RT- (Figure 55).

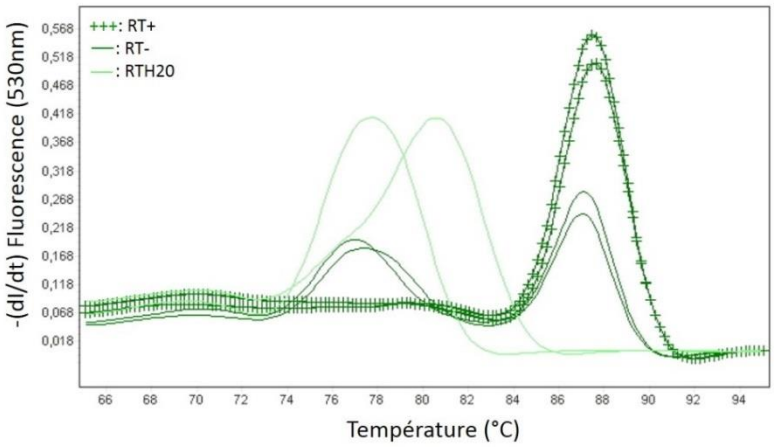


Figure 55. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène *rpl10* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces rpl10-Na-F1/rpl10-Na-R1, en fonction de la température.

7. Gène d'intérêt *halC8* codant le précurseur de l'halocine C8 chez *Nnm. altunense* JCM12890

Pour l'étude de notre gène d'intérêt, *halC8* codant ProC8, cinq couples d'amorces ont été testés (Annexe 3). Le couple d'amordes halC8-Na-F4/halC8-Na-R4 (amplification d'un fragment codant une partie de HalI) présente les résultats les plus encourageants à une température d'hybridation de 60 °C. En effet, le signal de fluorescence de l'échantillon RT+(Cs de 20,93 et 21,00) et celui du RT- (Cs de 36,06 et 33,85) apparait bien plus de 10 cycles après. Pour les échantillons de contrôle RTH20 et contrôle RT^0, le signal de fluorescence est détecté complètement en fin de la réaction de q-PCR, après le trente troisième cycle (Figure 56). De plus, nos amorces se fixent bien à la matrice d'ADNc et non entre elles dans nos échantillons RT+ (Figure 57).

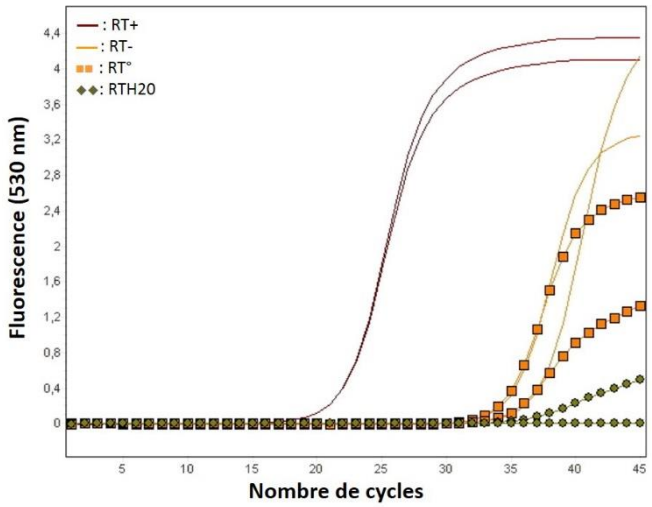


Figure 56. Courbe d'amplification du gène d'intérêt *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890 avec les amorces halC8-Na-F4/halC8-Na-R4.

Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN ; R° contrôle sans ARN mais en présence de transcriptase inverse.

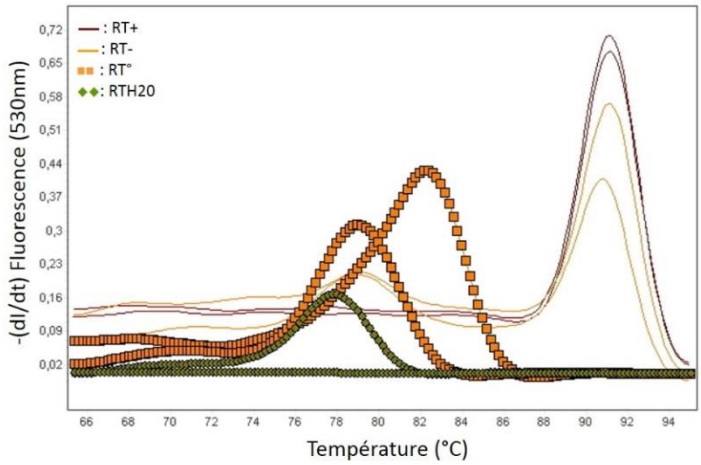


Figure 57. Courbe de fusion des amplicons, obtenu après q-RT-PCR du gène d'intérêt *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890 amplifié avec les amorces halC8-Na-F4/halC8-Na-R4, en fonction de la température.

II. PCR quantitative de l'ADNc des gènes de référence et de *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411

1. Gènes de référence *gapdh, rpoB, radA et rpl10* et séquence ITS1 chez *Hfx. mediterranei* DSM1411

Nous n'avons pas recherché de couples d'amorces pour le gène codant l'ARNr 16S car nous savons que ce gène sera surexprimé et que nous ne pourrons pas normaliser les résultats de notre gène d'intérêt *halH4* par rapport aux résultats du gène codant l'ARNr 16S.

Pour l'étude du gène *gapdh*, nous avons testés 3 couples d'amorces (Annexe 4). Le couple d'amorces gapdh-Hm-F3/gapdh-Hm-R3 a été retenu pour la suite de l'étude, avec une température d'hybridation à 64 °C. La courbe d'amplification montre un signal de fluorescence pour les échantillons RT+ à partir du 25^{e} cycle, ce qui est tard, l'idéal étant aux alentours du 20ème cycle (Figure 58).

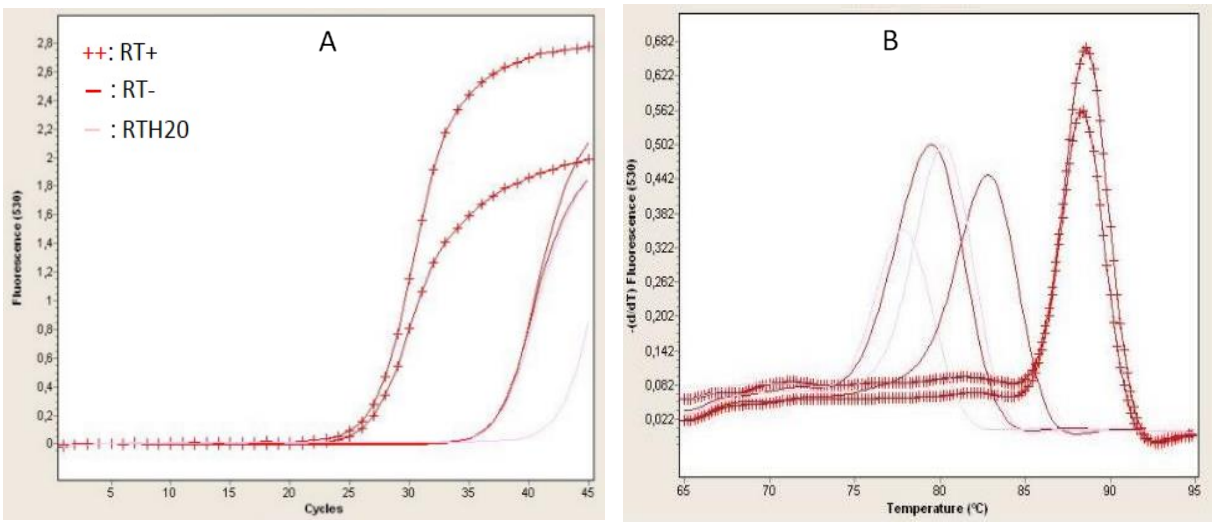


Figure 58. Test de spécificité des amorces gapdh-Hm-F3/gapdh-Hm-R3 s'hybridant au gène *gapdh* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.
A : courbes d'amplification. Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN B : courbes de fusion en fonction de la température.

Pour l'étude de la séquence ITS, nous avons testé 2 couples d'amorces (Annexe 4). Le couple d'amorces ITS1-Hm-F2/ITS1-Hm-R2, testé à une température d'hybridation de 64 °C, donne de bons résultats. Cependant, il serait préférable que le contrôle de RTH20 présente un cycle de détection plus élevé (Figure 59).

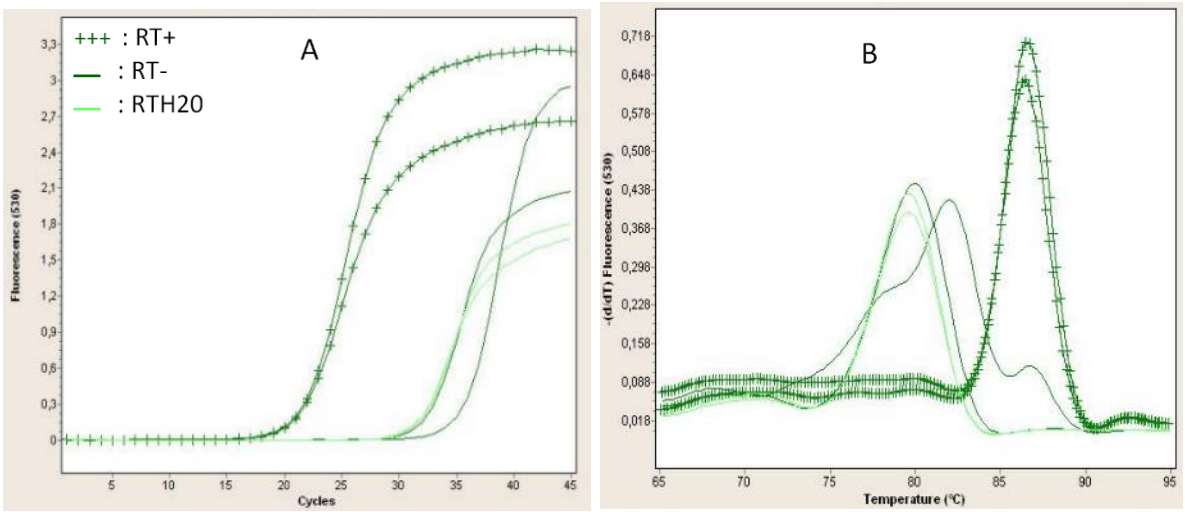


Figure 59. Test de spécificité des amorces ITS1-Hm-F2/ITS1-Hm-R2 s'hybridant à la séquence ITS1 chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.
A : courbes d'amplification. Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN B : courbes de fusion en fonction de la température.

Pour l'étude du gène codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*), le seul couple d'amorces rpoB-Hm-F/rpoB-Hm-R (Annexe 4) testé présente de bons résultats avec une température d'hybridation de 63 °C (Figure 60). Il en est de même pour le gène codant la protéine de réparation et de recombinaison de l'ADN : RadA (*radA*), le couple d'amorces radA-Hm-F/radA-Hm-R (Annexe 4) a été sélectionné pour la suite de l'étude, avec une température d'hybridation de 63 °C (Figure 61). Le couple rpl10-Hm-F/rpl10-Hm-R a été le seul testé pour l'étude du gène codant la protéine ribosomique L10 (*rpl10*) et à une température d'hybridation de 60 °C, ce couple présente des résultats encourageants (Figure 62).

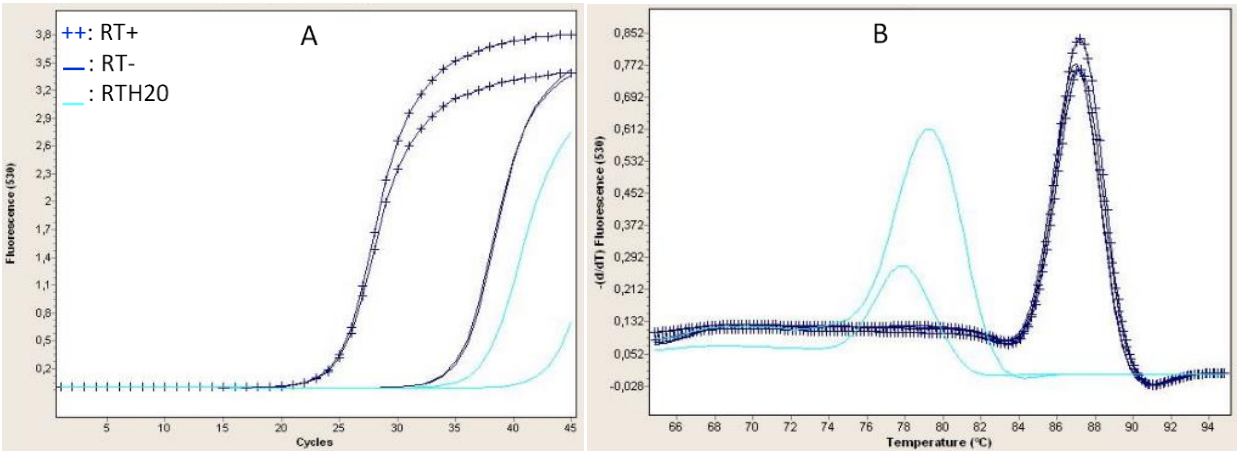


Figure 60. Test de spécificité des amorces rpoB-Hm-F/rpoB-Hm-R s'hybridant au gène *rpoB* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.
A : courbes d'amplification. Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN. B : courbes de fusion en fonction de la température.

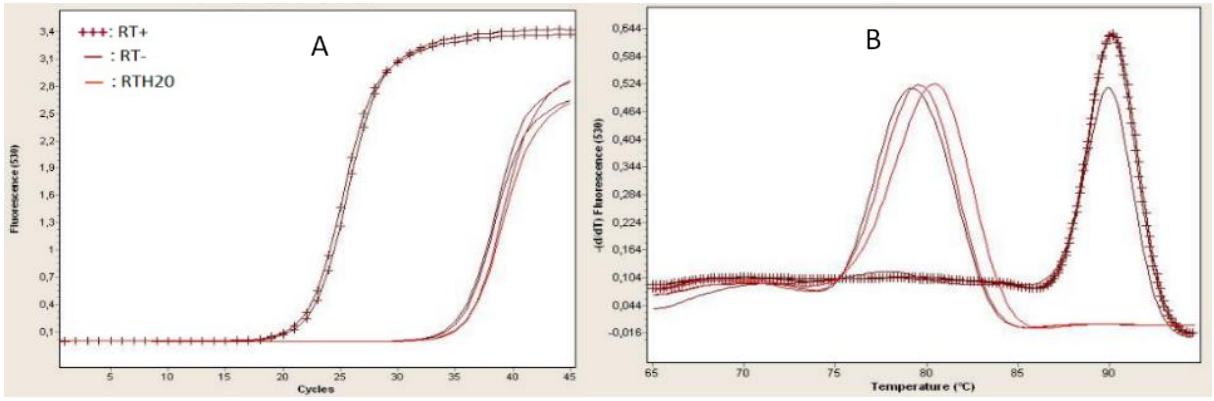


Figure 61. Test de spécificité des amorces radA-Hm-F/radA-Hm-R s'hybridant au gène *radA* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.
A : courbes d'amplification. Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN. B : courbes de fusion en fonction de la température.

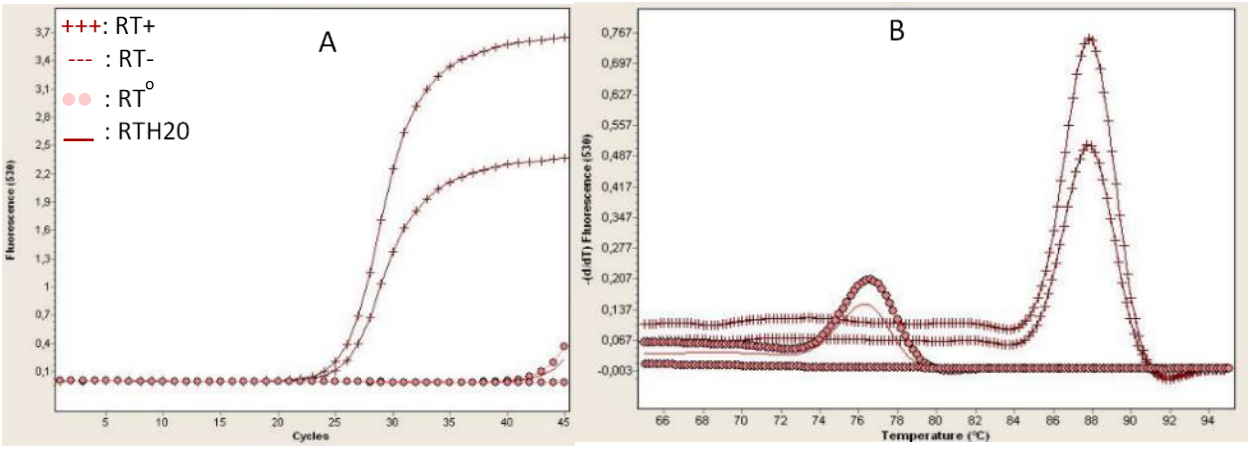


Figure 62. Test de spécificité des amorces rpl10-Hm-F/rpl10-Hm-R s'hybridant au gène *rpl10* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.
A : courbes d'amplification. Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN ; R° contrôle sans ARN mais en présence de transcriptase inverse. B : courbes de fusion en fonction de la température.

2. Gène d'intérêt *halH4* codant le précurseur de l'halocine H4 chez *Hfx. mediterranei* DSM1411

Enfin pour l'étude de notre gène d'intérêt *halH4*, nous avons testé 2 couples d'amorces (Annexe 4). Le couple halH4-Hm-F1/halH4-Hm-R1 est sélectionné pour la suite de notre étude (Figure 63).

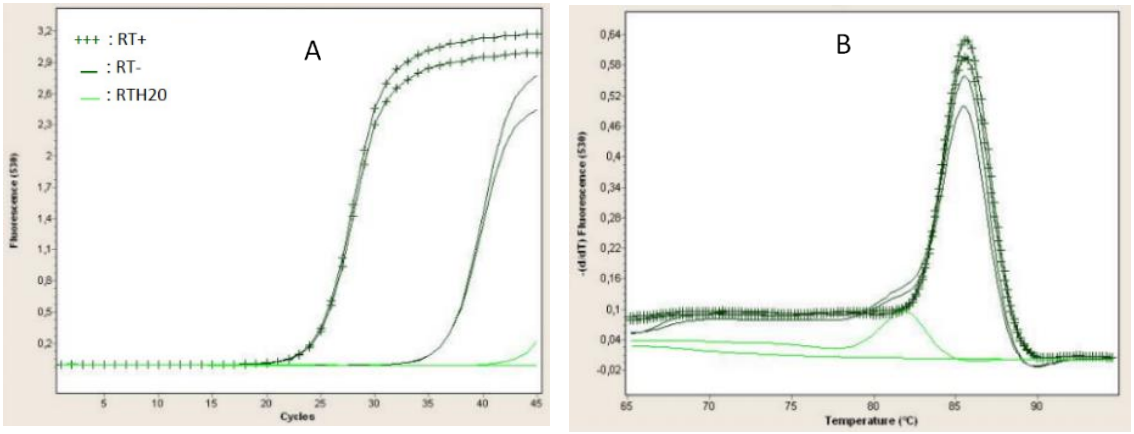


Figure 63. Test de spécificité des amorces halH4-Hm-F1/halH4-Hm-R1 s'hybridant à *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411.
A : courbes d'amplification. Le signal de fluorescence à 530 nm est mesuré en fonction du nombre de cycles d'amplification. Chaque réaction est réalisée en double. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc ; RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse ; RTH2O : contrôle négatif, l'eau remplace l'ARN. **B** : courbes de fusion en fonction de la température.

Le tableau 11 présente les résultats obtenus lors des essais préliminaires avec les meilleurs couples d'amorces pour étudier l'expression des gènes *halC8* et *halH4* par q-RT-PCR. Les gènes et la séquence ITS1 en caractères gras sont validés pour la suite de l'étude.

Tableau11. Récapitulatif de la détection du signal de fluorescence (cycle seuil) obtenu par q-RT-PCR pour les amorces s'hybridant aux gènes de référence et aux gènes d'intérêt *halC8* et *halH4*.

Gène/Séquence	Amorces	RT+		RT-		RTH2O	
Nnm. altunence JCM12890							
ARN16S	16s-Na-F1/16s-Na-R1	ND	ND	32,24	31,71	30,21	29,55
gapdh	gapdh-Na-F8/gapdh-Na-R8	24,17	24,21	24,82	24,78	24,76	24,77
ITS1	ITS-Na-F1/ITS-Na-R2	**23,25**	**23,34**	**34,44**	**33,33**	**35,21**	**34,53**
radA	radA-Na-F2/radA-Na-R2	**23,85**	**23,87**	33,68	**34,88**	**33,52**	**35,91**
rpl10	rpl10-Na-F1/rpl10-Na-R1	**20,52**	**20,67**	**32,17**	**32,59**	**32,54**	**33,85**
rpoB	rpoB-Na-F4/rpoB-Na-R4	**24,21**	**24,44**	**35,79**	33,97	**34,87**	**35,02**
halC8	halC8-Na-F4/halC8-Na-R4	**20,93**	**21,00**	**36,06**	**33,85**	**33,13**	**33,76**
Hfx. mediterrranei DSM1411							
gapdh	gapdh-Hm-F3/gapdh-Hm-R3	**25,66**	**25,95**	**36,24**	**35,96**	**36,33**	**>40,00**
ITS1	ITS-Hm-F2/ITS-Hm-R2	**20,58**	**20,88**	**34,58**	**31,10**	30,26	30,67
radA	radA-Hm-F/radA-Hm-R	**24,72**	**24,61**	ND	ND	ND	**>40,00**
rpl10	rpl10-Hm-F/rpl10-Hm-R	**20,97**	**21,13**	**34,23**	**34,27**	**34,88**	**34,94**
rpoB	rpoB-Hm-F/rpoB-Hm-R	**23,71**	**23,74**	**34,07**	**34,25**	**>40,00**	**36,12**
halH4	halH4-Hm-F1/halH4-Hm-R1	**23,73**	**23,70**	**35,67**	**35,54**	**>40,00**	**>40,00**

Les chiffres indiquent les valeurs en duplicat du cycle seui (Cs) à partir duquel le signal de fluorescence est détecté. Les valeurs indiquées en gras valident la spécifité des amorces. RT+ : échantillon avec ARN rétrotranscrit en ADNc. RT- : échantillon avec ARN mais sans la transcriptase inverse. RTH2O : contrôle négatif où l'eau remplace l'ARN. ND : non déterminable.
Les gènes et la séquence ITS1 en caractères gras sont validés pour la suite de l'étude.

