



Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles

Alison Besse

► To cite this version:

Alison Besse. Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles. Microbiologie et Parasitologie. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2016. Français. <NNT : 2016MNHN0007>. <tel-01592394>

HAL Id: tel-01592394

<https://theses.hal.science/tel-01592394v1>

Submitted on 24 Sep 2017

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.



HAL Authorization

MUSEUM NATIONAL



D'HISTOIRE NATURELLE

Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2016

N °attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Alison Besse

Le 23 septembre 2016

**Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême :
peptides antimicrobiens d'archées halophiles**

Sous la direction de : **Madame Rebuffat Sylvie, Professeur et Madame Carré-Mlouka Alyssa, MCU**

JURY :

M. Dufour, Alain	Professeur, Laboratoire de biotechnologie et Chimie marine, Lorient (056)	Président
Mme. Rebuffat, Sylvie	Professeur, Muséum national d'histoire naturelle, Paris (075)	Directeur de Thèse
Mme. Carré-Mlouka, Alyssa	Maître de conférences, Muséum national d'histoire naturelle, Paris (075)	Co-directeur de Thèse
M. Huguet, Arnaud	Chargé de recherche, CNRS, Paris (075)	Rapporteur
M. Jebbar, Mohamed	Professeur, Laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes, Plouzane (029)	Rapporteur

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'unité « Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes », UMR7245 CNRS-MNHN au Muséum national d'Histoire naturelle de Paris.

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Mohamed Jebbar ainsi que le Docteur Arnaud Huguet, pour avoir accepté d'être rapporteurs et m'avoir fait l'honneur de lire et d'évaluer ce travail de thèse. Mes remerciements vont également au Professeur Alain Dufour pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier les Professeurs Philippe Grellier et Sylvie Rebuffat, Directeurs actuel et passé de l'unité 7245, pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de thèse pendant ces trois années et m'avoir accueillie au sein de leur unité. Je souhaite plus particulièrement remercier le Professeur Sylvie Rebuffat pour sa qualité de directrice de thèse. Un grand merci pour m'avoir confié un beau sujet de thèse, m'avoir fait confiance et pour le temps consacré à la correction de ce manuscrit.

Mes remerciements vont également au Docteur Alyssa Carré-Mlouka pour avoir suivi ces travaux de thèse, avoir écouté mes questions et pris le temps d'y répondre. Je la remercie pour le temps et l'énergie qu'elle a consacrés à faire avancer ce projet. Un grand merci également pour m'avoir permis de participer à un congrès international où les rencontres effectuées ont été enrichissantes, enthousiasmantes et m'ont permis de comprendre pourquoi j'aimais vraiment la recherche.

Je souhaite également remercier le Docteur Jean Peduzzi, pour sa présence depuis l'initiation du projet ainsi que pour sa vision et les conseils qu'il a apportés à ce travail de thèse.

Je remercie l'Ecole Doctorale 227 du MNHN, son Président Bruno de Reviers, ainsi que le service administratif, pour l'octroi de la bourse qui m'a permis de réaliser ce doctorat et leur aide administrative précieuse. Par la même occasion, je tiens à remercier Coralie Martin, Linda Kohl et Hubert Becker pour avoir été les membres de mon comité de thèse. Je les remercie pour leurs idées, conseils et critiques toujours constructives.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à ce projet de thèse. Parmi elles, le Professeur Patrick Forterre et le Docteur Morgan Gaia pour leur aide dans l'identification de virus halophiles et pour les études de microscopie électronique qu'ils ont réalisées. Je tiens également à remercier Chakib Djediat pour son aide avec les observations de microscopie électronique réalisées sur la plateforme du MNHN. Je remercie Roxanne Lestini pour nous avoir reçus une journée entière au LOB de Palaiseau afin de nous montrer avec beaucoup de précision et de patience le protocole de transformation de la souche *Haloferax volcanii*. Un grand merci à Christiane Deregnaucourt pour m'avoir laissé utiliser l'ultracentrifugeuse ainsi que pour sa disponibilité et les discussions scientifiques que nous avons eues autour de cette centrifugeuse ! Je remercie aussi Elisabeth Mouray pour sa gentillesse et pour l'aide qu'elle m'a apportée quand Christiane était absente. Je tiens également à remercier Soraya Chaouch pour le temps qu'elle m'a consacré, sa patience et sa pédagogie qui nous ont permis de comprendre le principe de q-RT-PCR. Enfin, mes remerciements les plus sincères vont à Martine Boccara pour les analyses physiques réalisées sur les nanoparticules et ses nombreuses explications sur le principe physique de l'analyse, pas toujours facile à comprendre. J'admire son enthousiasme, sa curiosité et son « originalité » scientifiques qui ont été une source d'inspiration pour moi.

J'adresse également mes remerciements aux étudiants qui ont contribué à ce travail, Dounia Hini et Déborah Barbé. Merci pour votre investissement dans le projet.

Je voudrais également remercier la Société des Amis du Muséum pour leur soutien financier qui m'a permis de réaliser une mission de terrain à Puerto Rico, valorisant ainsi mon travail de thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire MCAM que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces trois années de thèse. Chacun de vous a participé, même indirectement, à ce travail de thèse et je voudrais remercier chacun d'entre vous pour vos qualités scientifiques et humaines.

Un grand merci à Nora, Djena, Fayzath et Brice pour leur aide administrative. Je vous demande sincèrement de m'excuser pour ma consommation en tubes de colle. Au-delà des tâches qui vous sont confiées dans le cadre de votre travail, je vous remercie pour les personnes que vous êtes. Merci à Fayzath pour ta générosité, pour tous les goûters d'encouragement que tu m'as apporté. J'admire ta jolie philosophie de vie et je crois aussi qu'effectivement plus on

donne et plus on reçoit. Merci à Djena pour avoir toujours été attentive à moi et d'avoir toujours eu un mot gentil. Enfin, je remercie Brice pour avoir été à l'origine de beaucoup de mes fous-rires de ces trois dernières années, pour être toujours prêt à faire toutes les bêtises que je lui demande de faire et pour égayer la vie du laboratoire quotidiennement, ou en tous cas avoir égayé la mienne.

Je remercie chaleureusement Manon Vandervennet pour sa présence et son aide qui ont été si précieuses pendant mes trois années de thèse. Cette thèse n'aurait pas été possible sans ton soutien qui m'a redonné du courage et de la motivation dans les moments les plus difficiles. Tu as été un véritable pilier pour moi et tes conseils ont toujours été les bons. J'espère que tu ne m'oublieras pas et que tu penseras à m'envoyer un message le moment venu !

Un grand merci à Christine Bailly pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces trois années, beaucoup plus que ce que tu ne l'imagines. J'admire la dévotion que tu as pour les autres et le temps que tu consacres à arranger les choses. Je te remercie pour ta grande générosité et les efforts que tu as fait dans le seul but de me rendre heureuse. J'espère que ton enthousiasme et ta volonté de réunir les personnes resteront intacts, ce sont deux belles qualités qui font que tu es l'âme de ce laboratoire.

Je souhaite également remercier Carine Lombard, l'incarnation de la force tranquille. Merci pour ta présence, ton attention, ton soutien et tous tes conseils qui ont été d'une grande importance pour moi.

J'adresse également des remerciements sincères à Cétaise Hyacinthe. J'admire ta joie de vivre, résistante à toutes épreuves, et ta bonne humeur communicative. J'ai beaucoup appris humainement à tes côtés.

Je voudrais remercier mes copines de laboratoire, celles qui sont toujours là pour écouter une bonne blague ou pour partager une glace. Merci à Ambre, Margot et Laura pour votre soutien et pour tous les moments que l'on a partagés ensemble. Ambre et Margot, je vous souhaite un bon courage dans la poursuite de votre thèse. Je remercie également Béatrice Gaume et Anaïs Massé pour leur gentillesse et leur soutien. Les rencontrer a été un véritable plaisir.

Merci à Natacha, pour avoir été un soutien énorme pendant la rédaction de ce manuscrit et pour m'avoir aidée à gérer les problèmes calmement. J'ai beaucoup aimé partager mon

bureau avec toi, partager un bon goûter, une bonne blague, un post-it rose mais pas mon agrafeuse. Je te remercie pour tes encouragements et pour tous les moments que l'on a passés ensemble. Je tiens à te signaler que Frida Kahlo a rencontré Robin des Bois sur la plage abandonnée et lui a demandé : tu as fait ta valise ? Elle lui a répondu : Ah ça ! Ils en ont conclu qu'ils se retrouveraient samedi pour boire un verre.

Un grand merci aussi à mes homologues thésards, Agathe, Jimmy, Benjamin et Mehdi à tous les moments que nous avons passés ensemble, mais aussi à ceux moins marrants que nous avons aussi traversés ensemble ! Je vous souhaite un bon courage dans la finalisation de votre thèse. Le plus grand des mercis va à Fadoua, ma thésarde préférée qui déborde de gentillesse et de générosité. Cela a été un plaisir de partager ces trois années de thèse avec toi et un grand réconfort de partager nos échecs communs avec des archées qui ne font rien de ce qu'on leur demande de faire !

Un grand merci à Christophe Goulard pour avoir recherché notre halocine avec frénésie ! Je remercie également Alain Blond, Michel Cheminant et Alexandre Deville. Alexandre RMN, finalement, si tu devais être une station de métro tu ne serais pas la rue des boulets mais beaucoup d'autres car Anvers et contre tous, tu as su allier Arts et Métiers pour nous jouer un Bel-air qui a apporté un peu de Gaîté et a rendu ce laboratoire moins Ternes. En revanche, pour la planète, tu restes Pluton, où personne n'ose s'aventurer.

Un grand merci à Arlette, pour son soutien au quotidien et pour m'avoir fait une place dans son bureau, ce qui m'a permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Maylis et Cléa, vous êtes les belles rencontres que l'on fait au hasard de la vie professionnelle et qui deviennent des personnes qui comptent dans notre vie personnelle. Je suis heureuse que vous fassiez désormais partie de ma vie et l'époque du MNHN me semble minuscule par rapport à ce qu'il nous reste à vivre.

Je tiens également à remercier tous les membres de ce laboratoire, Adrienne Kish, Isabelle Domart-Coulon, Séverine Zirah, Séverine Amand et Alain Paris et plus particulièrement les chefs d'équipe Marie-Lise Bourguet et Yanyan Li. Plus généralement, un grand merci à toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer et qui par un geste, un sourire, un mot, m'ont donné envie de faire de la science.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus profonds et les plus sincères à ma famille pour leur soutien tout au long de mes études.

Florent, merci d'être exactement celui que j'aurais rêvé que tu sois. Tu es la plus belle découverte de ma thèse, mieux que trois PCR qui marchent d'affilé, mieux qu'un gel de polyacrylamide qui ne fuit pas, mieux qu'un clonage qui marche du premier coup, mieux qu'une pipette qui pipette le bon volume, mieux que le prix Nobel, mieux que la science. Merci d'être là, d'être toi et de vivre avec moi une vie sans problème où il n'y a de la place que pour le bonheur.

Merci au clan Besse, auquel je suis fière d'appartenir. Je suis si heureuse d'avoir une famille aussi soudée, aussi différente des autres et aussi drôle. Simon, merci d'avoir toujours une blague à raconter, une chanson à m'apprendre, un grand huit à tester et pour nous montrer tous les jours que la vie est tellement belle quand on est heureux. Nathan, Lucien, Camille, Sylvie, Patrice, et même le petit Louis, merci de me donner la chance de vous retrouver tous les week-ends et de profiter des choses simples ensemble. Je remercie Mom pour tous ses encouragements et je pense à Pop avec qui j'aimerais tellement partager mes connaissances. Je remercie Codeu et Daniel pour leur soutien sans faille, pour être les plus beaux exemples de vie et qui font de moi quelqu'un d'heureux et libre. Je suis l'esprit fouineur du secrétaire de la grande chambre d'amis et je chéris cette découverte qui n'en égalera jamais aucune autre de ma vie scientifique.

Papa et Maman, merci d'être des parents parfaits et de nous accompagner dans chaque étape de notre vie. Merci d'avoir su nous donner des bases solides pour pouvoir tout affronter, merci de croire en moi et de me soutenir dans tout ce que j'entreprends. Je n'aurais jamais les mots pour exprimer à quel point je vous suis reconnaissante d'avoir fait de moi quelqu'un d'heureux et de simple. Un grand merci à mes sœurs, elles sont ce que j'ai de plus précieux et je ne les échangerai pour rien au monde. Papa, Maman, Indiana et Shaïna, l'amour que je vous porte est la seule chose qui est éternelle.

Table des matières

Abréviations	6
Liste des Tableaux.....	10
Liste des Figures.....	10
Introduction générale	14
Etat de l'art	18
1. Les archées	19
1.1 Historique et découverte	19
1.1.1 Mise en évidence de l'existence d'un troisième domaine.....	19
1.1.2 Place des archées dans l'arbre phylogénétique actuel.....	20
1.1.3 Place des archées dans l'apparition de la vie sur terre	23
1.2 Caractéristiques générales	24
1.2.1 Caractéristiques morphologiques	24
1.2.1.1 Forme.....	25
1.2.1.2 Paroi.....	27
1.2.1.3 Membrane.....	30
1.2.1.4 Structures extracellulaires et formation de vésicules.....	31
1.2.1.5 ADN, chromosome et chromatine	36
1.2.2 Caractéristiques moléculaires.....	36
1.2.2.1 Réplication de l'ADN	36
1.2.2.2 Transcription et traduction.....	37
1.2.2.3 Recombinaison et réparation de l'ADN	38
1.2.2.4 Méthanogénèse	38
1.3 Taxonomie des archées.....	39
1.4 Répartitions géographiques des archées	42
2. les milieux extrêmes et leur microbiote	43
2.1 Définition des milieux extrêmes.....	43
2.2 Conditions extrêmes et mécanismes d'adaptation.....	44
2.2.1 Température	44
2.2.2 pH.....	47
2.2.3 Pression	49
2.2.4 Autres conditions extrêmes	51

2.2.4.1	Radiations ionisantes	51
2.2.4.2	Métaux lourds	53
3.	Ecologie des milieux hypersalins.....	54
3.1	Définition des environnements hypersalins.....	54
3.1.1	Concentration en sels et composition ionique.....	54
3.1.2	Environnements thalassohalins	54
3.1.3	Environnements athalassohalins	56
3.2	Stratégies d'adaptation	57
3.2.1	« Salt-in » ou « high salt-in »	58
3.2.2	« Salt-out » ou « low salt-in »	60
3.3	Colonisation des environnements hypersalins.....	63
3.3.1	Classification : des halotolérants aux halophiles extrêmes	63
3.3.2	Organismes halophiles	63
3.3.3	Archées halophiles	63
3.3.4	Bactéries halophiles.....	67
3.3.5	Eucaryotes halophiles.....	68
3.3.6	Distribution des espèces en fonction de la salinité.....	70
3.3.7	Virus halophiles.....	72
3.3.8	Applications des halophiles.....	75
4.	Peptides antimicrobiens procaryotes.....	77
4.1	Bacteriocines	77
4.1.1	Ubiquité de la production de bactériocines	78
4.1.1.1	Production par les bactéries à Gram positif.....	78
4.1.1.2	Production par les bactéries à Gram négatif.....	85
4.1.2	Biosynthèse	88
4.1.2.1	Localisation des gènes	89
4.1.2.2	Organisation génétique	90
4.1.2.3	Maturation des bactériocines et sécrétion.....	92
4.1.3	Mode d'action	95
4.1.4	Mécanisme d'immunité.....	99
4.1.4.1	Protéines d'immunité.....	99
4.1.4.2	Mécanismes d'immunité.....	100
4.1.5	Rôle écologique des bactériocines	102

4.1.6	Applications	103
4.2	Archéocines	106
Matériels et méthodes		107
1.	Méthodes bactériologiques	108
1.1	Souches et plasmides	108
1.1.1	Souches.....	108
1.1.2	Plasmides.....	109
1.2	Milieux de culture.....	111
1.3	Curage du plasmide	113
1.4	Tests antimicrobiens	114
1.4.1	Préparation des échantillons à tester	114
1.4.2	Tests en milieu solide	114
1.4.3	Gel overlay	114
1.5	Induction de la production de ProC8, HalC8 et HalI par expression hétérologue ..	114
1.6	Criblage banque de mutants	115
1.6.1	Amplification de la banque	117
1.6.2	Criblage de la banque	118
2.	Méthodes de biologie moléculaire	119
2.1	Techniques utilisant de l'ADN	119
2.1.1	Purification	119
2.1.1.1	Purification des produits PCR	119
2.1.1.2	Extraction d'ADN génomique.....	119
2.1.1.3	Extraction d'ADN plasmidique	120
2.1.2	Amplification	120
2.1.2.1	PCR.....	120
2.1.3	Clonage.....	122
2.1.3.1	Préparation des inserts	122
2.1.3.2	Préparation des vecteurs	122
2.1.3.3	Ligation.....	122
2.1.3.4	Préparation de cellules compétentes.....	123
2.1.3.5	Transformation d' <i>E. coli</i> DH5 α et <i>E.coli</i> Dam ⁻	123
2.1.3.6	Transformation d' <i>Haloferax volcanii</i> H98	124
2.1.4	Séquençage.....	124

2.2	Techniques utilisant de l'ARN	125
2.2.1	Extraction d'ARN	125
2.2.2	Transcription inverse.....	126
2.2.3	q-RT-PCR.....	126
3.	Analyse <i>in silico</i> des séquences	127
3.1	Recherche de similarités de séquences.....	127
3.2	Alignements multiples.....	127
3.3	Arbres phylogénétiques	127
4.	Méthodes de Biochimie	128
4.1	Purification d'HalC8.....	128
4.1.1	Purification à partir d'une culture liquide de <i>Natrinema</i> sp. SWI6.....	128
4.1.2	Purification à partir d'une culture solide de <i>Nnm. altunense</i> JCM12890	128
4.2	Extraction des protéines.....	129
4.3	Gels d'électrophorèse	129
4.3.1	Gels d'agarose	129
4.3.2	Gels de polyacrylamide SDS-PAGE.....	129
4.3.3	Colorations des gels	130
4.3.3.1	Coloration au bleu de Coomassie	130
4.3.3.2	Coloration au nitrate d'argent.....	131
4.4	Purification des nanoparticules.....	131
5.	Méthodes d'analyse	132
5.1	Analyse physique des nanoparticules	132
5.2	Spectrométrie de masse	132
5.3	Microscopie	133
5.3.1	Coloration négative	133
5.3.1.1	Coloration à l'acide phosphotungstique	133
5.3.1.2	Fixation au tétraoxyde d'osmium.....	133
5.3.2	Inclusion dans des résines	133
5.4	Observation des échantillons	134
Chapitre 1		135
Les archéocines		
1.	Résumé.....	136
2.	Article	137

Chapitre 2.....	150
Halocine c8, un peptide antimicrobien distribué parmi quatre genres d'archées halophiles, <i>Natrinema</i> , <i>Haloterrigena</i> , <i>Haloferax</i> , <i>Halobacterium</i>	
1. Résumé.....	151
2. Article	153
3. Résultats complémentaires et discussion	190
3.1 Curage du plasmide	190
3.2 Amplification des gènes du cluster chez les souches <i>Natrinema</i> et <i>Haloterrigena</i>	194
3.3 Co-expression des gènes <i>halU</i> , <i>halR</i> et <i>halC8</i>	198
3.4 Co-régulation des gènes du cluster	199
4. Conclusion et perspectives.....	204
Chapitre 3.....	206
Interactions microbiennes dans les environnements hypersalins : peptides antimicrobiens et virus	
1. Résumé.....	207
2. Article	208
3. Résultats complémentaires et discussion	240
4. Conclusion et perspectives.....	242
Chapitre 4.....	243
Identification de la cible de l'halocine C8	
1. Introduction.....	244
2. Résultats et discussions.....	246
2.1 Détermination du spectre d'activité d'HalC8	246
2.2 Surexpression d'HalC8 chez l'hôte hétérologue <i>Haloferax volcanii</i>	249
2.2.1 Constructions génétiques.....	250
2.2.2 Induction de l'expression	252
2.3 Identification de la cible moléculaire par criblage d'une banque de mutants d' <i>Hfx. volcanii</i>	255
3. Conclusions et perspectives	262
Conclusion et perspectives générales.....	267
Références	274
Annexe	Erreur ! Signet non défini.
Résumé	303

Abréviations

°C : degré

µm : micromètre

ACN : acétonitrile

ADNg : ADN génomique

ADNc : ADN complémentaire

ADP : adénosine disphosphate

AFPs : protéines antigel (AntiFreeze Proteins)

AHL : homosérine lactones N-acétylées

ARNm : ARN messenger

ARNp : ARN polymérase

ARNr : ARN ribosomal

ATP : adénosine triphosphate

BLIS : substances inhibitrices bacteriocin-like

Br : brome

Ca : calcium

Cl : chlore

CMI : concentration minimale inhibitrice

CSPs : signatures conservées des protéines

CSIs : signatures conservées d'Indels

Dha : déhydroalanine

Dhb : déhydrobutyrine

EROs : espèces réactives de l'oxygène

ESCRT : complexe endosomal d'adressage requis pour le transport (endosomal sorting complexe required for transport)