III. Discussion

Pour l'étude de l'expression du gène *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890 par RT-PCR quantitative, six gènes de référence avaient été sélectionnés. Après les nombreux essais, des couples d'amorces pour les 3 gènes de référence (*radA, rpl10* et *rpoB*) ainsi que la séquence ITS1 répondent aux critères de spécificité. En ce qui concerne notre gène d'intérêt *halC8*, un couple d'amorces permet également de répondre aux critères de spécificité.

Pour l'étude de l'expression du gène *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411 par RT-PCR quantitative, 3 gènes de référence (*gapdh, rpl10* et *rpoB*) et la séquence ITS1 ont été sélectionnés . Des couples d'amorces pour ces 4 gènes répondent aux critères de spécificité. Pour le gène d'intérêt *haH4*, un couple d'amorce répond également aux critères de spécificité.

L'étape suivante consistera à vérifier la reproductibilité des amplifications avec les différents couples d'amorces choisis et l'efficacité des couples choisis afin de ne conserver que

les trois meilleurs couples. Un couple d'amorces est dit efficace si un doublement de la quantité d'ADNc est observé à chaque cycle.

Les couples d'amorces sélectionnés ne sont malheureusement pas parfaits. En effet, pour certains le cycle de détection du signal de fluorescence de nos échantillons RT+ est aux alentours des cycles 23 à 26. Or lors de la réalisation de la gamme d'efficacité, il ne faut pas dépasser 30 cycles. Cela impose beaucoup de points pour déterminer la linéarité en utilisant des dilutions rapprochées et par conséquent un dépassement du 30ème cycle. Il est donc nécessaire d'obtenir des amplicons RT+ présentant un signal de fluorescence détecté avant le 20ème cycle et après le 34ème cycle pour les amplicons RT-. Pour arriver à un tel résultat, il est nécessaire d'optimiser encore notre protocole d'extraction d'ARN, pour récupérer des échantillons contenant des quantités plus élevées d'ARN, de meilleure qualité et moins contaminés par de l'ADNg. Enfin, alors nous pourrons tester l'efficacité de nos couples d'amorces validés pour leur spécificité.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les archées qui constituent le 3ème domaine du vivant sont des micro-organismes colonisant majoritairement les milieux extrêmes mais elles participent également à de nombreux microbiotes dont le système digestif des ruminants et celui de l'homme. Ce projet avait pour but d'étudier les halocines, peptides antimicrobiens produits par les archées halophiles isolées des milieux hypersalins. Alors que les peptides antimicrobiens produits par les bactéries ont été depuis longtemps très étudiés, les données concernant les halocines, leurs modes d'action et leur rôle au sein des environnements hypersalins sont jusqu'à présent rares et ce domaine de recherche reste encore peu explorée.

Notre étude s'est focalisée sur deux halocines dont la séquence nucléotidique du gène codant les précurseurs ProC8 et ProH4 était connue. Nous avons cherché à savoir si les gènes *halC8* et *halH4* étaient fréquemment rencontrés dans les génomes des archées halophiles extrêmes. Nous avons également engagé une étude sur leur voie de biosynthèse et leur mode d'action.

Nous avons montré dans cette étude que le gène *halC8* est présent chez les différentes espèces des genres *Natrinema* et *Haloterrigena*, deux genres phylogénétiquement très proches de la famille des *Natrialbaceae*. Mais *halC8* est également retrouvé chez d'autres espèces d'archées halophiles de la classe des *Halobacteria* comme plusieurs espèces du genre *Haloferax*, mais aussi chez des espèces des genres *Halobacterium*, *Halococcus*, *Halopige*r, *Halorussus*, *Halostella* et *Natronorubrum*. Le gène *halC8* est également présent chez des espèces du genre *Methanosarcina*, qui sont des archées méthanogènes halophiles appartenant à la classe des *Methanomicrobia* et chez plusieurs souches d'archées hyperthermophiles sulfato-réductrices de l'espèce *Archaeoglobus fulgidus* appartenant à la classe des *Archaeoglobi.* Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que *halC8* est retrouvé chez toutes les souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* quel que soit leur origine géographique. Cette répartition géographique large montrerait que ce gène, localisé sur le chromosome, fait partie intégrante du génome de ces deux genres, et qu'il n'a pas été acquis pas un transfert horizontal de gènes entre archées halophiles. Cela laisse supposer que HalC8 pourrait avoir un autre rôle physiologique plus fondamental, que celui d'un peptide antimicrobien. Ceci a d'ailleurs été évoqué récemment pour HalH4 qui serait impliqué dans l'induction de l'absorption de l'ADN et donc serait potentiellement un activateur de compétence chez *Hfx. mediterranei* (Chen at al., 2019). Nous avons également montré que contrairement à *halC8* présent chez de nombreuses espèces, le gène *halH4*, localisé sur des mégaplasmides de 322 kb, n'est retrouvé que chez un nombre restreint de souches appartenant à des genres éloignés phylogénétiquement : *Haloferax*, *Halorubrum, Natrialba*, et *Natrinema*.

Le gène *halC8* code le précurseur ProC8 qui présente plusieurs régions dont la protéine d'immunité et HalC8 mature. C'est un exemple unique où la protéine d'immunité est localisée sur le même gène que celui codant le peptide antimicrobien. Nous avons montré que chez *Natrinema* et *Haloterrigena*, les identités de séquences en acides aminés de ProC8 se retrouve aussi bien au niveau de la protéine d'immunité qu'au niveau de l'halocine mature. Par contre chez toutes les autres espèces possédant un gène *halC8*, les identités de séquence ne sont observées qu'au niveau de HalC8. L'analyse phylogénétique des séquences de HalC8 a montré qu'il existait deux clades, l'un avec toutes les séquences provenant des espèces de *Natrinema*, *Haloterrigena* ainsi que 3 séquences provenant d'*Haloferax*, le second rassemblant les autres séquences provenant des autres espèces d'*Haloferax* et *Halobacterium*. Au contraire de *halC8*, *halH4* ne code pas la protéine d'immunité, mais seulement le précurseur ProH4. Chez les bactériocines des bactéries à Gram positif ou les microcines d'*E. coli*, le gène codant la protéine d'immunité est toujours localisé à côté du gène codant le peptide antimicrobien et dans une même unité de transcription. Nous avons étudié la nature des gènes situés à proximité de *halH4* chez *Hfx. mediterranei* et montré qu'il n'existe aucun gène adjacent à *halH4* dans une même unité de transcription qui pourrait coder une protéine d'immunité. Par contre, en amont de *halH4*, on observe plusieurs gènes codant des protéines qui pourraient être impliquées dans l'export de HalH4. Chez *Hfx. mediterranei*, on peut imaginer un mécanisme similaire à celui observé chez les microcines de classe I, où l'immunité est assurée par des protéines d'export présentes dans le groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse de ces peptides antimicrobiens.

Nous avons montré que l'organisation du groupe de gènes conduisant à la biosynthèse de HalC8 chez la souche de *Natrinema* sp. AS7092 est retrouvée chez les souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* dont le génome est disponible. On observe chez *Natrinema* sp. AS7092 que *halC8* est entouré de 5 gènes. Le gène *halU* est présent dans les différents groupes de gènes mais son rôle dans la biosynthèse de HalC8 demeure obscur. Le gène *halR* adjacent à *halC8* code une protéine régulatrice qui n'est pas retrouvée dans tous les groupes de gènes chez *Natrinema* et *Haloterigena*. Son rôle dans la régulation de l'expression de *halC8* reste à démontrer. Les gènes *halT2* et *halT3* codent 2 constituants de transporteur ABC qui pourraient être impliqués dans l'export de HalC8. Quant au gène *halT1*, il code une protéine participant à l'efflux d'autoinducteur du quorum sensing. Son rôle dans la biosynthèse de HalC8 serait également à préciser. Chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500 productrice de HalH4, le gène *halH4* est entouré de différents gènes dont certains codent des protéines qui pourraient être impliquées dans l'export de HalH4, mais qui pourrait également jouer un rôle dans l'immunité. Contrairement à ce que l'on a observé chez les différents groupes de gènes impliqués dans la biosynthèse de HalC8 chez *Natrinema* et *Haloterrigena*, on n'observe pas une organisation conservée des gènes aux alentours de *halH4* chez *Nab. aegyptia* DSM13077, *Nnm*. *gari* JCM14663 et *Hrr*. *arcis* JCM13916. Cependant chez *Hrr*. *arcis* on retrouve orienté en sens

opposé à *halH4*, un gène homologue à celui présent chez *Hfx. mediterranei* ATCC33500. Comme nous pouvons le voir, la voie de biosynthèse de HalC8 et de HalH4 est encore loin d'être élucidée, et le rôle des différents gènes à proximité de *halC8* et de *halH4* doit être précisé. C'est pourquoi, nous avons entamé l'étude de l'expression de *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890 et de *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411 par q-RT-PCR. Des gènes de référence ont été validés chez *Nnm. altunense* JCM12890 et chez *Hfx*. *mediterranei* DSM1411 et des couples d'amorces sont disponibles pour nos gènes d'intérêt *halC8* et *halH4*. Cependant avant de poursuivre, il sera nécessaire d'optimiser encore notre protocole d'extraction d'ARN, pour récupérer des échantillons contenant des quantités plus importantes, de meilleure qualité d'ARN et moins contaminés par de l'ADNg. Ce travail pourra être poursuivi après mon diplôme et toute cette phase de mise au point sera alors valorisée. Une fois les mises au point terminées, le but sera de mesurer le taux de transcription des gènes *halC8* et *halH4* au cours de la phase de croissance. Nous compléterons cette étude par celle de l'expression des gènes *halU, halR, halT1, halT2* et *halT3* présents, chez *Nnm. altunense* JCM12890, dans le groupe de gènes afin de connaitre leur profil d'expression et de connaître leur rôle dans la biosynthèse de HalC8. De la même manière, on pourra étudier l'expression des gènes adjacents à *halH4* chez *Hfx. mediterranei* DSM1411, afin de savoir s'ils sont impliqués dans la biosynthèse de HalH4. A plus long terme, afin d'identifier les fonctions exactes de chacun des gènes contenus dans le groupe de gènes impliqué dans la biosynthèse de HalC8, ils devront être mutés un par un, afin d'observer le phénotype résultant. Les gènes pourront être mutés par la méthode de pop-in / pop-out décrit chez l'archée halophile *Hfx. volcanii* et qui consiste en deux évènements de recombinaison homologue successifs résultant en un remplacement du gène sauvage par sa version mutée (Allers et Mevarech, 2005). Après mutations de chacun des gènes, des tests antimicrobiens pourront être réalisés afin d'observer si l'activité est conservée et des analyses par spectrométrie de masse permettront de vérifier si le précurseur est toujours clivé ou si la production de HalC8 est modifiée.

Il serait également intéressant d'analyser l'expression des gènes *halC8* et *halH4* par q-RT-PCR en faisant varier différents facteurs abiotiques : salinité, température, pH ou un facteur biotique en testant par exemple la présence d'une souche compétitrice. Cette dernière expérience pourrait permettre de connaître les conditions qui régulent la transcription des gènes *halC8* et *halH4* et de formuler des hypothèses sur le rôle de HalC8 et de HalH4 dans les compétitions microbiennes.

L'étude réalisée sur l'activité antimicrobienne de HalC8 a révélé une activité interdomaine, puisque que HalC8 présente une activité contre une bactérie halophile extrême, *S. ruber*, fréquemment rencontrée dans les milieux hypersalins. Une telle activité interdomaine est un phénomène rarement observé (Atanasova et al., 2013). En outre, HalH4 présente un large spectre d'activité, ce qui confirme les premiers résultats (Rodríguez-Valera et al., 1982). Cependant, contrairement à HalC8, son activité est uniquement dirigée contre

des archées halophiles. Nous avons également observé que parmi les souches testées, celles de *Hfx*. *alexandrinus* DSM27206 et *Natrinema* sp. SWI15 produisaient probablement HalC8 et HalH4. Il serait intéressant de rechercher par la suite, si chez ces souches productrices de 2 halocines, celles-ci présentent une activité synergique ou additive. Pour cela, il sera nécessaire de purifier les 2 halocines provenant d'une même souche et rechercher si on observe une action synergique par tests en milieu gélosé. Une autre hypothèse serait que les 2 halocines soient produites dans des conditions environnementales différentes, ce qui pourra être étudié par PCR en temps réel.

La purification de quantité importante de HalC8 et de HalH4 rendrait possible l'étude de leur mode d'action. Comme nous avons pu le voir lors de ce projet, la purification de ces halocines en quantité suffisante demeure complexe et les problèmes rencontrés diffèrent entre HalC8 qui est un peptide stable et HalH4 qui est une protéine dont l'activité disparaît dans les milieux faiblement salins. Néanmoins, nous avons pu obtenir la masse exacte de HalC8 par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse et ainsi pu prouver que cette halocine possède 5 ponts disulfures expliquant ainsi sa très forte stabilité. Il est probable que la structure de HalS8 de 8,6 kDa récemment décrite (Ghanmi et al., 2020), qui présente 8 cystéines, est également stabilisée par la formation de 4 ponts disulfure. Comme pour beaucoup de peptides et de protéines, la surexpression de HalC8 et de HalH4 chez *Hfx. volcanii* H98) sous forme de protéine recombinante (Bitan-Banin et al., 2003 ; Allers et al., 2004) serait une solution qui permettrait d'obtenir de substantielles quantités d'halocine. Cependant, ces techniques chez les archées sont moins classiques que chez les autres modèles. Pour l'instant, tous les essais qui ont été réalisés n'ont pas encore été concluants. L'utilisation d'halocines purifiées nous permettrait de mesurer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur les différentes souches sensibles, et d'avoir une idée du mécanisme d'action. En effet des CMI de l'ordre >10 µM implique en général une perturbation membranaire tandis qu'une CMI de l'ordre de 0,1 µM-nM implique une cible intracellulaire essentielle (Socchi et al, 2015). Pour les PAMs présentant un double mécanisme d'action, il est nécessaire d'utiliser une concentration au minimum supérieure à 10 fois la CMI pour observer un effet membranaire du PAM (Socchi et al, 2015).

Nous n'avons pas réalisé complètement tous nos objectifs mais ce travail ambitieux a permis d'explorer plus profondément un sujet de recherche intéressant, nouveau et original que sont les archées halophiles et leur(s) peptide(s) antimicrobien(s) dans des milieux extrêmes. De plus certaines halocines stables pourrait être intéressantes pour lutter contre certaines bactéries pathogènes comme *P. aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*.

BIBLIOGRAPHIE

Adam, P.S., G. Borrel, C. Brochier-Armanet et S. Gribaldo. 2017. The growing tree of *Archaea*: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. ISME J **11**:2407-2425.

Akolkar, A.V., D. Durai et A.J. Desai. 2010. *Halobacterium* sp. SP1(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. J Appl Microbiol **109**:44-53.

Allers, T., H.-P. Ngo, M. Mevarech et R.G. Lloyd. 2004. Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. Appl Environ Microbiol **70**:943-953.

Allers, T. et M. Mevarech. 2005. Archaeal genetics - the third way. Nat Rev Genet **6**: 58-73.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers et D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol **215**:403-410.

Amoozegar, M.A., M. Siroosi, S. Atashagi, H. Smidt et A. Ventosa. 2017. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. Microbiology **63**:623-645.

Andrä J, R. Herbst et M. Leippe. 2003. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permabilizing their membranes. Dev Comp Immunol **27**:291-304.

Antón, J., A. Oren, S. Benlloch, F. Rodríguez-Valera, R. Amann et R. Rosselló-Mora. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic member of *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. Int J Syst Evol Microbiol **52**:485-491.

Antón, J., A. Peňa, F. Santos, M Martinez-García, P. Schmitt-Kopplin et R. Rosseló-Mora. 2008. Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. Saline Systems **4**:15. http://www.salinesystems.org/content/4/1/15

Anwar, T. et R.S. Chauhan. 2012. Computational analysis of halotolerance genes from halophilic prokaryotes to infer their signature. Int J Adv Biotechnol Bioinfor **1**:69-77.

Aouad, M., N. Taib, A. Oudart, M. Lecocq, M. Gouy et C. Brochier-Armanet. 2018. Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen class II lineages. Mol Phylogenet Evol **127**:46-54.

Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M.M. Babu et L.M. Iyer. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. FEMS Microb Rev **29**:231-262.

Armenteros, J.J.A., K.D. Tsirigos, C.K. Sønderby, T.N. Petersen, O. Winter, S. Brunak et al., 2019. Signal 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural network. Nature Biotechnol **37**:420-423.

Arnison, P.G., M.J. Bibb, G. Bierbaum, A.A. Bowers, T.S. Bugni, G. Bulaj et al. 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. Nat Prod Rep **30**:108-160.

Asaduzzaman, S.M. et K. Sonomoto. 2009. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. J Biosc Bioeng **107**:475-487.

Atanasova, N.S., E. Roine, A. Oren, D.H. Bamford et H.M. Oksanen. 2012. Global network of specific-host interactions in hypersaline environments. Environ Microbiol **14**:426-440.

Atanasova, N.S., M.K. Pietilä et H.M. Oksanen. 2013. Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier. MicrobiologyOpen **2**:811-825.

Baker, B.J., V. de Anda, K.W. Seitz, N. Dombrowski, A.E. Santoro et K.G. Lloyd. 2020. Diversity, ecology and evolution of Archaea. Nature Microbiol. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z

Basaran, T.I., D. Berber, B. Gökalsin, A. Tramice, G. Tommonaro, G.R. Abbamondi et al. 2020. Extremophilic *Natrinema* versiforme against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm. Front Microbiol **11**:79. doi: 10.3389/fmicb.2020.00079

Becker, J. et C. Wittmann. 2020. Microbial production of extremolytes - high-value active ingredient for nutrition, health care, and well-being. Curr Opin Biotech **65**:118-128.

Besse, A., J. Peduzzi, S. Rebuffat et A. Carré-Mlouka. 2015. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. Biochimie **118**:344-355.

Besse A. 2016. Interactions et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles. Thèse de Doctorat du Muséum national d'Histoire naturelle. 309p.

Besse, A., M. Vandervennet, C. Goulard, J. Peduzzi, S. Isaac, S. Rebuffat et al. 2017. Halocin C8: an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera: *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* and *Halobacterium*. Extremophiles **21**:523-638.

Biemans-Oldehinkel, E., M.K. Doeven et B. Poolman. 2006. ABC-transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. FEBS Lett **580**:1023-1035.

Birbir, M., S. Eryilmaz et A. Ogan. 2004. Prevention of halophilic microbial damage on brine cured hides by extremely halophilic halocin producer strains. J Soc Leather Technologists Chem **88**:99-104.

Birkeland, N.-K., P. Schönheit, L. Poghosyan, A. Fiebig et H.-P. Klenk. 2017. Complete genome sequence analysis of *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324 (DSM 8774), a hyperthermophilic archaeal sulfate reducer from a North sea oil field. Stand Genomic Sci **12**:79. doi: 10.1186/s40793-017-0296-5

Bitan-Banin, G., R. Ortenberg et M. Mevarech. 2003. Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. J Bacteriol **185**:772-778.

Bolhuis, H., P. Palm, A. Wende, M. Falb, M. Rampp, F. Rodríguez-Valera et al., 2006. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. BMC Genom **7**:16. doi:10.1186/1471-2164-7-169

Bonete, M.J., V. Bautista, J. Esclapez, M.J. García-Bonete, C. Pire, M. Camacho et al. 2015. New uses of haloarchaeal species in bioremediation processes. In "Advances in bioremediation of wastewater and pollutes soil". Shiomi, S. (Edt.), Intech, 23-49.

Brown, C.T., L.A. Hug, B.C. Thomas, I. Sharon, C.J. Castelle, A. Singh et al. 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain *Bacteria*. Nature **523**:208-211.

Bulet, P., R. Stocklin et L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol Rev **198**:169-184.

Burns, D.G., P.H. Janssen, T. Itoh, M. Kamekura, Z. Li, G. Jensen et al. 2007. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. Int J Syst Evol Microbiol **57**:387-392.

Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem **55**:611-622.

Cai, M, Y. Liu, X. Yin, Z. Zhou, M.W. Friedrich, T. Richter-Heitmann et al. 2020. Diverse Asgard archaea including the novel phylum *Gerdarchaeota* participate in organic matter degradation. Sci China Life Sci. doi: 10.1007/s11427-020-1679-1. https://phys.org/news/2020-05-asgard-archaea-phylum-gerdarchaeota-degradation.html

Canganella, F. et J. Wiegel. 2011. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. Naturwissenschaften **98**:253-279.

Cascales, E., S.K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Loubès, K. Postle et al. 2007. Colicin biology. Microbiol Molec Biol Rev **71**:158-229.

Castelle C. J., K. C. Wrighton, B. C. Thomas, L. A. Hug, C. T. Brown, M. J. Wilkins et al. 2015. Genomic expansion of domain archaea highlights roles of organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. Curr Biol **25**:690-701.

Castelle, C.J. et J.F. Banfield. 2018. Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. Cell **172**:1181-1197.

Castillo-Carvajal, L.C., J.L. Sanz-Martín et B.E. Barragán-Huerta. 2014. Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review. Environ Sci Pollut Res **21**:9578-9588

Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol **17**:540-552.

Cavicchioli, R. 2002. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. Asrobiology **2**:81-92.

Cavicchioli, R. 2011. Archaea - timeline of the third domain. Nature Rev Microbiol **9**:51-61.

Cayol, J.L., B. Ollivier, B.K. Patel, G. Prensier, J. Guezennec et J.L. Garcia. 1994. Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov., sp. nov., a halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. Int J Syst Bacteriol **44**:534–540.

Chaban, B., S.Y.M. Ng et K. Jarrell. 2006. Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. Can J Microbiol **52**: 3-116.

Chanos, P. et T. Mygind. 2016. Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol **100**:4297–4308.

Charlesworth, J. et B.P. Burns. 2016. Extremophilic adaptations and biotechnological applications in diverse environments. AIMS Microbiol **2**:251-261.

Chen, S., S. Sun, G.A. Korfanty, J. Liu et H. Xiang. 2019. A halocin promotes DNA uptake in *Haloferax mediterranei*. Front Microbiol 10:1960. doi: 10.3389/fmicb.2019.01960

Cheung, J., K.J. Danna, E.M. O'Connor, L.B. Price et R.F. Shand. 1997. Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. J Bacteriol **179**:548-551.

Chevenet, F., C. Brun, A.-L. Bañuls, B. Jacq et R. Christen. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses ofr trees. BMC Bioinfo **7**:439. doi:10.1186/1471-2105-7-439

Christian J.H.B et J.A. Waltho. 1962. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. Biochim Biophys Acta **65**:506-508.

Cintas, L. M., P. Casaus, L.S. Håvarstein, P.E. Hernandez et I.F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl Environ Microbiol.**63**:4321-4330.

Coker, J.A. 2019. Recent advances in understanding extremophiles. F1000Research (F1000 Faculty Rev) **8**: 1917. https://doi.org/10.12688/f1000research.20765.1

Cornforth, D.M. et K.R. Foster.2013. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. Nature Rev Microbiol **11**:285-293.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res **16**:10881-10890.

Cotter, P.D., C. Hill et R.P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol **3**:777-788.

Cotter, P.D., R.P. Ross et C. Hill. 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? Nat Rev Microbiol **11**:95-105.

Crits-Christoph, A., D.R. Gelsinger, B. Ma, J. Wierzchos, J. Ravel, A. Davila et al. 2016. Functional interactions of archaea, bacteria and viruses in a hypersaline endolithic community. Environ Microbiol **18** :2064-2077.

DasSarma S. et P. DasSarma. 2015. Halophiles and their enzymes: negatively put to good use. Curr Opin Microbiol **25**:120-126.

DasSarma, S. et P. DasSarma. 2017. Halophiles. In " Encyclopedia of Life Science" Wiley London. https://doi: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub4

Dayhoff, M.O., R.M. Schwartz et B.C. Orcutt. 1978. A model of evolutionary change in proteins. In "Atlas of protein sequence and structure" Vol 5, Supll. 3 Dayhoff, M.O. (Edt) National Biomedical Research Foundation USA 345-352.

DeLong, E.F., K.Y. Wu, B.B. Prézelin et R.V.M. Jovine. 1994. High abundance of Archaea in Antartic marine picoplankton. Nature **371**:695-697.

DeLong, E.F. 1998. Everything in moderation: Archaea as "non-extremophiles". Curr Opin Genet Develop **8**:649-654.

Dereeper A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet et al. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res Jul 1;**36**(Web Server issue):W465-9.

de Ruyter, P.G., O.P. Kuipers, M.M. Beerthuyzen, I. van Alen-Boerrigter et W.M de Vos. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. J Bacteriol **178**:3434-3439.

de Zamaroczy, M. et M. Chauleau. 2011. Colicin killing: foiled cell defense and hijacked cell functions. In "Prokaryotic antimicrobial peptides" Drider, D. et S. Rebuffat (Eds.), Springer New York 255-287.

Diamond, G., N. Beckloff, A. Weinberg et K.O. Kisich. 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. Curr Pharm Des **15**:2377-2392.

Diep, D. B., D. Straume, M. Kjos, C. Torres et I.F. Nes. 2009. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. Peptides **30**: 1562-1574.

Djeridi, I., C. Militon, V. Grossi et V. Cuny. 2013. Evidence for surfactant production by the haloarchaeon *Haloferax* sp. MSNC14 in hydrocarbon-containing media. Extremophiles **17**:669-675.

Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L.M. McMullen et H. Prévost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol Molec Biol Rev **70**:564-582.

Dridi, B., D. Raoult et M. Drancourt. 2011. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. Anaerobe **17**:56-63.

Drozdetskiy, A., C. Cole, J. Procter et G.J. Barton. 2015. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **43**:W389–W394. https://doi.org/10.1093/nar/gkv332

Du, D., X. Wang-Kan, A. Neuberger, H.W. van Veen, K.M. Pos, L.J.V. Piddock et al. 2018. Multidrug efflux pumps: structure function and regulation. Nar Rev Microbiol **16**:523-539.

Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi et S. Rebuffat. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. Nat Prod Rep **24**:708-734.

El-Gebali, S., J. Mistry, A. Bateman, S.R. Eddy, A. Luciani et al. 2019. The Pfam protein families database in 2019. Nucl Acids Res **47**:D427-432. doi: 10.1093/nar/gky995

Ellen, A.F., O.V. Rohulya, F. Fusetti, M. Wagner, S.V. Albers et A.J.M. Driessen. 2011. The sulfolobicin genes of encode novel antimicrobial proteins. J Bacteriol **193**:4380-4387.

Emerson, J.B., B.C. Thomas, K. Andrade, E.R. Allen, K.B. Heidelberg et J.F. Banfield. 2012. Dynamic viral populations in hypersaline systems as revealed by metagenomic assembly. Appl Environ Microbiol 78:6309-6320.

Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto et A. Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol Rev **24**:85-106.

Fan, L., J. Sun, M. Zhou, J. Zhou, X. Lao, H. Zheng et al. 2016. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. Sci Rep **6**:24482. doi: 10.1038/srep24482

Fernández, A.B., R. Ghai, A-R. Martin-Cuadrado, C. Sánchez-Porro, F. Rodríguez-Valera et A. Ventosa. 2014. Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. FEMS Microbiol Ecol **88**:623-635.

Field, D., P.D. Cotter et R.P. Ross. 2015. Bioengineering lantibiotics for therapeuthic success. Front Microbiol **6**:1363. doi: 10.3389/fmicb.2015.01363

Fimland, G., L. Johnsen, B. Dalhuset J. Nissen-Meyer. 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. J Pept Sci **11**: 688-696.

Franke, C.M., J. Tiemersma, G. Venema et J. Kok. 1999. Membrane topology of the lactococcal bacteriocin ATP-binding cassette transporter LenC. J Biol Chem **274**:8484-8490.

Gaci, N., G. Borrel, W. Tottey, P.W. O'Toole et J-F. Brugère. 2014. Archaea and the human gut: new beginning of an old story. World J Gastroenterol **20**:16062-16078.

Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Rev Immunol **3**:710-720.

Gascuel, O. 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. Mol Biol Evol **14**:685-695.

Geer, L.Y., M. Domrachev, D.J. Lipman et S.H. Bryant. 2002. CDART: protein homology by domain architecture. Genome Res **12**:1619-1623.

Gerlier, D., S. Plumet et F. Herschke. 2007. Dynamique de l'ARNome du virus de la rougeole. Virologie **3**:231-245.

Gertz E.M., Y.K. Yu, R. Agarwala, A.A. Schäffer et S.F. Altschul. 2006. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. BMC Biol **4**:41. doi:10.1186/1741-7007-4-41

Ghai, R., A.B. Martin-Cuadrado, A. Molto, I.G. Heredia, R. Cabrera, J. Martin et al. 2010. Metagenome of the Mediterranean deep chlorophyll maximum studied by direct and fosmid library 454 pyrosequencing. ISME J **4**:154–1166.

Ghai, R., L. Pašić, A. B. Fernández, A.-B. Martin-Cuadrado, C. M. Mizuno, K.D. McMahon et al. 2011. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. Sci Rep **1**:1-10. doi: 10.1038/srep00135

Ghanmi, F. 2016. Production, purification et caractérisation de peptides antimicrobiens d'archées halophiles de la saline de Sfax. Thèse de doctorat du Muséum national d'Histoire naturelle. 292p.

Ghanmi, F., A. Carré-Mlouka, Z. Zarai, H. Mejdoub, J. Peduzzi, S. Maalej et al. 2020. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* ETD5 from the solar saltern of Sfax (Tunisia) produces multiple halocins. Res Microbiol **171**:80-90.

Gómez-Villegas, P., J. Vigara, R. León. 2018. Characterization of the microbial population inhibiting a solar saltern pond of the Odiel marshlands (SW Spain). Mar Drugs **16:**pii:E332. doi:10.3390/md16090332

Gordon, D.M. et C.L. O'Brien. 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. Microbiol **152**:3239-3244.

Grant, W.D. 2004.Life at low water activity. Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci **359**:1249-1266.

Gunde-Cimerman, N., P. Zalar, S. de Hoog et A. Plemenitaš. 2000. Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiol Ecol **32**:235-240.

Gunde-Cimerman, N., J. Ramos et A. Plemenitaš. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. Mycol Res **113**:1231-1241.

Gunde-Cimerman N., A. Plemenitaš et A. Oren. 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to hight salt concentration. FEMS Microbiol Rev **42**:353-375.

Gupta, R. S., S. Naushad, et S. Baker. 2015. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol **65**:1050-1069.

Gupta, R. S., S. R. Naushad, R. Fabros et M. Adeolu. 2016a. A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class *Halobacteria*: proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families, *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam nov. Ant van Leewen **109**:565-587.

Gupta, R. S., S. R. Naushad, R. Fabros et M. Adeolu. 2016b. Erratum to: A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class *Halobacteria*: proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families, *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam nov. Ant van Leewen **109**:1521-1523.

Hahn-Löbmann, S., A. Stephan, S. Sculz, T. Schneider, A. Shaverskyi D. Tusé et al. 2019. Colicins and salmocin - new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials. Front Plant Sci **10**:437. doi: 10.3389/fpls.2019.00437

Hamm, J.N., S. Erdmann, E.A. Eloe-Fadrosh, A. Angeloni, L. Zhong, C. Brownlee et al. 2019. Unexpected host dependency of Antartic *Nanohaloarcheota*. Proc Natl Acad Sci USA **116**:14661-14670.

Håvarstein, L. S., Diep, D. B. et I.F. Nes. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Mol Microbiol **16**:229-240.

Henikoff, S. et J.G. Henikoff. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. 1992. Proc Natl Acad Sci USA **89**:10915-10919.

Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol **8**:67-113.

Hollingsworth, M.A. et B.J. Swanson.2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. Nat Rev Cancer **4**:45-60.

Hug, L.A., B.J. Baker, K. Anantharaman, C.T. Brown, A.J. Probst, C.J. Castelle et al. 2016. A new view of the tree of life. Nat. Microbiol.**1:** 16048. https://doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.48.

Imadalou-Idres, N., A. Carré-Mlouka, M. Vandervennet, H. Yahiaoui, J. Peduzzi, et S. Rebuffat. 2013. Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. J Life Sci **7**:1057-1069.

Jenssen, H, P. Hamill et R.E.W. Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. **19**: 491-511.

Johnsen, L., G. Fimland, D. Mantzilas et J. Nissen-Meyer. 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. Appl Environ Microbiol 7**0**: 2647-2652.

Kandori, H. 2015. Ion-pumping microbial rhodopsins. Front Mol Biosci **2**:52. https://doi: 10.3389/fmolb.2015.00052

Karthikeyan, P., S.G. Bhat et M. Chandrasekaran. 2013. Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated isolated from salt pans of South India. Saudi J Biol Sci **20**:205-212.

Kavitha, P., A. Lipton, A. Sarika et M. Aishwarya. 2011. Growth characteristics and halocin production by a new isolate, *Haloferax volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India). Res J Biol Sci **6**:257-262.

Kharroub, K., M.L. Jímenez-Pranteda, M. Aguilera, A. Boulahrouf, A. Ramos-Cormenzana et M. Monteoliva-Sánchez. 2008. *Halomonas sabbkhae* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from an Algerian sabkha. Int J Syst Evol Microbiol **58**:40-44.

Khemili-Talbi, S., S. Kebbouche-Gana, S. Akmoussi-Toumi, Y. Angar et M.L. Gana. 2015. Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. Extremophiles **19**:1109-1120.

Kim, Y.C., A.W. Tarr et C.N. Penfold. 2014. Colicin import into *E. coli* cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. Biochim Biophys Acta **1843**:1717-1731.

Kis-Papo, T. et A. Oren. 2000. Halocins: are they involved in the competition between Halobacteria in saltern ponds? Extremophiles **4**:35-41.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev **12**:39-86.

Kleerebezen, M. 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. Peptides **25**:1405-1414.

Klenk, H.-P., R.A. Clayton, J.-F. Tomb, O. White, K.E Nelson K.A. Ketchum et al. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Nature **390**:364-370.

Koskinen, K., M.P. Pausan, A.K. Perras, M. Beck; C. Bang, M. Mora, A. Schilhabel et al. 2017. First insights into the diverse human archeome: specific detection of Archaea in the gastrointestinal tract, lung, and nose and on skin. mBio **8**:e00824-17. https://doi.org/10.1128/mBio.00824-17.

Kozera, B. et M. Rapacz. 2013. Reference genes in real-time PCR. J Appl Genet **54**:391–406.

Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne et E.L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol **305**:567-580.

Kuipers, A., R. Rink et G.N. Moll. 2011. Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics. In " Prokaryotic Antimicrobial Peptides" D. Drider et S. Rebuffat (Eds). Springer, New York 147-169.

Kumar, V., J. Saxena et S.K. Tiwari. 2016. Description of a halocin-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. Arch Microbiol **198**:181-192.

Kumar, V. et S.K. Tiwari. 2017a. Halocin HA1: an archeocin produced by the haloarchaeon *Haloferax larsenii* HA1. Proc Biochem **61**:202-208.

Kumar, V. et S.K. Tiwari. 2017b. Activity-guided separation and characterization of new halocin HA3 from fermented broth of *Haloferax larsenii* HA3. Extremophiles **21**:609-621.

Lazar, V., L-M. Ditu, G.G. Pircalabioru, I. Gheorghe, C. Curutiu, A.M. Holban, et al. 2018. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. Front Immunol **9**:1830. https://doi: 10.3389/fimmu.2018.01830

Law, C.J., P.C. Mahoney et D.-N. Wang. 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. Annu Rev Microbiol **62**:289-305.

Lieleg, O., C. Lieleg, J. Bloom, C.B. Buck et K. Ribbeck. 2012. Mucin biopolymers as broad-spectrum antiviral agents. Biomacromolecules **13**:1724-1732. doi: 10.1021/bm3001292

Li, Y., H. J. Xiang, M. Liu, M. Zhou et H. Tan. 2003. Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. Extremophiles **7**:401-407.

Li, Y.-T., Y. Tian, H. Tian, T. Tu, G.-Y. Gou, Q. Wang, et al. 2018. A review on bacteriorhododopsin-based bioelectronic devices. Sensors **18**: 368. doi:10.3390/s18051368

Li, W.J., Y.Q. Zhang, P. Schumann, H.Y. Liu, L.Y. Yu, Y.Q. Zhang et al. 2008. *Nesterenkonia halophila* sp. nov., a moderately halophilic alkalitolerant actinobacterium isolated from a saline soil. Int J Syst Evol Microbiol **58**:1359-1363.

Liu, C., B. Hu, Y. Liu Y, et S. Chen. 2006. Stimulation of nisin production from whey by a mixed culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Biochem Biotechnol 1**31**:751-761.

Liu, X., D. Miao, F. Zhang, Z. Wu, J. Liu et H. Xiang. 2013a. Characterization of the minimal replicon of pHM300 and independent copy number control of major and minor chromosomes of *Haloferax mediterranei*. FEMS Microbiol Lett **339**:66-74.

Liu, X., L. Wang, J. Liu, L. Cai et H. Xiang. 2013b. Genome-wide analysis of gene expression in stationary phase and genetic characterization of stationary phase-dependent halocin gene expression in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei.* J Genet Genomics **40**:441-444.

Madern, G., C. Ebel et G. Zaccai. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles **4**:91-98.

Makarova, K.S., Y.I. Wolf, S. Karamycheva, D. Zhang, L. Aravind et E.V. Koonin. 2019. Antimicrobial peptides, polymorphic toxins, and self-nonself recognition systems in archaea: an untapped armory for intermicrobial conflicts. mBio **10**:e00715-19. doi.org/10.1128/mBio.00715-19

Makhdoumi-Kakhki, A., M.A. Amoozegar et A. Ventosa. 2012. *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and of *Salinibacter ruber*. Int J Syst Evol Microbiol **62**:1521-1527.

Mandelli, F., V.S. Miranda, E. Rodrigues et A.Z. Mercadante. 2012. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganism. World J Microbiol Biotechnol **28**:1781-1790.

Margesin, R., Y. Nogi. 2004. Psychropiezophilic microorganisms. Cell Mol Biol **50**:429-436.

Mazguene, S., M. Rossi, M. Gogliettino, G. Palmieri, E. Cocca, S. Mirino et al. 2018. Isolation and characterization from solar salterns of North Algeria of a haloarchaeon producing a new halocin. Extremophiles **22**:259-270.

MacLeod, F., G.S. Kindler, H.L. Wong, R. Chen et B.P. Burns. 2019. Asgard archaea: diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes. AIMS Microbiol. **5**:48-61. doi: 10.3934/microbiol.2019.1.48.

Méheust, R., D. Burstein, C.J. Castelle et J.F. Banfield. 2019. The distinction of CPR bacteria from other bacteria based on protein family content. Nature Com **10**:4173. ps://doi.org/10.1038/s41467-019-12171-z

Mei, S.S., Y. Li, Q. Lu, et H. Xiang. 2006. Cloning and analysis of genes in the halocin C8 gene cluster. Wei Sheng Wu Xue Bao **46**:318-322.

Mei, S.S., C. Sun, X. liu, Q. Lu, L. Cai, Y. Li et, H. Xiang. 2008. The helix-loop-helix motif at the N-terminus of HalI is essential for its immunity function against halocin C8. J Bacteriol **190**:6501-6508.

Meknaci, R., P. Lopes, C. Servy, J.P. Le Caer, J. P. Andrieu, H. Hacene et J. Ouazzani. 2014. Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. Extremophiles **18**:1049-1055.

Mesbah, N.M., D.B. Hedrick, A.D. Peacock, M. Rohde et J. Wiegel. 2007. *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov. Int J Syst Evol Microbiol **57**:2507-2512.

Mesbah, N.M. et J. Wiegel, J. 2009. *Natronovirga wadinatrunensis* gen. nov., sp. nov. and *Natranaerobius trueperi* sp. nov., halophilic, alkalithermophilic micro-organisms from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. Int J Syst Evol Microbiol **59**:2042-2048.

Meseguer, I. et F. Rodríguez-Valera. 1985. Production and purification of halocin H4. FEMS Microbiol Lett **28** :177-182.

Meseguer, I. et F. Rodríguez-Valera. 1986. Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium.* J Gen Microbiol **132**:3061-3068.

Meseguer, I., F. Rodríguez-Valera et A. Ventosa. 1986. Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. FEMS Microbiol Lett **36**:177-182.

Meseguer, I., M. Torreblanca et T. Konishi. 1995. Specific inhibition of the halobacterial Na+/H+ antiporter by halocin H6. J Biol Chem **270**:6450-6455.

Mevarech, M., F. Frolow, et L. M. Gloss. 2000. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. Biophys Chem **86**:155-164.

Michel, H. et D. Oesterhelt. 1976. Light-induced change of the pH gradient and the membrane potential in *H. halobium*. FEBS Lett **65**:175-178.

Minegishi H., M. Kamakura, T. Itoh, A. Echigo, R. Usami et T. Hashimoto. 2010. Further refinement of the phylogeny of *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (*rpoB'*) gene. Int J Syst Evol Microbiol **60**:2398-2408.

Mitchell, A.L., T.K. Attwood, P.C. Babbitt, M. Blum, P. Bork, A. Bridge et al. 2019. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. Nucleic Acids Res **47**:D351-D360.

Moissl-Echinger, C., M. Pausan, J. Taffner, G. Berg, C. Bang et R.A. Schmitz. 2018. Archaea are interactive components of complex microbiomes. Trends Microbiol **26**:71-85.

Namwong, S., S. Tanasupawat, K.C. Lee, et J.S. Lee. 2009. *Oceanobacillus kapialis* sp. nov., from shrimp paste in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol **59**: 2254-2259.

Naor, A., P. Lapierre, M. Mevarech, R.T. Papke et U. Gophna.2012. Low species barriers in halophilic archaea and the formation of recombinant hybrids. Curr Biol **22**:1444-1448.

Naor, A., Y. Yair et U. Gophna. 2013. A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. Extrem Life Extreme Cond **17**:973-979.

Narasingarao, P., S. Podell, J.A. Ugalde, C. Brochier-Armanet, J.B. Emerson, J.J. Brocks et al. 2012. *De novo* metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. ISME J **6**:81-93.

Natale, P., T. Brüser et A.J.M. Driessen.2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - Distinct translocases and mechanisms. Biochim Biophys Acta **1778**:1735-1756.

Ng, W.V., S.P. Kennedy, G.G. Mahairas, B. Berquist, M. Pan, H.D. Shukla et al. 2000. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. Proc Natl Acad Sci USA **97**:12176-12181.

Nielsen, K, J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides prediction of their cleavage sites. Protein Eng **10**:1-6.