Fe : Fer

HalC8 : halocine C8

HalH4 : halocine H4

Hbt. : *Halobacterium*

Hfx. : *Haloferax*

Hmc. : *Halomicrobium*

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

Hrr. : *Halorubrum*

Htg. : *Haloterrigena*

ICSPs : Comité international de Systématique des procaryotes

K : potassium

kb : kilobases

LAB : labionine

LACA : dernier ancêtre commun des *Archaea*

Lan : lanthionine

LARCA : dernier ancêtre commun des *Arkarya*

LC-MS : spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide

LECA : dernier ancêtre commun des *Eukarya*

LUCA : dernier ancêtre commun universel

Man-PTS : phosphotransférase du mannose

Mb : mega paire de bases

MeLan : β -méthyl lanthionine

MET : microscopie électronique à transmission

MV : vésicule membranaire

Na : sodium

NAM : N-acétylmuramique

NAT : N-acétyltalosaminuronique

NAG : N-acétylglucosamine

NHE : échangeur Na^+/H^+

nm : nanomètre

Nnm. : *Natrinema*

NRPs : peptides non produits par la voie ribosomique (non ribosomal peptides)

ORBs : séquences de reconnaissance de l'origine de réplication (origin recognition boxes)

Pa : Pascal

PAGE : électrophorèse d'un gel de polyacrilamide (polyacrilamide gel electrophoresis)

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérase en chaîne

PHTs : protéines à hystérèse thermique

q-PCR : PCR quantitative

QS : Quorum Sensing

RiPPs : peptides synthétisés par la voie ribosomique et modifiés post-traductionnellement (ribosomally synthesized et post-translationally modified peptides)

RPs : peptides produits par la voie ribosomique (ribosomally synthesized peptides)

RT-PCR : PCR après transcription inverse

SDS : sodium-dodécyle sulfate

TBP : protéine se fixant à la TATA-box

TFB : facteur de transcription B

Transporteurs ABC : transporteurs à ATP Binding Cassettes

VPs : Protéine d'adressage vacuolaire

Liste des Tableaux

Tableau 1. Tableau comparatif des caractéristiques des archées, bactéries et eucaryotes.....	p 24
Tableau 2. Conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées et organismes colonisateurs.....	p 43
Tableau 3. Solutés organiques zwitterions et non chargés les plus fréquemment utilisés lors de l'osmoadaptation de type « low salt-in ».....	p 61
Tableau 4. Classification des organismes en fonction de leur tolérance et besoin en NaCl...	p 63
Tableau 5. Principaux genres d'archées halophiles.....	p 65
Tableau 6. Virus halophiles de procaryotes.....	p 73
Tableau 7. Identification et origine des souches utilisées.....	p 108
Tableau 8. Plasmides utilisés dans cette étude.....	p 109
Tableau 9. Milieux hypersalés utilisés pour la culture de souches halophiles.....	p 112
Tableau 10. Milieux utilisés lors de la manipulation d'organismes non extrémophiles.....	p 112
Tableau 11. Antibiotiques utilisés.....	p 113
Tableau 12. Additifs utilisés.....	p 113
Tableau 13. Amorces utilisées dans les réactions de PCR.....	p 121
Tableau 14. Amorces utilisées pour le séquençage.....	p 125
Tableau 15. Composition des gels d'acrylamide de séparation et de concentration.....	p 130
Tableau 16. Etude de la répartition de la production d'HalC8 chez les souches <i>Natrinema</i> et <i>Haloterrigena</i>	p 153
Tableau 17. Etat du séquençage des génomes des espèces appartenant aux genres <i>Natrinema</i> et <i>Haloterrigena</i>	p 191
Tableau 18. Amplification par PCR des gènes <i>halU</i> , <i>halR</i> , <i>halT2</i> et <i>halT3</i> chez les <i>Natrinema</i> et <i>Haloterrigena</i>	p 196
Tableau 19. Détection du signal de fluorescence par q-RT-PCR des échantillons RT ⁺ , RT ⁻ et H ₂ O pour différents couples d'amorces s'hybridant à des gènes de ménage et au gène d'intérêt <i>halC8</i>	p 202
Tableau 20. Spectre d'activité d'HalC8 contre des eucaryotes, bactéries et archées halophiles.....	p 247

Liste des Figures

Figure 1. Représentations schématiques de l'arbre phylogénétique universel selon les deux théories de l'existence de trois ou deux domaines du vivant.....	p 22
Figure 2. Cellules d'archées <i>Methanothermus fervidus</i> en forme de bacilles.....	p 25
Figure 3. Cellules d'archées en forme de coques.....	p 25
Figure 4. Cellules d'archées <i>Haloquadratum walsbyi</i>	p 26
Figure 5. Cellules pléomorphes de <i>Ferroplasma acidiphilum</i>	p 26
Figure 6. Modèles de couche S chez les archées.....	p 27
Figure 7. Schémas de parois d'archées.....	p 28
Figure 8. Comparaison des compositions du peptidoglycane des bactéries et du pseudo-peptidoglycane des archées.....	p 29
Figure 9. Phospholipides d'une membrane cellulaire d'archée et de bactérie ou d'eucaryote.....	p 30
Figure 10. Structures extracellulaires spécifiques des archées : cannulae et hami.....	p 33
Figure 11. Vésicules membranaires de <i>S. solfataricus</i> observées par microscopie électronique à transmission.....	p 35
Figure 12. Système hypothétique de production de MVs chez les archées.....	p 35
Figure 13. Arbre phylogénétiques du règne <i>Archaeota</i> représentant les superphyla DPANN et TACK et le phylum des <i>Euryarchaeota</i>	p 41
Figure 14. Centre du réseau formé par les paires d'ions à l'interface d'un dimère de la glutamate deshydrogénase de <i>Pyrococcus furiosus</i>	p 46
Figure 15. Système de réparation de l'ADN en deux étapes chez <i>Deinococcus radiodurans</i>	p 52
Figure 16. Environnements hypersalins thalassohalins.....	p 56
Figure 17. Environnements hypersalins athalassohalins : la Mer Morte.....	p 57
Figure 18. Différents systèmes de transport d'ions chez les archées halophiles aérobies.....	p 59
Figure 19. Bactérie halophile extrême <i>Salinibacter ruber</i>	p 68
Figure 20. Diversité des micro-organismes halophiles en fonction du gradient de salinité...p	71
Figure 21. Morphologie des virus halophiles.....	p 72
Figure 22. Morphologie des virus halophiles infectant les archées.....	p 74
Figure 23. Structures des acides aminés modifiés des lantibiotiques et de la nisine.....	p 80
Figure 24. Structure de la labyrinthopeptine A2 contenant des résidus labionine.....	p 81

Figure 25. Structure de la subtilosine A.....	p 81
Figure 26. Structure primaire des bactériocines de classe IIa.....	p 82
Figure 27. Séquence en acides aminés des bactériocines de classe IIb.....	p 83
Figure 28. Structure des bactériocines de classe IIc : l'acidocine B et la carnocycline A.....	p 84
Figure 29. Microcines modifiées post-traductionnellement.....	p 87
Figure 30. Organisation génétique du cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la nisine, bactériocine de classe I.....	p 90
Figure 31. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des colicines A et E3, de groupe A et de la colicine 5 du groupe B.....	p 91
Figure 32. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des microcines B17, C7/C51 et J25.....	p 92
Figure 33. Maturation des bactériocines.....	p 93
Figure 34. Maturation des lantibiotiques : exemple de la nisine A.....	p 94
Figure 35. Paroi des bactéries à Gram négatif et Gram positif.....	p 95
Figure 36. Interaction de la nisine avec le lipide II.....	p 96
Figure 37. Mécanisme de la formation de pores dans la membrane plasmique par la nisine.....	p 97
Figure 38. Cibles des bactériocines contre les bactéries à Gram positif.....	p 98
Figure 39. Obstruction du second canal de l'ARN polymérase par la microcine J25.....	p 99
Figure 40. Cluster des gènes de biosynthèse des microcines V et 24.....	p 100
Figure 41. Mécanisme d'immunité de la nisine et de la lacticine 481.....	p 101
Figure 42. Localisation des cibles des antibiotiques et bactériocines.....	p 105
Figure 43. Carte du plasmide pGEM-T.....	p 109
Figure 44. Plasmide pTA963.....	p 110
Figure 45. Carte du plasmide pUC19.....	p 111
Figure 46. Transposon TrpA-cat-Mu utilisé pour la génération d'une banque de mutants par insertion aléatoire.....	p 115
Figure 47. Stratégie de mutagenèse utilisée pour générer une banque de mutants de la souche <i>Haloferax volcanii</i> H295.....	p 117
Figure 48. Croissance de <i>Nm. altunense</i> JCM12890 en présence de 0, 25, 50, 75, 100 et 125 mg.mL ⁻¹ d'acridine orange.....	p 192
Figure 49. Activité antimicrobienne après curage des plasmides à l'acridine orange.....	p 193

Figure 50. Localisation des amorces spécifiques des gènes <i>halU</i> , <i>halR</i> , <i>halT1</i> , <i>halT2</i> et <i>halT3</i>	p 194
Figure 51. Localisation respective de <i>halU</i> , <i>halR</i> et <i>halC8</i> chez <i>Nm. altunense</i> JCM12890.....	p 197
Figure 52. Hypothèse de la localisation de trois promoteurs pour le groupe de gènes impliqués dans la production d'HalC8, résultant en trois transcrits.....	p 198
Figure 53. Co-expression des gènes <i>halU</i> , <i>halR</i> et <i>halC8</i> chez <i>Nm. altunense</i> JCM12890.....	p 199
Figure 54. Test de spécificité des amorces s'hybridant à <i>rpl10</i>	p 203
Figure 55. Gel overlay des échantillons post-centrifugation d'une culture de <i>Nm. altunense</i> JCM12890 et post-ultracentrifugation du surnageant.....	p 241
Figure 56. Test d'activité antimicrobienne du surnageant concentré 40 fois de <i>Nm. altunense</i> JCM12890 contre les champignons halophiles <i>E. rubrum</i> LCP 6453 et <i>P. corylophilum</i> LCP 5424.....	p 248
Figure 57. Constructions génétiques pour l'expression hétérologue de ProC8, HalC8 ou HalI chez <i>Haloferax volcanii</i> H98, avec ou sans étiquette histidine.....	p 252
Figure 58. Croissance d' <i>Haloferax volcanii</i> H98 transformée avec les plasmides pTA962 et pTA963 pour l'expression de ProC8, HalC8 et HalI avec ou sans étiquette histidine.....	p 253
Figure 59. Surexpression de la protéine d'immunité après 24 heures d'induction par 0, 5, 8, 10 et 25 mM de Trp.....	p 254
Figure 60. Surexpression de la protéine d'immunité après 68 heures d'induction par 0 ou 5 mM de tryptophane.....	p 255
Figure 61. Inhibition de la croissance d' <i>Hfx. volcanii</i> H295 sur milieu solide et liquide par le surnageant de <i>Nm. altunense</i> JCM12890.....	p 257
Figure 62. Croissance de la banque de mutants d' <i>Hfx. volcanii</i> H295 en absence et en présence de surnageant de <i>Nm. altunense</i> JCM12890.....	p 258
Figure 63. Obtention de 6 colonies résistantes à l'activité du surnageant de <i>Nm. altunense</i> JCM12890.....	p 259
Figure 64. Localisation des amorces utilisées pour la vérification de la présence d'un insert et son séquençage.....	p 261

Introduction générale

Introduction générale

Les environnements réunissant des conditions physico-chimiques hostiles à la vie sont très nombreux sur la planète. Néanmoins, de tels environnements suscitent un grand intérêt de la part de la communauté scientifique car les conditions physico-chimiques présentes ainsi que les organismes colonisateurs et leurs mécanismes d'adaptation sont différents de ce qui est communément connu et étudié. Ces environnements sont une source de biomolécules aux propriétés, aux structures et aux fonctions aussi variées qu'originales ; biomolécules par ailleurs aujourd'hui exploitées dans de nombreuses applications biotechnologiques (Irwin et Baird, 2004). C'est par exemple le cas de l'enzyme *Taq*, polymérase utilisée quotidiennement dans les diagnostics et la recherche en laboratoire, initialement isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* découverte dans les sources d'eau chaude du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis en 1969 (Brock et Freeze, 1969). La *Taq* polymérase résiste à 95 °C et est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) durant laquelle l'ADN à amplifier est chauffé afin que la polymérase accède aux brins dénaturés. La résistance de la *Taq* polymérase à de fortes températures permet la réalisation de toutes les étapes de réaction dans un unique tube sans devoir ajouter d'enzyme au cours de la réaction. D'autres applications ont été développées pour ces biomolécules dont l'utilisation est encore plus large. Des enzymes lipolytiques, capables de modifier les lipides et utilisées comme supplément aux lessives, ont été identifiées chez *Sulfolobus acidophilus* et *Pyrobaculum* sp. 1860 (Shao *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2014), procaryotes isolées de sources hydrothermales. Ces enzymes sont très stables à la chaleur et actives à pH alcalin, conditions indissociables au processus de lavage.

Parmi les environnements hostiles à la vie, on rencontre les environnements hypersalins ayant une concentration en sels supérieure à celle de l'eau de mer et qui peut atteindre la saturation dans certains lacs intérieurs ou déserts. Les environnements hypersalins sont nombreux sur la surface terrestre : Mer Morte (810 km²), Grand Lac salé (4400 km²), Salar d'Uyuni (10 580 km²), nombreux marais salants, etc. Les biomolécules isolées de ces environnements pourraient avoir des applications intéressantes, notamment dans la décontamination des eaux usées hypersalées rejetées par de nombreux processus industriels comme ceux liés à l'extraction de pétrole (Lefebvre et Moletta, 2006). Parmi les biomolécules

synthétisées dans ces milieux hypersalins, se trouvent des peptides qui possèdent une activité antimicrobienne. Ils ont été identifiés il y a seulement un peu plus de 30 ans (Rodríguez-Valera *et al.*, 1982) et très peu de données sont aujourd'hui disponibles sur ces peptides antimicrobiens, dont moins d'une vingtaine ont été décrits. Les études menées sont pour la plupart assez fragmentaires et décrivent essentiellement une activité antimicrobienne, et par extension, la production d'un peptide antimicrobien, associé à une espèce donnée. Les peptides antimicrobiens décrits à ce jour dans les milieux hypersalins sont exclusivement produits par les micro-organismes appartenant au troisième domaine du vivant : les archées (Besse *et al.*, 2015).

Un grand nombre d'études ont été réalisées sur les peptides antimicrobiens produits par les bactéries. Pour ces peptides, nommés bactériocines ou microcines, les recherches sont beaucoup plus avancées et ont conduit à une classification basée sur l'organisme producteur, la structure et le mode d'action (Rea *et al.*, 2011 ; Rebuffat, 2011). Les connaissances acquises ont permis de comprendre leur mécanisme de biosynthèse de ces peptides, leur mode d'action ou encore leur structure. Ces connaissances ont permis de développer l'utilisation de ces peptides antimicrobiens dans de nombreuses applications agro-alimentaires (conservateurs) et médicales (probiotiques) (Yang *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, notre objectif au cours de ce travail de thèse a consisté à étudier les peptides antimicrobiens biosynthétisés par les archées dans les milieux hypersalins, afin de mieux comprendre leurs rôles écologiques *via* l'étude de leurs voies de biosynthèse, leurs spectres d'action ou encore leurs mécanismes d'action.

La première partie de ce manuscrit de thèse présente l'état de l'art des connaissances actuelles sur les archées, les milieux extrêmes qu'elles colonisent et plus particulièrement les environnements hypersalins. Le dernier paragraphe de cette partie expose les principales connaissances sur les peptides antimicrobiens produits par les bactéries ainsi que leurs applications actuelles.

La seconde partie de ce manuscrit présente les travaux de thèse réalisés pendant trois années et s'articule en 4 chapitres :

Le **Chapitre 1** sera un travail bibliographique de synthèse regroupant les connaissances actuelles sur les peptides antimicrobiens produits par les archées, et notamment ceux produits dans les milieux hypersalins, les halocines. Cette étude bibliographique a fait l'objet d'une publication intitulée « Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes : Lessons from archaeocins » parue dans la revue Biochimie.

Le **Chapitre 2** s'intéressera à la répartition de la biosynthèse d'une halocine : l'halocine C8, dans différents environnements hypersalins. Les résultats obtenus font l'objet d'une publication intitulée « Halocin C8 : an antimicrobial peptide widely distributed among the genera *Natrinema* et *Haloterrigena* » à soumettre dans la revue FEMS Microbiology Ecology.

Le **Chapitre 3** visera à étudier la nature de l'activité antimicrobienne associée à l'halocine C8 et une hypothèse sur la voie de biosynthèse du peptide sera avancée.

Le **Chapitre 4** regroupera les travaux réalisés dans le but d'identifier la cible de l'halocine C8 via l'étude de son spectre d'activité et la recherche de sa cible moléculaire.

Enfin, le manuscrit se terminera par un chapitre intitulé **Conclusions et perspectives** qui comportera une discussion globale des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse.

Etat de l'art

1. LES ARCHEES

1.1 Historique et découverte

Depuis l'Antiquité, les Hommes éprouvent la nécessité de classer et d'ordonner le vivant. Aristote est le premier à avoir classé les formes vivantes selon des catégories qu'il nomme minéral, végétal, animal ou encore Homme, en se basant simplement sur une observation à l'œil nu. Près de 2000 ans plus tard, en 1735, Carl von Linné fonde la nomenclature moderne « *Systema Naturae* » qui se base sur l'observation de critères de ressemblance et c'est alors qu'apparaissent les groupes hiérarchisés de règne, embranchement, classe, ordre, famille, genre et espèces, initialement pour les végétaux : ses travaux constituent les bases de la systématique moderne. La découverte et l'étude des organismes unicellulaires n'a été possible qu'avec l'invention du microscope au 16^{ème} siècle. C'est ainsi que van Leeuwenhoek, un siècle plus tard, décrit la première bactérie par une simple description visuelle. Ce n'est que l'invention du microscope électronique, presque 4 siècles plus tard, qui a permis de mettre en évidence l'ultrastructure cellulaire et donc de diviser le vivant en deux règnes, procaryotes et eucaryotes, en se basant sur la compartimentation interne des cellules. La définition d'eucaryote et de procaryote est ainsi établie par Stanier, Doudoroff et Aldeberg en 1963 (Stanier *et al.*, 1963).

1.1.1 Mise en évidence de l'existence d'un troisième domaine

Le 10 août 1977, Carl Woese, George Fox et leurs collègues de l'université de l'Illinois aux Etats-Unis soumettent un article au journal *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS) dans lequel ils révèlent, en se basant sur la comparaison des séquences codants les ARN codant la petite sous-unité ribosomale 16S, que les organismes considérés jusqu'alors comme des bactéries appartiennent en fait à deux groupes distincts (Fox *et al.*, 1977). Un des groupes rassemble les organismes appelés méthanogènes et l'autre groupe, les organismes restants qui sont appelés bactéries. En effet, Woese et son équipe se sont rendus compte que les méthanogènes n'étaient pas plus affiliés aux bactéries qu'ils ne le sont aux humains ou aux chênes par exemple. En effet, bien que les méthanogènes avaient une morphologie comparable à celle des bactéries, ils présentaient des caractères qui leur étaient propres.

La découverte et la classification des archées dans un domaine spécifique fut la première révolution apportée par l'approche moléculaire, basée sur la comparaison des séquences des ARN codant la petite sous-unité ribosomale (Woese *et al.*, 1975). Une semaine après la soumission de leur premier article, Fox et Woese en soumettent un deuxième au même journal qui apparaît comme une extension de la première soumission et fait l'objet d'une classification des organismes en trois domaines, toujours basée sur la séquence des ARN ribosomaux : (i) les vraies bactéries ou eubactéries, (ii) les archées que Fox et Woese avaient initialement nommées archéobactéries, incluant comme chefs de file les méthanogènes, et enfin (iii) les eucaryotes incluant les plantes, champignons, animaux mammifères ou non, et beaucoup d'autres organismes ayant un noyau (Woese et Fox, 1977). C'est ainsi que naissent les trois domaines du vivant et que les termes procaryotes et bactéries ne sont plus interchangeables, car les archées sont également des procaryotes puisque ce sont des cellules dont le noyau n'est pas délimité par une membrane.

1.1.2 Place des archées dans l'arbre phylogénétique actuel

Les relations évolutives entre les trois domaines de la vie sont illustrées par des arbres phylogénétiques qui étaient construits jusqu'à la fin des années 1990 sur la base de la comparaison des séquences des ARNr. Ils combinent aujourd'hui plusieurs techniques de phylogénie, biologie moléculaire, biochimie... Les organismes de ces arbres divergent du dernier ancêtre commun universel (LUCA) à partir duquel les trois grands domaines actuels du vivant ont émergé. En 1984, James Lake proposa un arbre universel dans lequel les eucaryotes seraient en fait un groupe frère d'un sous-groupe du phylum des archées qu'il désigne Eocytes (Lake *et al.*, 1984). La plupart des phylogénéticiens sont favorables à une nouvelle version d'arbre « Eocyte » dans lequel les eucaryotes émergeraient du règne des archées. Récemment en 2015, P. Forterre propose le nom *Arkarya* pour le clade regroupant les archées et les eucaryotes (Forterre, 2015). Aujourd'hui, les arbres phylogénétiques dans lesquels les eucaryotes émergent du domaine des archées sont souvent considérés comme des arbres à deux domaines par opposition à l'arbre à trois domaines proposé par Carl Woese en 1990 (Gribaldo *et al.*, 2010 ; Woese *et al.*, 1990). L'origine des eucaryotes et leurs relations évolutives avec les archées restent une question biologique majeure, largement débattue au sein de la communauté scientifique. En 2015, P. Forterre construit des arbres phylogénétiques, validés par des analyses

phylogénétiques robustes, illustrant les différentes théories (Forterre, 2015). Les arbres, construits à partir de l'arbre phylogénétique proposé par Woese en 1990, montrent LUCA (ancêtre commun des trois domaines du vivant) ainsi que LARCA (ancêtre commun des archées et eucaryotes) (Figure 1). Le second arbre, modifié selon l'hypothèse « Eocyte » ne comprend plus d'ancêtre commun pour le règne des archées (LACA). Selon cette théorie, le taxon *Archaea* ne serait plus un taxon valide puisqu'il est paraphylétique, c'est-à-dire que LACA serait un ancêtre commun aux eucaryotes et aux archées. Des travaux complémentaires devront être réalisés afin de valider l'un des deux modèles évolutifs proposés et d'affirmer avec certitude l'existence de deux ou trois domaines du vivant.

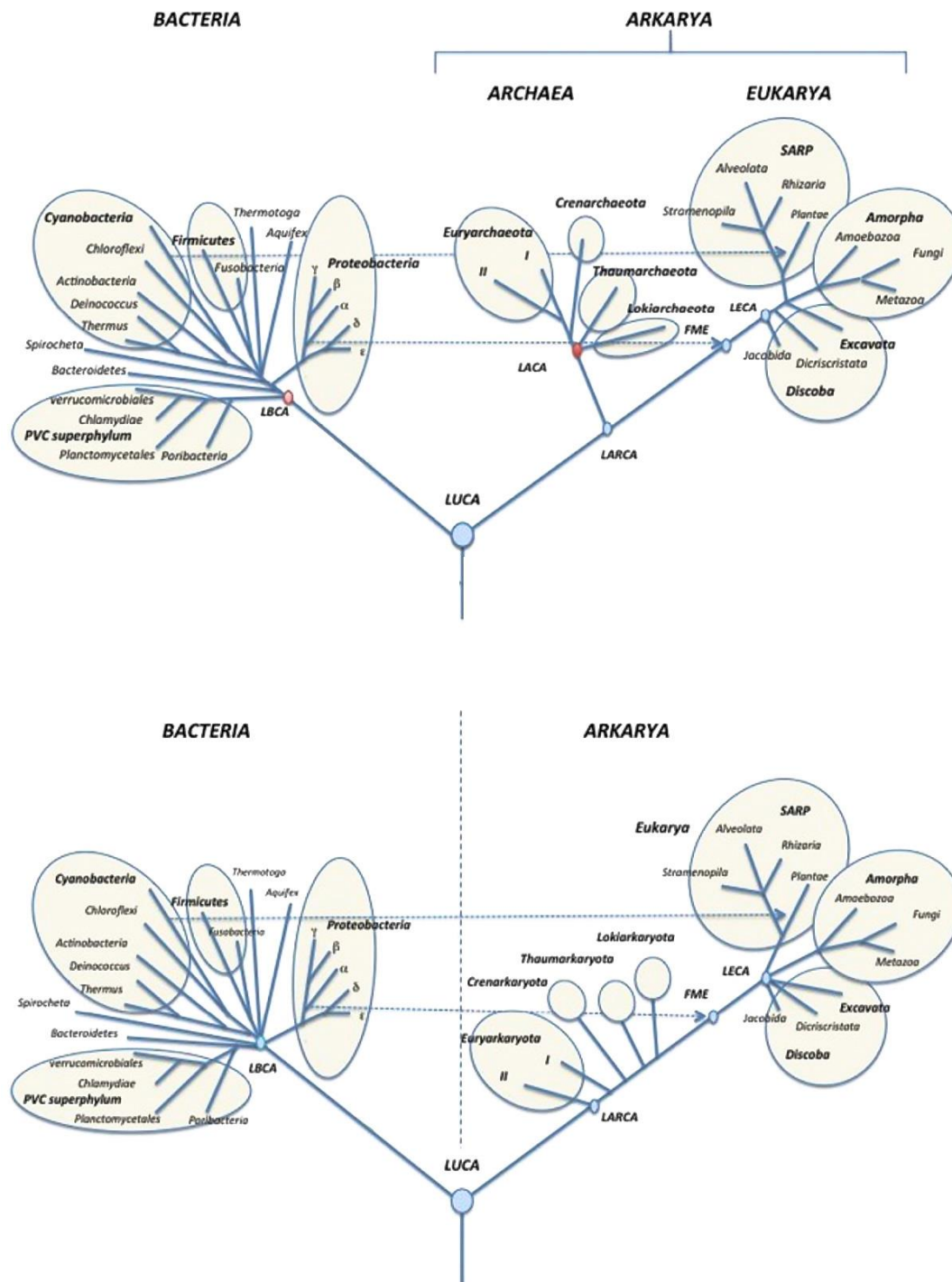


Figure 1. Représentations schématiques de l'arbre phylogénétique universel selon les deux théories de l'existence de trois ou deux domaines du vivant.

Les arbres sont construits à partir de (Woese *et al.*, 1990) et sont une version simplifiée présentant seulement les groupes les plus importants. En haut : l'arbre représentant les trois domaines du vivant. En bas : l'arbre basé sur l'hypothèse Eocyte selon laquelle deux domaines du vivant existent. LBCA : dernier ancêtre commun des *Bacteria*. LACA : dernier ancêtre commun des *Archaea*. LARCA : dernier ancêtre commun des *Arkarya*. LECA : dernier ancêtre commun des *Eukarya*. FME : première mitochondrie eucaryote. SARP : *Stramenophila*, *Alveolata*, *Rhizobia*, *Plantae* (Forterre, 2015).

1.1.3 Place des archées dans l'apparition de la vie sur terre

L'étude de l'origine de la vie et la recherche de la première trace d'une forme vivante reste une éternelle interrogation suscitant un intérêt constant auprès de la communauté scientifique. L'âge de la terre est estimé à 4,5 milliards d'années mais à son origine, la température de sa couche externe empêchait toute forme de vie. Durant son premier milliard d'années d'existence, la croûte terrestre se refroidit et les océans commencent à se former. La première forme de vie, composée à partir de molécules simples, est apparue dans les océans vers 3,5 à 3,8 milliards d'années. Les extrémophiles, organismes capables de se développer dans des conditions extrêmes, sont de bons candidats en tant que premiers êtres vivants, car ils sont capables de se développer dans les conditions présentes à l'origine de la vie, notamment à de très hautes températures. A cette période, l'oxygène étant absent sur Terre, les ancêtres de la vie étaient très certainement des organismes anaérobies puisque l'apparition de l'oxygène produit par la photosynthèse réalisée par les cyanobactéries est apparue il y a 3 milliards d'années.

Des études basées sur le rapport isotopique de différents métabolites, sur des traces microfossiles ou sur l'utilisation de biomarqueurs, ont permis de découvrir des traces de vie microbienne datant de seulement 2,5 milliards d'années et correspondant à l'ère de l'Archéen (Gribaldo et Brochier-Armanet, 2006). En effet, les biomarqueurs bactériens les plus anciens sont les hopanes et les stéranes, composants de la membrane bactérienne, qui datent de 2,7 milliards d'années (Brocks *et al.*, 1999 ; Summons, 1999). Pour les fossiles archéens, les seuls biomarqueurs disponibles sont les isoprénoïdes, molécules à longues chaînes carbonées qui composent leurs membranes. Ils ont permis de dater l'apparition des archées à 1,6 milliards d'années seulement (Gribaldo et Brochier-Armanet, 2006). Des archées halophiles, comme *Halococcus salifodinae*, ont été isolées à partir de roches salines datant du Permien, soit 225-280 millions d'années (Denner *et al.*, 1994) (Stan-Lotter *et al.*, 2002). Récemment, le génome complet d'une archée, *Halobacterium hubeiense*, a été séquencé à partir d'halite provenant d'une dépression située à 200 mètres de profondeur en Chine et estimée vieille de 123 millions d'années (Jaakkola *et al.*, 2016).

1.2 Caractéristiques générales

Les archées possèdent des caractéristiques qui leur sont propres justifiant ainsi leur statut de troisième domaine du vivant, distinct des bactéries et des eucaryotes. En effet, bien qu'elles partagent de nombreux caractères morphologiques avec les bactéries, les archées ne peuvent pas leur être plus associées qu'elles ne le sont aux eucaryotes avec lesquels elles partagent de fortes similarités d'organisation et de machinerie de l'ADN. Ce paragraphe décrit les caractères morphologiques et intrinsèques propres aux archées, qui ne sont retrouvés ni chez les bactéries, ni chez les eucaryotes (Tableau 1).

Caractéristique		Domaine du vivant		
		Archées	Bactéries	Eucaryotes
Morphologie	Noyau	Non	Non	Oui
	Organites	Non	Non	Oui
	Appendices uniques	Cannula hamus bindosome		
Paroi cellulaire		Couche S	Peptidoglycane	Pas chez les animaux et les protozoaires
Membrane	Liaison glycérol-lipide	Ether	Ester	Ester
	Squelette phosphate des lipides	Glycérol-3-phosphate	Glycérol-1-phosphate	Glycérol-3-phosphate
Métabolisme	Méthanogénèse	Oui	Non	Non
	Machinerie centrale de la transcription	type eucaryote	bactérie	eucaryote
	Facteurs d'élongation de la traduction	type eucaryote	bactérie	eucaryote

Tableau 1. Tableau comparatif des caractéristiques des archées, bactéries et eucaryotes. Ce tableau présente les caractéristiques observées dans la majorité des cas (Cavicchioli, 2011).

1.2.1 Caractéristiques morphologiques

Les archées sont des êtres unicellulaires dont la taille varie entre 0,1 et 15 μm . En tant que procaryotes, elles se distinguent des eucaryotes par une architecture plus simple et l'absence de membrane délimitant les compartiments internes.

1.2.1.1 Forme

Les cellules d'archées ont des formes très variées. Certaines ont des formes typiques rondes (coques) ou en batonnets (bacilles), comparables à celles que l'on observe chez les bactéries (Figure 2 et 3).

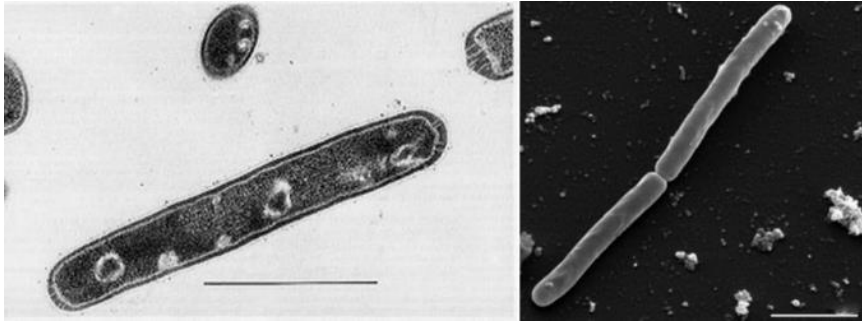


Figure 2. Cellules d'archées *Methanothermus fervidus* en forme de bacilles.

A gauche : coupe ultrafine de cellule observée en microscopie électronique à transmission (Stetter, 2001) (barre d'échelle 1 μm). A droite : observation en microscopie électronique à balayage de deux cellules (Anderson *et al.*, 2010) (barre d'échelle 1 μm).

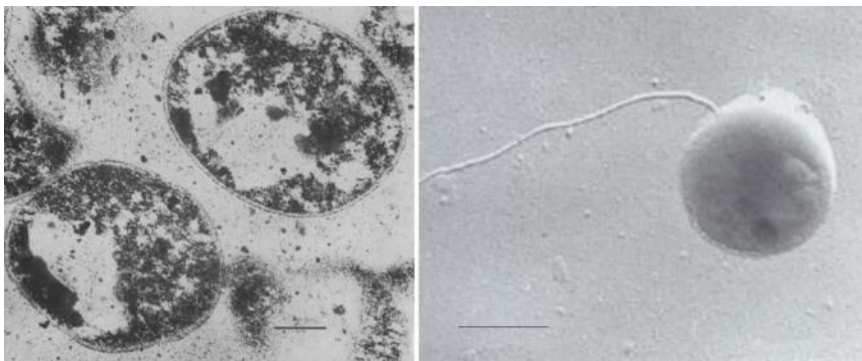


Figure 3. Cellules d'archées en forme de coques.

A gauche : coupe ultrafine de cellule de *Metallosphaera sedula* observée en microscopie électronique à transmission (barre d'échelle 0,2 μm) (Huber *et al.*, 1989). A droite : observation en microscopie électronique à balayage d'une cellule de *Sulfolobus acidocaldarius* avec un flagelle (barre d'échelle 1 μm) (Dworkin *et al.*, 2006).

D'autres archées adoptent des formes aussi originales qu'inattendues. Certaines ont une forme en disque, en spirale ou encore en filament, alors que d'autres ont des formes encore plus originales, rappelant celles de structures minéralogiques en carré ou en triangle (Figure 4). D'autres archées sont pléomorphes (Figure 5). Les facteurs importants pour la détermination de la forme cellulaire des archées sont encore incompris à ce jour, mais pourraient être liés à l'absence de paroi chez de nombreuses archées.

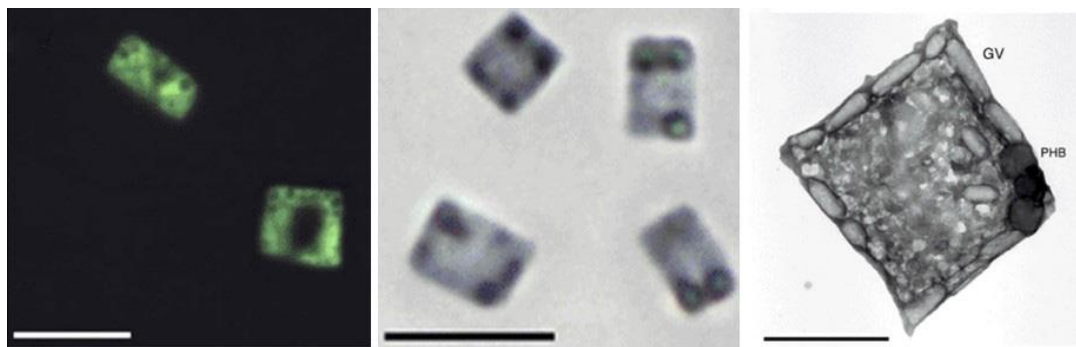


Figure 4. Cellules d'archées *Haloquadratum walsbyi*.

A gauche : observation en microscopie à épifluorescence de cellules marquées à l'acridine orange. Au milieu : observation en microscopie à contraste de phase de cellules marquées au colorant Nile Blue A. A droite : observation en microscopie électronique à transmission d'une cellule colorée à l'acétate d'uranyle 2 %. GV : vécisules de gaz, PHB : poly(3-hydroxy-butyrat). Barres d'échelle 1 μm (Burns *et al.*, 2004).

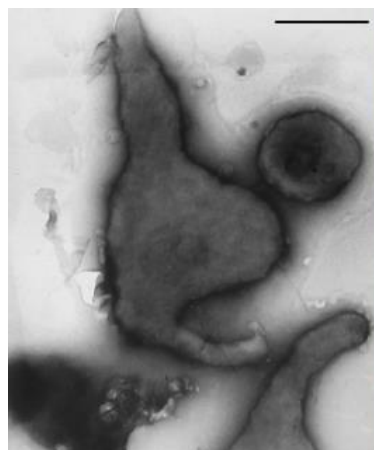


Figure 5. Cellules pléomorphes de *Ferropasma acidiphilum*.

Cliché de microscopie électronique à transmission en coloration négative (Pivovarova *et al.*, 2002) (barre d'échelle : 1 μm)

1.2.1.2 Paroi

La plupart des archées possèdent une couche protéique rigide qui entoure la cellule et qui pourrait contribuer au maintien de sa forme ou à la régulation de sa composition chimique intracellulaire. Dans la plupart des cas, cette couche externe est une couche S (couche de surface) composée de protéines et de glycoprotéines identiques. Chez les archées, la plupart des couches S sont composées d'un seul type de protéine et de glycoprotéine qui, dans beaucoup de cas, sont ancrées dans la membrane cytoplasmique. Cependant, des cas particuliers chez qui les couches S sont composées de deux protéines distinctes, SlaA et SlaB, ont été observés pour les souches *Acidianus ambivalens*, *Sulfolobus solfataricus* et *Metallosphaera sedula*, appartenant à l'ordre des *Sulfolobales* (Veith *et al.*, 2009). Les protéines de couche S forment un réseau cristallin en deux dimensions qui peut avoir une symétrie oblique, carrée ou hexagonale, en fonction de laquelle la géométrie et la taille des pores sera différente (Figure 6) (Albers et Meyer, 2011). La symétrie de type hexagonale est la plus répandue dans les couches S des archées. La plupart des couches S font entre 5 et 25 nm d'épaisseur et sont plutôt lisses sur leur surface externe, alors que leur surface interne est ondulée. Toutes les protéines de la couche S sont N- ou O-glycosylées chez les archées (Figure 6).

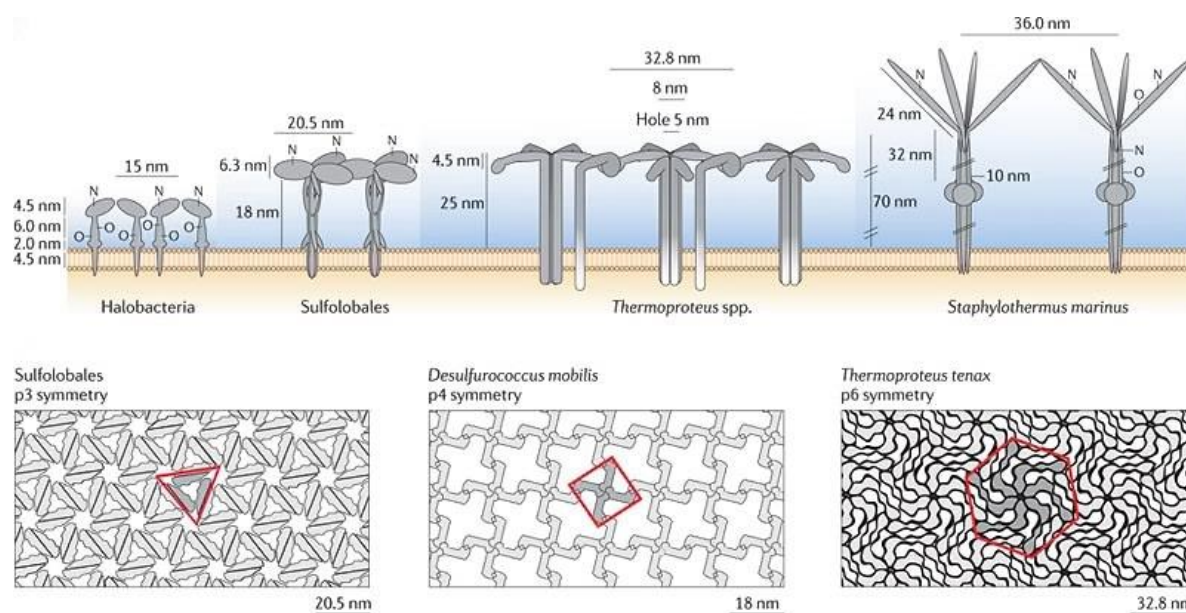


Figure 6. Modèles de couche S chez les archées.

Vue latérale (haut) et vue du dessus de l'assemblage des protéines de couches S (bas). Les couches S sont représentées en gris et les pores ou vides en blanc. Les périmètres rouges montrent une unité simple de répétition dans la structure cristalline, qui possède une symétrie oblique (symétrie p3), une symétrie carrée (symétrie p4) ou une symétrie hexagonale (symétrie p6). N : N-glycosylation ; O : O-glycosylation (Albers et Meyer, 2011).

Chez certaines archées, notamment les espèces du genre *Sulfolobus*, la couche S est le seul constituant de la paroi (Figure 7, exemple des *Sulfolobales*), alors que chez d'autres, la paroi est composée de polymères multiples en plus des protéines de couche S. Quelques archées ont une paroi constituée de polysaccharides, de méthanocondroïtine (Figure 7, exemple des *Methanosarcina*) ou de pseudomuréine (Figure 7, exemple des *Methanothermus*). La pseudomuréine (ou pseudopeptidoglycane) est un polymère d'une épaisseur de 15-20 nm qui est similaire au peptidoglycane chez les bactéries. Cependant, la liaison entre l'acide N-acétyltalosaminuronique (NAT) et la N-acétylglucosamine (NAG) est de type $\beta(1,3)$ dans le pseudopeptidoglycane des archées, alors que dans le peptidoglycane des bactéries, la N-acétylglucosamine est liée à l'acide N-acétylmuramique (NAM) par une liaison $\beta(1,4)$ (Figure 8). En outre, dans le peptidoglycane des archées, les trois acides aminés de liaison sont en configuration L, alors que chez les bactéries, on retrouve des acides aminés en configuration D.