Nielsen, K., K.D. Tsirigos, S. Brunak et G. von Heijne. 2019. A brief history of protein sorting prediction. Protein J **38**:200-216.

Nishie, M., J.-I. Nagao et K. Sonomoto. 2012. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. Biocontrol Sci **17** :1-16.

Nissen-Meyer, J., P. Rogne, C. Oppegård, H.S. Haugen et P.E. Kristiansen. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine -containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Curr Pharm Biotechnol **10**:19-37.

Nissen-Meyer, J., C. Oppegård, P. Rogne, H.S. Haugen et P.E. Kristiansen. 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. Probiotics Antimicrob Proteins **2**:52-60.

O'Connor, E.M. et R.F. Shand. 2002. Halocins and sulfolobicins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. J Ind Microbiol Biotechnol **28**:23-31.

Oren, A. 2001.The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations; implications for the functioning of salt lake ecosystems. Hydrobiolocica **466**:61-72.
Oren, A. 2002a. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. FEMS Microbiol Ecol **39**:1-7
Oren, A. 2002b. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol **28**:56-63.
Oren, A. 2006a. Life at high salt concentrations. In "The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry. Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer et E. Stackebrandt (Eds.). Springer New York 263-282.
Oren, A. 2006b. The order *Haloanaerobiales*. In "The Prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria". Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer et E. Stackebrandt (Eds.), Springer New York 804-814.
Oren, A; 2008.Microbial life at high salt concentrations: phylogenic and metabolic diversity. Saline Systems **4**:2. http://doi:10.1186/1746-1448-4-2.
Oren, A. 2010a. The dying Dead Sea: the microbiology of an increasingly extreme environment. Lake Reserv Manage **15**:215-222.
Oren, A. 2010b. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environ Technol **31**:825-834.
Oren, A. 2013. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. FEMS Microbiol Lett **342**:1-9.
Oren, A. 2014. Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. Extremophiles **18**: 825-834.
Oren, A, M. Heldal, S. Norland et E.A. Galinski. 2002. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic Bacterium *Salinibacter ruber*. Extremophiles **6**:491-498.
Ortega, G., T. Diercks et O. Millet. 2015. Halophilic protein adaptation results from synergistic residue-ion interactions in the folded and unfolded states. Chem Biol **22**:1597-1607.
Pakdeeto, A., S. Tanasupawat, C. Thawai, S. Moonmangmee, T. Kudo, T. Itoh et T. Pak. 2007. *Salinicoccus siamensis* sp. nov., isolated from a fermented shrimp paste in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol **57** :2004-2008.
Palmer, T, et B.C. Berks. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. Nat Rev Microbiol **10**:483-496.
Pancsa, R., D. Kovacs et P. Tompa. 2019. Misprediction of structural disorder in halophiles. Molecules **24**, 479. doi:10.3390/molecules24030479
Pao, SS., I.A. Paulsen et M.H. Saier Jr. 1998. Major facilitator superfamily. Microb Molec Biol Rev **62**:1-34.
Papke, R.T., E. White, P. Reddy, G. Weigel, M. Kamekura, H. Minegishi et al. 2011. A multilocus sequence analysis approach to the phylogeny and taxonomy of the *Halobacteriales*. Int J Sys Evol Mocrobiol **61**:2984-2995.
Pašić, L., B. Velikonja et N. P. Ulrih. 2008. Optimization of the culture conditions for the production of a bacteriocin from halophilic archaeon Sech7a. Prep Biochem Biotechnol **38**:229-245
Paul, P., S.K. Bag, S. Das, E.T. Harvill et C. Dutta. 2008. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. Genome Biol. **9**:R70. (doi:10.1186/gb-2008-9-4-r70
Perez, R.H., T. Zendo et K. Sonomoto. 2018. Circular and leaderless bacteriocins: Biosynthesis, mode of action, applications and prospects. Front Microbiol **9**:2085. doi: 10.3389/fmicb.2018.02085
Petitjean, C., P. Deschamps, P. López-García, D. Moreira et C. Brochier-Armanet. 2015. Extending the conserved phylogenetic core of *Archaea* disentangles the evolution of the third domain of life. Mol Biol Evol **32**:1242-1254.
Platas, G., I. Meseguer et R. Amils. 1996. Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3. Microbiología **12**:75-84.

Platas, G., I. Meseguer et R. Amils.2002. Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. Int Microbiol **5**:15-19.

Podell, S., J.A. Ugalde, P. Narasingarao, J.F. Banfield, K.B. Heidelberg et E. Ellen. 2013. Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem. PLoS One. **8**:e61692. doi: 10.1371/journal.pone.0061692

Podell, S., J.B. Emerson, C.M. Jones, J.A. Ugalde, S. Welch, K.B. Heidelberg et al. 2014. Seasonal fluctuations in ionic concentrations drive microbial succession in a hypersaline lake community. ISME J. **8**:979-990.

Poli, A., P. Di Donato, G. R. Abbamondi et B. Nicolaus. 2011. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. Archaea **2011**:693253. doi:10.1155/2011/693253

Pfeiffer, M. 2009. Alternative rapid chromosomal DNA isolation. In "The Halohandbook. Protocols for haloarchaeal genetics" Dyall-Smith, M. (Edt) 70. https://haloarchaea.com/wp-content/uploads/2018/10/Halohandbook_2009_v7.3mds.pdf

Prangishvili, D., I. Holz, E. Stieger, S. Nickell, J.K. Kristjansson et W. Zillig. 2000. Sulfolobicins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. J Bacteriol **182**:2985-2988.

Price, L.B. et R.F. Shand. 2000. Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. J Bacteriol **182**:4951-4958.

Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Microbiol Rev **57**:50-108.

Quadri, L.E.N. 2002. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. Anton van Leeuwen **82**:133-145.

Quadri, I., I.I. Hassani, S. l'Haridon, M. Chalopin, H. Hacène et M. Jebbar. 2016. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. Microbiol Res **186**:119-131.

Raymann, K., C. Brochier-Armanet et S. Gribaldo. 2015. The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea. Proc Natl Acad Sci USA **112**:6670–6675.

Rea, M.C., R.P. Ross, P.D. Cotter et C. Hill. 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In "Prokaryotic antimicrobial peptides" Drider, D. et S. Rebuffat (Eds.), Springer New York 29-53.

Rebouças, E., J. Costa, M. Passos, J. Passos, R. van der Hurk et J. Silva. 2013. Real time PCR and importance of housekeepings genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. Braz Arch Biol Rechnol **56**:143-154.

Rebuffat, S. 2011. Bacteriocins from Gram-negative bacteria: a classification? In "Prokaryotic antimicrobial peptides" Drider, D. et S. Rebuffat (Eds.), Springer New York 55-72.

Rettner, R.E. et M.H. Saier Jr. 2010. The autoinducer-2 exporter superfamilly. J Mol Microbiol Biotechnol **18**:195-205.

Riley, M.A. et D.M. Gordon. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends Microbiol **7**:129-133.

Riley, M.A. 2011. Bacteriocin-mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In "Prokaryotic antimicrobial peptides" Drider, D. et S. Rebuffat (Eds.), Springer New York 13-27

Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczybra, N.N. Ivanova, I.J. Anderson, J.-F. Cheng et al. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. Nature **499**:431-437.

Roberts, M.F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline Systems **1**:5. doi:10.1186/1746-1448-1-5

Rodrigo-Baños M, I. Garbayo, C. Vílchez, M.J. Bonete et R.M. Martínez-Espinosa. 2015. Carotenoids from *Haloarchaea* and their potential in biotechnology. Mar Drugs **13**:5508-5532.

Rodríguez-Valera, F., G. Juez et D.J. Kushner. 1982. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. Can J Microbiol **28**:151-154.

Rodríguez-Valera, F., G. Juez et D.J. Kushner. 1983. *Halobacterium mediterranei* spec. nov. A new carbohydrate-utilizing extreme halophile. System Appl Microbiol **4**:369-381.

Rončević, J., J. Puizina et A. Tossi. 2019. Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era? Int J Molec Sci **20**:5713. doi:10.3390/ijms20225713

Rotschild, L.J. et R.L. Mancinelli. 2001. Life in extreme environments. Nature **409**:1092-1101.

Salas, C.E., J.A. Badillo-Corona, G. Ramírez-Sotelo et C. Olivier-Salvador. 2015. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. BioMed Res Int **2015**:102129. http://dx.doi.org/10.1155/2015/102129

Saum, S.H. et V. Müller. 2008. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. Saline System **4**:4. http://www.salinesystems.org/content/4/1/4

Shand, R. F. et K. J. Leyva. 2007. Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobicins. In "Bacteriocins: Ecology and evolution" Riley, M.A. et M.A. Chavan (Eds.), Springer Verlag Heidelberg 93-109.

Severinov, K., E. Semenova et T. Kazakov. 2011. Class I microcins: their structures, activities and mechanisms of resistance. In "Prokaryotic antimicrobial peptides" Drider, D. et S. Rebuffat (Eds.), Springer New York 289-308.

Simons, A., K. Alhanout et R.E. Duval. 2020. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multi-drug-resistant bacteria. Microorganisms **8**:639. doi:10.3390/microorganisms8050639

Şimşek, Ö., S. Buzrul, N. Akkoç, H. Alpas et M. Akçelik. 2009. Stress response kinetics of two nisin producer strains of *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Appl Biochem Biotechnol **158**:384-397.

Socchi, M., M. Mardirossian, G. Runti et M. Benincasa. 2016. Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. Curr Top Med Chem **16**:76-88.

Sorokin, D.Y., B. Abbas, A.Y. Merkel, W.I. Rijpstra, J.S.S Damste, M.V. Sukhacheva et al. 2015. *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes. Int J Syst Evol Microbiol **65**:3739-3745.

Sowers, K.R., J.E. Boone et R.P. Gunsalus. 1993. Disaggregation of *Methanosarcina* spp. and growth as single cells at elevated osmolarity. Apll Envir Mircobiol **59**:3832-3839.

Stetter, K.O. 1996. Hyperthermophilic prokaryotes. FEMS Microbiol Rev **18**:149-158.

Stevenson, A, J.A. Cray, J.P. Williams, R. Santos, R. Sahay, N. Neuenkirchen et al. 2015. Is there a common water-activity limit for the three domains of life? ISME J **9**:1333-1351.

Sun, C., Y. Li, S. Mei, Q. Lu, L. Zhou et H. Xiang. 2005. A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. Mol Microbiol **57**:537-549.

Süssmuth, R.D., et A. Mainz. 2017. Nonribosomal peptide synthesis - principles and prospects. Angew Chem Int Ed **56**:3770-3821

Tagg, J.R., A.S. Dajani et L.W Wannamaker. 1976. Bacteriocins from Gram-positive bacteria. Bacteriol Rev **40**:722-756.

Tanasupawat, S., A. Pakdeeto, S. Namwong, C. Thawai, T. Kudo et T. Itoh. 2006. *Lentibacillus halophilus* sp. nov., from fish sauce in Thailand. Int J Syst Evol Microbio **56**:1859-1863.

Thompson, J.D., D.G. Higgins et T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res **22**:4673-4680.

Torreblanca, M., I. Meseguer et F. Rodríguez-Valera. 1989. Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. J Gen Microbiol **135**:2655-2661.

Torreblanca, M., I. Meseguer et A. Ventosa. 1994. Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. Lett Appl Microbiol **19**:201-205.

Torregrosa-Crespo, J., C. Pire et R.M. Martínez-Espinosa. 2017. Biocompounds from Haloarchaea and their uses in biotechnology. In "Archaea. New biocatalysts, novel pharmaceutical and various biotechnological applications" Sghaier, H. (Edt.) Intech doi: 10.5772/intechopen.69944

Turgis, M., K.D. Vu, M. Millette, C. Dupont et M. Lacroix. 2016. Influence of environmental factors on bacteriocin production by human isolates of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33. Probiotics Antimicrob Proteins **8**: 53-59.

Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm et al. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res **40**:e115.

Uratani, J.M., R. Kumaraswamy et J. Rodríguez. 2014. A systematic strain selection approach for halotolerant and halophilic bioprocess development: a review. Extremophiles **18**: 629-639.

Vaisman, N. et A. Oren. 2009. *Salisaeta longa* gen. nov., a red, halophilic member of the *Bacteroïdetes*. Int J Syst Evol Microbiol **59**:2571-2574.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. **3**: RESEARCH0034

Vassiliadis, G., D. Destoumieux-Garzón, C. Lombard, S. Rebuffat et J. Peduzzi. 2010. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M ant H47. Antimicrob Agents Chemother **54**:288-297.

Vassiliadis, G., D. Destoumieux-Garzón et J. Peduzzi. 2011. Class II microcins. In " Prokaryotic Antimicrobrial Peptides" D. Drider et S. Rebuffat (Eds.). Springer, New York 309-332.

Ventosa, A., J. J. Nieto et A. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol R **62**:504-544.

Ventosa, A., A.B. Fernández, M. J. León, C. Sánchez-Porro, et F. Rodríguez-Valera. 2014. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. Extremophiles **18**:811-824.

Voica, D.M., L. Bartha, H.L. Banciu et A. Oren. 2016. Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. FEMS Microbiol Lett **363**: fnw146. doi: 10.1093/femsle/fnw146

von Heijne, V. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acids Res **14**:4683-4890

Wilhem, J. et A. Pingoud. 2003. Real-time polymerase chain reaction. Chem Bio Chem **4**:1120-1128.

Woese, C.R., G.E. Fox, L. Zablen, T. Uchida, L. Bonen, K. Pechman, B.J. et al. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. Nature **254**: 83-86.

Woese, C.R. et G.E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA **74** :5088-5090.

Woese, C.R., L.J. Magrum et G.E. Fox. 1978. Archaebacteria. J Mol Evol **11**:245-252.

Woese, C.R., O. Kandler et M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci USA. **87**:4576-4579.

Yin, J., J.-C. Chen, Q. Wu et G.-Q. Chen. 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. Biotechnol Adv **33**:1433-1442.

Zenke, R., S. von Gronau, H. Bolhuis, M. Gruska, F. Pfeiffer et D. Oesterhelt. 2015. Fluorescence microscopy visualisation of halomucin, a secreted 927 kDa protein surrounding *Haloquadratum walsbyi* cells. Front Microbiol **6**:249. doi: 10.3389/fmicb.2015.00249

Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagne, et W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol **7**:203-214

.

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux utilisés pour la culture des souches

Annexe 2 : Amorces utilisées lors de l'étude de la biosynthèse des halocines C8 et H4

Annexe 3 : Amorces utilisées lors de la q-RT-PCR chez *Nnm*. *altunense* JCM12890

Annexe 4 : Amorces utilisées lors de la q-RT-PCR chez *Hfx*. *mediterranei* DSM1411

Annexe 5 : Publication " HalocinC8: an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera: *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax*, and *Halobacterium* "

Annexe 1 : Milieux utilisés pour la culture des souches

Milieu	Composition	Concentration
M372[a]	Extrait de levure (BD)	5 $g.L^{-1}$
	Acides casaminés (BD)	5 $g.L^{-1}$
	Glutamate monosodique (Acros organics)	1 $g.L^{-1}$
	KCl (Roth)	2 $g.L^{-1}$
	Citrate trisodique (Roth)	3 $g.L^{-1}$
	$MgSO_4$, $7H_20$ (Panréac)	20 $g.L^{-1}$
	NaCl (Roth)	200 $g.L^{-1}$
	$FeCl_2$, $4H_2O$ (Sigma Aldrich)	36 $g.L^{-1}$
	$MnCl_2$, $4H_20$ (Sigma Aldrich)	0,36 $g.L^{-1}$
	pH 7-7,2	
SW25[b]	Extrait de levure (BD)	5 $g.L^{-1}$
	NaBr (Sigma Aldrich)	0,625 $g.L^{-1}$
	$NaHCO_3$ (Sigma Aldrich)	0,25 $g.L^{-1}$
	NaCl (Roth)	195 $g.L^{-1}$
	KCl (Roth)	5 $g.L^{-1}$
	$CaCl_2$, $2H_2O$ (Sigma Aldrich)	1,25 $g.L^{-1}$
	$MgSO_4$, $7H_20$ (Panréac)	49,5 $g.L^{-1}$
	$Mgcl_2$, $6H_20$ (Roth)	34,6 $g.L^{-1}$
	pH 7,2	
MB[c] + 8% NaCl	MB	37,4 $g.L^{-1}$
	NaCl (Roth)	80 $g.L^{-1}$
	pH 7,6	
M53[d] + 10% NaCl	Tryptone (BD)	10 $g.L^{-1}$
	Extrait de levure (BD)	5 $g.L^{-1}$
	Glucose (Sigma Aldrich)	5 $g.L^{-1}$
	NaCl (Roth)	100 $g.L^{-1}$
	pH 7,2-7,4	
LB	Tryptone (BD)	10 $g.L^{-1}$
	Extrait de levure (BD)	5 $g.L^{-1}$
	NaCl (Roth)	10 $g.L^{-1}$

[a] https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium372.pdf

[b] Sea water 25%, Antón et al., 2002

[c] Marine Broth, https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium514.pdf

[d] https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium53.pdf

Annexe 2 : Amorces utilisées lors de l'études de la biosynthèse des halocines C8 et H4

Nom	Séquence 5'-3'	Localisation	Taille amplicon (pb)
ARNr 16S-F	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA	Gène codant l'ARN 16S des archées	919
ARNr 16S-R	YCC GGC GTT GAM TCC AAT T		
halC8-F	ACG CTG TGC GAG TAG GAG TT	Gène *halC8 codant* ProC8 (HalC8) de *Nnm altunense* JCM12890	1058
halC8-R	GAG ACG ACG TTC GAG GAA TC		
halC8-Imm-F	GAG GAA CCG AAA CTG CTCA C	Gène *halC8* codant ProC8 (HalI) de *Nnm altunense* JCM12890	651
halC8-Imm-R	RTC GGC GAC GGT ACA GA		
halU-F	GCY GTG ACG ATC GGK GT	Gène *halU*	742
halU-R	CCG CCG ACG AAC CAC G		
halR-F	CAT CGA ACG ACS CTC MG	Gène *halR*	538
halR-R	TCG TTG TAC GCG AYV AKC ATG		
halT1-F	CTC GCG GTC GAC TAT CTC	Gène *halT1*	622
halT1-R	CCG ACG ACG AYG CCG AT		
halT2-F	GCG TCG CVG GCT GTC TGA	Gène *halT2*	675
halT2-R	GTC GAG TAG GAG ACG AYC AT		
halT3-F	GTC GGS GTC GTC TTC GT	Gène *halT3*	1064
halT3-R	CTC CCG ACG ACG AGA CTC GCC		
halH4-Hm-F	TGC TCT GAA TTT AAG TAT GCA A	Gène *halH4* codant ProH4 de *Hfx mediterranei* DSM1411	1174
halH4-Hm-R	GTA GAG GCA CCG CTA CAG AA		
halH4-F	GAC ATG TAC GGH GAS GGT GA	Gène *halH4* codant une zone conservée chez les différentes séquences d'HalH4	512
halH4-R	GAG CAG GAA GGT CGA XGA RTC		
halH4-Hmc-F	GAG ATG TAC GGC GAG GGT GA	Gène *halH4* codant une zone conservée d'HalH4 de *Hfx mediterranei* DSM1411	512
halH4-Hmc-R	CAG TAG GTA CGT CGA CGA ATC		
M13univ-F	GTA AAA CGA CGG CCA G	Amorces universelle pour séquençage d'insert au niveau du gène *lacZ* dans le plasmide pGEM-®-T	taille de l'insert
M13univ-R	CAG GAA ACA GCT ATG AC		

F : Amorce sens R : Amorce antisens

Annexe 3 : Amorces utilisées lors de la q-RT-PCR chez *Nnm*. *altunense* JCM12890