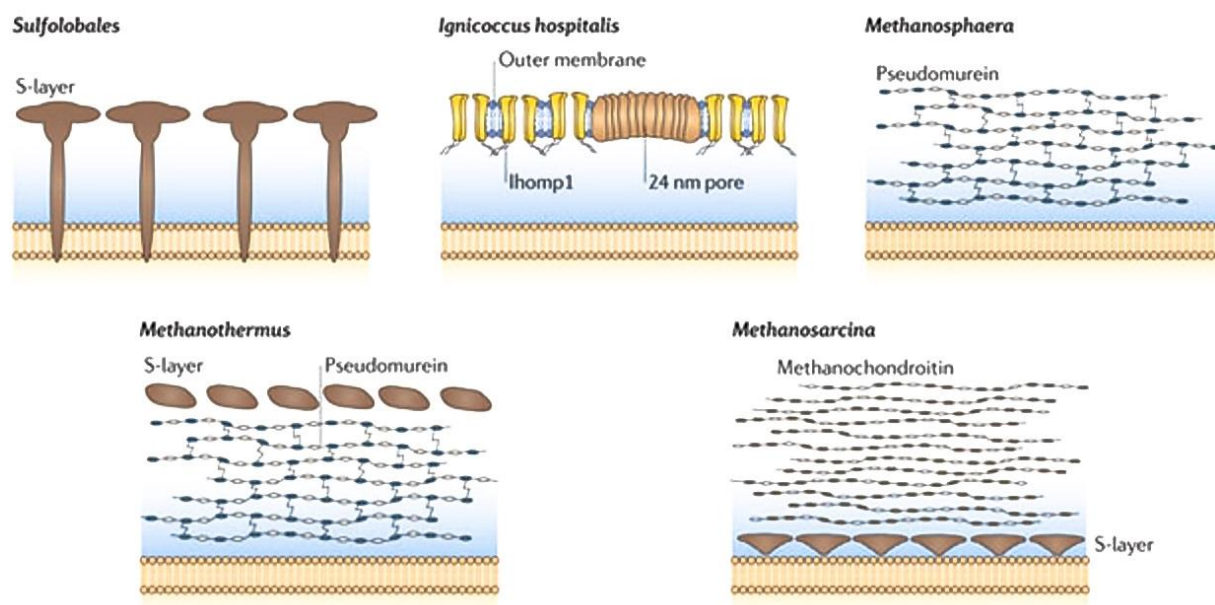


Figure 7. Schémas de parois d'archées.

Les protéines formant la couche S sont représentées en marron ; elles sont dans la plupart des cas ancrées dans la membrane. *Ignicoccus hospitalis* possède deux membranes. *Methanosphaera*, *Methanothermus*, *Methanosarcina* possèdent des polymères multiples représentés en bleu, marron et blanc. L'espace pseudopériplasmique est représenté en bleu. (Albers et Meyer, 2011).

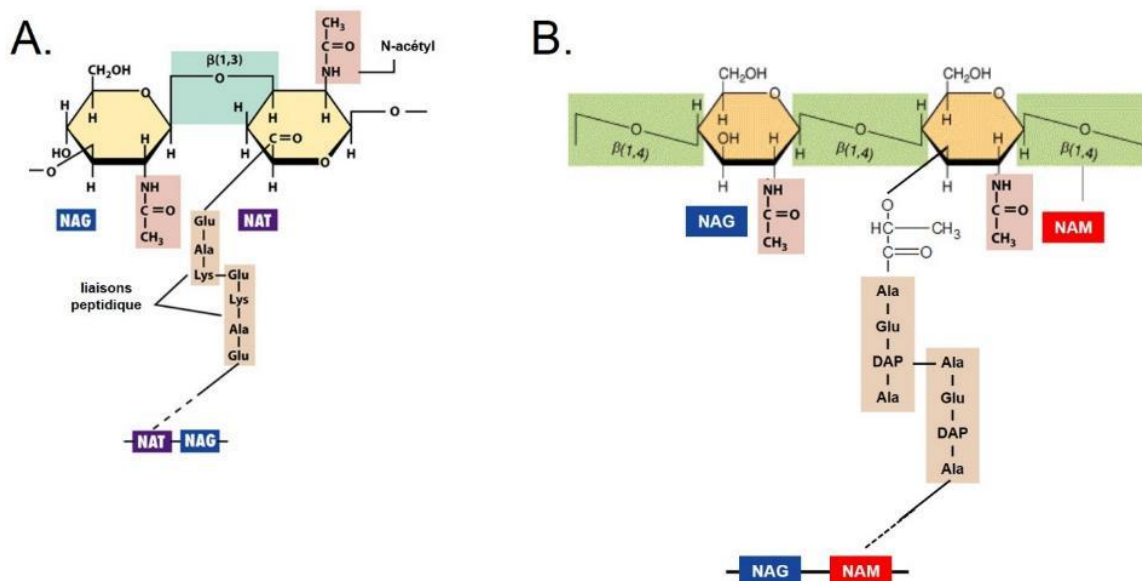


Figure 8. Comparaison des compositions du peptidoglycane des bactéries et du pseudo-peptidoglycane des archées.

A : pseudo-peptidoglycane des archées. B. peptidoglycane des bactéries. Les liaisons glucosidiques sont colorées en vert, les acides aminés en beige (DAP : acide diaminopimélique ; NAG : N-acétylglucosamine ; NAT : acide N-acétyltalosaminuronique ; NAM : acide N-acétylmuramique).

La couche S est observée presque universellement chez les archées à l'exception de quelques membres appartenant aux genres archéens *Halococcus*, *Ignicoccus*, *Natronococcus*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Thermoplasma*, et l'espèce *Thermosphaera aggregans* (Albers et Meyer, 2011). En effet, *Natronococcus occultus* a une paroi constituée exclusivement d'un polymère de glutaminylglycane, *Halococcus morrhuae* possède une paroi composée d'un hétéropolysaccharide de mannose, galactose, glucosamine, galactosamine et d'acide glucosaminuronique et les espèces appartenant au genre *Methanosphaera* possèdent une paroi exclusivement constituée de pseudomuréine (Figure 7). D'autres archées ne possèdent aucun constituant de paroi cellulaire. C'est le cas de certains membres des *Thermoplasmatales*, comme *Ferroplasma acidophilum* ou d'autres espèces du genre *Thermoplasma* qui vivent dans des environnements où le pH est très bas. Ces cellules adoptent une forme pléomorphe (Figure 5) (Segerer *et al.*, 1988) et il est donc probable que l'intégrité cellulaire soit maintenue grâce à des glycoprotéines et lipoglycane associés à la membrane, formant ainsi une couche gluante appelée glycocalyx (Albers et Meyer, 2011). Les espèces du genre *Ignicoccus* ne possèdent pas non plus de couche S mais sont les seules à posséder deux membranes (Figure 7) (Rachel *et al.*, 2002). La membrane externe est une bicouche asymétrique contenant la protéine Ihomp1, qui forme des complexes de grande taille imitant les porines (Figure 7) (Burghardt *et al.*, 2007 ; Junglas *et al.*, 2008).

1.2.1.3 Membrane

Comme les autres organismes vivants, les archées possèdent une membrane agissant comme une barrière entre la cellule et son environnement. Cependant, la membrane cellulaire des archées est fondamentalement différente de celle des bactéries et eucaryotes et constitue d'ailleurs la première différence clé sur laquelle est basée la séparation phylogénétique des domaines bactéries et archées. Il existe 4 différences fondamentales dans la membrane des archées. Comme chez les autres domaines du vivant, les constituants de base des membranes sont les phospholipides, qui sont composés d'une molécule de glycérol avec un groupement phosphate à l'une de leur extrémité et de deux chaînes latérales à l'autre extrémité (Figure 9). Chez les archées, la chiralité du glycérol est différente de celle observée chez les bactéries et les eucaryotes dont les phospholipides renferment du L-glycérol. La présence de stéréoisomères distincts implique l'intervention d'enzymes ayant des sites actifs de topologies différentes. La seconde différence réside dans la nature de la liaison entre le glycérol et les chaînes latérales. Les archées utilisent une liaison éther, alors que les bactéries et les eucaryotes utilisent une liaison ester (Figure 9). Ainsi, le phospholipide aura des propriétés chimiques différentes.

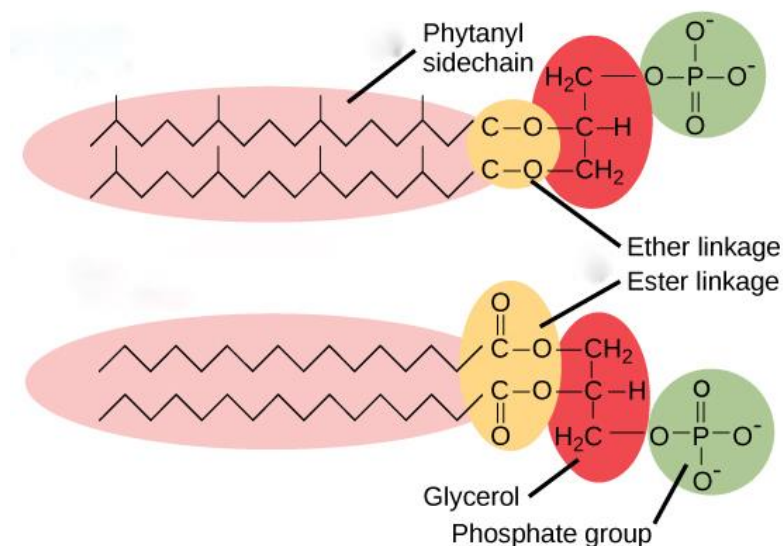


Figure 9. Phospholipides d'une membrane cellulaire d'archée (en haut) et de bactérie ou d'eucaryote (en bas).

Les groupements phosphate sont entourés en vert, les molécules de glycérol possédant une chiralité différente en rouge (L-glycérol et D-glycérol respectivement chez les archées et les bactéries), les chaînes d'acides gras en rose et les liaisons éther ou ester entre ces deux motifs en jaune.

Par ailleurs, les chaînes latérales des lipides des membranes de bactéries et eucaryotes sont des acides gras de 16 à 18 carbones. A la place, les archées ont des chaînes isopréniques de 20 carbones. Dans les membranes d'archées, on observe la formation de phospholipides transmembranaires uniques créés par la jonction de deux chaînes latérales d'isoprènes ou la jonction avec d'autres phospholipides d'un autre côté de la membrane. Ces formations pourraient être à l'origine d'une plus grande stabilité de la membrane, car elles ont été observées chez des espèces vivant à de très hautes températures et pourraient avoir un rôle de stabilisateur similaire à celui du cholestérol des membranes de cellules animales (Shinozawa *et al.*, 1979).

1.2.1.4 Structures extracellulaires et formation de vésicules

Comme il a souvent été observé chez les bactéries, les archées possèdent également des structures extracellulaires leur permettant d'être mobiles et/ou d'adhérer aux surfaces. Certaines structures, telles que les flagelles ou les pili, sont en apparence similaires à celles que l'on peut retrouver chez les bactéries mais possèdent en fait des caractéristiques spécifiques aux archées. D'autres structures comme les cannulae, les hami ou le bindosome, sont des structures extracellulaires propres aux archées et qui représentent un mode d'adaptation unique à leur environnement.

Les flagelles sont les structures de surface les mieux étudiées chez les archées. Ils sont très bien distribués parmi les archées (Thomas *et al.*, 2001). Les flagelles d'archées n'ont qu'un seul point commun avec leurs homologues bactériens, ils assurent la fonction de motilité. En effet, ils diffèrent par leurs caractéristiques biochimiques, génétiques et structurales (Albers et Jarrell, 2015). Le premier flagelle d'archée étudié fut celui d'*Halobacterium salinarum* (Alam et Oesterhelt, 1984). Contrairement aux flagelles bactériens, le flagelle d'*Hbt. salinarum*, forme une hélice à pas droit dont le sens de rotation définit la direction du mouvement et qui ne se désintègre pas lors du changement du sens de rotation (Albers et Jarrell, 2015). Les flagellines d'archées sont synthétisées sous forme de préprotéines avec un peptide signal localisé en partie N-terminale (Kalmokoff *et al.*, 1990 ; Kalmokoff et Jarrell, 1991), contrairement aux flagellines bactériennes qui utilisent un système de sécrétion de type III dédié (Chevance et Hughes, 2008). Aucun des gènes impliqués dans la biosynthèse des flagelles d'archées ne présente de similarités avec leur orthologue bactérien. L'ensemble de leurs caractéristiques si particulières

a conduit à proposer que le flagelle d'archées soit renommé « archaellum ». Les flagelles d'archées, en plus de jouer un rôle dans la motilité, pourraient également servir de « câble » reliant les cellules, peut-être pour l'échange de matériel génétique ou pour l'adhésion aux surfaces abiotiques (Näther *et al.*, 2006).

Des pili de 15 nm de diamètre ont été identifiés chez *Ignicoccus hospitalis*. Ces pili sont très fragiles et leur éventuelle implication dans l'adhésion à une surface ou à une cellule reste encore aujourd'hui à démontrer (Müller *et al.*, 2009). Chez plusieurs espèces de *Sulfolobales*, en plus du flagelle, un pilus a été décrit. Sa biosynthèse est activée en réponse à des dommages de l'ADN induits par les rayons UV. Ces pili sont indispensables à l'agrégation des cellules observée en présence d'UV et pourraient être impliqués dans la réparation de l'ADN (Fröls *et al.*, 2008).

D'autres appendices ont été exclusivement observés chez les archées. En 1983, Stetter et son équipe ont décrit la formation d'une aire plane et étroite lors de l'observation au microscope de la morphologie de différentes souches de *Pyrodicticum occultum* isolées de sources hydrothermales (Stetter *et al.*, 1983) (Figure 10, a). Cette longue fibre d'un diamètre de 25 nm et dont la longueur peut varier de 30 à 150 µm, baptisée cannula permet aux cellules filles de rester liées lors de la division cellulaire (Horn *et al.*, 1999). La présence de cannulae conduit à la formation d'un réseau de cellules et de tubules particulièrement dense (Figure 10, b). Le rôle précis de ces structures reste encore à déterminer, mais elles pourraient être impliquées dans l'échange de nutriments ou être simplement un moyen d'attachement et d'ancrage au support (Nickell *et al.*, 2003).

De longues structures filamenteuses nommées hami ont été observées sur la surface de cellules d'archées SM1. Ces archées se développent à une température de 10 °C dans des sources d'eau sulfurée (Moissl *et al.*, 2002 ; Rudolph *et al.*, 2001). Les cellules SM1 peuvent exprimer jusqu'à 100 hami à leur surface (Figure 10, c). Ces derniers ont un diamètre de 7 à 8 nm, une longueur de 1 à 3 µm et une structure hélicoïdale. Le long de chaque hamus, on retrouve des piquants à intervalles réguliers ainsi qu'une structure en forme de crochet de 60 nm de diamètre à l'extrémité distale (Figure 10, d) (Moissl *et al.*, 2005). Les hami s'attacheraient les uns aux autres et pourraient ainsi initier la formation de la communauté mixte de bactéries et d'eucaryotes présente dans ce type de milieu. Les hami sont très résistants aux variations de

température et de pH et pourraient avoir un rôle de médiateur de forte adhésion cellulaire sur des surfaces de différente composition chimique.

Le bindosome a été mis en évidence et est retrouvé chez les espèces *Sulfolobus solfataricus* et *Sulfolobus islandicus* (Albers *et al.*, 2006 ; Albers et Meyer, 2011). Chez ces deux souches, on recense un nombre très élevé de lectines excrétées grâce à un peptide signal de classe III. Ce type de peptide signal est couramment utilisé pour diriger les sous-unités du flagelle d'archées ou des pili de type IV de bactéries vers l'extérieur des cellules (Albers et Meyer, 2011). Il a été proposé que les lectines chez *S. solfataricus* s'assembleraient à une structure de surface plus ordonnée, nommée bindosome (Zolghadr *et al.*, 2007). Le bindosome, serait une partie intégrale de la couche S des cellules de *S. solfataricus* et *S. islandicus* et pourrait ainsi contribuer à leur capacité à métaboliser une plus grande quantité de glucides en augmentant leur surface cellulaire (Zolghadr *et al.*, 2011).

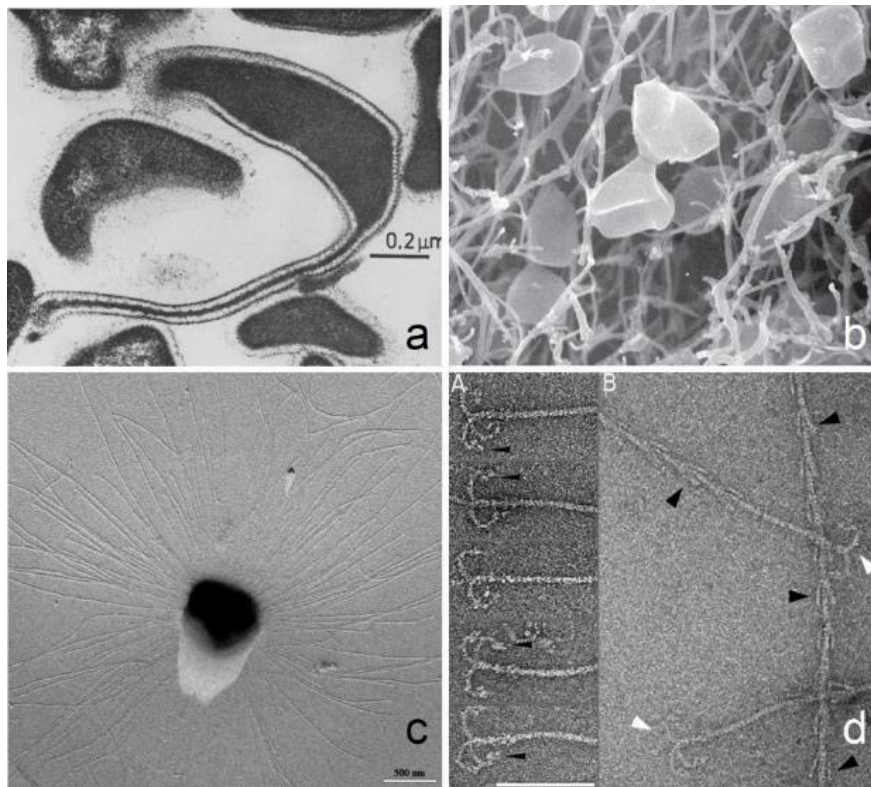


Figure 10. Structures extracellulaires spécifiques des archées : cannulae (a, b) et hami (c,d). Clichés de microscopie électronique. a : formation d'une aire plane et étroite de cannula (Stetter *et al.*, 1983) (barre d'échelle : 0,2 µm) ; b : formation d'un réseau de tubules de cannulae (Albers et Meyer, 2011) ; c : 100 hami accrochés à une cellule d'archée SM1 colorée au platine (barre d'échelle 500 nm) (Albers et Meyer, 2011) ; d : formation de crochets et d'épines le long du hamus (barre d'échelle 100 nm) (Moissl *et al.*, 2005).

La production de vésicules membranaire (MVs) est un phénomène commun aux trois règnes du vivant. Plusieurs fonctions ont été attribuées aux MVs bactériennes telles que la sécrétion de protéines et d'ADN, la communication de cellule à cellule ou encore la réponse à un stress causé par un dommage membranaire (Deatherage et Cookson, 2012). Des MVs ont été observées par microscopie électronique pour de nombreuses archées différentes, à savoir les *Euryarcheota* appartenant au genre *Thermococcales* ou l'espèce *Aciduliprofundum boonei* ou encore les *Crenarchaeota* thermophiles et acidophiles appartenant aux genres *Sulfolobus* et *Ignicoccus* (Figure 11) (Ellen *et al.*, 2009, 2010). Ces vésicules, dont le diamètre peut varier de 90 à 230 nm, sont généralement entourées d'une couche protéique, probablement formée par des protéines de couche S (Figure 11) (Ellen *et al.*, 2009). Comme chez les bactéries et les eucaryotes, les MVs d'archées dérivent de la surface cellulaire et sont libérées par constriction de cette surface. L'analyse protéomique des MVs des trois archées thermophiles *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus* et *Sulfolobus tokodaii*, réalisée par LC-MS et SDS-PAGE, a démontré la présence d'au moins deux protéines (trois pour *S. solfataricus*) homologues aux protéines du complexe eucaryote ESCRT-III (Endosomal sorting complex required for transport) ainsi que d'ATPases de la famille AAA, orthologues archéens de l'ATPase Vps4 (Vacuolar sorting protein) d'eucaryote (Ellen *et al.*, 2009 ; Makarova *et al.*, 2010). La libération des MVs d'archées est donc susceptible d'être contrôlée par un mécanisme de régulation impliquant des homologues de la machinerie de scission ESCRT-III et Vps4 présents chez les eucaryotes. Chez ces derniers, la machinerie ESCRT est impliquée dans le bourgeonnement et la libération d'endosomes ou encore dans l'étape finale de scission de la membrane à la fin de la cytokinèse, alors que Vps4 catalyse la dissociation des sous-unités formant le complexe ESCRT-III de la membrane endosomale de manière ATP-dépendante (Alonso Y Adell et Teis, 2011). Un mécanisme de libération des MVs reposant sur ces considérations a été proposé pour les archées. La formation d'un complexe ESCRT-III homologue aurait lieu au niveau de la membrane. Ce complexe formerait de longs filaments qui entoureraient le site de constriction de la membrane et induiraient la protrusion de la membrane vers l'extérieur (Figure 12). La dissociation de ce complexe protéique par des ATPases Vps4 homologues provoquerait la libération de la vésicule (Figure 12). Compte-tenu des fonctions remplies par les protéines ESCRT-III et Vps4 chez les eucaryotes, ce mécanisme proposé pour la production de MVs chez les archées apparaît fortement probable, mais l'implication des protéines homologues à ESCRT-III et Vps4 chez les archées reste à

démontrer. Il existe peu de données concernant les MVs chez les archées et les fonctions dans lesquelles elles pourraient être impliquées. Cependant, il a été montré que ces vésicules étaient capables de transporter des peptides antimicrobiens dans le milieu extracellulaire (Prangishvili *et al.*, 2000).

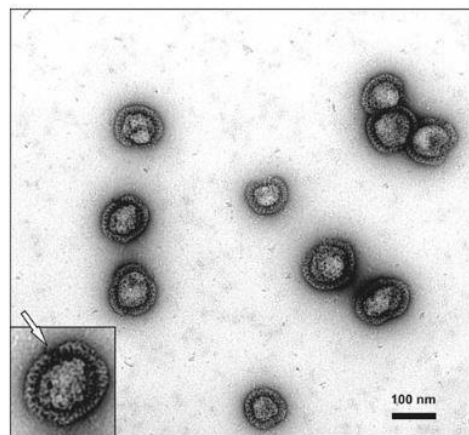


Figure 11. Vésicules membranaires de *S. solfataricus* observées par microscopie électronique à transmission.

Les vésicules membranaires ont été colorées à l'acétate d'uranyle. La flèche blanche indique la tige par laquelle la couche S est attachée à la membrane (Ellen *et al.*, 2009).

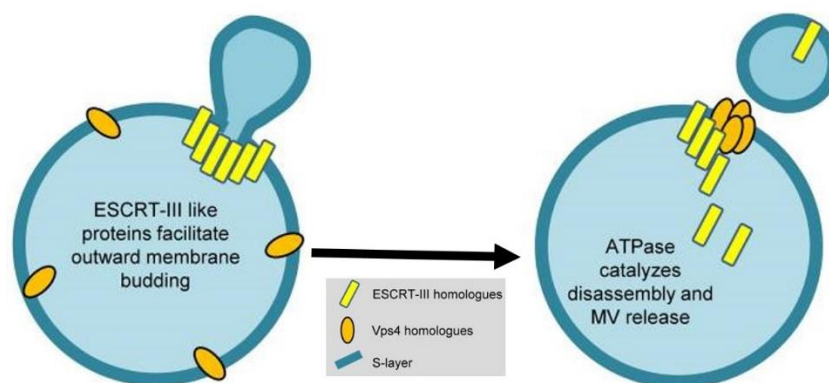


Figure 12. Système hypothétique de production de MVs chez les archées.

Le processus est facilité par une action coordonnée des protéines homologues à ESCRT-III (en jaune) et Vps4 (en orange). Les protéines ESCRT-III, connues chez les eucaryotes pour leur rôle de scission, entourent le site de formation de la MV et induisent la protrusion de la membrane vers l'extérieur. Les ATPases homologues de Vps4 catalysent ensuite le désassemblage des protéines ESCRT-III homologues, libérant ainsi la MV (Deatherage et Cookson, 2012).

1.2.1.5 ADN, chromosome et chromatine

Le plus grand génome archéen séquencé à ce jour est celui de *Methanosarcina acetivorans* avec 5,7 millions de paires de bases (Mb) et le plus petit est celui d'*Aigarchaeota archaeon* SCGC AAA471-I13 avec seulement 1,6 Mb. A l'instar des bactéries, les génomes d'archées sont généralement constitués d'un seul chromosome circulaire, et parfois de plasmides ou d'éléments extrachromosomiques. Un ou plusieurs mégaplasmines ont souvent été retrouvés chez les archées qui vivent dans des conditions d'hypersalinité. Une dizaine de ces mégaplasmines ont été séquencés et certains d'entre eux ont été nommés minichromosomes à cause de la présence de gènes importants ou essentiels. A titre d'exemple, l'organisme modèle *Halobacterium* sp. NRC-1, contient deux mégaplasmines : pNRC100 et pNRC200 respectivement de 191 et 365 kb, codant des vésicules de gaz ainsi que d'autres gènes essentiels pour l'hôte (DasSarma *et al.*, 2009).

Les génomes de tous les organismes sont compactés de façon à être confinés à l'intérieur d'une cellule ou d'un noyau, respectivement chez les procaryotes et les eucaryotes. En 1990, le laboratoire de John Reeve rapporta que l'archée méthanogène *Methanothermus fervidus* contenait un homologue d'histone d'eucaryote (Sandman *et al.*, 1990). Cette découverte surprenante réfutait l'idée jusqu'alors admise que les procaryotes n'ont pas besoin d'avoir une machinerie complexe pour la compaction de l'ADN. Les données de séquençage des génomes ont révélé que des gènes d'histones sont largement répandus dans le phylum des *Euryarchaeota*, mais absents de celui des *Crenarchaeota* (White et Bell, 2002). Les histones d'archées forment des dimères qui s'assemblent ensuite en tétramères autour desquels s'enroulent environ 60 pb d'ADN. Cependant, les histones d'archées n'ont pas de queues N- et C-terminales qui sont chez les eucaryotes, des sites de régulation des modifications post-traductionnelles, suggérant que les modifications de la chromatine ne sont pas des moyens de régulation de gènes chez les archées (Reeve, 2003).

1.2.2 Caractéristiques moléculaires

1.2.2.1 Réplication de l'ADN

Chez les archées, l'initiation de la réplication a lieu au niveau de sites spécifiques appelés ORBs pour «origin recognition boxes » qui sont constitués de deux ou plusieurs courtes

séquences d'ADN répétées et qui recrutent le complexe protéique d'initiation puis le complexe protéique d'élongation, appelé réplisome. Comme chez les eucaryotes, des origines multiples de réplication ont été observés pour un large spectre d'archées appartenant aux genres *Pyrobaculum*, *Haloferax*, *Archaeoglobus*, *Methanocaldococcus* et *Halobacterium* (Maisnier-Patin *et al.*, 2002 ; Pelve *et al.*, 2012). Néanmoins, à l'instar de ce qui est connu pour les bactéries, des cas d'origine de réplication unique existent également chez les *Euryarchaeota* (Maisnier-Patin *et al.*, 2002 ; Myllykallio *et al.*, 2000). Les fragments d'Okasaki qui se forment à partir du brin sens de l'ADN ont une longueur de l'ordre de 100 nucléotides comme c'est le cas pour les eucaryotes, alors que chez les bactéries les fragments sont 10 fois plus grands (Matsunaga *et al.*, 2003). Les protéines qui participent à l'élongation sont homologues à la machinerie des eucaryotes, à l'exception de la polymérase PolD, utilisée par les *Euryarchaeota* (Čuboňová *et al.*, 2013 ; Sarmiento *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Transcription et traduction

L'ARN polymérase (ARNp) des archées est formée d'au moins 10 sous-unités, ce qui en fait une machinerie plus complexe que chez les bactéries où l'ARNp est composée de 5 sous-unités. Les interactions protéiques entre les sous-unités D, L, N et P forment un sous-complexe homologue au sous-complexe eucaryote des ARNp I et III, formé par les sous-unités RPB3, RPB10, RPB11 et RPB13. Comme chez les eucaryotes, l'ARNp des archées est incapable de reconnaître seul les promoteurs. Deux facteurs additionnels sont au minimum requis pour une reconnaissance efficace du promoteur, les facteurs TBP (TATA-box-binding protein) et TFB (transcription factor B). Ces facteurs sont respectivement homologues au TBP et TFIIB (facteur IIB) des eucaryotes (Bell et Jackson, 2001). Bien que les machineries de base de transcription des archées et des eucaryotes possèdent de nombreux points communs, notamment au niveau des composants du cœur de l'ARNp et de l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription, des projets de séquençage des génomes d'archées ont révélé l'existence d'homologues bactériens de régulateurs de transcription (Bell et Jackson, 2000). Trois régulateurs de transcription ont été caractérisés *in vitro* : MDR1 (metal-dependent repressor 1) chez *Archaeoglobus fulgidus*, Lrs14 chez *Sulfolobus solfataricus* et LrpA chez *Pyrococcus furiosus* (Bell et Jackson, 2001). Ces trois régulateurs de transcription sont des répresseurs. MDR1 et LrpA inhibent le recrutement de l'ARNp par le complexe TBP/TFB (Bell *et al.*,

1999), alors que Lrs14 empêche la reconnaissance du promoteur par les facteurs de transcription TBP et TFB (Bell et Jackson, 2000). Ainsi, la transcription chez les archées est un mécanisme hybride intrigant qui implique un appareillage de transcription de type eucaryote et des mécanismes de régulation de type bactérien.

La traduction est un mécanisme qui a été moins étudié que la transcription chez les archées. Les composants du cœur de la machinerie de traduction, comme les ARNr, sont de nature eucaryote. Comme chez les eucaryotes, l'initiation de la traduction requiert plus de 10 facteurs d'initiation chez les archées, quand les bactéries en requièrent seulement trois (Benelli et Londei, 2011). De plus, la méthionine est le premier acide aminé ajouté à la chaîne polypeptidique chez les archées et les eucaryotes alors que les bactéries utilisent la N-formyl-méthionine. Cependant, les bactéries et archées possèdent également des caractéristiques communes : leurs ARN messagers (ARNm) sont polycistroniques et le ribosome se fixe à une séquence Shine-Dalgarno riche en purines dans la région 5' non traduite de l'ARNm (Allers et Mevarech, 2005).

1.2.2.3 Recombinaison et réparation de l'ADN

Chez les archées, la recombinaison et la réparation de l'ADN impliquent la protéine RadA, dont la séquence protéique possède plus de similarités avec celle de la protéine homologue eucaryote Rad51 que l'équivalent bactérien RecA. Des mutants de l'archée *Haloferax volcanii*, chez lesquels le gène *radA* a été muté, ont montré une déficience dans le processus de recombinaison et les souches mutées étaient très sensibles aux dommages créés par l'ADN (Woods et Dyall-Smith, 1997). La protéine Rad1, homologue archéen de la nucléase eucaryote XPF reconnaissant les régions où les ADN simple brin et double brin sont joints, pourrait fonctionner comme un autre système de réparation de l'ADN par excision.

1.2.2.4 Méthanogénèse

La méthanogénèse est la production biologique de méthane (CH₄) par les micro-organismes appelés les méthanogènes. À ce jour, tous les méthanogènes décrits sont des archées et aucune bactérie méthanogène n'a été décrite. Le caractère méthanogène de certaines archées est le second facteur, après la liaison éther des phospholipides présente dans leurs membranes

cellulaires, qui est exclusivement retrouvé chez des archées et qu'elles ne partagent ni avec les bactéries, ni avec les eucaryotes. Les archées méthanogènes, bien que très diverses, utilisent des sources de carbone restreintes et peuvent être classées selon le substrat qu'elles utilisent. On distingue les hydrogénotrophes (substrat hydrogène), les méthylotrophes (substrat méthyle) et les acétotrophes (substrat acétate) (Liu et Whitman, 2008). La plupart des méthanogènes sont hydrogénotrophes et réduisent le CO₂ en méthane en présence de H₂ comme donneur d'électrons selon la réaction : $4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$. La méthanogénèse est un processus important dans le cycle global du carbone, conduisant à la production d'environ 1,6 % du carbone fixé chaque année par les plantes et les algues (Hedderich et Whitman, 2006). Le méthane produit biologiquement peut servir de substrat aérobie, anaérobie ou encore être émis dans l'atmosphère. Le méthane émis dans l'atmosphère est un composant majeur des gaz à effet de serre et aujourd'hui, on estime que 85 % du niveau global de méthane provient du méthane biologique. L'archée anaérobie méthanogène *Methanococcus jannaschii* colonise le rumen des ruminants, avec qui elle entretient une relation symbiotique, indispensable à la survie des hôtes. L'environnement anaérobie du rumen est le lieu des réactions de la méthanogénèse qui leur permet de digérer leur alimentation végétale et fibreuse (Hook *et al.*, 2010).

1.3 Taxonomie des archées

Les archées ayant été distinguées des bactéries et considérées comme un règne à part entière il y a à peine 35 ans, leur phylogénie est en constante évolution, tant dans la découverte de nouvelles souches d'un genre, famille ou même phylum, que dans les corrections et modifications des classes déjà établies. La première étude phylogénétique basée sur la comparaison des séquences d'ARNr codant la petite sous-unité du ribosome a été réalisée en 1980. Elle a permis de séparer les premiers membres fondateurs des archées en deux taxons, l'un regroupant les espèces méthanogènes et celles vivant dans des conditions d'extrême salinité, l'autre contenant les espèces vivant à de très hautes températures et à pH acide (Fox *et al.*, 1980). Dix ans plus tard, les analyses sur un groupe taxonomique plus important ont amené à la division du règne *Archaea* en deux groupes : les *Crenarchaeota*, regroupant exclusivement des micro-organismes vivant à de très hautes températures et les *Euryarchaeota*, un groupe hétérogène d'espèces ayant des phénotypes très différents (espèces méthanogènes, espèces vivant à de très hautes températures, à des températures modérées ou à de fortes concentrations

salines) (Woese *et al.*, 1990). Cependant, 15 ans plus tard, des analyses métagénomiques ont révélé que *Candidatus Cenarchaeum symbosium* et *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*, deux souches non cultivables, possédaient des caractères génomiques appartenant aux deux phyla *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota* (Hallam *et al.*, 2006 ; Elkins *et al.*, 2008 ; Brochier-Armanet *et al.*, 2008). L'analyse génomique de ces deux espèces a amené à la création de deux nouveaux phyla, les *Thaumarchaeota*, contenant l'espèce *C. symbosium* et le phylum des *Korarchaeota*, contenant *K. cryptofilum*. L'espèce, *Nanoarchaeum equitans*, un symbionte obligatoire de l'archée *Ignicoccus hospitalis*, montrait encore plus de divergences génomiques avec les autres membres des *Crenarchaeota* et fut donc le premier membre du phyla *Nanoarchaeota*. Cependant, une étude postérieure basée sur des informations génomiques suggère que ce groupe pourrait en fait être un groupe ayant évolué depuis le phylum des *Euryarchaeota* (Brochier *et al.*, 2005). Depuis presque 10 ans, la découverte de nouvelles espèces et l'acroissement de leurs analyses phylogénétiques ont débouché sur la proposition de près de 15 nouveaux phyla. En 2011, l'espèce *Candidatus Caldiarcheum subterraneum* fut proposée comme définissant un nouveau phylum, les *Aigarchaeota* (Nunoura *et al.*, 2010). En 2013, le phylum *Parvarchaeota* fut proposé pour regrouper les genres *Candidatus Micrarchaeum* et *Candidatus Parvarchaeum* (Rinke *et al.*, 2013). Aujourd'hui, on compte plus de 15 phyla dans le règne des *Archaea*, certains d'entre eux ayant été regroupés en superphylum. On distingue le superphylum TACK, proposé en 2011 et duquel les eucaryotes auraient évolué selon la théorie de l'éocyte, regroupant les phyla *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* et *Korarchaeota* (Guy et Ettema, 2011). Ce superphylum a récemment été rejoint par des phyla récemment proposés : *Bathyarchaeota*, *Geoarchaeota* et *Lokiarchaeota* (Castelle *et al.*, 2015 ; Evans *et al.*, 2015 ; Nasir *et al.*, 2015) (Figure 13). Une autre superphylum, DPANN a été proposé en 2013 et regroupe les phyla *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota* et *Nanohaloarchaeota* (Figure 13) (Rinke *et al.*, 2013). Enfin, les phyla *Woesearchaeota* et *Pacearchaeota* décrits en 2016 ont été regroupés dans le superphylum DPANN (Ortiz-Alvarez et Casamayor, 2016).

1.4 Répartitions géographiques des archées

Les membres fondateurs du règne des *Archaea* étaient des organismes méthanogènes, ou colonisant des milieux où la concentration saline est supérieure à 2 M, la température supérieure à 80 °C, ou le pH inférieur à 2 (Chaban *et al.*, 2006). Si les premières études ont semblé limiter les archées aux environnements où les conditions sont extrêmes, l'analyse culture-indépendante des communautés microbiennes de différents environnements a permis de démontrer la présence d'archées dans de nombreux environnements aux conditions extrêmes, mais aussi non extrêmes, tels que l'eau de mer, les sédiments d'eau douce ou encore les sols (DeLong, 1998a, 1998b). Cependant, les membres du règne des *Archaea* sont particulièrement abondants dans les environnements extrêmes, hostiles à la vie, où ils sont les micro-organismes dominants. Les records de conditions extrêmes permettant la croissance de cellules vivantes sont tous détenus par des archées : 121 °C pour *Geogemma barossii* (Kashefi et Lovley, 2003), pH $\approx$ 0 pour *Picrophilus oshimae* et *Picrophilus torridus* (Schleper *et al.*, 1995), saturation en NaCl ($\approx$ 5,2 M) pour des membres des *Halobacteriales* (Oren, 2014a).

2. LES MILIEUX EXTREMES ET LEUR MICROBIOTE

2.1 Définition des milieux extrêmes

D'un point de vue anthropocentrique, la terre est largement constituée d'environnements où la température, la pression, le pH, la salinité, etc., sont extrêmes, c'est-à-dire où la survie de l'Homme se trouverait menacée (Cavicchioli *et al.*, 2011). Ces environnements sont colonisés par des organismes que l'on appelle extrêmophiles. On distingue les extrêmophiles stricts, qui requièrent des conditions extrêmes pour leur survie, leur développement et leur multiplication, et les extrêmophiles modérés ou extrêmotolérants, qui tolèrent des conditions extrêmes mais sont aussi capables de croître dans des conditions plus modérées. Une liste non exhaustive des conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées est dressée dans le tableau 2.

Paramètre environnemental	Condition optimale	Colonisateurs	
		Nom	Exemple
Température (partie 2.1.1)	Supérieure à 80 °C	Hyperthermophiles	<i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrolobus</i> , <i>Methanopyrus</i>
	Entre 50 et 80 °C	Thermophiles	<i>Thermoplasma acidophilum</i> <i>Picrophilus torridus</i>
	De 5 °C à 25 °C	Psychrotrophes (tolérants)	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	Inférieure à 15 °C	Psychrophiles	<i>Micrococcus cryophilus</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
pH (partie 2.1.2)	pH < 2	Acidophiles	<i>Picrophilus oshimae</i> <i>Picrophilus torridus</i>
	pH > 10	Alcalophiles	<i>Bacillus alcalophilus</i> <i>Natrialbales</i>
Salinité (partie 3)	2,5 M à 5 M NaCl	Halophiles	<i>Halobacteriales</i> <i>Natrialbales</i> <i>Haloferacales</i> <i>Desulfococcus abyssi</i>
Pression hydrostatique (partie 2.1.3)	0,1 MPa ou plus	Piezotolérant (tolérants)	<i>Marinitoga piezophila</i>
	> 0,1 MPa	Piezophiles	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
Éléments externes (partie 2.1.4)	Fortes concentrations en métaux lourds	Metalophiles	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
	Radiations ionisantes	Radiophiles	<i>Deinococcus radiodurans</i> <i>Deinococcus radiophilus</i> <i>Rubrobacter radiotolerans</i>

Tableau 2. Conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées et exemple d'organismes colonisateurs.

Dans la plupart des environnements, plusieurs conditions extrêmes peuvent coexister et les colonisateurs sont alors appelés poly-extrêmophiles. À titre d'exemple, l'archée *Sulfolobus acidocaldarius* colonise des lieux où se produisent des éruptions gazeuses contenant de l'acide sulfurique où le pH est de 2 et la température de 80 °C (Chen *et al.*, 2005). Les différentes espèces de bactéries appartenant au genre *Anaerobranca* sont thermophiles et alcalinotolérantes et ont été isolées d'échantillons provenant du parc national de Yellowstone (USA), d'un bras de mer chaude du lac Bogoria au Kenya, des sédiments d'un lac alcalin chaud situé sur l'île de Paoha en Californie, ou encore d'un bassin géothermal peu profond au Kamchatka en Russie (Engle *et al.*, 1995 ; Gorlenko *et al.*, 2004 ; Kevbrin *et al.*, 2008 ; Prowe et Antranikian, 2001). Les conditions extrêmes affectent la structure de tous les composants cellulaires : membranes, systèmes de transport, solutés internes, acides nucléiques et protéines. Les poly-extrêmophiles ont donc développé différents mécanismes leur permettant de s'adapter aux multiples conditions auxquelles ils doivent faire face.

2.2 Conditions extrêmes et mécanismes d'adaptation

2.2.1 Température

Des températures extrêmes sont enregistrées dans des environnements froids, où la température est inférieure à 5 °C et des environnements chauds, où la température est très élevée et peut être de plus de 100 °C. Parmi les environnements froids extrêmes, on recense les profondeurs océaniques où la température varie entre -1 et 4 °C en dessous de 1000 mètres, les zones terrestres où la température des sédiments et de l'eau marine n'excède pas -1 °C et où la glace marine peut aller jusqu'à -35 °C en hiver, ainsi que les régions alpines et les glaciers où la neige éternelle représente 20 % des sols (D'Amico *et al.*, 2002 ; Deming, 2002). Les organismes colonisant les environnements froids sont appelés psychrophiles. Ils ont un optimum de croissance de 15 °C ou moins. Les psychrotrophes, contrairement aux psychrophiles, sont des organismes capables de résister à des variations de température entre 5 et 25 °C (Irwin et Baird, 2004). Parmi les organismes psychrophiles, on recense principalement des bactéries (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* et *Bacteroides*), des champignons (*Cryptococcus* spp.), des microalgues ainsi que quelques vertébrés comme les poissons d'antarctiques de la famille des *Channichthyidae* (*Chaenocephalus aceratus*) (D'Amico *et al.*, 2006). La température limite pour la vie a été

enregistrée pour des bactéries qui colonisent des sols gelés en permanence et la glace marine où la température est de -20 °C (D'Amico *et al.*, 2006).