Nom	Séquence 5'-3'	Localisation	Taille de l'amplicon (pb)
16S-Na-F1	CCG TGA GGC GTC CTG TTA	Gène codant l'ARN 16S	132
16S-Na-R1	ACC TAC CGT TGC CCG TTC C		
16S-Na-F2	GAA AGG GGA CGC TAA TCTC C	Gène codant l'ARN 16S	97
16S-Na-R2	TCT GAGG CGC GAT TAC TAC C		
gapdh-Na-F1	CTC GTC GAC GTG AGT TTC AA	Gène codant la GAPDH	140
gapdh-Na-R1	ACT TTC TCG ACG CCG TAC TC		
gapdh-Na-F2	GAG ACC ATC TTC CCC AAC CT	Gène codant la GAPDH	97
gapdh-Na-R2	CCT CTT CCA GGG TGA CGT T		
gapdh-Na-F3	CAG CGG AAA ACT CAA GGA GTA	Gène codant la GAPDH	123
gapdh-Na-R3	ATG CCC TGG AAG CAG TAG AA		
gapdh-Na-F4	GAG ACA GCG ATC GAC AAG G	Gène codant la GAPDH	191
gapdh-Na-R4	GGC GTG TCG TAC TCC TCG TA		
gapdh-Na-F5	ATG CAA CAG GTC GCC ATC	Gène codant la GAPDH	93
gapdh-Na-R5	GAC GC CCA GTA CTT CCA TGT		
gapdh-Na-F6	CAA CAG GTC GCC ATC AAC G	Gène codant la GAPDH	137
gapdh-Na-R6	CCCTTGTCGATCGCTGTCT		
gapdh-Na-F2	GAG ACC ATC TTC CCC AAC CT	Gène codant la GAPDH	129
gapdh-Na-R7	CGA ACA GGT TAC GGA CGT C		
gapdh-Na-F8	ATG CAA CAG GTC GCC ATC A	Gène codant laGAPDH	144
gapdh-Na-R8	GAA CCC CTT GTC GAT CGC T		
gapdh-Na-F9	TGA ACG TCA CCC TGG AAG AG	Gène codant la GAPDH	119
gapdh-Na-R9	CTTGAGTTTTCCGCTGCCAT		
ITS1-Na-F1	TGG TAG AGT GCC TCC TTT GC	Région transcrite entre le gène codant ARNr 16S et le gène codant ARNr 23S (ITS1)	97
ITS1-Na-R1	TCTCCCACTTAAGGGACACG		
ITS1-Na-F1	TGG TAG AGT GCC TCC TTT GC	Région transcrite entre le gène codant ARNr 16S et le gène codant ARNr 23S (ITS1)	131
ITS1-Na-R2	ATC GGT TCG TGT TCG GAT TA		
rpoB-Na-F1	ATG ACG CTG AAG GAA CGA CT	Gène codant RpoB	120
rpoB-Na-R1	GCA GTT CGG ACA GTA GAC A		
rpoB-Na-F2	TGA TGA GCT ACG AGG GGT TC	Gène codant RpoB	200
rpoB-Na-R2	CAG GTG GTT GTA CGC TTC CT		
rpoB-Na-F3	TGG TCT CGA ACA AAC TGC AC	Gène codant RpoB	111
rpoB-Na-R3	GTT CCA TCT CCC CGA TAC G		
rpoB-Na-F4	CAA CAA CGA GAG GCG AAA GT	Gène codant RpoB	136
rpoB-Na-R4	CTT TGA CCG AGA CGT TGA CC		
radA-Na-F1	GAA CCC CGA CTC CTA CT	Gène codant RadA	94
radA-Na-R1	GGA CTT GCG GAG GTA GA		
radA-Na-F2	GAC TCC TAC TTC GGC GAC C	Gène codant RadA	150
radA-Na-R2	GCT TGT CAC CCT TG GAC TTG		
radA-Na-F2	GAC TCC TAC TTC GGC GAC C	Gène codant RadA	177
radA-C8-R3	TTT CAG CCC TTC GTC CTG TA		
rpl10-Na-F1	CAA ACC TGC CTC CAT GTA CC	Gène codant RPL 10	100
rpl10-Na-R1	CATCTTGTGCTGTGCGATCT		
rpl10-Na-F2	GAG GAC TAC CCC GTC CAG AT	Gène codant RPL 10	141
rpl10-Na-R2	GCG CAG GAC CAT CTT GTA GT		
halC8-Na-F1	CTC GAT TAC TAC TAC GAA ACC GAC	Gène codant ProC8 au niveau de HalI	145
halC8-Na-R1	GGA TCG CGT CCG TAT CGA CG		
halC8-Na-F2	GTG GGC TCC TCG GTA TCA C	Gène codant RoC8 au niveau de HalC8	102
halC8-Na-R2	CGT CAC CGC AAC CGC TGT		
halC8-Na-F3	GAG GAA CCG AAA CTG CTC AC	Gène codant ProC8 au niveau de HalI	177
halC8-Na-R3	GAC CTC TCG AGC GAA GTC CT		
halC8-Na-F4	ATT AAT CGC CGA AAC GTC CT	Gène codant ProC8 au niveau de HalI	119
halC8-Na-R4	GTG AGC AGT TTC GGT TCC TC		
halC8-Na-F5	CGA CAT CGA CGA GAG CAG T	Gène codant ProC8 au niveau de HalI-HalC8	91
halC8-Na-R5	ACC TGC GGC GTA TTT ACA AG		

F : Amorce sens, R : Amorce antisens

Annexe 4 : Amorces utilisées lors de q-RT-PCR chez *Hfx. mediterranei* DSM1411

Nom	Séquence 5'-3'	Localisation	Taille amplicon (bp)
gapdh-Hm-F1	TAC GAA ACA CAC CAC ACA C	Gène codant la GAPDH	134
gapdh-Hm-R1	GTG TTA CAC GAG ACG ACA C		
gapdh-Hm-F2	GAA GAC AAA CGG GAC AGC AT	Gène codant la GAPDH	85
gapdh-Hm-R2	CCT GCT CAG AGA ACC CAG AA		
gapdh-Hm-F3	GAG GAG TAC GGC GTC GAT AA	Gène codant la GAPDH	184
gapdh-Hm-R3	GGA CTT TCA GTC CGA GCG TA		
ITS1-Hm-F1	TGG TAG AGT GCC TCC TTT GC	Région transcrite entre le gène codant ARNr 16S et le gène codant ARNr 23S (ITS1)	81
ITS1-Hm-R1	TCG GGA GTG GAG TAC TGC TT		
ITS1-Hm-F2	GCA GTA CTC CAC TCC CGA AC	Région transcrite entre le gène codant ARNr 16S et le gène codant ARNr 23S (ITS1)	145
ITS1-Hm-R2	CAA ACA CCC TCG GAG ATA GC		
rpoB-Hm-F	GAG ATC AAC GAG GAC CAC AC	Gène codant RpoB	120
rpoB-Hm-R	CCC TGC ACC CAT CGT AAT AC		
radA-Hm-F	CAA CCA CCA GAT TCT CCT CG	Gène codant RadA	100
radA-Hm-R	CGT AAG GGA GTC GAC ACA AA		
rpl10-Hm-F	AAG TTG CCC CGA ACG ACA T	Gène codant RPL 10	134
rpl10-Hm-R	GGA GTC TTC GGT CAC CTT GA		
halH4-Hm-F1	GGA CGA CAA GGC GAA AGA AA	Gène codant ProH4 au niveau de HalH4	144
halH4-Hm-R1	AGC GCA AAG TCG GTG TAA TC		
halH4-Hm-F2	ATT ACA CCG ACT TTG CGC TC	Gène codant ProH4 au niveau de HalH4	118
halH4-Hm-R2	CAG TTC ACC ATG TCG CTG AG		

F : Amorce sens R : Amorce antisens

Annexe 5 : Publication " Halocin C8: an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera: *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* et *Halobacterium* "

Extremophiles (2017) 21:623–638
DOI 10.1007/s00792-017-0931-5

ORIGINAL PAPER

Halocin C8: an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera: *Natrinema, Haloterrigena, Haloferax*, and *Halobacterium*

Alison Besse[1] · Manon Vandervennet[1] · Christophe Goulard[1] · Jean Peduzzi[1] · Stéphanie Isaac[1] · Sylvie Rebuffat[1] · Alyssa Carré-Mlouka[1]

Received: 7 February 2017 / Accepted: 24 March 2017 / Published online: 6 April 2017
© Springer Japan 2017

Abstract Halophilic archaea thrive in hypersaline ecosystems and produce antimicrobial peptides (AMPs) named halocins. AMPs are essential effectors of microbial interactions in natural ecosystems. Halocin C8 is a 7.4 kDa peptide produced by *Natrinema* sp. AS7092. Surrounded by genes involved in regulation and transport, the *halC8* gene encodes a precursor, processed into the mature halocin and an immunity protein, protecting the producing strain against its halocin. This feature constitutes a unique property of halocin C8, as known AMPs and their immunity proteins are generally encoded on distinct ORFs in an operon. By complementary in silico and PCR-based approaches, the presence of *halC8* in halophilic archaea collected from various parts of the world was evidenced. The full-length *halC8* gene is restricted and consistently found in the genomes of strains belonging to the phylogenetically related genera *Natrinema* and *Haloterrigena*, along with transport and regulation genes. Functional expression of *halC8* was demonstrated by RT-PCR and antimicrobial assays. Active halocin C8 was shown to contain five disulphide bridges, presumably conferring a compact structure resistant to harsh environmental conditions. In other archaeal genera, *Haloferax* and *Halobacterium*, genes encoding halocin C8 with diverging immunity protein moiety were evidenced. A phylogenetic analysis of halocin C8 sequences was conducted.

Keywords Hypersaline ecosystems · Halophilic archaea · Antimicrobial peptides · Halocin C8 · *Natrinema* · *Haloterrigena*

Abbreviations
AMP Antimicrobial peptide
Hal Halocin

Introduction

Antimicrobial compounds are essential effectors of microbial interactions in natural ecosystems (Hibbing et al. 2010). In hypersaline environments, antimicrobial proteinaceous compounds called halocins, have been found to be produced by halophilic archaea belonging to the class *Halobacteria*. Several halocins have been described so far, but only a few have been studied at the molecular level (Besse et al. 2015). Among those, halocin C8 (HalC8), initially purified from the halophilic strain *Natrinema* sp. AS7092 (formerly *Halobacterium* sp. AS7092), is a very stable 7.4 kD peptide with antimicrobial activity directed against several genera of halophilic archaea (Li et al. 2003). This halocin is produced ribosomally from the *halC8* gene, encoding a 29.4 kDa-ProC8 precursor protein containing a N-terminal signal peptide for the Tat pathway, which allows export of folded proteins through the cytoplasmic membrane (Palmer and Berks 2012). Maturation of ProC8 involves proteolytic cleavage by an unknown mechanism, to yield the active 7.4 kDa-mature peptide HalC8 and a

Communicated by A. Oren.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00792-017-0931-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alyssa Carré-Mlouka
acarre@mnhn.fr

[1] Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245 CNRS-MNHN), Sorbonne Universités, Muséum National d'Histoire Naturelle, Centre national de la Recherche scientifique (CNRS), CP 54, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

17.7 kDa-immunity protein HalI that protects the producing strain against its own antimicrobial peptide (Sun et al. 2005). The genetic locus surrounding *halC8* has been sequenced in *Natrinema* sp. AS7092, revealing putative genes that may also be involved in the production of HalC8: *halU* would encode a membrane-spanning protein with an unknown function; *halR* displays identities to regulator genes; *halT1, halT2* and *halT3* encode the three components of an ATP-binding cassette (ABC) transporter system (Mei et al. 2006). The presence of a gene cluster dedicated to the production of the peptide, the maturation pathway involving a proteolytic cleavage of a precursor protein, and the presence of an immunity protein, are all reminiscent of features commonly encountered for bacterial antimicrobial peptides (AMPs), which have been widely studied and described both in Gram-positive and Gram-negative bacteria (Kuipers et al. 2011; Rebuffat 2011). However, the AMP and its immunity protein are usually encoded by distinct genes in an operon, and halocin C8 represents an original and unique example where the precursor protein carries both the AMP and the immunity function. This feature results in peculiarities in the regulation processes, as it might be driven by release of the AMP from the precursor by the yet unidentified proteolytic entity.

Several studies report the production of HalC8 and/or the presence of the *halC8* gene among halophilic archaea of different geographical origins. While the halophilic strain *Natrinema* sp. AS7092, from which HalC8 was initially purified, originated from the Chaidan salt lake in Qinghai province, China (Li et al. 2003), three independent studies on Algerian isolates describe the production of HalC8. Five *Natrinema* sp. strains isolated from the Ichekaben salterns have been shown to carry the *halC8* gene and display papain sensitive antimicrobial compounds (Imadalou-Idres et al. 2013). The AMP has also been purified from an isolate from the Sidi Ben Ameur sebkha, indicated to belong to the genus *Halorubrum* but in fact affiliated to *Natrinema* sp. (Meknaci et al. 2014; Besse et al. 2015). Six strains belonging to the *Natrinema* genus isolated from the Chott Melghir, the El Golea, Sidi Ameur and Adrar sebkhas, displayed antimicrobial activity and their genome contained a *halC8* gene (Quadri et al. 2016). Variants of HalC8 have also been reported. The unidentified Tunisian strain TuA4 produces halocin A4, a 7.4 kDa peptide whose amino acid sequence is 75% identical to that of HalC8 (Shand and Leyva 2007). Interestingly, there is no study reporting a HalC8-producing strain that belongs to another genus than *Natrinema*.

This study thus focuses on HalC8 with the aim of determining whether the capacity to produce this AMP can be correlated with a phylogenetic affiliation to the *Natrinema* genus. In silico analysis of the *halC8* and surrounding genes was conducted, using GenBank databases. Using a wide range of available *Natrinema* isolates, as well as isolates belonging to the closely related genus *Haloterrigena*, PCR amplification of the *halC8* gene was performed, as well as a transcriptional analysis and antimicrobial assays to determine whether the peptide was expressed.

Materials and methods

Strains and growth conditions

Archaeal strains used in this study are listed in Table 1. Collections strains were purchased from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Germany, http://www.dsmz.de/) or the Japan Collection of Microorganisms (JCM, Japan, http://jcm.brc.riken.jp/). All the archaeal halophilic strains were cultivated in DSMZ Halobacteria medium 372 (http://www.dsmz.de) at 37 °C, supplemented with 15 g L^{-1} agar for solid medium. Experiments described below were performed for all the *Natrinema* and *Haloterrigena* strains described in Table 1, except HalC8 detection which was performed only for strain *Nnm. altunense* JCM12980.

Antimicrobial assays

The detection of antimicrobial activity was conducted using the agar well-diffusion method. Fifteen milliliters of medium 372 molten soft agar (agar 8 g L^{-1}) was inoculated with 1–50 µL of an early stationary phase culture (OD_{600} = 1.2–1.8) so as to obtain a final OD_{600} of 0.0001. After pouring in Petri dishes over a layer of solidified 15 g L^{-1} agar medium 372, wells with 0.5 cm diameter were aseptically punched. Aliquots (80 µL) of heated (10 min, 100 °C) and filtered (0.22 µm) culture supernatant of the producer strains were then deposited in the wells. The plates were incubated at 37 °C until a confluent microbial growth of the target strain was observed. Antimicrobial activity was detected by the formation of a clear inhibition halo (measured in mm) around the well. Experiments were repeated 2–5 times.

Nucleic acid extraction

Genomic DNA was extracted from the cell pellet of a 20 mL stationary phase culture. It was resuspended in 1.8 mL of SET buffer (20% sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.6). Cell lysis was obtained by adding 20 µL lysozyme (Biosolve, 20 mL^{-1}) and incubating for 15 min at room temperature. Twenty microliters of 10% (w/v) SDS were added before the sample was incubated for 1 h at room temperature with stirring. Fifty microliters of 20 mg mL^{-1} proteinase K (Panreac AppliChem) were added, followed

Table 1 Halophilic archaeal strains used in this study

Strain	Origin	References
Hrr. chaoviator ETD3	Sfax salterns, Tunisia	Ghanmi et al. 2016)
Htg. hispanica DSM18328[a]	Fuente de Piedra salt lake, Spain	Romano et al. (2007)
Htg. jeotgali DSM18794[a]	Shrimp jeotgal (fermented food), Korea	Roh et al. (2009)
Htg. thermotolerans DSM11552[a]	Solar salterns, Puerto Rico	Montalvo-Rodríguez et al. (2000)
Htg. salina JCM13891[a]	Xilinhot salt Lake, Inner Mongolia, China	Gutiérrez et al. (2008)
Htg. turkmenica DSM5511[a]	Saline soil, Turkmenistan	Zvyagintseva and Tarasov (1988)
Nnm. altunense JCM12890[a]	Ayakekum salt Lake, Xinjiang, China	Xu et al. (2005)
Nnm. ejinorense DSM18194[a]	Lake Ejinor, Inner Mongolia, China	Castillo et al. (2006)
Nnm. gari JCM14663[a]	Anchovy fish sauce, Thailand	Tapingkae et al. (2008)
Nnm. pellirubrum DSM15624[a]	Salted hide	McGenity et al. (1998)
Nnm. pallidum DSM15623[a]	Salted cod	McGenity, et al. (1998)
Nnm. versiforme DSM16034[a]	Aibi salt Lake, Xinjiang, China	Xin et al. (2000)
Nnm. salaciae DSM25055[a]	Lake Medee, Eastern Mediterranean Sea, Italy	Albuquerque et al. (2012)
Natrinema sp. SWI15[a]	Ichekaben, Algeria	Imadalou-Idres et al. (2013)
Natrinema sp. SSI9[a]	Ichekaben, Algeria	Imadalou-Idres et al. (2013)

[a]Strains tested by PCR for the presence of *halC8*, using primers C8-Imm1 and C8-12-R

by incubation for 2 h at 55 °C with stirring. After centrifugation, the lysate was dialyzed extensively (3500 Da membranes, Spectrum) against MilliQ® water overnight at 4 °C. DNA was extracted with chloroform and precipitated with isopropanol, as described (Sambrook et al. 1989).

RNA extraction was performed using an 80 mL culture cell pellet using TriZOL® reagent, as recommended by the manufacturer (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher, France). Quantification was performed using a NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare). Following treatment with DNAse (Promega, France, 1 U for 5 µg RNA) for 1 h 30 min at 37 °C, RNA was further purified using PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher, France).

Yield and purity of genomic DNA and RNA were determined using a NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare).

Reverse transcription and PCR amplification

The extracted RNA (500 ng) was mixed with 0.2 µg mL^{-1} random primers (Promega, France), 1 µL of 40 mM dNTP mix (VWR, France) and incubated at 65 °C for 5 min. After adding first strand buffer 1X (Invitrogen, ThermoFisher, France), 1 µL of 0.1 M DTT (Invitrogen, ThermoFisher, France) and incubating for 2 min at 25 °C, 200 U of SuperscriptII® reverse transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher, France) were added and incubation was carried out for 50 min at 42 °C. The reaction was stopped by incubation for 15 min at 70 °C.

PCR amplifications were performed using VWR reagents (France). Each 25 µL reaction mixture contained 1X Extra PCR buffer, dNTP mix (10 µM final concentration each), 0.4 µM of each primer, 1.25 U Taq DNA polymerase, 1 µL of template genomic DNA or cDNA. The following PCR program was used: 95 °C for 30 s followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55–62 °C for 30 s and 72 °C for 1–2 min, followed by an extension step of 7 min at 72 °C. The oligonucleotide primers used were the intergenic primers C8-IG1 (5′-ACGCTGTGCGAG TAGGAGTT-3′) and C8-IG2 (5′-GAGACGACGTTC GAGGAATC-3′) for amplification of the complete *halC8* gene; or primers C8-Imm1 (5′-GAGGAACCGAAA CTGCTCAC-3′) and C8-12-R (5′-RTCGGCGACGGTA CAGA-3′) for amplification of the partial *halC8* gene. Amplified DNA was submitted to electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels in Tris–acetic acid-EDTA buffer containing 1X GelRed (Biotim) and visualized under UV light.

PCR products were purified using the GeneClean Turbo® kit (MPBio, France) and cloned into the pGEM-T Easy vector following the manufacturer's instructions (Promega, France). Plasmid DNA was extracted using the QuickLyse® kit (Qiagen, France) and sequenced by Eurofins (Germany).

Sequence accession numbers

The *halC8* gene sequences reported in this study have been deposited in GenBank database under accession numbers KX382973–KX3829982.

In silico sequence analysis

The presence of the *halC8* gene or ProC8 sequences were searched in the Genbank databases using the BLASTN, BLASTP, and TBLASTN algorithms (Altschul et al. 1990; Zhang et al. 2000) and the sequences of *Natrinema* sp. AS7092 as query (GenBank accession numbers: DQ137141, nucleotides 4330–5181 and AAQ 82548). When multiple hits were found for the same strain, that with the lowest score was excluded from the analysis. Multiple alignments were generated using ClustalW (Thompson et al. 1994). Phylogenetic tree was reconstructed using the neighbour-joining method (BioNJ algorithm, Gascuel 1997, http://www.atgc-montpellier.fr/fastme; Lefort et al. 2015), using 1000 replicates in the bootstrap test. The tree was visualized using TreeDyn (Chevenet et al. 2006, http://www.phylogeny.fr). Prediction of Tat signal sequences was assayed using PRED-TAT (Bagos et al. 2010, http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT). Secondary structures were predicted using JPRED (Drozdetskiy et al. 2015, http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4).

HalC8 detection from solid culture of *Natrinema altunense* JCM12890 by mass spectrometry

Sixteen Petri dishes of DSMZ Halobacteria solid medium 372 sowed with *Natrinema altunense* JCM12890 were grown for 14 days at 37 °C. The sowed agar was cut out into small pieces, which were macerated for 4 h in methanol. The liquid phase was evaporated under reduced pressure (rotary evaporator, Buchi) and solubilized in H_2O containing 0.1% formic acid, which was extracted with butanol. The butanol phase was evaporated under reduced pressure (rotary evaporator, Buchi), solubilized in 500 mL of H_2O with 0.1% formic acid, and extracted on a C8 Sep-Pak cartridge 35 cc (Waters) pre-equilibrated with 10% acetonitrile (ACN) in H_2O containing 0.1% acid formic, washed with 500 mL of ACN/H_2O (20/80) and eluted with 600 mL of ACN/H_2O (80/20). Antimicrobial activity of the eluted fraction was tested against the sensitive strain *Halorubrum chaoviator* ETD3. The eluted fraction was evaporated, solubilized in 500 µL of 80% ACN, and was submitted to liquid chromatography–mass spectrometry analysis on an Ultimate 3000 micro-HPLC system (Thermo Scientific) connected to an electrospray ionization quadrupole time-of-flight Q-STAR mass spectrometer (AB Sciex). The separation was achieved on a Zorbax 300 SB 18 column (1 mm × 100 mm, Agilent). The elution gradient was 0 to 60% ACN in 0.1% trifluoroacetic acid over 20 min at a flow rate of 40 µL min^{-1}. Detection wavelength was set at 226 nm and electrospray ionization source was operated in positive mode with a spray voltage of 100 eV.