Il existe des environnements extrêmes où la température est très élevée. Ces environnements sont souvent retrouvés à proximité de zones volcaniques actives ou le long des fractures tectoniques (dorsales océaniques ou terrestres) et des points chauds. Les volcans, geysers, fumeroles, cheminées hydrothermales des profondeurs océaniques, ainsi que les sources d'eau chaude sont des environnements où la température peut être supérieure à 100 °C. Il existe également des zones non-volcaniques considérées comme extrêmes qui sont localisées à 3000 mètres sous la surface de la terre dans des réservoirs d'huile chauffés par géothermie. On retrouve ces réservoirs sous le plancher de la mer du Nord et sous la surface enneigée du Nord de l'Alaska (Stetter *et al.*, 1993). Les thermophiles et les hyperthermophiles colonisent les environnements où la température est respectivement élevée et très élevée, et ont un optimum de croissance supérieur à 50 °C pour les thermophiles et à 80 °C pour les hyperthermophiles (Irwin et Baird, 2004). Les thermophiles appartiennent aux trois règnes du vivant : algues et champignons (Tansey et Brock, 1972), bactéries *Bacillus* (Bae *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 1999), *Clostridium* (Rooney *et al.*, 2015 ; Wiegel *et al.*, 1981), *Thiobacillus* (Hallberg et Lindstrom, 1996), *Thermus* spp. (Mandelli *et al.*, 2015), bactéries lactiques, actinomycètes, spirochètes, etc.) et archées (*Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus*). Cependant, les organismes hyperthermophiles appartiennent exclusivement aux règnes des archées (*Sulfolobus*, *Pyrococcus*, *Pyrolobus*, *Methanopyrus*...) (Irwin et Baird, 2004). Le record de température pour la croissance est détenu par l'archée hyperthermophile *Pyrolobus fumarii*, capable de vivre à 113 °C (Cowan, 2004).

La température affecte la structure des protéines (Bischof et He, 2005 ; Scharnagl *et al.*, 2005). Les psychrophiles, thermophiles et hyperthermophiles ont donc développé des stratégies afin de maintenir la stabilité de leurs protéines et de préserver leur activité optimale sous différentes conditions. A haute température, les thermophiles et les hyperthermophiles diminuent la flexibilité de leurs protéines grâce à l'augmentation du nombre d'interactions ioniques, de liaisons hydrogène, de ponts disulfure et d'interactions hydrophobes (Reed *et al.*, 2013). A titre d'exemple, la glutamate deshydrogénase de l'archée hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* contient une séquence riche en acides aminés chargés. Ces derniers s'associent pour former des paires d'ions ancrées au niveau des régions inter-sous-unités qui

stabilisent l'enzyme (Figure 14). Lorsque que l'on compare avec la même enzyme chez un micro-organismes mésophile, ces régions riches en résidus chargés sont absentes (Yip *et al.*, 1995). La même stratégie est employée pour augmenter la stabilité des protéines de la couche S. Une étude comparant les glycoprotéines de la couche S des archées mésophiles *Methanococcus voltae*, *Methanococcus vanniellii*, de l'archée thermophile *Methanothermococcus thermolithrophicus*, et de l'archée hyperthermophile *Methanocaldococcus jannaschii* a révélé une augmentation du nombre de résidus chargés dans la composition en acides aminés des glycoprotéines des archées thermophiles et hyperthermophiles (Eichler, 2003). Une augmentation des résidus chargés pourrait contribuer à la stabilité des glycoprotéines de la couche S à haute température via des interactions coulombiennes qui augmentent les interactions électrostatiques (Claus, 2002). Aussi, grâce aux modélisations structurales, les glycoprotéines de la couche S des archées hyperthermophiles devraient contenir une plus grande proportion de structures en feuillets β que leurs homologues mésophiles. Ces structures secondaires pourraient avoir un impact sur la stabilité thermique. Enfin, alors que le nombre de cystéines dans les séquences en acides aminés des glycoprotéines de la couche S est souvent faible, les archées hyperthermophiles *Methanothermus fervidus*, *Methanothermus sociabilis* et *Methanocaldococcus jannaschii* possèdent des nombreux résidus cystéines dans la composition en acides aminés de leurs glycoprotéines. Ces cystéines sont susceptibles de former des ponts disulfure qui contribueraient à la stabilité des couches S à très hautes températures (Eichler, 2003).

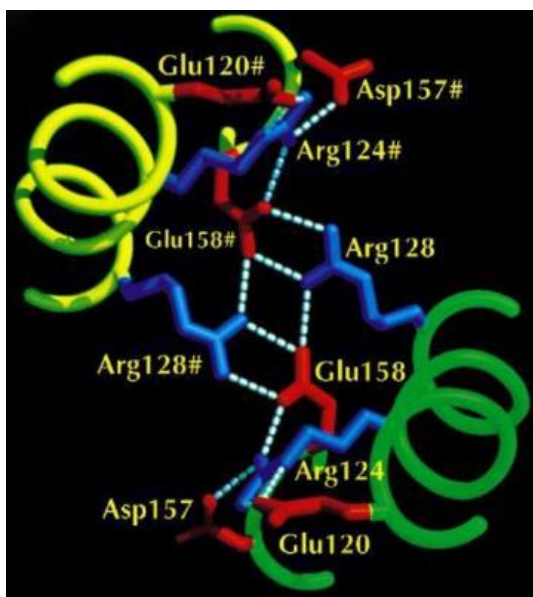


Figure 14. Centre du réseau formé par les paires d'ions à l'interface d'un dimère de la glutamate deshydrogénase de *Pyrococcus furiosus*.

La sous-unité A (jaune) et la sous-unité B (vert) sont stabilisées par des interactions entre les résidus chargés négativement (aspartate et glutamate en rouge) et les résidus chargés positivement (arginine en bleu) (Yip *et al.*, 1995).

Les psychrophiles ont eux aussi développé des stratégies pour maintenir leurs protéines fonctionnelles lorsque la température diminue. Au contraire des thermophiles, la flexibilité des structures protéiques chez les psychrophiles est augmentée grâce à l'absence presque totale d'interactions ioniques et de liaisons hydrogènes (Reed *et al.*, 2013), où encore grâce à l'existence d'une faible barrière énergétique entre les différentes conformations, *via* une faible enthalpie d'activation, une faible affinité de substrat et une forte activité spécifique (Feller, 2013 ; Siddiqui et Cavicchioli, 2006). Les psychrophiles doivent aussi se protéger de la formation d'un cristal de glace qui détruirait leurs membranes (Irwin et Baird, 2004). Ils préservent leur membrane en augmentant la proportion d'acides gras insaturés (Margesin *et al.*, 2003) et en synthétisant des molécules/protéines cryo-protectrices et antigel (Protéines antigel (AntiFreeze Proteins, AFPs)) qui modifient la structure des cristaux de glace et inhibent la recristallisation de la glace à -10 °C (Gilbert *et al.*, 2004). Ces AFPs ont été très bien décrites chez des poissons des mers Arctiques et Antarctiques, des insectes, des levures, des plantes et des champignons (Buzzini *et al.*, 2012 ; Gilbert *et al.*, 2004). Plus récemment, de telles protéines ont également été identifiées chez des procaryotes comme *Pseudomonas putida*, *Micrococcus cryophilus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Matrinomonas protea*, et une espèce du genre *Moraxella* (Gilbert *et al.*, 2004). D'autres protéines cryo-protectrices ont été identifiées, à l'instar des protéines à hystérèse thermiques (PHTs) qui abaissent la température de congélation de l'eau en se fixant à la surface d'un cristal de glace naissant (Barrett, 2001). Ces PHTs ont été retrouvées chez des vertébrés, invertébrés, plantes, champignons et des bactéries telles que *Rhodococcus erythropolis* et *Micrococcus cryophilus* (Barrett, 2001 ; Duman et Olsen, 1993).

2.2.2 pH

Les environnements alcalins, peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Dans ce dernier cas, ils sont le fruit de processus commerciaux comme la fabrication du ciment ou du papier. Les lacs et les déserts de soude sont le principal type d'environnements alcalins naturels. Ces lacs et déserts ont des pH souvent supérieurs à 11,5 et on estime que plus de 80 % du volume des eaux intérieures sont alcalines (Kaluzhnaya *et al.*, 2001). Ces lacs sont caractérisés par la présence de grandes quantités de carbonate de sodium formées par l'évaporation sous des conditions géologiques, géographiques et climatiques particulières. Bien que les environnements alcalins semblent inhospitaliers, ils sont colonisés par des organismes que l'on

appelle alcalophiles et dont la croissance nécessite un pH compris entre 10 et 11 (Irwin et Baird, 2004). Contrairement aux lacs classiques, la biomasse des lacs alcalins est dominée par le règne procaryote. On retrouve néanmoins des algues eucaryotes et des protozoaires mais les exemples où ces organismes représentent une fraction significative de la population sont rares et sont souvent observés dans les lacs les plus dilués et les moins alcalins (Horikoshi et Grant, 1998). Les lacs alcalins sont colonisés par des représentants alcalophiles des principaux groupes trophiques de bactéries et d'archées incluant les cyanobactéries, spirochètes, protéobactéries, thermotogas, archées méthanogènes (Horikoshi et Grant, 1998). C'est d'ailleurs les colonisateurs des lacs alcalins qui sont responsables des efflorescences saisonnières ou permanentes aux couleurs remarquables.

Les environnements acides sont généralement associés à des zones volcaniques, sources naturelles de dioxyde de soufre. On retrouve un pH très acide dans les lacs de cratère comme le Kawah Idjen à Java qui détient des records de taille (700 x 600 m, 200 m de profondeur moyenne) et d'acidité (pH de 0,15 en août 1999) (Löhr *et al.*, 2005). Aussi, des émanations volcaniques de soufre ont lieu au niveau des solfatares, type de fumeroles rejetant d'importantes quantités de soufre, qui servent de zones de dégazage à la lave en profondeur (Benson *et al.*, 2011). Les geysers et les lacs sulfuriques sont également une source importante d'acidité. Enfin, les eaux acides proviennent du drainage de sites miniers acides comme ceux du Rio Tinto (Espagne) où l'eau a un pH de 2,2 (García-Moyano *et al.*, 2012). Les micro-organismes qui colonisent les environnements acides sont appelés acidophiles et ont un pH optimal de croissance inférieur à 3 (Baker-Austin et Dopson, 2007). On recense des acidophiles eucaryotes, dont la majorité sont des microalgues telles que *Chlorella* spp., *Chlamydomonas acidophila*, *Ulothrix zonata* ou *Klebsormidium fluitans* (Johnson, 1998) et des acidophiles procaryotes tels que *Ferromicrobium acidophilus* (capable d'oxyder le fer), *Thiobacillus acidophilus* (capable d'oxyder le soufre) ou encore *Acidobacterium capsulatum* (Johnson et Hallberg, 2003). Les organismes les plus acidophiles, comme les archées *Picrophilus oshimae* et *Picrophilus torridus*, ont un pH optimal de croissance inférieur à 0,7 (Ciaramella *et al.*, 2005 ; Schleper *et al.*, 1995).

Pour conserver l'activité optimale de leurs protéines et leur intégrité structurale, les organismes doivent maintenir un pH cytoplasmique entre 7,4 et 7,8 (Padan *et al.*, 2005). Les acidophiles et les alcalophiles évoluant dans des milieux où le pH externe est respectivement en dessous de 1 et au-dessus de 10, ils ont développé des stratégies afin de maintenir leur pH interne proche de la neutralité. Pour les alcalophiles, l'utilisation de pompes à protons qui permettent d'augmenter la concentration intracellulaire en ions hydrogène et ainsi d'augmenter le pH interne est une stratégie répandue (Irwin et Baird, 2004). Cependant, la façon dont leurs protéines extracellulaires restent actives à des pH extrêmes est encore inconnue à ce jour. Pour les acidophiles, plusieurs mécanismes ont été observés pour maintenir un pH interne proche de la neutralité. Il existe des mécanismes actifs comme les pompes à protons qui pompent l'excès de protons à l'extérieur de la cellule, notamment observés chez *Bacillus acidocaldarius* et *Thermoplasma acidophilum* (Michels et Bakker, 1985). De plus, les acidophiles ont une capacité de tamponnage interne élevée grâce à une large gamme d'acides aminés tampon comme par exemple des acides aminés basiques (Baker-Austin et Dopson, 2007). La membrane a également un rôle essentiel dans l'adaptation des acidophiles à leur milieu, puisque la perte de leur intégrité pour des pH supérieurs à 4 est causée par une déficience de la fonction de barrière de la membrane (Ciaramella *et al.*, 2005). La membrane de certains acidophiles est composée exclusivement de lipides tétra-éther, conduisant à la formation d'une monocouche imperméable aux protons (Macalady *et al.*, 2004). D'ailleurs, la différence des pH optimaux de croissance chez les acidophiles *Ferroplasma acidarmanus* et *Ferroplasma acidiphilum* pourrait être due à une différence de perméabilité ionique, fruit de la différence des structures des têtes lipidiques (Macalady *et al.*, 2004).

2.2.3 Pression

Les environnements terrestres viables pour l'Homme où la pression atmosphérique est de 10^5 Pascal (Pa) ou moins ne représentent qu'1 % de la biosphère. Des pressions atmosphériques supérieures sont considérées comme extrêmes et sont retrouvées au fur et à mesure que l'on se rapproche du centre de la terre. Dans les océans, la pression hydrostatique augmente de 10 Mégapascal (MPa) par kilomètre dans la colonne d'eau et de 30 MPa par kilomètre sous le plancher océanique (Oger et Jebbar, 2010). En termes de volume, les environnements à forte pression représentent la plus grande partie de la biosphère puisque 70 %

de la surface terrestre est recouverte d'océans dont la profondeur moyenne est de 3800 mètres et où la pression moyenne est 380 fois supérieure à celle de la surface terrestre (Allen et Barlett, 2004). Dans les fosses océaniques, la pression hydrostatique peut atteindre 110 MPa. En plus des environnements marins profonds, des régions à fortes pressions sont retrouvées dans les lacs d'eau douce telle que le lac Baikal en Sibérie où la profondeur maximale est de 1600 mètres (Bowmaker *et al.*, 1994).

Les organismes colonisateurs des environnements à haute pression ont initialement été appelés barophiles par Zobell et Johnson (Zobell et Johnson, 1949). Pour des raisons étymologiques, le terme barophile a aujourd'hui été remplacé par celui de piézophile puisque le préfixe « *baro* » signifiait poids en grec alors que le préfixe « *piezo* » signifie pression. On appelle piézophiles les organismes qui supportent des pressions supérieures à 0,1 MPa. On distingue les hyperpiézophiles dont l'optimum de croissance est supérieur à 60 MPa. Actuellement, les organismes les plus piézophiles sont des actinomycètes affiliées aux genres *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Tsukamurella* et *Williamsia* isolés de la fosse des Mariannes à 10 898 mètre de profondeur dans l'océan Pacifique où la pression enregistrée est supérieure à 100 MPa (Pathom-Aree *et al.*, 2006). Les environnements où l'on enregistre une forte pression sont presque exclusivement associés à des températures extrêmes. Les organismes qui les colonisent sont donc pour la plupart poly-extrêmophiles et leur survie est déterminée par leur adaptation à une forte pression ainsi qu'à des températures extrêmes, comme *Marinitoga piezophila* ou plusieurs espèces du genre *Pyrococcus* (*P. kulkarnii*, *P. yayanosii*, *P. furiosus*, *P. woesei*, *P. horikoshii*, *P. abyssi*, *P. glycovorans*) qui colonisent les cheminées hydrothermales des profondeurs océaniques (Alain *et al.*, 2002 ; Callac *et al.*, 2016). Des souches de micro-organismes anaérobies et thermophiles ont également été cultivées à partir d'échantillons provenant de roches à 4000 mètres de profondeur dans le puit de forage Gravberg dans le centre de la Suède (Szewzyk *et al.*, 1994).

Les mécanismes d'adaptation des piézophiles à leur environnement ont été beaucoup moins étudiés que ceux des autres extrêmophiles. Néanmoins, il a été observé que *Photobacterium profundum* accumule des monomères et oligomères de β -hydroxybutyrate en réponse à une pression hydrostatique et que *Marinitoga piezophila* accumule des acides aminés (α -glutamate, proline et alanine) en réponse à une pression atmosphérique élevée (Jebbar *et al.*, 2015). Cependant, le rôle de ces solutés dans l'adaptation à de fortes pressions n'a pas été

investigué. Une récente analyse multi-omique de l'archée *Pyrococcus yayanosii* CH1, l'unique hyperthermophile piézophile strict décrit, a permis de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation à de fortes pressions (Michoud et Jebbar, 2016). Par comparaison avec le génome d'archées piézophiles facultatives du genre *Pyrococcus*, il a été montré que *P. yayanosii* ne possède pas les gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport de plusieurs acides aminés basiques et aromatiques, processus aux coûts énergétiques trop élevés et dont l'import pourrait être plus avantageux en situation de stress. Aussi, plusieurs gènes sont régulés en condition de stress chez *P. yayanosii* : les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique via des hydrogénases sont sous-exprimés alors que les gènes impliqués dans la chimiotaxie, la traduction ribosomale ou les gènes codant pour des ATPases transmembranaires sont surexprimés. La sur-expression de ces gènes pourraient permettre à *P. yayanosii* d'augmenter le nombre de rotations du flagelle et ainsi faciliter la recherche de nutriments, d'avoir un meilleur rendement de biosynthèse des protéines et d'augmenter ainsi l'efficacité enzymatique, ou encore de réguler le pH intracellulaire en conditions de stress (Michoud et Jebbar, 2016).

2.2.4 Autres conditions extrêmes

2.2.4.1 Radiations ionisantes

Les radiations ionisantes sont des particules ou rayonnements énergétiques ayant la capacité de transmettre leur énergie à la matière irradiée. Un rayonnement ionisant possède assez d'énergie pour créer des dommages dans la matière qu'il traverse. Les radiations affectent les cellules en abimant leurs organites et en endommageant leur ADN, directement ou indirectement via l'action des espèces réactives de l'oxygène (EROs), formées par la réaction des molécules de dioxygène avec les radiations. Ces EROs sont responsables de mutations et de cassures sur les brins d'ADN. Une faible dose d'irradiation est contrée par les mécanismes de défense et de réparation intracellulaires via la surexpression d'enzymes telles que les superoxydes dismutases, les catalases, la glutathion peroxydase ou encore la glutathion réductase qui permettent de détoxifier les EROs. Cependant, pour des expositions répétées et à fortes doses, les mécanismes ne sont plus assez efficaces et un dysfonctionnement de l'organisme pourra alors apparaître, conduisant à la mort cellulaire.

Certains procaryotes ont développé des mécanismes qui leur permettent de résister à une exposition à de très fortes doses d'irradiation. Ils sont appelés radiophiles. Les trois organismes les plus résistants à la radioactivité découverts à ce jour sont les bactéries *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus radiophilus* et *Rubrobacter radiotolerans*. La bactérie *Deinococcus radiodurans* isolée d'un réacteur nucléaire peut survivre à plus de 20 000 Gray de radiation gamma, c'est-à-dire 2000 fois la dose létale pour un homme. Ces radiations fragmentent son génome, mais un système efficace de réparation lui permet de réparer son ADN en quelques heures et de subir jusqu'à 150 cassures double brin par chromosome (Cox *et al.*, 2010). Cette réparation a lieu en deux phases : la première consiste en une double synthèse d'ADN double brin à partir d'ADN simple brin (Extended synthesis-dependent single-strand DNA annealing, ESDSA) et la seconde phase répare des cassures d'ADN double brin grâce à la protéine RecA (Cox *et al.*, 2010) (Figure 15).

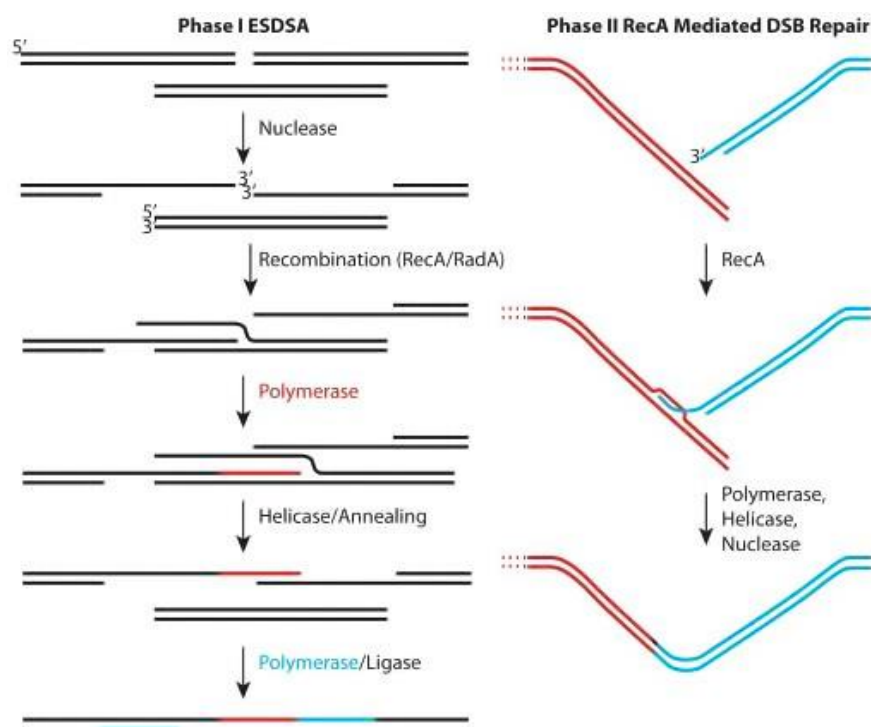


Figure 15. Système de réparation de l'ADN en deux étapes chez *Deinococcus radiodurans*.