Results

The *halC8* gene is found in the genomes of archaeal strains belonging to four genera

To date, the *halC8* gene has been detected exclusively in strains belonging to the *Natrinema* genus (Meknaci et al. 2014; Besse et al. 2015; Quadri et al. 2016). To investigate whether other microorganisms could have the capacity to produce HalC8, we conducted an in silico analysis to search for genes similar to those involved in the biosynthesis of HalC8, using as query the sequence of *Natrinema* sp. AS7092. With BLASTN default parameters, only a few hits could be detected, using the complete nucleotide sequence of *halC8: Natrinema* sp. SWI15 HalC8 precursor (Genbank Accession No. KF516080; identity 99%, query cover 100%); *Natrinema* sp. J7-2 complete genome (Genbank Accession No. CP003412; identity 93%, query cover 63%); *Natrinema pellirubrum* DSM15624 complete genome (Genbank Accession No. CP003372; identity 73%, query cover 94%). However, when using the translated sequence of *halC8* with the BLASTP or TBLASTN algorithms, a larger number of amino acid sequences presenting identities to the ProC8 precursor could be retrieved, either previously identified as HalC8 precursor or annotated as hypothetical proteins (Table 2, columns 3–5). Based on visual examination of the alignments and presence of large gaps, we arbitrarily chose to exclude sequences with scores below 100, although the E-value was acceptable ($<e^{-17}$). All identified sequences were retrieved from halophilic archaea in the class *Halobacteria*, which belonged to only a few genera: *Natrinema, Haloterrigena* (identified only with BLASTP algorithm, Table 2), *Haloferax*, and *Halobacterium*. The BLASTP analysis (Table 2) also revealed the presence of HalC8-encoding genes in the assembly driven genomes of two unaffiliated strains (J07HX5 and J07HB67) from Lake Tyrell, Australia (Podell et al. 2013).

We noted that for sequences with identity below 40%, although the query cover indicated alignment along the whole sequence, the C-terminal end of the precursor including the mature sequence of HalC8 presented better similarity. Therefore, we artificially split the sequence of the ProC8 precursor (deducted from translation of the *Natrinema* sp. AS7092 *halC8* gene) in two. Then we used either the N-terminal region of ProC8 (residues 1–207) which corresponds to the HalI immunity protein, or the C-terminal region (residues 208–283) which corresponds to the mature HalC8 peptide, as queries to conduct a similar analysis (Table 2, columns 6–11). They confirmed that, for *Natrinema* and *Haloterrigena* strains, the ProC8 amino acid sequences were similar to that of *Natrinema* sp. AS7092 along the whole sequence, while this was not the case for *Haloferax* and *Halobacterium* strains. No HalI

Table 2 In silico search results for the presence of the *halC8* gene, using the BLASTP or TBLASTN algorithm

	Sequence accession no	ProC8			HalI			HalC8		
		Score	Identity (%)	Query cover (%)	Score	Identity (%)	Query cover (%)	Score	Identity (%)	Query cover (%)
halocin C8 precursor[a] [*Natrinema* sp. SWI15]	AII25935	556	98	100	404	97	100	154	100	100
halocin C8 precursor gene[b] [*Natrinema* sp. SWI15]	KF516080	535	94	100	380	92	100	153	100	100
halocin C8 precursor[a] [*Nnm. altunense* JCM12890]	ELY84479	495	99	87	343	99	87	153	100	100
halocin C8 precursor[a] [*Natrinema* sp. SSI9]	AII25940	425	73	100	308	74	100	115	70	100
halocin C8 precursor gene[b] [*Natrinema* sp. SSI9]	KF516085	404	70	100	287	70	100	115	70	100
halocin C8 precursor[a] [*Htg. salina* JCM13891]	ELZ21917	412	82	87	269	78	83	143	91	100
halocin C8 precursor[a] [*Nnm. pellirubrum* JCM15624]	ELY70477	332	61	100	206	56	98	127	80	98
hypothetical gene[b] [*Nnm. pellirubrum* JCM15624]	CP003372	331	59	100	205	53	98	126	80	98
hypothetical gene[b] [*Natrinema* sp. J7-2]	CP003412	329	89	65	184	85	53	142	95	100
halocin C8 precursor[a] [*Nnm. gari* JCM14663]	WP_008456182	240	89	46	101	86	27	137	92	100
hypothetical protein[a] [*Htg. thermotolerans* DSM11552]	ELZ16389	154	40	86	81.6	41	65	65.5	49	98
halocin C8 (TBD)[a] [*Hfx. gibbonsii* ATCC33959]	WP_004975848	154	36	99	ND	ND	ND	85.9	58	93
halocin C8 (TBD) [a] [*Hfx. lucentense* DSM 14919]	WP_004064530	152	36	99	ND	ND	ND	85.9	58	93
halocin C8 (TBD) [a] [*Hfx. alexandrinus* JCM10717]	ELZ89596	152	36	99	ND	ND	ND	85.9	58	93
halocin C8 (TBD)[a] [*Hfx. volcanii* DS2]	ELY31431	148	36	99	ND	ND	ND	85.9	58	93
hypothetical gene[b] [*Hfx. gibbonsii* ARA6]	CP011947	147	34	99	ND	ND	ND	85.5	58	93
hypothetical gene, plasmid pHV4[b] [*Hfx. volcanii* DS2]	CP001955	144	35	99	ND	ND	ND	85.5	58	93
hypothetical gene, megaplasmid 2[b] [*Hbt.* sp. GN101]	EU080936	135	31	95	ND	ND	ND	69.7	50	97
hypothetical protein J07HB67_00644[a] [halophilic archaeon J07HB67]	ERH11636	130	34	79	ND	ND	ND	57.8	41	97

Table 2 (continued)

	Sequence accession no	ProC8			HalI			HalC8		
		Score	Identity (%)	Query cover (%)	Score	Identity (%)	Query cover (%)	Score	Identity (%)	Query cover (%)
hypothetical protein[a] [*Hfx. larsenii* JCM13917]	WP_007541953	124	33	76	ND	ND	ND	63.9	47	97
hypothetical protein[a] [*Hbt. salinarum* R1]	WP_012289233	108	29	75	52	33	41	52	38	98
hypothetical gene, plasmid PHS3[b] [*Hbt. salinarum* R1]	AM774415	107	28	86	51.2	33	41	45.4	48	63
hypothetical gene, plasmid pNRC200[b] [*Hbt.* sp. NRC-1]	AE004437	107	28	85	52	33	41	43.5	40	96
Vng6329h (plasmid)[a] [*Hbt. salinarum* NRC-1]	AAG20958	103	30	72	ND	ND	ND	45.4	48	63
hypothetical protein J07HX5_02037[a] [halophilic archaeon J07HX5]	ERG89865	ND	ND	ND	ND	ND	ND	60.8	47	94

ND not detected
[a]BLASTP, [b]TBLASTN

immunity protein moiety, as encountered in *Natrinema* and *Haloterrigena*, could be detected for *Haloferax* strains, and for one *Halobacterium* strain, it could be detected only with very low identity (33%) and coverage (41%). Therefore, the genomes of *Natrinema* and *Haloterrigena* strains encode full-length ProC8 precursor protein, while the genomes of *Haloferax* and *Halobacterium* strains encode a mature HalC8-like peptide, with a N-terminal region presenting no identified similarity to the HalI immunity protein moiety. In the four genera, the sequence of the mature HalC8 peptide is part of a larger sequence.

The *halC8* gene is amplified from the genome of *Natrinema* and *Haloterrigena* strains

Since our in silico analysis showed that the full-length *halC8* gene is conserved in *Natrinema* and *Haloterrigena* genomes, we aimed to determine whether the presence of this gene was a characteristic of these genera. For this, we designed specific nucleotide primers, based on a multiple alignment of the sequences identified by the in silico analysis (data not shown). Two primer pairs were designed: C8-IG1 and C8-IG2, which are localized upstream and downstream the coding sequence of *halC8*, and C8-Imm1 and C8-12-R allowing amplification of a partial *halC8* sequence lacking the 5′ extremity encoding the N-terminal part of HalI, and lacking the 3′ end encoding the C terminus of HalC8. PCR amplification was performed, using as template the extracted genomic DNA of a large set of available *Natrinema* and *Haloterrigena* species (Table 1). Using primers C8-Imm1 and C8-12-R, an amplicon of expected size (651 bp) was obtained (data not shown), after optimization of amplification parameters, for all the tested strains, including those identified by the in silico analysis (*Natrinema* sp. SWI15, *Natrinema* sp. SSI9, *Nnm. altunense* JCM12890, *Nnm. pellirubrum* JCM15624, *Nnm. gari* JCM14663, *Htg. salina* JCM13891, and *Htg. thermotolerans* DSM11552). Despite the fact that the genome sequences for *Nnm. pallidum* DSM15623, *Nnm. versiforme* DSM16034, *Htg. jeotgali* DSM18794, and *Htg. turkmenica* DSM5511 are available in databases, we were not able to identify a *halC8* gene by in silico analysis. However, a *halC8* gene was amplified for these four strains using the primers C8-Imm1 and C8-12-R, as well as for strains *Nnm. ejinorense* DSM18194, *Nnm. salaciae* DSM25055 and *Htg. hispanica* DSM18328 for which no genome sequence was available. Morever, a 1058 bp-fragment was amplified with the primers C8-IG1 and C8-IG2 localized upstream and downstream the coding sequence of *halC8*, for *Nnm. altunense* JCM12890, *Nnm. ejinorense* DSM18194, *Nnm. salaciae* DSM25055, *Htg. turkmenica* DSM5511, *Htg. jeotgali* DSM18794, *Htg. thermotolerans* DSM11552, and *Htg. salina* JCM13891. Amplicons were cloned and sequenced.

Interestingly, while the *Nnm. altunense* ProC8 sequences retrieved from the database (ELY84479) and generated in this study (KX382973) were identical, this was not the case for the *Htg. thermotolerans* (WP_006648340, KX382978) or *Htg. salina* (ELZ21917, KX382979) sequences. These sequences were named *Htg. thermotolerans*1 and *Htg. salina*1 when they were obtained from this study and *Htg. thermotolerans*2 and *Htg. salina*2, when obtained from databases.

Multiple alignments and phylogenetic analysis of ProC8 sequences

Because the genomes of *Haloferax* and *Halobacterium* isolates do not encode a clearly identifiable HalI immunity protein moiety, we decided to consider HalI and HalC8 as separate entities to perform multiple alignments. Using ClustalW, the HalC8 and HalC8-like sequences from *Haloterrigena, Haloferax, Natrinema* and *Halobacterium* (Fig. 1a), or the HalI sequences from *Natrinema* and *Haloterrigena* (Fig. 1b) were aligned, and phylogenetic trees were constructed based on these multiple alignments (Fig. 2). For HalC8, the amino acid sequence of HalA4 (Shand and Leyva 2007), a variant of HalC8 isolated from the unidentified TuA4 halophilic archaeal strain, was also considered. The shorter sequences of *Nnm. versiforme* (KX382981), *Htg. hispanica* (KX382982), *Nnm. pallidum* (KX382980) were due to the fact that we were unable to amplify the full-length *halC8* gene with primers C8-IG1 and C8-IG2, but we sequenced an amplicon obtained with primers C8-Imm1 and C8-12-R, corresponding to a partial *halC8* gene. Some other sequences were shorter, based on gene prediction in Genbank: HalC8-like peptide of *Hbt. salinarum* NRC-1 in the C-terminal end; HalI of *Htg. salina* (ELZ21917), *Nnm. altunense* (ELY84479), *Htg. thermotolerans* (WP_006648340), *Nnm. gari* (WP_008456182) and *Natrinema* sp. J7-2 (AFO55702) in the N-terminal extremity. The surrounding sequences for the five last strains were carefully examined to determine whether similarities to ProC8 sequences could be identified, in the three reading frames. This was the case for *Htg. salina* (ELZ21917) and *Nnm. altunense* (ELY84479), for which the initiation methionine had been predicted as M32 and not M1; the sequences were accordingly corrected. For *Nnm. gari* and *Natrinema* sp. J7-2, the initiation amino acid had been predicted as V151, but the predicted immediate N-terminal sequence (G98-E150) also displayed similarities to ProC8 sequence of *Natrinema* sp. AS7092, and the sequence was thus edited.

For the totality of the complete HalC8 and HalC8-like sequences, the position of the ten cysteine residues is perfectly conserved, with the exception of the HalA4 sequence in which C268 is instead I268 and C260 is instead S260 (Fig. 1a). The phylogenetic analysis (Fig. 2a) reveals that the HalC8 sequences are clearly divided into two clades, the sequence from strain J07HB67 being excluded from both. Clade I contains HalC8-like sequences and clusters the *Halobacterium* sequences with the sequence from the unaffiliated strain J07HX5, but also one *Haloferax* (*Hfx. larsenii*) and one *Haloterrigena* (*Htg. thermotolerans*2) sequence. Clade II consists of *Natrinema, Haloterrigena*, and *Haloferax* sequences, including a very well supported *Haloferax* sub-clade. While the two divergent HalC8 sequences of *Htg. salina* are both included in clade II, those of *Htg. thermotolerans* are affiliated to two different clades. We can observe that HalC8 is encountered in four genera belonging to the three novel orders recently defined in the class *Halobacteria* (Gupta et al. 2015): *Halobacteriales* (*Halobacterium*), *Haloferacales* (*Haloferax*) and *Natrialbales (Natrinema* and *Haloterrigena*).

The HalI sequences (Fig. 1b) are conserved in the *Natrinema* and *Haloterrigena* genera. The Tat signal peptide is found with its characteristic features including the twin arginine in all the sequences except the shorter sequences of *Htg. thermotolerans*2, *Nnm. gari*, and *Natrinema* sp J7-2, and the artificially shorter sequences of *Nnm. versiforme* (KX382981), *Htg. hispanica* (KX382982), *Nnm. pallidum* (KX382980), due to amplification of a partial *halC8* gene. The helix-loop-helix motif, found to be essential to the immunity function of HalI (Mei et al. 2008), is present in all but the shorter sequences of *Nnm. gari* and *Natrinema* sp J7-2. Although not found to be involved in the immunity function of HalI (Mei et al. 2008), two other structural features, helix 3 and 4, are conserved in all the analysed sequences. The phylogenetic analysis is consistent with that of HalC8, and shows similar clustering (Fig. 2), with the *Htg. thermotolerans* (WP_006648340) being the most distant sequence. While the N-terminal sequences of HalC8 for *Haloferax* strains display no clear sequence identity with that of HalI, their length (207–231 amino acids) is similar. In the case of *Hfx. alexandrinus, Hfx. gibonsii, Hfx. lucentense*, and *Hfx. volcanii*, a Tat signal peptide and a helix-loop-helix motif are found at equivalent localizations along the sequences, which display 92–98% identity with each other (Fig. 1 Suppl). No Tat signal peptide could be identified using PRED-TAT for the other sequences, but a helix-loop-helix motif was identified using JPRED for *Hfx. larsenii, Hbt. salinarum* GN101, and *Hbt. salinarum* NRC-1, which display 61–99% identity with each other (Fig. 1 Suppl).

The HalC8 biosynthesis gene cluster is conserved

For sequences identified by the in silico analysis (Table 2), the surrounding ORFs were examined. In *Natrinema* sp. AS7092, the surrounding genes may be involved in the

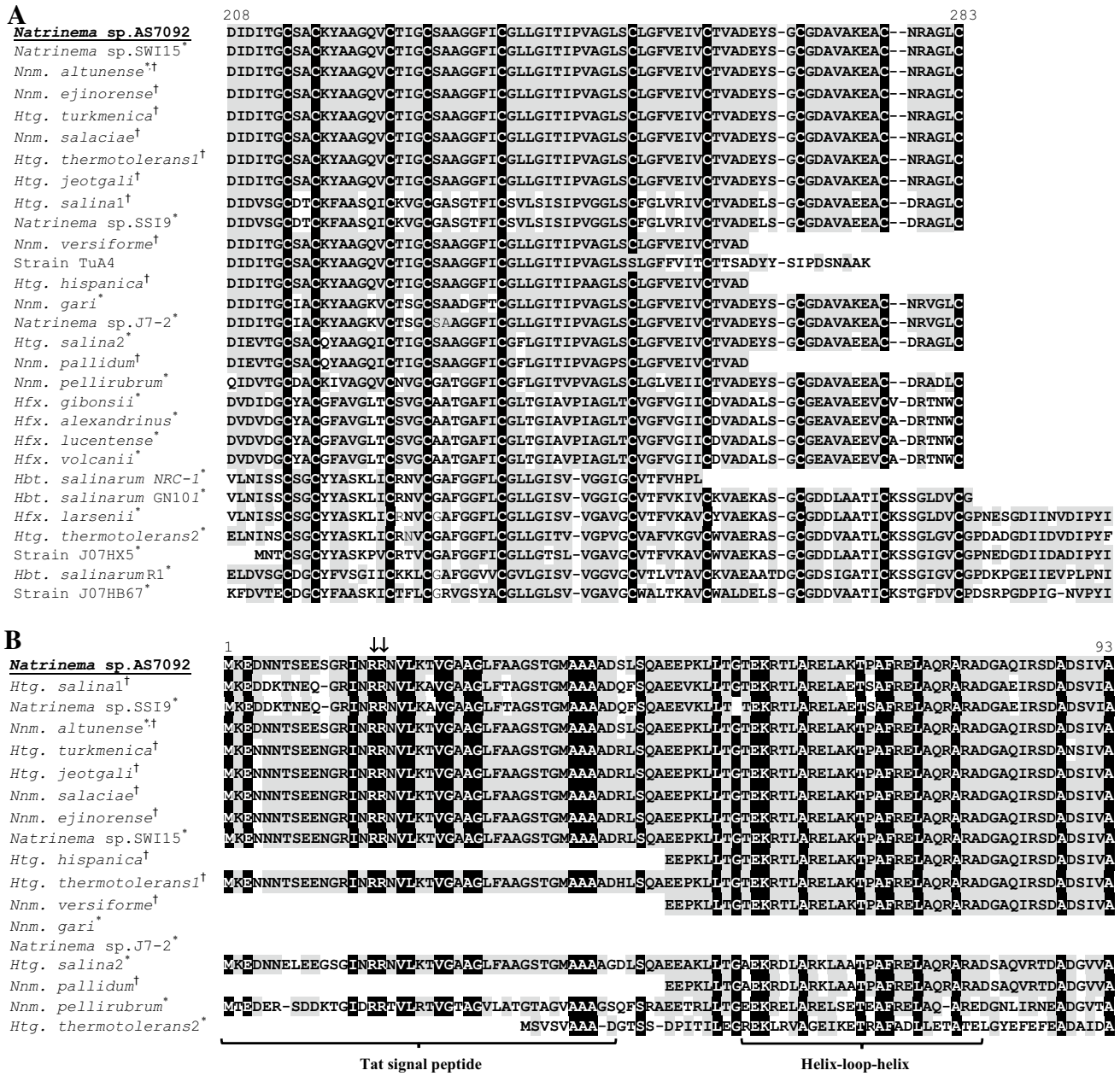


Fig. 1 Multiple alignment of the mature HalC8 and HalC8-like peptide sequences (**a**) and of the mature HalI immunity protein sequences from *Natrinema* and *Haloterrigena* strains (**b**), generated by ClustalW. *Sequences from the Genbank database, identified by the in silico analysis (Table 2). †Sequences from this study. The sequences of *Nnm. pallidum, Nnm. versiforme, Htg. hispanica* are shorter because they were amplified with primers C8-Imm1 and C8-12-R allowing amplification of a partial *halC8* gene. The strain TuA4 sequence is halocin A4 (Shand and Leyva 2007). Numbering refers to the ProC8 sequence of *Natrinema* sp. AS7092 (UniProt Accession No. P83716). At each position of the alignment, *grey shaded* amino acids are those present in the majority of the sequences, either identical or belonging to the same category, i.e. aliphatic (G, V, I, L, A, P), aromatic (W, F, Y), acidic (D, E), basic (K, R, H), or hydroxylated amino acids (S, T). *Black shaded* amino acids are those present in all sequences

production of HalC8: *halU* would encode a membrane-spanning protein with an unknown function; *halR* displays identities to regulator genes; *halT1, halT2* and *halT3* encode components of an ABC transporter system (Mei et al. 2006). Figure 3 summarizes the genetic organization at the locus around the *halC8* gene in the different strains. In *Nnm. altunense, Nnm. pellirubrum, Nnm. gari, Natrinema* sp. J7-2, and *Htg. salina*, the genetic organization is similar to that described for *Natrinema* sp. AS7092, except for the substitution of *halR* by a gene of an unknown function in *Nnm. gari* (ELY79089) and *Natrinema* sp. J7-2 (AFO55701), and the absence of *halT2* and *halT3* in *Htg.*

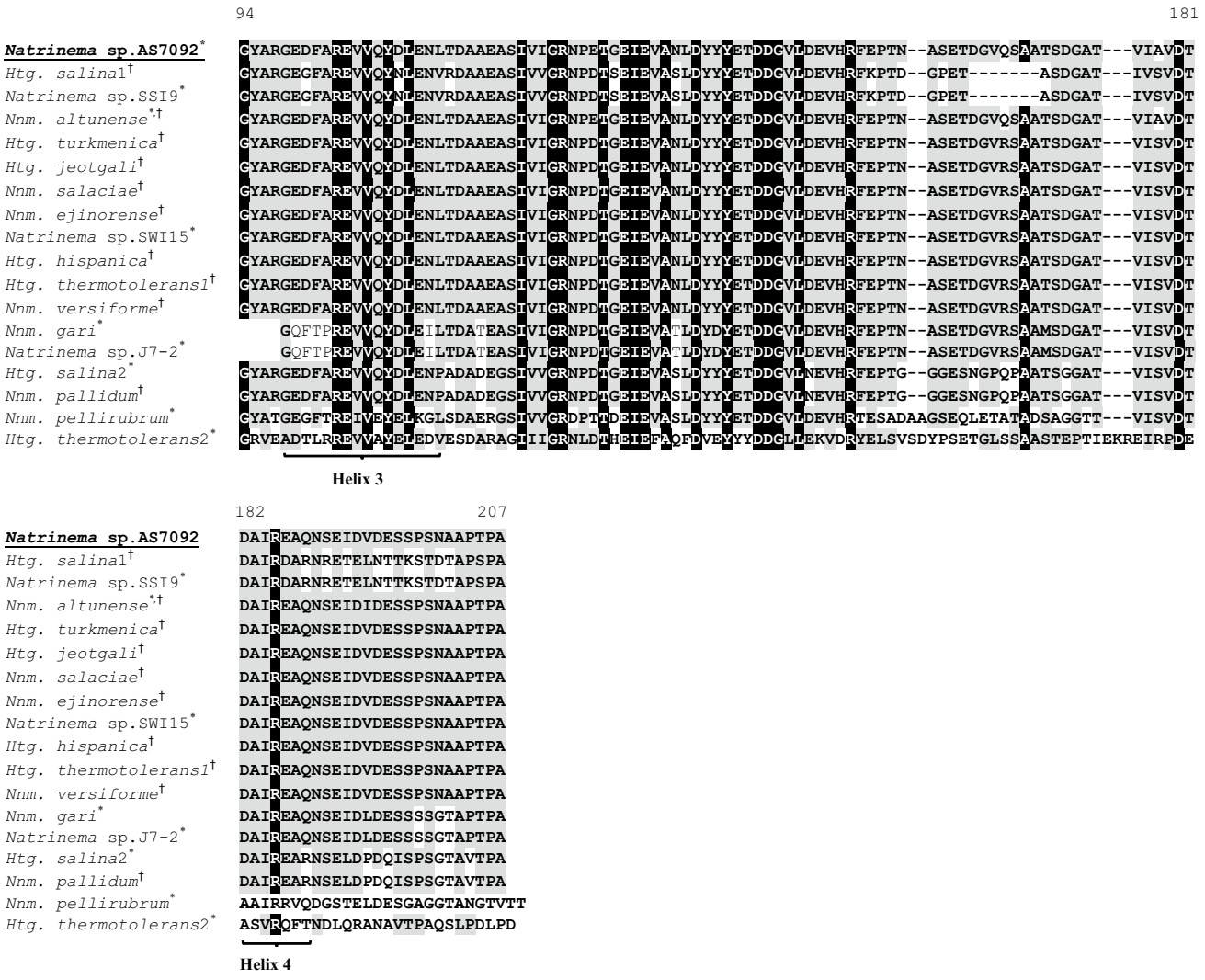


Fig. 1 (continued)

salina. Remarkably, the *hal* locus is surrounded by multiple genes encoding ABC transporters, besides *halT1, halT2* and *halT3*. The two ORFs upstream of the locus have been annotated as "ABC-type antimicrobial peptide transport system" (ELY84486–ELY84485; ELY70470–ELY70471; ELY79094–ELY79093; AFO55696–AFO55697; ELZ21924–ELZ21923). Immediately, upstream *halU*, a short ORF encoding a protein involved in competence (ELY84484; ELY70473; ELY79091; AFO55699; ELZ21921) can be found in all the examined *Natrinema* and *Haloterrigena* strains but *Htg. thermotolerans*. The latter displays a different organization: *halU, halR, halT1, halT2* and *halT3* are absent but genes involved in transcriptional regulation or ABC transport can be found close to the *halC8* gene.