La première étape de réparation de l'ADN (ESDSA) génère de l'ADN simple brin grâce à des nucléases et hélicases, des recombinaisons par les protéines RecA et/ou RadA, la synthèse d'ADN et l'annealing de l'ADN. La seconde étape est une réparation conventionnelle de cassures d'ADN double brin médiée par la protéine RecA (Cox *et al.*, 2010).

2.2.4.2 Métaux lourds

Aucune définition scientifique n'est clairement établie mais on appelle métaux lourds des éléments métalliques naturels dont la densité est supérieure à 5 g.cm^{-3} . Les métaux lourds existent naturellement mais en quantité très faible dans les sols, l'eau et l'air. Ils peuvent être libérés dans l'atmosphère par des sources naturelles comme les feux de forêt ou les éruptions volcaniques. Certaines activités humaines comme la combustion du charbon, du pétrole, des déchets et certains procédés industriels libèrent une grande quantité de métaux lourds dans l'environnement. Les principaux métaux lourds émis dans l'atmosphère par les activités humaines sont le zinc, le cuivre, le nickel, le plomb, le chrome, le sélénium, l'arsenic, le mercure et le cadmium. Les bactéries de l'environnement qui peuvent supporter de fortes concentrations en métaux lourds sont appelées métalophiles. La plupart des systèmes de résistance sont codés par des groupes de gènes présents sur des plasmides, mais des systèmes similaires sont retrouvés sur le chromosome pour certaines espèces (*Bacillus*) (Silver et Phung, 1996). A titre d'exemple, la bactérie *Alcaligenes eutrophus* CH34 possède deux plasmides de résistance aux métaux lourds : pMOL28, plasmide de 163 kb conférant une résistance au nickel, mercure et cobalt et pMOL30, plasmide de 238 kb conférant une résistance au zinc, cadmium, mercure, argent, cuivre, plomb et cobalt (Mergeay *et al.*, 1985). Les mécanismes de détoxification du cytoplasme sont basés sur l'efflux chimio-osmotique de cations grâce à des contre-transporteurs de protons (CzcCBA, CnrCBA et SilCBA), des protéines qui facilitent la diffusion de cations (CzcD et CnrT) ainsi que des ATPases de type P qui pompent les cations à l'extérieur de la cellule (CopF, CzcP) (De *et al.*, 2008 ; Monchy *et al.*, 2007).

3. ECOLOGIE DES MILIEUX HYPERSALINS

Les environnements où la concentration en sels est élevée sont considérés comme extrêmes et ont fait l'objet de ce travail de thèse. La description de ces milieux, les organismes les colonisant ainsi que les mécanismes d'adaptation qu'ils emploient seront développés en détail dans cette troisième partie.

3.1 Définition des environnements hypersalins

3.1.1 Concentration en sels et composition ionique

Les environnements hypersalins sont essentiellement caractérisés par leur concentration totale en sels mais leur composition ionique, différente pour chacun, est un facteur clé pour déterminer le biotope de l'environnement (Oren, 2006). Les sels sont des composés ioniques de cations et d'anions formant un produit neutre et sans charge nette. Ces ions peuvent être minéraux (Cl^- , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ , etc) ou organiques (acétate, carbonate, citrate, nitrate) ainsi que monoatomiques (F^-) ou polyatomiques (SO_4^{2-}). Dans le cas des environnements hypersalins, le terme sel est utilisé pour définir une combinaison de différents anions et cations inorganiques parmi lesquels Cl^- et Na^+ sont les plus abondants. On considère qu'un environnement est hypersalin quand la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 35 g.L^{-1} (DasSarma et DasSarma, 2012). Cependant, la notion d'hypersalinité peut faire référence à des concentrations salines bien plus élevées, parfois même proches des conditions de saturation. Les environnements hypersalins sont nombreux et très répandus sur notre planète puisqu'on en retrouve sur chacun des cinq continents. Il existe deux types de milieux hypersalins, les environnements thalassohalins et athalassohalins, qui diffèrent selon leur composition ionique et sont colonisés par des organismes extrémophiles que l'on appelle halophiles.

3.1.2 Environnements thalassohalins

Les environnements thalassohalins ont une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer, avec des proportions de cations et d'anions similaires et une prédominance du NaCl . Le pH des environnements thalassohalins est légèrement alcalin, entre 7 et 8 (Oren, 2006). Les

environnements thalassohalins peuvent être d'origine anthropique, comme les marais salants, ou bien d'origine naturelle, comme les sebkhas ou les lagons.

Environnement thalassohalin d'origine anthropique : les marais salants

Les marais salants, ou salines, sont une succession de bassins d'évaporation créés par l'Homme et qui servent à la production de sels à partir de la concentration des sels présents dans l'eau de mer (DasSarma et DasSarma, 2012). Il existe un degré croissant de salinité à travers les différents bassins d'évaporation : les bassins les plus proches de la mer ont une concentration saline identique à celle de la mer ; plus l'on s'éloigne de la mer, sous l'effet de l'évaporation de l'eau par le soleil (et la diminution de la profondeur des bassins), plus la concentration en sels augmente dans les différents bassins d'évaporation jusqu'au bassin de cristallisation (conditions saturantes) où le sel est récolté (Oren, 2006). Au fur et à mesure de l'évaporation de l'eau, la composition ionique est modifiée : la limite de solubilité du sulfate de calcium CaSO_4 qui précipite sous forme de gypse est atteinte lorsque la concentration en sels est d'environ $100\text{-}120 \text{ g.L}^{-1}$. Dans les bassins de cristallisation, la composition ionique est encore différente puisque les concentrations en calcium et en sulfate sont réduites (de façon minime pour le sulfate) jusqu'à atteindre le dernier bassin de cristallisation où le NaCl précipite en halite et où les concentrations relatives de K^+ et Mg^{2+} augmentent (Oren, 2006).

Environnement thalassohalin d'origine naturelle : les sebkhas, lacs intérieurs et lagons.

Les environnements hypersalins thalassohalins d'origine naturelle peuvent être des lacs intérieurs, comme le Grand Lac Salé aux Etats-Unis (Great Salt Lake) ; des lagons, qui désignent une étendue d'eau peu profonde fermée au large du littoral par un récif corallien ou encore des « sebkhas », bassins à forte salinité occupant le fond d'une dépression séparés d'un milieu marin retrouvé dans les régions désertiques (Figure 16) (Oren, 2006). Ces bassins sont retrouvés dans les zones arides des pays du Maghreb ou le long des côtes du golfe persique dans les Emirats Arabes Unis.

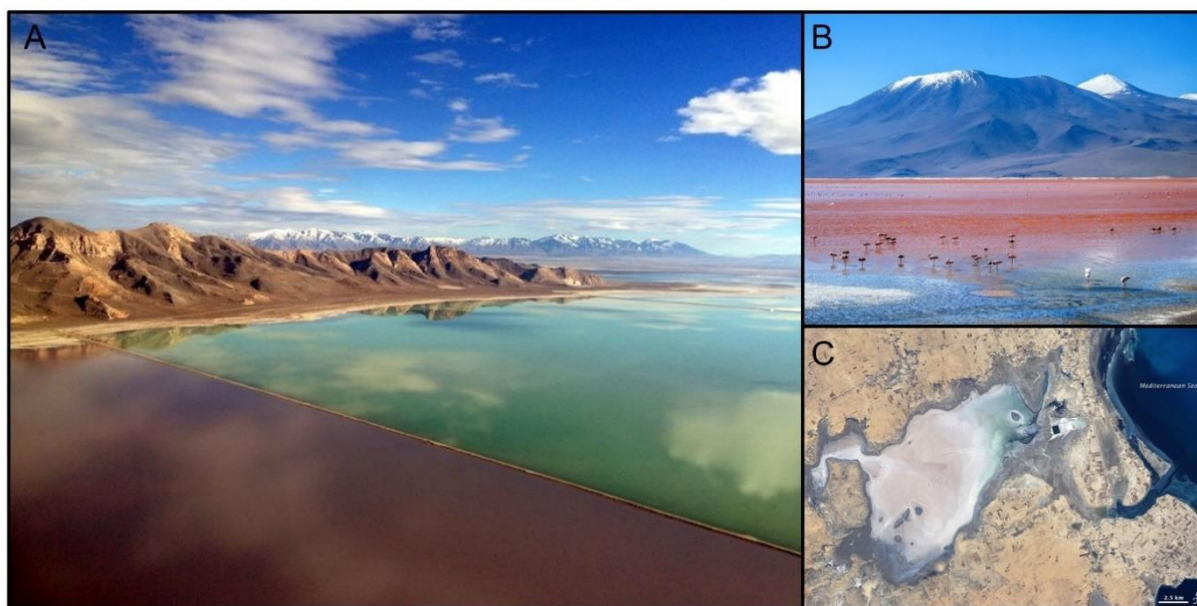


Figure 16. Environnements hypersalins thalassohalins.

A : Grand Lac Salé, USA (crédit photo : Patrick Wiggins) ; B : Laguna colorada, Bolivie (crédit photo : Exploregram) ; C : Sebkhas El Melah, Tunisie (crédit photo : EarthObservatory).

3.1.3 Environnements athalassohalins

Les environnements athalassohalins ont une composition ionique différente de celle de l'eau de mer et dérivent de sources d'eau douce (torrents de montagne...). L'environnement hypersalin le plus étudié au monde est d'origine athalassohaline. Il s'agit de la Mer Morte : un lac fermé partagé entre l'Israël, la Jordanie et la Palestine où la concentration saline est de 340 g.L^{-1} (Figure 17). Dans ce lac, les cations divalents dominant : les concentrations de Mg^{2+} ($45,93 \text{ g.L}^{-1}$) et Ca^{2+} ($63,97 \text{ g.L}^{-1}$) sont supérieures à celle du Na^+ ($38,88 \text{ g.L}^{-1}$) et K^+ ($7,82 \text{ g.L}^{-1}$). A cause de la forte concentration calcique, la solubilité du sulfate est faible et les anions monovalents Cl^- et Br^- représentent plus de 99 % des anions totaux. Le pH de la Mer Morte est relativement faible, de l'ordre de 5,8-6 (Oren, 2006). Il existe également des environnements athalassohalins alcalins : des lacs de soude sont présents dans de nombreuses régions telles que l'Afrique de l'Est (Lac Magadi et d'autres lac au Kenya et Tanganika), dans le désert Ouadi Natroun en Egypte ainsi qu'aux Etats-Unis, Inde, Chine, etc. A cause du pH élevé, 10-11 ou plus, les cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} sont très peu solubles et la concentration de ces ions est en dessous du seuil de détection. Ces lacs sont riches en ions carbonates et bicarbonates, responsables de l'alcalinité du lac, et qui représentent une partie importante des anions totaux, en plus du Cl^- et sulfate.



Figure 17. Environnements hypersalins athalassohalins : la Mer Morte.

Crédit photo : Seacret : minerals from the dead sea (<http://www.seacretspa.com/The-Dead-Sea>).

3.2 Stratégies d'adaptation

Les milieux hypersalins sont caractérisés par une forte osmolarité. La différence d'osmolarité entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule génère une pression osmotique sur la membrane plasmique conduisant à l'expulsion de l'eau et à la plasmolyse de la cellule. Afin de prévenir la plasmolyse, les cellules des micro-organismes halophiles doivent garantir l'équilibre osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, c'est-à-dire maintenir un environnement intracellulaire au moins isoosmotique avec les sels du milieu extérieur et dans certains cas, même hyperosmotique lorsqu'une pression turgescente doit être maintenue (Oren, 2006). On appelle osmoadaptation la capacité des cellules à s'adapter aux variations extérieures de pression osmotique et osmorégulation leur capacité à développer les mécanismes permettant l'osmoadaptation (Galinski, 1995). Afin de compenser la perte d'eau induite par la pression osmotique, le transport actif de molécules d'H₂O vers l'intérieur de la cellule serait un processus énergétiquement irréalisable. A la place, l'osmorégulation des halophiles repose sur l'accumulation de petites molécules dans leur cytoplasme (Roberts, 2005). Ces petites molécules, ou osmolytes, peuvent être de nature organique ou inorganique (Roberts, 2005). Selon leur nature, les solutés seront impliqués dans deux stratégies distinctes : la stratégie « high salt-in » basée sur l'accumulation de solutés inorganiques et la stratégie « low salt-in » basée sur l'accumulation de solutés organiques (Oren, 2008).

3.2.1 « Salt-in » ou « high salt-in »

L'accumulation d'ions inorganiques dans le cytoplasme cellulaire permet de maintenir des concentrations salines intracellulaires extrêmement élevées (Oren, 2006). Dans la plupart des cas, K^+ (plutôt que Na^+) et Cl^- sont respectivement les cations et anions majoritairement accumulés (Oren, 2006). Cependant, des cellules d'*Haloanaerobium praevalens* en phase stationnaire ont montré une grande variabilité parmi les cellules individuelles : certaines contenant de fortes concentrations de NaCl plutôt qu'une forte concentration de KCl (Oren et Haldal, 1997).

La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action coopérative de plusieurs pompes ioniques, transporteurs couplés ou d'autres protéines transporteuses dont les plus importants sont schématisés dans la figure 18. La force motrice utilisée pour le transport d'ions est un gradient électrochimique de protons et une différence de potentiel formés de part et d'autre de la membrane. Le gradient électrochimique de protons peut être formé grâce à la chaîne respiratoire, au niveau de laquelle le transport d'électrons est accompagné de la sortie de protons (figure 18, [1]), à des protéines membranaires, les bactériorhodopsines, qui grâce à leur pigment, captent l'énergie lumineuse qu'elles utilisent pour l'export de protons (figure 18, [2]), ou encore grâce à des ATP synthases fonctionnant à l'envers et qui libèrent un proton à l'extérieur de la cellule (figure 18, [3]). Les ions K^+ rentrent dans les cellules halophiles via des systèmes de transporteur en réponse au potentiel membranaire (Wagner *et al.*, 1978) (figure 18, [6]). Afin de maintenir l'électroneutralité, une charge positive est expulsée sous forme de Na^+ via un transporteur de Na^+/H^+ (figure 18, [4]). Ainsi, en plus de la régulation de la composition ionique de la cellule, on assiste à la génération d'un gradient de Na^+ qui est utilisé pour le co-transport d'acides aminés, et autres composés (figure 18, [5]). La circulation de H^+ et l'efflux de Na^+ résulte en la création d'un fort potentiel électrique négatif à l'intérieur de la cellule. De ce fait, le transport passif de Cl^- ne permettrait qu'une perte de Cl^- plutôt que son accumulation cellulaire, pourtant requise pour la cellule. Deux systèmes de transports actifs de Cl^- ont été identifiés pour les cellules d'*Halobacterium*. Le premier est un système de symport de Cl^- et Na^+ indépendant de la lumière (figure 18, [7]) (Duschl et Wagner, 1986). Le second est un transport utilisant l'énergie lumineuse captée par la protéine rétinienne halorhodopsine et qui a été notamment retrouvée chez les archées *Halobacterium salinarum* et *Natronomonas pharaonis* (figure 18, [8]) (Schobert et Lanyi, 1982).

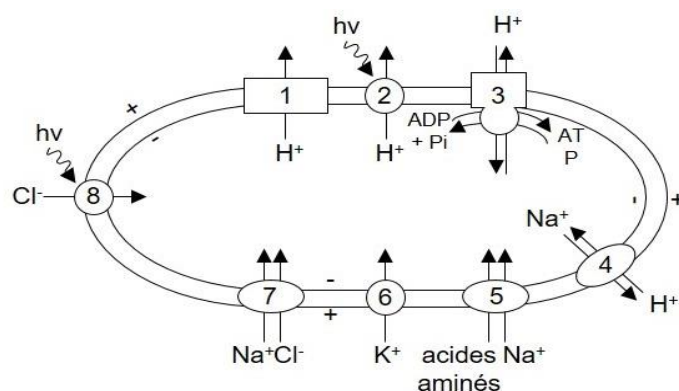


Figure 18. Différents systèmes de transport d'ions chez les archées halophiles aérobies.

Les numéros 1 et 6 désignent des transporteurs, 2 et 8 des transporteurs qui utilisent l'énergie lumineuse ($h\nu$ = photon), 3 représente une ATPase, 4, 7 et 8 des transporteurs couplés. ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, Pi : phosphate, (Oren, 2006).

L'importante concentration en sels, qui résulte de l'accumulation des ions inorganiques K^+ , Cl^- et Na^+ à l'intérieur de la cellule, favorise les liaisons hydrophobes inter- et intra-protéiques conduisant à l'agrégation et à la destruction des structures protéiques. De plus, les charges des ions interfèrent avec les interactions électrostatiques essentielles qui existent entre les macromolécules. Enfin, à cause de l'hydratation des sels, le volume d'eau libre disponible dans la cellule est largement diminué et peut nuire aux processus biologiques essentiels (Oren, 2006). De ce fait, la machinerie enzymatique intracellulaire est contrainte de s'adapter à la forte concentration saline afin de conserver la conformation et l'activité biologique des protéines et assurer ainsi la survie cellulaire. Les halophiles ont un protéome acide et moins hydrophobe que les organismes ne vivant pas en condition d'hypersalinité. Les protéines halophiles possèdent un grand nombre de résidus acides, aspartate (Asp), glutamate (Glu), et peu de résidus basiques, lysine (Lys), arginine (Arg). A titre d'exemple, la malate déshydrogénase de l'archée halophile *Haloarcula marismortui* possède 10,4 % de résidus acides supplémentaires par rapport à une enzyme d'un milieu non hypersalin (Dym *et al.*, 1995). La résolution des structures cristallographiques de plusieurs protéines halophiles comme la malate déshydrogénase et la ferredoxine d'*Haloarcula marismortui* ou encore la dihydrofolateréductase d'*Haloferax volcanii* ont apporté des informations essentielles pour la compréhension des mécanismes d'adaptation des protéines halophiles à leur milieu (Dym *et al.*, 1995 ; Frolov *et al.*, 1996 ; Pieper *et al.*, 1998). En effet, ces études ont montré que les groupements carboxyliques $-COO^-$ des résidus acides sont utilisés pour séquestrer, organiser et arranger un réseau étroit d' H_2O et d'ions K^+ hydratés à la surface des protéines garantissant ainsi la solubilité des protéines (Dym *et al.*, 1995 ; Paul *et al.*, 2008). Le protéome

des halophiles est également caractérisé par un faible nombre des résidus hydrophobes méthionine (Met), leucine (Leu), et isoleucine (Ile), généralement impliqués dans la formation d'hélices α (Leu, Met, Lys) ou de feuillet β (Ile), permettant une flexibilité des protéines plus importantes (Paul *et al.*, 2008). Enfin, peu de résidus cystéines (Cys) sont présents, participant également à la plus grande flexibilité des protéines dans les milieux hypersalins (Paul *et al.*, 2008). A cause de toutes ces adaptations, les halophiles ne peuvent généralement pas survivre dans des milieux de faible concentration saline (moins de 60-120 g.L⁻¹ de sels) et ont une adaptation très restreinte aux variations externes de concentrations en sels (Eisenberg et Wachtel, 1987 ; Oren, 2008).

Bien que cette stratégie « high salt-in » soit énergétiquement moins coûteuse que la biosynthèse de grandes quantités de solutés organiques, l'utilisation de cette stratégie n'est pas répandue parmi les trois domaines de la vie (Oren, 2008). Elle est principalement utilisée par les espèces d'archées halophiles de la classe des *Halobacteria*, telles que *Halobacterium salinarum* ou *Haloarcula marismortui*. Cette stratégie est aussi utilisée par quelques espèces de bactéries halophiles appartenant au phyla des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes*, comme *Salinibacter ruber*. Ces exemples sont les seuls qui utilisent exclusivement l'accumulation de K⁺ pour contrer la pression osmotique et chez lesquels on ne retrouve pas ou très peu de solutés organiques (Roberts, 2005).

3.2.2 « Salt-out » ou « low salt-in »

La stratégie « salt-out » ou « low salt-in » est basée sur la conservation d'une faible concentration ionique intracellulaire, grâce à un transport actif des ions en dehors des cellules empêchant ainsi l'agrégation des protéines. L'efflux de Na⁺ est réalisé par des systèmes de transporteur couplés Na⁺/H⁺ (figure 18, [4]). Afin de garantir l'équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu extérieur, les organismes qui emploient cette stratégie de « salt-out » accumulent et/ou biosynthétisent des solutés organiques (Kempf et Bremer, 1998). Ces solutés sont des composés organiques, polaires, de faible masse moléculaire, solubles dans l'eau à de fortes concentrations et dont la plupart ne possèdent pas de charges nettes (zwitterions ou composés non chargés) (DasSarma et DasSarma, 2012 ; Oren, 2008). Ces solutés sont des dérivés d'acides aminés, des sucres, ou encore des polyols (Tableau 3) (DasSarma et DasSarma, 2012). La plupart des cellules utilisent un cocktail de différents solutés organiques plutôt qu'un système basé sur un seul composé organique (Galinski, 1995).