The genetic organization around *halC8* in the other strains is more elusive. No genes similar to *halU, halR, halT1, halT2* and *halT3* could be identified near *halC8* (data not shown), neither were present other genes involved in ABC transport or competence, except in the case *of Hfx. lucentense* and *Hfx. alexandrinus* for which several ABC transporter genes were present downstream *halC8*. However, in some cases, elements suggesting genetic mobility can be found at the vicinity of *halC8*: insertion sequence ISH9 in *Hfx. larseni* (ELZ79605) and *Hfx. volcanii* (HVO_RS03235); XerC/D-like integrase in *Hbt. salinarum* R1 (CAP13563); insertion sequences ISH3, ISH5 and ISH8 (nucleotides 251224–266840, AE004438) in *Hbt. salinarum* NRC-1 (data not shown).

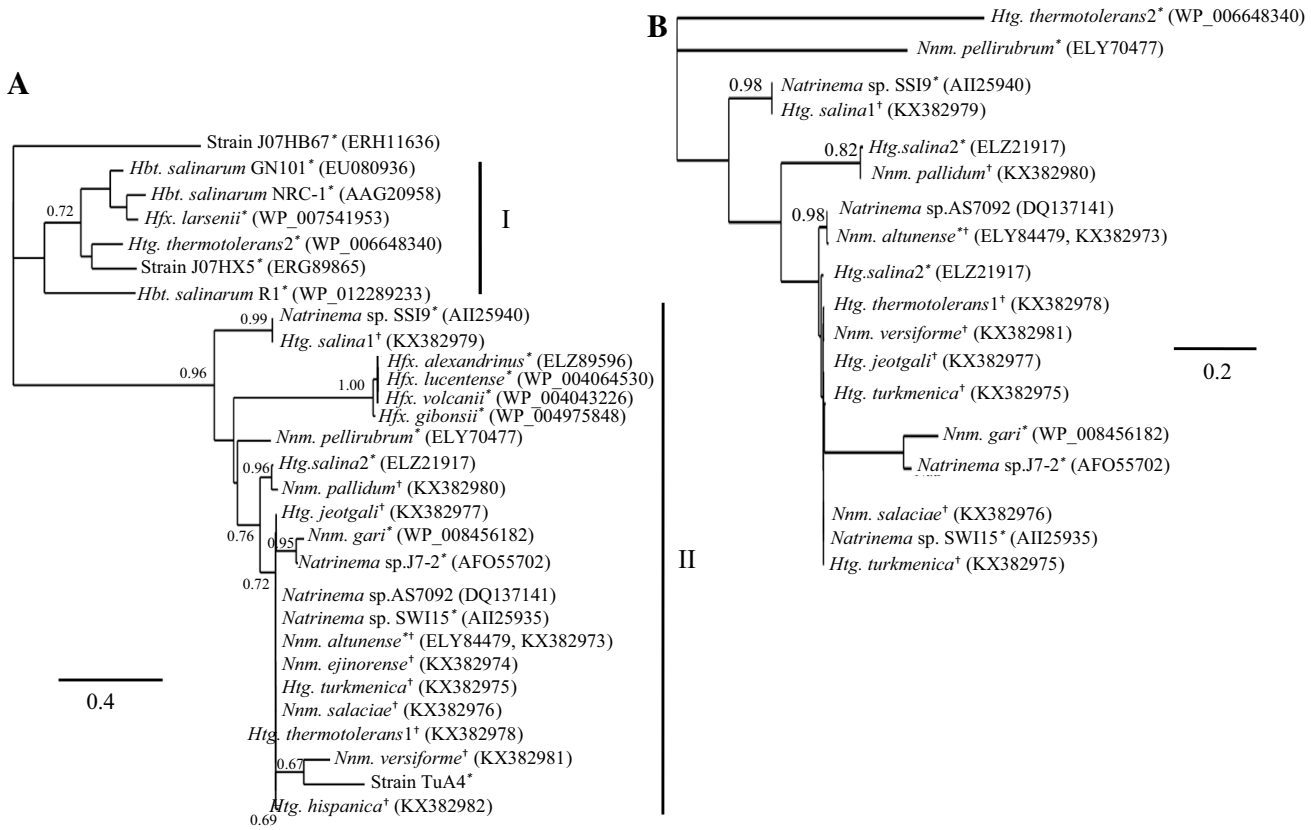


Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree of mature HalC8 and HalC8-like peptide sequences (**a**) and HalI immunity protein sequences (**b**). *Sequences from the Genbank database, identified by the in silico analysis (Table 2). †Sequences from this study. Accession numbers of the sequences are indicated in parenthesis. Bootstrap values are based on 1000 replicates and are noted on main branches with over 60% bootstrap support

The *halC8* gene is transcribed and antimicrobial activity is detected in exponential growth stage

All tested *Natrinema* and *Haloterrigena* strains have the capacity to produce HalC8, as their genome contains a *halC8* gene, and evidence for the presence of other genes in the *hal* cluster is demonstrated for strains *Nnm. altunense, Nnm. pellirubrum, Nnm. gari, Natrinema* sp. J7-2, and *Htg. salina* (Fig. 3). To determine whether HalC8 is expressed in all the *Natrinema* and *Haloterrigena* strains studied here, RNA was extracted from end of exponential growth stage cultures, which usually corresponds to maximal expression of AMPs (Besse et al. 2015). A RT-PCR analysis was conducted using primers C8-Imm1 and C8-12-R (Fig. 4a). For all the tested strains, the presence of a *halC8* transcript was detected (data not shown).

To determine whether these strains indeed produced antimicrobial compounds, culture supernatants (end of exponential growth) from the same *Natrinema* and *Haloterrigena* strains were subjected to agar diffusion assays. Because HalC8 is a 7.4 kDa peptide described as being resistant to heat treatment (Li et al. 2003), the culture supernatants were heated and filtered to exclude the potential activity of a viral or heat-sensitive agent. The inhibition halos produced on lawns of sensitive *Hrr. chaoviator* ETD3 by filtered, heated, or filtered and heated culture supernatant of *Htg. salina* JCM13891 are shown on Fig. 4B. They demonstrate no loss of antimicrobial activity of the HalC8 containing culture supernatant, whatever the treatment. Antimicrobial activity was assayed against the target strain *Hrr. chaoviator* ETD3 (Table 3; Fig. 2 Suppl.). All the strains carrying the *halC8* gene displayed a thermoresistant antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3, presumably due to production of HalC8.

Nnm. altunense JCM12890 produces HalC8 with five disulphide bridges

To demonstrate that thermoresistant antimicrobial activity was indeed due to HalC8, we aimed to detect the mature peptide in cultures of *Nnm. altunense* JCM12890, which was shown to display the highest antimicrobial activity

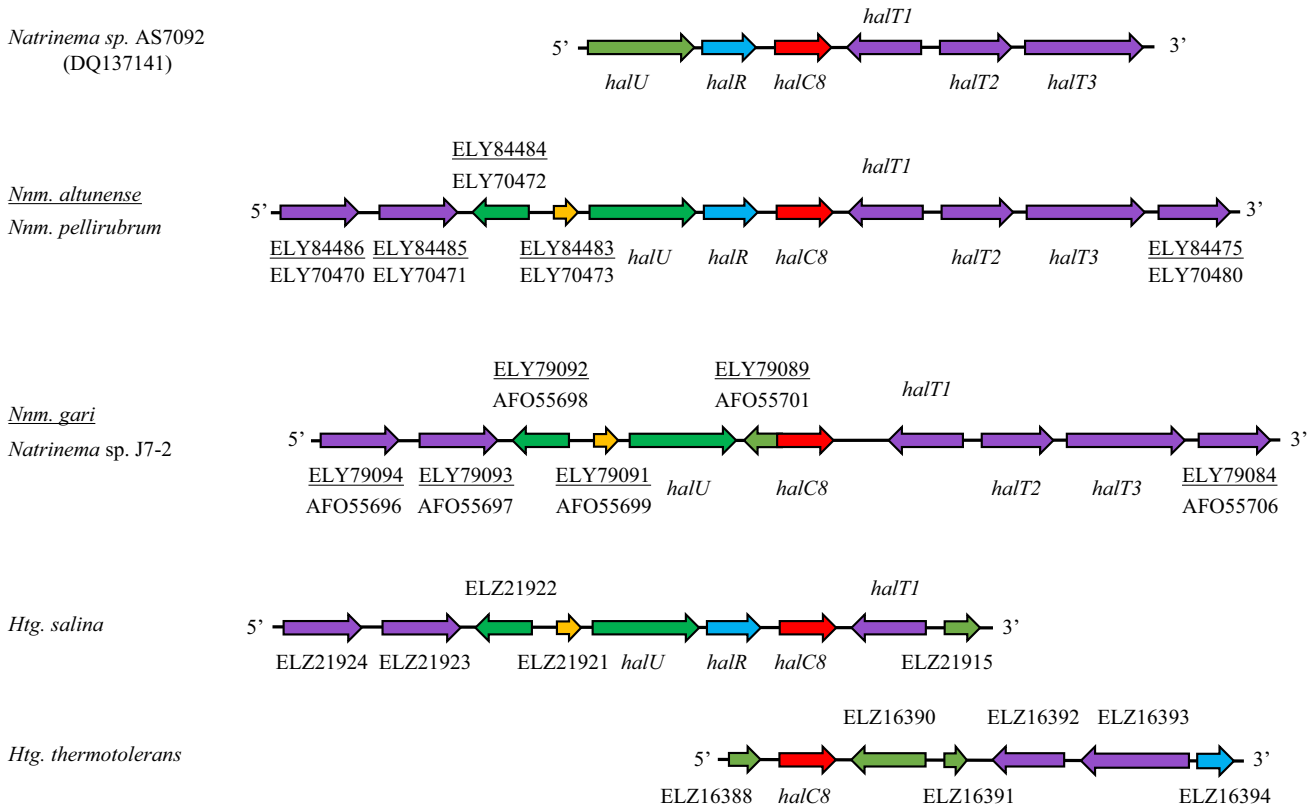


Fig. 3 Genetic organization at the *hal* locus. Names of the *hal* genes or protein accession numbers are indicated. *Nnm. altunense* and *Nnm. pellirubrum* on one hand, and *Nnm. gari* and *Natrinema* sp. J7-2 on the other hand, display the same organization. The nucleotide sequence accession numbers are: *Natrinema* sp. AS7092, DQ137141; *Nnm. altunense*, AOIK01000035, nucleotides 55867–43075; *Nnm. pellirubrum*, AOIE01000110, nucleotides 22881—34423; *Nnm. gari*, AOIJ01000052, nucleotides 28929–17862; *Natrinema* sp. J7-2, CP003412, nucleotides 411127–422193; *Htg. salina*, AOIS01000017, nucleotides 59628–49774; *Htg. thermotolerans*, AOIR01000031, nucleotides 6760674225. The precursor *halC8* gene is indicated in *red arrows*. Transcriptionnal regulator genes are indicated in *blue arrows*. *Purple arrows* correspond to ABC transporter genes. *Green arrows* are genes with an unknown function. *Yellow arrows* are genes involved in competence

against *Hrr. chaoviator* ETD3 (Table 3). In a recent study, HalC8 was purified from large amounts of solid culture of *Natrinema* sp. SSR (formely *Halorubrum* sp. SSR) (Meknaci et al. 2014; Besse et al. 2015). Therefore, we cultivated *Nnm. altunense* JCM12890 on 16 Petri dishes, and the agar was used to extract the proteins with methanol. The active fraction from subsequent solid phase extraction on Sep-Pak C18 cartridge was analysed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry that allowed obtaining an accurate mass measurement. The peak eluting after the 52nd min displayed two peaks at isotopic *m/z* 1487.3526 and 1858.9384, matching with $[M+5H]^{5+}$ and $[M+4H]^{4}$ ions of HalC8, respectively (Fig. 5), which corresponds to a measured mass of 7431.752 ± 0.011 Da. This result is in agreement with the presence of five disulphide bridges formed between the ten cysteines present along the predicted amino acid sequence of HalC8, as average mass of HalC8 calculated from amino acid sequence with oxidized Cys is 7431.636 Da. The presence of five disulphide bridges in HalC8, which had been previously suggested (Sun et al. 2005; Besse et al. 2015) is thus evidenced here for the first time.

Discussion and conclusions

In archaea, information on AMPs is scarce, compared to the abundant literature on bacterial AMPs, and concerns only members of the class *Halobacteria* and the order *Sulfolobales* (Besse et al. 2015). HalC8 is the best known archaeal AMP, as it has been demonstrated to be produced from a ProC8 precursor, targeted to the membrane by the Tat pathway, and cleaved by an unknown mechanism to yield the active mature peptide HalC8 and an immunity protein HalI, protecting the producing strain against its own AMP (Sun et al. 2005). A putative gene cluster containing regulatory and transport genes has been identified (Mei et al. 2006), and expression of the *halC8* gene is abundant

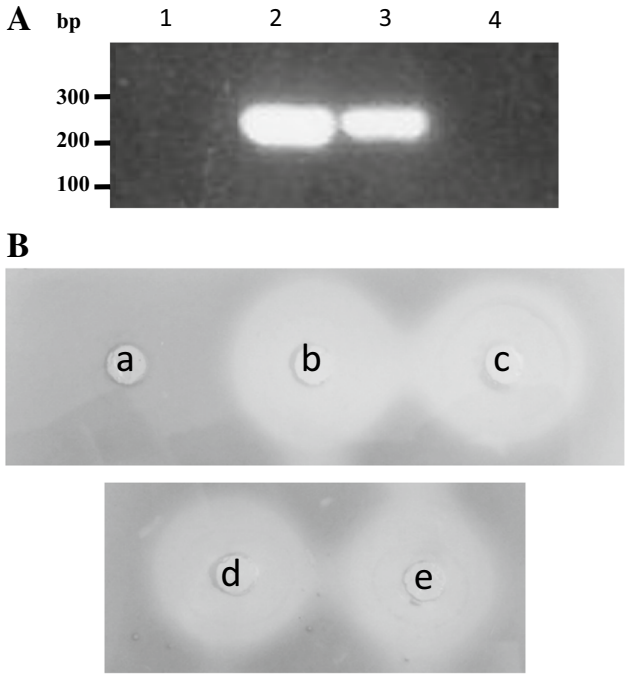


Fig. 4 Expression of HalC8 in *Htg. salina* JCM13891. **A** RT-PCR analysis of *halC8* in stationary stage culture, amplification with primers C8-Imm1 and C8-12-R. *1* RNAse free water, *2* genomic DNA, *3* cDNA, *4* RNA. **B** Antimicrobial assays using *Hrr. chaoviator* ETD3 as target strain. *a* Medium 372. Stationary stage culture supernatant: untreated (*b*), heated (*c*), filtered (*d*), heated and filtered (*e*)

Table 3 Antimicrobial assays

Producing strain	Inhibition halos on lawn of *Hrr. chaoviator* ETD3 (mm)
Nnm. altunense JCM12890	45
Nnm. versiforme DSM16034	46
Nnm. salaciae DSM25055	17
Natrinema sp. SSI9	53
Natrinema sp. SWI6	50
Nnm. pallidum DSM15623	31
Htg. salina JCM13891	37
Nnm. gari JCM14663	30
Nnm. ejinorense DSM18194	24
Nnm. pellirubrum DSM15624	21
Htg. thermotolerans DSM11552	40
Htg. turkmenica DSM5511	30
Htg. hispanica DSM18328	17
Htg. jeotgali DSM18794	15

Inhibition halos (mm) are representative values of one experiment

at transition from exponential to stationary stage of growth, while proteolytic processing decreases during the stationary stage (Sun et al. 2005). The immunity protein HalI functions by sequestering multiple HalC8 mature peptides at the membrane, through direct specific interaction involving a helix-loop-helix motif (Mei et al. 2008).

Besides the Chinese strain from which HalC8 was originally isolated (Li et al. 2003), several studies report either the production of HalC8 or the presence of the *halC8* gene from Algerian (Imadalou-Idres et al. 2013; Meknaci et al. 2014; Quadri et al. 2016) or Tunisian (Shand and Leyva 2007) isolates. The present study demonstrates that HalC8 is in fact widespread among hypersaline environments in the world (Table 1). Indeed, it was shown to be also produced by isolates from Spain (e.g. *Htg. hispanica*), Korea (e.g. *Htg. jeotgali*), Puerto Rico (e.g. *Htg. thermotolerans*), Turkmenistan (e.g. *Htg. turkmenica*), Thailand (e.g. *Nnm. gari*), and even from deep-sea brine pools in the Mediterranean Sea (e.g. *Nnm. salaciae*). Similar data demonstrating the widespread distribution of AMPs from bacteria have been reported (Athey et al. 2016). The full-length *halC8* gene sequence, encoding the mature HalC8 peptide and the HalI immunity protein, is restricted to isolates belonging to two genera: *Natrinema* and *Haloterrigena*. These two genera were defined two decades ago, based on 16S rDNA sequences (McGenity et al. 1998; Ventosa et al. 1999). However, their distinction is still controversial due to the extreme phylogenetic closeness of species of *Haloterrigena* and *Natrinema*, even when using other markers than 16S rDNA sequences such as *rpoB* (Tindall 2003; Wright 2006; Enache et al. 2007; Minegishi et al. 2010). For the large panel of tested *Natrinema* and *Haloterrigena* strains, we could amplify a *halC8* fragment, provided that the proper primers were used, and even when the genome sequence was available in databases and did not yield any hit with our in silico analysis. This was the case for *Nnm. pallidum* DSM15623, *Nnm. versiforme* DSM16034, *Htg. jeotgali* DSM18794, *Htg. turkmenica* DSM5511, and *Htg. salina* JCM13891. Some of these genome sequences are not published and/or are incomplete, but those of *Htg. jeotgali* DSM18794 and *Htg. turkmenica* DSM5511 have been published with no mention of the presence of a *halC8* gene (Saunders et al. 2010; Cha et al. 2015). This could possibly be due to the presence of *halC8* on a sequencing recalcitrant locus, or on a versatile plasmid. Interestingly, for *Htg. salina* and *Htg. thermotolerans*, the sequence retrieved from the database and the sequence we amplified, were divergent. It could possibly be that two copies of *halC8* are present in these strains.

The capacity to produce HalC8-like peptides was also found in other isolates belonging to the *Haloferax* and *Halobacterium* genera (Table 2). However, our phylogenetic analysis of the HalC8 sequences clearly shows that they represent a distinct clade, together with the divergent *Htg. thermotolerans*2 sequence (Fig. 2). Besides, the N-terminal part of the precursors are strongly different and cannot be aligned to the HalI immunity protein

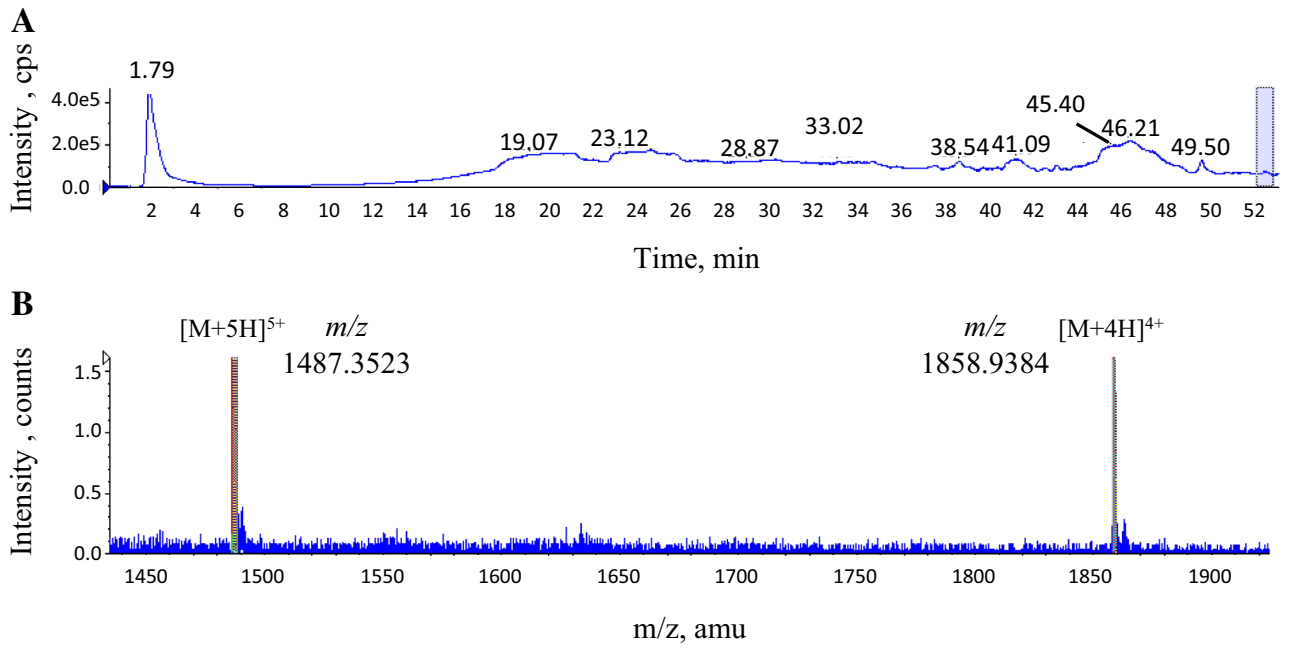


Fig. 5 HalC8 detection by LC-MS. **a** Chromatogram of the active C8 Sep-Pak fraction. **b** ESI-qQ-TOF spectrum of the peak indicated by a *box* on the chromatogram

encountered in *Natrinema* and *Haloterrigena* strains, although their lengths are comparable (Fig. 1 Suppl). Because *halC8* is consistently found in all tested *Natrinema* and *Haloterrigena* isolates, one could hypothesize that it is a characteristic of these two genera, and that event(s) of horizontal gene transfer may have permitted *Haloferax* and *Halobacterium* strains to acquire this trait. Possibly, duplication of the *halC8* gene and divergent evolution could have resulted in a sequence resembling *Htg. thermotolerans*2, which would subsequently have been transmitted to *Haloferax* and *Halobacterium* isolates. When sequences surrounding *halC8* were available, their analysis showed good conservation of the genetic cluster described in *Natrinema* sp. AS7092 with the presence of putative regulatory and transport genes, only in *Natrinema* and *Haloterrigena* genera, again with the exception of *Htg. thermotolerans*2 sequence (Fig. 3). Interestingly, the *Haloferax* and *Halobacterium* sequences are localized on plasmids, and elements suggesting genetic mobility can be found at the vicinity of *halC8* in *Hfx. larseni, Hfx. volcanii, Hbt. salinarum* R1 and *Hbt. salinarum* NRC-1. It is also remarkable that *Haloferax* and *Halobacterium* are the only two other genera for which other halocin genes, all localized on plasmids, have been described: halocin H4 and halocin S8 (Besse et al. 2015). In the case of *Hfx. mediterranei*, halocin redundancy has been reported: a deletion mutant of *halH4* retained the capacity to inhibit the growth of competing strains (Naor et al. 2012, 2013). Also, the presence of multiple genes encoding halocins has been reported in the genome of *Hfx. alexandrinus* (Khelaifia et al. 2016).

HalC8 was reported to contain ten cysteine residues, potentially involved in disulphide bridges (Sun et al. 2005). Mass spectrometry data obtained in this study revealed that five disulphide bridges are indeed present in the structure of HalC8 (Fig. 5) which should result in a compact structure that would explain the resistance of the peptide to harsh environmental conditions. Our multiple alignment of the HalC8 sequences (Fig. 1a) emphasizes this statement, as the localization of the ten cysteines are absolutely conserved in all the sequences but one, that of strain TuA4 (Shand and Leyva 2007). However, determination of the TuA4 sequence was performed by Edman sequencing only and could have been inaccurate, especially close to the C-terminal part of the peptide. While HalC8 is predicted to be a hydrophobic compact peptide, the HalI immunity protein is hydrophilic without any cysteine residue (Sun et al. 2005, Fig. 1b). Secondary structure patterns with some specific residues (highlighted in black, Fig. 1b) are highly conserved, including the helix-loop-helix demonstrated to be essential to immunity function, most likely through direct interaction with HalC8 (Mei et al. 2008). Interestingly, this motif is also found at equivalent locations in the N-terminal part of the HalC8-containing ORFs for *Hfx. alexandrinus, Hfx. gibonsii, Hfx. volcanii, Hfx. lucentense, Hfx. larsenii, Hbt. salinarum* GN101, and *Hbt. salinarum* NRC-1

(Fig. 1 Suppl). This would suggest that, although bearing no sequence similarity with HalI, the N-terminal part of the HalC8-containing ORFs in these strains might also assume the immunity protein function through the essential helix-loop-helix motif. Besides, the Tat signal peptide with its typical twin arginine motif is found in all *Natrinema* and *Haloterrigena* sequences (with the exceptions of *Nnm. gari* and *Natrinema* sp. J7-2, and again, of *Htg. thermotolerans*2, Fig. 1b), but also in three *Haloferax* sequences for which the HalC8 sequences form a very well supported sub-clade (Fig. 2a), *Hfx. alexandrinus, Hfx. gibonsii, Hfx. volcanii* and *Hfx. lucentense* (Fig. 1 Suppl). Interestingly, N-terminal Tat signal peptides were also detected in the precursors of halocin H4 and halocin S8 (Cheung et al. 1997; Price and Shand 2000), and the Tat pathway may be a general translocation mechanism for halocin precursors.

All these observations strongly suggest that, in different isolates, HalC8 is always produced as a precursor cleaved into the well-conserved mature C-terminal AMP and the more divergent N-terminal immunity protein. Although production of a specific immunity protein is a feature commonly observed for bacterial AMPs, HalC8 is unique in the sense that, to our knowledge, it is the only known example where the AMP and its immunity protein are carried on the same protein entity. Upon translation, the precursor would be directed to the membrane by the Tat pathway via cleavage of the N-terminal signal peptide, or by another translocation pathway in the case of sequences lacking the Tat signal peptide (e.g. *Hfx. larsenii, Hbt. salinarum* GN101, and *Hbt. salinarum* NRC-1). Production of HalC8 would be regulated both transcriptionally and post-translationally through processing of the precursor, as suggested by Sun et al. (2005). These authors showed that, in *Natrinema* sp. AS7092, *halC8* transcripts are up-regulated upon transition from exponential to stationary phase and remain abundant during stationary phase, and they suggest that proteolytic cleavage of the precursor is down-regulated during stationary phase (Sun et al. 2005). This may be a general feature of HalC8 production. In our study, for all the tested *Natrinema* and *Haloterrigena* strains, both *halC8* transcripts and antimicrobial activity against the sensitive *Hrr. chaoviator* ETD3 strain could be detected at the end of the exponential stage (Fig. 4, Fig. 2 Suppl.). While HalI but also ProC8 have been shown to have an immunity function, proteolytic cleavage is evidently essential to the regulation and release of HalC8. Identification of the protease component, which could be a membrane associated protease (Giménez et al. 2015), or be carried by the ABC transporter as previously reported for bacteriocins (Håvarstein et al. 1995; Nes et al. 1996), would certainly prove fruitful. However, no clue can be afforded by analysis of the other genes present at the *hal* locus, apart from the fact that the conserved *halU* gene is predicted to encode a transmembrane protein.

Nevertheless, at least in *Natrinema* and *Haloterrigena* genomes, some of the genes identified around *halC8* are conserved (Fig. 3). The presence of multiple ABC transport genes is intriguing, and suggests that this type of transport may be used for export of the mature halocin, cleavage of the HalC8 precursor and/or import of signaling molecules for regulation of HalC8 expression. The presence, upstream *halU* of a gene involved in competence may also be related to the function of HalC8. Pore-forming AMPs could in fact play a role in prokaryotic competence, especially if finely tuned by complex mechanisms involving both transcriptional and post-translational regulation. The fact that HalC8 is produced by all the tested *Natrinema* and *Haloterrigena* strains in monoculture, outside the context of microbial competition, and that it is regulated along the growth phase, hence depending on cell density, suggests that it may have functions other than in the microbial warfare, perhaps in signaling. Future prospects on HalC8 research will include deciphering the function of the genes surrounding *halC8* in production, regulation, processing and immunity of HalC8, and gaining insight into the exact role of this halocin in environmental conditions where the strains are challenged by biotic and abiotic constraints.

Acknowledgements Alison Besse was funded by a Grant from the Doctoral School ED 227 "Sciences de la Nature et de l'Homme" attributed by decision of the Doctoral Program Coordination Committee. This work was supported by the ATM Microorganisms of the National Museum of Natural History in Paris (France).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Albuquerque L, Taborda M, La Cono V, Yakimov M, da Costa MS (2012) *Natrinema salaciae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from the deep, hypersaline anoxic Lake Medee in the Eastern Mediterranean Sea. Syst Appl Microbiol 35:368–373. doi:10.1016/j.syapm.2012.06.005

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST—a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402

Athey T-B, Vaillancourt K, Frenette M, Fittipaldi N, Gottschalk M, Grenier D (2016) Distribution of Suicin gene clusters in *Streptococcus suis* Serotype 2 belonging to sequence types 25 and 28. Biomed Res Int 6815894. doi:10.1155/2016/6815894

Bagos PG, Nikolaou ET, Liakopoulos TD, Tsirigos KD (2010) Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. Bioinformatics 26:2811–2817. doi:10.1093/bioinformatics/btq530

Besse A, Peduzzi J, Rebuffat S, Carré-Mlouka A (2015) Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: lessons from archaeocins. Biochimie 118:344–355. doi:10.1016/j.biochi.2015.06.004

Castillo AM, Gutiérrez MC, Kamekura M, Xue Y, Ma Y, Cowan DA, Jones BE, Grant WD, Ventosa A (2006) *Natrinema ejinorense* sp. nov., isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. Int J Syst Evol Microbiol 56:2683–2687. doi:10.1099/ijs.0.64421-0

Cha IT, Lee MH, Kim B-Y Cho YJ, Kim DW, Yim KJ, Song HS, Seo MJ, Rhee JK, Choi JS, Choi HJ, Yoon C, Roh SW, Nam YD (2015) Genome sequence of the haloarchaeon *Haloterrigena jeotgali* type strain A29T isolated from salt-fermented food. Stand Genomic Sci 10:49. doi:10.1186/s40793-015-0047-4

Cheung J, Danna KJ, O'Connor EM, Price LB, Shand RF (1997) Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. J Bacteriol 179:548–551

Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC Bioinf 7:439. doi:10.1186/1471-2105-7-439

Drozdetskiy A, Cole G, Procter J, Barton GJ (2015) Jpred4: a protein secondary structure prediction server. Nucleic Acids Res 43(W1):W389–W394. doi:10.1093/nar/gkv332

Enache M, Itoh T, Fukushima T, Usami R, Dumitru L, Kamekura M (2007) Phylogenetic relationships within the familly *Halobacteriaceae* inferred from *rpoB'* gene and protein sequences. Int J Syst Evol Microbiol 57:2289–2295. doi:10.1099/ijs.0.65190-0

Gascuel O (1997) BioNJ: an improved version of the NJ algorithm bases on a simple model of sequence data. Mol Biol Evol 14:685–695

Ghanmi F, Carré-Mlouka A, Vandervennet M, Boujelben I, Frikha D, Ayadi H, Peduzzi J, Rebuffat S, Maalej S (2016) Antagonistic interactions and production of halocin antimicrobial peptides among extremely halophilic prokaryotes isolated from the solar saltern of Sfax, Tunisia. Extremophiles 20:363–374. doi:10.1007/s00792-016-0827-9

Giménez MI, Cerletti M, De Castro RE (2015) Archaeal membrane-associated proteases: insights on *Haloferax volcanii* and other haloarchaea. Front Microbiol 6:39. doi:10.3389/fmicb.2015.00039

Gupta RS, Naushad S, Baker S, Adeolu M (2015) Phylogenetic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol 65:1050–1069. doi:10.1007/s10482-016-0660-2

Gutiérrez MC, Castillo AM, Kamekura M, Ventosa A (2008) *Haloterrigena salina* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake. Int J Syst Evol Microbiol 58:2880–2884. doi:10.1099/ijs.0.2008/001602-0

Håvarstein LS, Diep DB, Nes IF (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrate concomitant with export. Mol Microbiol 16:229–240

Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nat Rev Microbiol 8:15–25. doi:10.1038/nrmicro2259

Imadalou-Idres N, Carre-Mlouka A, Vandervennet M, Yahiaoui H, Peduzzi J, Rebuffat S (2013) Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. J Life Sci 7:1057–1069

Khelaifia S, Caputo A, Djossou F, Raoult D (2016) Draft genome sequence of a human-associated isolate of *Haloferax alexandrinus* strain Arc-hr, an extremely halophilic archaea. New Microbes New Infect 15:44–45. doi:10.1016/j.nmni.2016.11.012

Kuipers A, Rink R, Moll GN (2011) Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics. In: Drider D, Rebuffat S (eds) Prokaryotic antimicrobial peptides. Springer, New York, pp 147–169

Lefort V, Desper R, Gascuel O (2015) FastMe 2.0: a comprehensive, accurate and fast distance-based phylogeny inference program. Mol Biol Evol 32:2798–2800. doi:10.1093/molbev/msv150

Li Y, Xiang H, Liu J, Zhou M, Tan H (2003) Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. Extremophiles 7:401–407. doi:10.1007/s00792-003-0335-6

McGenity TJ, Gemmell RT, Grant WD (1998) Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov. Int J Syst Bacteriol 48:1187–1196. doi:10.1099/00207713-48-4-1187

Mei SS, Li Y, Lu QH, Xiang H (2006) Cloning and analysis of genes in the halocin C8 gene cluster. Wei Sheng Wu Xue Bao 46:318–322 **(in chinese)**

Mei S, Sun C, Liu X, Lu Q, Cai L, Li Y, Xiang H (2008) The helix–loop–helix motif at the N terminus of HalI is essential for its immunity function against halocin C8. J Bacteriol 190:6501–6508. doi:10.1128/JB.00665-08

Meknaci R, Lopes P, Servy C, Le Caer JP, Andrieu JP, Hacène H, Ouazzani J (2014) Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. Extremophiles 18:1049–1055. doi:10.1007/s00792-014-0682-5

Minegishi H, Kamekura M, Itoh T, Echigo A, Usami R, Hashimoto T (2010) Further refinement of the phylogeny of *Halobacteriaceae* based on the full-lenght RNA polymerase subunit B' (*rpoB'*) gene. Int J Syst Evol Microbiol 60:2398–2408. doi:10.1099/ijs.0.017160-0

Montalvo-Rodríguez R, López-Garriga J, Vreeland RH, Oren A, Ventosa A, Kamekura M (2000) *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. Int J Syst Evol Microbiol 50(Pt 3):1065–1071. doi:10.1099/00207713-50-3-1065

Naor A, Lapierre P, Mevarech M, Papke RT, Gophna U (2012) Low species barriers in halophilic archaea and the formation of recombinant hybrids. Curr Biol 22:1444–1448. doi:10.1016/j.cub.2012.05.056

Naor A, Yair Y, Gophna U (2013) A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. Extremophiles 17:973–979. doi:10.1007/s00792-013-0579-8

Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. A Van Leew J Microb 70:113–128

Palmer T, Berks BC (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. Nat Rev Microbiol 10:483–486. doi:10.1038/nrmicro2814

Podell S, Ugalde J-A, Narasingarao P, Banfield JF, Heidelberg KB, Allen EE (2013) Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem. PLoS One 8(4):e61692. doi:10.1371/journal.pone.0061692

Price LB, Shand R (2000) Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8a. J Bacteriol 182:4951–4958

Quadri I, Hassani I-I, l'Haridon S, Chalopin M, Hacène H, Jebbar M (2016) Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. Microbiol Res 186–187:119–131. doi:10.1016/j.micres.2016.04.003

Rebuffat S (2011) Bacteriocins from Gram-negative bacteria: a classification? In: Drider D, Rebuffat S (eds), Prokaryotic antimicrobial peptides. Springer, New York, pp 55–72

Roh SW, Nam Y-D, Chang H-W, Kim KH, Sung Y, Kim MS, Oh HM, Bae JW (2009) *Haloterrigena jeotgali* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from salt-fermented food. Int J Syst Evol Microbiol 59:2359–2363. doi:10.1099/ijs.0.008243-0

Romano I, Poli A, Finore I, Huertas FJ, Gambacorta A, Pelliccione S, Nicolaus G, Lama L, Nicolaus B (2007) *Haloterrigena hispanica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Fuente de Piedra, southern Spain. Int J Syst Evol Microbiol 57:1499–1503. doi:10.1099/ijs.0.64895-0

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Saunders E, Tindall BJ, Fähnrich R, Lapidus A, Copeland A, Del Rio TG, Lucas S, Chen F, Tice H, Cheng JF, Han C, Detter JC, Bruce D, Goodwin L, Chain P, Pitluck S, Pati A, Ivanova N, Mavromatis K, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Brettin T, Rohde M, Göker M, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Klenk HP, Kyrpides NC (2010) Complete genome sequence of *Haloterrigena turkmenica* type strain ($4k^T$). Stand Genom Sci 2:107–116. doi:10.4056/sigs.681272

Shand RF, Leyva KJ (2007) Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobicins. In: Riley MA, Chavan MA (eds). Bacteriocins. Springer, Berlin, pp 93–109

Sun C, Li Y, Mei S, Lu Q, Zhou L, Xiang H (2005) A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. Mol Microbiol 57:537–549. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04705.x

Tapingkae W, Tanasupawat S, Itoh T, Parkin KL, Benjakul S, Visessanguan W, Valyasevi R (2008) *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 58:2378–2383. doi:10.1099/ijs.0.65644-0

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 122:4673–4680

Tindall BJ (2003) Taxonomic problems arising in the genera *Haloterrigena* and *Natrinema*. Int J Syst Evol Microbiol 53:1697–1698. doi:10.1099/ijs.0.02529-0

Ventosa A, Gutiérrez MC, Kamekura M, Dyall-Smith ML (1999) Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus, Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol 49:131–136

Wright AD (2006) Phylogenetic relationship within the order *Halobacteriales* inferred from 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 56:1223–1227

Xin H, Itoh T, Zhou P, Suzuki K, Kamekura M, Nakase T (2000) *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. Int J Syst Evol Microbiol 50:1297–1303. doi:10.1099/00207713-50-3-1297

Xu XW, Ren PG, Liu SJ, Wu M, Zhou PJ (2005) *Natrinema altunense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake in Altun Mountain in Xinjiang, China. Int J Syst Evol Microbiol 55:1311–1314. doi:10.1099/ijs.0.63622-0

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol 7:203–214. doi:10.1089/10665270050081478

Zvyagintseva IS, Tarasov AL (1988) Extreme halophilic bacteria from saline soils. Microbiologiya 56:839–844

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Les halocines C8 et H4, composés antimicrobiens produits par des archées de milieux hypersalins

Manon Vandervennet

Résumé

Les archées, retrouvées à l'origine dans des environnements extrêmes, sont présentes dans de très nombreux milieux tels que les eaux lacustres, les réservoirs de pétrole, les rizières, les sols, les tourbières, mais également au sein des plantes, des ciliés et chez les eucaryotes, sur la peau, dans la sphère ORL et le tube digestif de nombreuses espèces. Notre étude a porté sur les archées des milieux hypersalins. Ces milieux (naturels ou anthropiques) dont la concentration en sels est comprise entre 35 $g.L^{-1}$ (eau de mer) et 350 $g.L^{-1}$ (limite de solubilité du NaCl) sont très répandus sur notre planète. Plus particulièrement, nous avons examiné les composés antimicrobiens produits par ces archées halophiles, nommés halocines, notamment les halocines C8 et H4. L'halocine C8 (HalC8) est un peptide de 7,4 kDa purifié à partir de la souche de *Natrinema* sp. AS7092 isolée d'un lac hypersalé chinois et l'halocine H4 (HalH4) est une protéine de 34,9 kDa purifiée à partir de *Haloferax mediterranei* R4 isolée d'un marais salant espagnol. Nous avons montré dans cette étude que le gène *halC8* est présent chez les différentes espèces des genres *Natrinema* et *Haloterrigena*, mais également chez plusieurs espèces d'archées halophiles de la classe des *Halobacteria*, ainsi que chez des archées méthanogènes halophiles de la classe des *Methanomicrobia* et des archées hyperthermophiles de la classe des *Archaeoglobi* . Contrairement au gène *halC8*, le gène *halH4* n'est retrouvé que chez un nombre restreint de souches appartenant à des genres éloignés phylogénétiquement. Après purification, nous avons pu obtenir la masse exacte de HalC8 par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse et ainsi prouver que cette halocine possède 5 ponts disulfure expliquant ainsi sa très forte stabilité. Enfin, nous avons débuté l'expression des gènes *halC8* et *halH4* par PCR en temps réel. Cela permettra d'aborder par la suite l'étude de la voie de biosynthèse de ces 2 halocines et la variation d'expression des halocines en fonction des conditions environnementales (facteurs abiotiques et biotiques).

Mots-clés : archées, milieux hypersalins, organisme halophile, peptide/protéine antimicrobien, halocine.