Solutés		Distribution
solutés zwitterions	bétaïne 	Halotolérants: <i>Thioalkalivibrio versutus</i> , <i>Actinopolyspora</i> sp. Halophiles: <i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Halorhodospira halochloris</i> , <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1, <i>Methanosarcina thermophila</i> , <i>Synechococcus</i> sp. DUN52
	ectoïne 	Halotolérants: <i>Sporosarcina pasteurii</i> , <i>Brevibacterium spidermidis</i> , <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i> , <i>Vibrio cholerae</i> et <i>Vibrio costociola</i> Halophiles: <i>Chromohalobacter israelensis</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> , <i>Halorhodospira halochloris</i> , <i>Halomonas elongata</i> , <i>Halomonas variabilis</i> , <i>Methylophilus marina</i> , <i>Methylophilus terricola</i> , <i>Methylophilus alcalica</i> , <i>Methylophilagatronic</i> , isolats halophiles des lacs de soude
	hydroxyectoïne 	Halophiles: <i>Halomonas elongata</i> , <i>Nocardiopsis halophila</i>
	Nγ-acétyldiaminobutyrate 	Halotolérants: <i>Halomonas elongata</i> CHR63
	Nε-acétyl-β-lysine 	Halotolérants: <i>Methanosarcina thermophila</i> , <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> , <i>Methanosarcina maei</i> Go1 Halophiles: <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1, <i>Methanohalophilus</i> sp. Z7302
	β-glutamine 	Halophiles: <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1
solutés non chargés	α-glucosylglycérol 	Halotolérants: <i>Synechocystis</i> sp., <i>Microcystis firma</i> , eubactéries phototrophiques, <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Stenotrophomonas</i>
	α-mannosylglyceramide 	Halotolérants: <i>Rhodothermus marinus</i>
	tréhalose 	Halotolérants: <i>Picrobactulum aerophilum</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Sulfolobus ambivalens</i> , <i>Thermoproteus tenax</i> , <i>Thermoplasma acidophilum</i> Halophiles: <i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Chromobacter israelensis</i> , <i>Desulfovibrio halophilus</i> , <i>Rhodothermusobamensis</i> , <i>Natrialba magadii</i>
	sucrose 	Halotolérants: plusieurs cyanobactéries et protéobactéries
	N-α-carbamoyl-L-glutamine 1-amide 	Halophiles: <i>Ectothiorhodospira mobilis</i>
	N-acétylglutaminylglutamine amide 	Halotolérants: <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> Halophiles: bactéries de soufre violet

Tableau 3. Solutés organiques zwitterions et non chargés les plus fréquemment utilisés lors de l'osmoadaptation de type « low salt-in ».

Les solutés zwitterions les plus fréquemment utilisés sont la bétaïne, l'ectoïne et l'hydroxyectoïne, Nε-actéyl-β-lysine et β-glutamine. Les solutés non chargés les plus fréquemment utilisés sont des glucides (trehalose et sucrose), dérivés de glucides (glucosylglycérol et α-mannosylglyceramide) ou des dérivés d'acides aminés (carboxamine et dipeptide glutamine acétylé) (Roberts, 2005).

L'accumulation de ces solutés organiques permet de garantir l'équilibre osmotique sans perturber l'activité des protéines intracellulaires. En effet, ils n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique, même à l'échelle de la concentration molaire. Ces solutés sont accumulés dans la cellule *via* leur biosynthèse *de novo* ou une absorption directe depuis le milieu. Les transporteurs d'osmolytes pour lesquels on dispose du plus d'informations sont ceux transportant la bétaine et l'ectoïne. Deux superfamilles de transporteurs de bétaine ont été identifiés : (i) Les transporteurs qui utilisent comme force motrice le gradient de proton. C'est le cas de la plupart des organismes qui utilisent des transporteurs bétaine/choline/carnitine. (ii) Les transporteurs à ATP Binding Cassettes (transporteurs ABC) qui utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les osmolytes. C'est le cas des méthanogènes qui utilisent des transporteurs ABC pour transporter la bétaine (Proctor *et al.*, 1997).

La stratégie « salt-out » est utilisée par des espèces qui appartiennent aux trois domaines du vivant : des eucaryotes halophiles tels que des plantes et champignons, la plupart des bactéries halophiles et halotolérantes et les archées halophiles méthanogènes. La concentration intracellulaire des solutés organiques étant régulée en fonction de la salinité du milieu extérieur, l'utilisation de cette stratégie d'osmorégulation permet une grande flexibilité d'adaptation à une large gamme de concentrations salines avec une adaptation rapide aux changements de salinité du milieu extérieur (Oren, 2006). C'est pourquoi cette stratégie est surtout utilisée par les halotolérants plutôt que par les halophiles extrêmes. Les eucaryotes halophiles (algues vertes et champignons) accumulent du glycérol et d'autres polyols alors que ces composés sont rares chez les micro-organismes halophiles procaryotes à l'exception du mannitol chez *Pseudomonas putida* (Kets *et al.*, 1996). La plupart des autres halophiles accumulent des espèces zwitterions comme la bétaine, la glycine ou encore l'ectoïne (DasSarma et DasSarma, 2012).

Cependant, dans la majorité des cas, il n'existe pas de barrière nette entre les deux stratégies de « low salt-in » et « high salt-in ». A titre d'exemple, les ions Cl⁻, accumulés chez les halophiles qui utilisent la stratégie « high salt-in », pourraient avoir un rôle crucial dans l'osmoadaptation *via* la stratégie « low salt-in » puisqu'il a notamment été montré que les ions Cl⁻ réguleraient le transport de bétaine (Müller et Oren, 2003).

3.3 Colonisation des environnements hypersalins

Les organismes halophiles ont été étudiés par des approches de cultures de micro-organismes ou indépendantes des cultures et basées sur le séquençage de l'ADN, la majorité des espèces n'étant pas cultivables.

3.3.1 Classification : des halotolérants aux halophiles extrêmes

Les organismes halophiles peuvent être classés en fonction de leur résistance et besoin en sels. La classification la plus largement adoptée est celle proposée par Kushner en 1978 et qui a été légèrement modifiée par Oren en 2006 (Tableau 4) (Oren, 2006). Dans cette classification, différents degrés de dépendance aux sels sont considérés, de léger, modéré à extrême, en fonction de la concentration en sels requise pour une croissance optimale.

Catégorie	Propriété	Exemples
Non-halophile	Prolifération optimale dans un milieu contenant moins de 12 g.L ⁻¹ de NaCl	La plupart des bactéries d'eau froide
Halophile faible	Prolifération optimale dans un milieu contenant 12-29 g.L ⁻¹ de NaCl	La plupart des bactéries marines
Halophile modéré	Prolifération optimale dans un milieu contenant 29-146 g.L ⁻¹ de NaCl	<i>Salinivibrio costicola</i>
Halophile extrême limite	Prolifération optimale dans un milieu contenant 88-234 M de NaCl	<i>Halorhodospira halophila</i>
Halophile extrême	Prolifération optimale dans un milieu contenant 146-5304 g.L ⁻¹ de NaCl	<i>Halobacterium salinarum</i>
Halotolérant	Non halophiles qui tolèrent la présence de NaCl (appelés halotolérants extrêmes si la concentration en NaCl dépasse 146 g.L ⁻¹)	<i>Staphylococcus aureus</i>

Tableau 4. Classification des organismes en fonction de leur tolérance et besoin en NaCl (Oren, 2013b).

3.3.2 Organismes halophiles

Des organismes halophiles et/ou halotolérants sont retrouvés dans les trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Oren, 2002). Cependant, la plupart des halophiles sont des représentants procaryotes.

3.3.3 Archées halophiles

Chez les archées, des représentants halophiles ont été identifiés parmi le phylum des *Euryarchaeota*, plus précisément appartenant aux classes *Halobacteria* et *Methanomicrobia*, et

plus récemment parmi le superphylum DPANN. La classe des *Halobacteria* est composée d'organismes considérés comme les halophiles par excellence. Cette classe est presque exclusivement composée d'organismes halophiles stricts qui requièrent des concentrations en sels supérieures à 150 g.L⁻¹ pour leur prolifération et qui subissent des dommages irréversibles, dans beaucoup de cas même une lyse cellulaire, si la concentration saline est inférieure à 100 g.L⁻¹ (Oren, 2011). Néanmoins, des études récentes relatent la présence d'archées, bien qu'appartenant à la classe des *Halobacteria*, dans des niches écologiques inattendues où la concentration en sels est très faible. C'est le cas des espèces *Haladaptatus paucihalophilus*, *Halosarcina pallida* et *Haloferax sulfurifontis*, isolées de sources sulfureuses dans l'Oklahoma où la concentration saline est de 46,8 - 58,4 g.L⁻¹, et qui sont donc considérés comme halophiles modérés (Elshahed *et al.*, 2004 ; Savage *et al.*, 2007, 2008). En mai 2016, les *Halobacteria* comptent 54 genres plus 2 candidats : *Candidatus Halobonum* et *Candidatus Haloectosymbiotes* (Filker *et al.*, 2014 ; Ugalde *et al.*, 2013) et 225 espèces clairement définies et validées par le comité international de systématique des Procaryotes (ICSP) (Tableau 5). La découverte de nouveaux genres et espèces parmi les halophiles extrêmes de la classe des *Halobacteria* est en pleine expansion (Oren, 2014b). En effet, depuis 2010, 25 nouveaux genres ont été décrits. Jusqu'en 2015, les archées halophiles extrêmes faisaient partie de la classe *Halobacteria* qui ne comprenait qu'un seul ordre, les *Halobacteriales*, et une seule famille, les *Halobacteriaceae*. L'augmentation des données issues du séquençage des génomes a permis d'affiner les données taxonomiques de ces archées halophiles. L'analyse de 129 séquences de génomes et l'identification de signatures moléculaires, comme les 234 signatures de protéines conservées (CSPs) et les 40 signatures d'indel (insertions-délétions) conservées (CSIs), a permis de définir 3 ordres au sein de la classe des *Halobacteria* : les *Halobacteriales*, les *Haloferacales* et les *Natrialbales*, respectivement divisées en trois, deux et une famille (Tableau 5) (Gupta *et al.*, 2015). Les différentes familles incluent des cellules adoptant une forme de coques ou de bâtonnets, mais également des cellules pléomorphes, et même parfois rectangulaire comme c'est le cas pour l'archée carré *Haloquadratum walsbyi* (Oren, 2012). Parmi les archées halophiles de la classe *Halobacteria*, certaines sont alcalophiles (espèces appartenant aux genres *Natronobacterium*, *Natronorubrum* et *Natromonas*), d'autres acidophiles (*Halarchaeum acidiphilum*) (Minegishi *et al.*, 2010a), d'autres encore psychrotolérantes (*Halorubrum lacusprofundi*) (Oren, 2012).

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
Euryarchaeota	Halobacteria	Halobacteriales	Haloarculaceae	Halapricum
				Haloarcula
				Halomicroarcula
				Halomicrobium
				Halorhabdus
				Halorientalis
				Halosimplex
				Haladaptatus
			Halobacteriaceae	Halalkalicoccus
				Halarchaeum
				Haloarchaeobius
				Halobacterium
				Halocalculus
				Halomarina
				Halorubellus
				Halorussus
				Halosiccatus
				Halovarius
				Halovenus
				Natribaculum
				Natronoarchaeum
				Natronomonas
				Salarchaeum
				Salinirubrum
			Halococcaceae	Halococcus
		Haloferacales	Haloferacaceae	Halobellus
				Haloferax
				Halogeometricum
				Halogramum
				Haloparvum
				Halopelagius
				Haloplanus
				Haloquadratum
			Halorubraceae	Halosarcina
				Halanaeroarchaeum
				Halobaculum
				Halohasta
				Halolamina
				Halonotius
				Halopenitus
				Halorubrum
				Salinigranum
				Candidatus Haloectosymbiotes
				Candidatus Halobonum
		Natrialbales	Inconnue Natrialbaceae	Halobiforma
				Halopiger
				Halostagnicola
				Haloterrigena
				Halovivax
				Natrialba
				Natrinema
				Natronobacterium
				Natronococcus
				Natronolimnobiobius
				Natronorubrum
				Salinarchaeum
	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	Methanohalobium
				Methanohalophilus
				Methanosalsum
				Methanocalculus
DPANN (Nanohaloarchaeota)	Nanohaloarchaea	Methanomicrobiales	Methanocalculaceae	Candidatus Haloredivivus
				Candidatus Nanosalina
				Candidatus Nanosalinarum

Tableau 5. Principaux genres d'archées halophiles.

Des représentants halophiles des archées sont présents parmi le phylum des *Euryarchaeota*, *Halobacteria* et *Methanomicrobia* et le superphylum DPANN (phylum des *Nanohaloarchaeota*). Ce tableau a été réalisé en mai 2016 avec les genres acceptés par l'ICSP (Gupta *et al.*, 2016 ; Narasingarao *et al.*, 2012 ; Oren, 2014b)

Parmi le phylum des *Euryarchaeota*, des espèces halophiles et halotolérantes ont également été identifiées dans la classe des *Methanomicrobia* et plus particulièrement les ordres *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales* (Tableau 5). Il s'agit d'archées méthanogènes, appartenant principalement à la famille *Methanosarcinaceae* (Oren, 2014b). Cette famille est composée de 7 genres phylogénétiques dont seulement 3, les genres *Methanohalobium*, *Methanohalophilus* et *Methanosalsum* contiennent des représentants halophiles. L'organisme méthanogène le plus halophile est *Methanohalobium evestigatum*, isolée d'un lagon hypesalin du lac Sivash en Ukraine, dont la croissance optimale a lieu à 250 g.L⁻¹ de NaCl (Zhilina et Zavarzin, 1987). D'autres méthanogènes halophiles appartiennent à la famille *Methanocalculaceae*. Dans cette famille, deux organismes hautement tolérants au sel ont été décrits : *Methanocalculus halotolerans*, qui pousse entre 0 et 125 g.L⁻¹ de NaCl, et *Methanocalculus natronophilus*, qui pousse entre 53 et 193 g.L⁻¹ de NaCl (Oren, 2014b). La découverte d'organismes méthanogènes halophiles indique que la réaction de méthanogénèse peut avoir lieu à de très fortes concentrations salines, proches de la saturation.

En 2012, une étude métagénomique menée sur le lac hypersalé Tyrrell en Australie, a révélé l'abondante présence d'archées possédant un génome et des capacités métaboliques très différentes des archées halophiles précédemment décrites (Narasingarao *et al.*, 2012). En outre, ces archées possédaient des caractéristiques qui leur étaient propres : composition en acides aminés unique, absence de protéines Gvp qui constituent les vésicules de gaz, chemins métaboliques originaux et petite taille cellulaire ($\approx 0,6$ μm de diamètre). Des analyses phylogénétiques ont permis de démontrer que ces organismes appartenaient à un nouveau groupe taxonomique unique, phylogénétiquement distant de la classe des *Halobacteria*. Une nouvelle classe d'archées, les *Nanohalobacteria*, fut alors proposée parmi le phylum des *Euryarchaeota*, composée des trois genres candidats : *Candidatus Nanosalina*, *Candidatus Nanosalinarum* et *Candidatus Haloredivivus* (Ghai *et al.*, 2011 ; Narasingarao *et al.*, 2012) (Tableau 5). En 2013, une étude basée sur des analyses phylogénétiques révèle que la classe des *Nanohalobacteria* avait été incorrectement placée dans le phylum des *Euryarchaeota*. Ainsi, la classe des *Nanohalobacteria* a été déplacée dans le superphylum DPANN (Rinke *et al.*, 2013). C'est la première fois que des représentants halophiles ont été identifiés comme appartenant à autre phylum que celui des *Euryarchaeota*. Le développement des techniques de métagénomique qui a conduit à la découverte du nouveau groupe taxonomique des *Nanohalobacteria* démontre que des environnements hypersalins, même s'ils ont été très

étudiés historiquement, peuvent révéler une diversité inattendue de micro-organismes halophiles. Ainsi, notre connaissance de la répartition des halophiles chez les archées est vraisemblablement encore incomplète.

3.3.4 Bactéries halophiles

Parmi le domaine des bactéries, des espèces halophiles ont été identifiées dans de nombreux phyla tels que *Cyanobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. Les cyanobactéries représentent une part importante du biote phototrophique dans les environnements hypersalins. Il existe plusieurs espèces de cyanobactéries, de halotolérantes à halophiles extrêmes, unicellulaires ou filamenteuses. Les espèces filamenteuses les plus souvent retrouvées dans les milieux hypersalins sont *Microcoleus chthonoplastes* et *Halospirulina tapeticola* (Garcia-Pichel *et al.*, 1996 ; Nübel *et al.*, 2000). La cyanobactérie unicellulaire la plus répandue est *Aphanothece halophytica*. Dans le Grand Lac Salé aux Etats-Unis, les cyanobactéries sont une composante caractéristique du microbiote du lac. Aux plus hautes salinités, on retrouve l'espèce *A. halophytica* et des espèces filamenteuses, comme *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Spirulina* et *Nodularia*, sont retrouvés dans les sédiments peu profonds du lac (Seckbach, 2007). Les marais salants sont également riches en cyanobactéries. La composante principale des communautés de cyanobactéries est généralement *M. chthonoplastes* (Seckbach, 2007). Cependant, dans la Mer Morte, les cyanobactéries ne sont pas une composante importante du biotope et on retrouve principalement des bactéries appartenant au phylum des *Gammaproteobacteria* (*Chromohalobacter marismortui*, *Halomonas halmophila* et *Pseudomonas halestorgus*) et des *Firmicutes* (*Salibacillus marismortui*, *Halobacteroides halobius*, *Orenia marismortui* et *Sporohalobacter lorterii*) (Oren et Ventosa, 1999 ; Seckbach, 2007).

La quasi-totalité des bactéries halophiles sont des halophiles modérés, faibles ou parfois mêmes halotolérants. Néanmoins, un petit nombre de bactéries sont halophiles extrêmes. La bactérie *Salinibacter ruber* est l'exemple le plus connu de bactérie halophile extrême. Cette bactérie, en forme de batonnet et de couleur rouge/orangé, appartient au phylum des *Bacteroidetes* (Figure 19). Cet organisme requiert une concentration en sels aussi élevée que l'archée la plus halophile et partage beaucoup d'autres caractéristiques avec ses homologues archéens colonisant les mêmes habitats. En effet, *Salinibacter ruber* a une croissance optimale

à une concentration saline de 200-300 g.L⁻¹, utilise du KCl pour garantir l'équilibre osmotique de son cytoplasme, possède des enzymes dépendantes au sel composées d'une grande proportion d'acides aminés acides, et contient de nombreux pigments retiniens (Oren, 2013a).



Figure 19. Bactérie halophile extrême *Salinibacter ruber*.

Cliché de microscopie électronique observée par coloration négative. La barre d'échelle représente 0,5 μm (Oren, 2013a).

Parmi les bactéries halophiles, quelques-unes sont polyextrêmophiles. La bactérie anaérobie *Halothermothrix orenii*, de l'ordre des *Halanaerobiales*, est une bactérie à la fois halophile et thermophile. Elle a été isolée de Chott El Guettar, un lac salin chaud situé en Tunisie, et a un optimum de croissance à 60 °C (jusqu'à 68 °C) et 200 g.L⁻¹ de NaCl (Cayol *et al.*, 1994). Un autre exemple de polyextremophilie parmi les bactéries halophiles est celui des bactéries *Natronaerobius thermophilus*, *Natronaerobius trueperi* et *Natronovirga wadinatruncensis* qui ont été isolées de lacs alcalins hypersalins en Egypte et ont un optimum de croissance à un pH de 9.5-10.5 et à une concentration saline de 220 g.L⁻¹ (Mesbah et Wiegel, 2009 ; Mesbah *et al.*, 2007).

3.3.5 Eucaryotes halophiles

Bien que les micro-organismes adaptés aux fortes concentrations en sels soient largement répandus parmi les règnes des archées et des bactéries, la vie eucaryote à de fortes concentrations salines est aussi possible. Parmi les eucaryotes halophiles, on retrouve des

micro-organismes comme des champignons et des algues, ainsi que des macro-organismes comme la crevette *Artemia* retrouvée pour des concentrations de 150-200 g.L⁻¹ de sels (Oren, 2011). La plupart des eucaryotes halophiles sont des halophiles modérés ou des halotolérants, mais quelques espèces halophiles extrêmes ont été identifiées.

Parmi les micro-organismes eucaryote halophiles, on distingue les champignons *Hortaea werneckii*, *Wallemia ichthyophaga* et *Aureobasidium pullulans*. *Debaryomyces hansenii* est une levure halotolérante, isolée de l'eau de mer qui pousse en condition aérobie dans des salinités pouvant atteindre 263 g.L⁻¹ de NaCl. Sa grande capacité d'osmoadaptation est basée sur la production de glycérol et arabitol, respectivement lors de la phase exponentielle et stationnaire (DasSarma et DasSarma, 2012). La plupart des algues vertes halophiles sont des halophiles modérées. Il n'existe que quelques espèces halophiles extrêmes dont *Dunaliella salina* ou *Asteromonas gracilis*. Les eucaryotes halophiles les plus étudiés et les plus connus sont les algues appartenant au genre *Dunaliella*, dont quelques espèces sont oranges plutôt que vertes à cause d'une accumulation de β -carotène. *Dunaliella* sp. a un rôle écologique important dans les lacs salés en tant que principal producteur primaire à de fortes concentrations salines (Oren, 2011). Des diatomées sont communément retrouvées, mais rarement de façon abondante, dans les environnements hypersalins (DasSarma et DasSarma, 2012). La plus grande variété d'espèces est retrouvée à une concentration de 117 g.L⁻¹ en NaCl et la diatomée la plus halophile a été retrouvée à 175 g.L⁻¹. Les diatomées les plus communément retrouvées sont *Amphora coffeaformis*, et des espèces appartenant aux genres *Navicula* et *Nitzschia*.

Des eucaryotes présentant une complexité supérieure ont également été isolés dans des environnements hypersalins. On distingue un plus grand nombre d'invertébrés capables de croître et de se développer dans des environnements hypersalins par rapport aux vertébrés (DasSarma et DasSarma, 2012). Les seuls organismes vertébrés halophiles sont des espèces de poissons du genre *Ilapia*, observés dans des hypersalinités modérées, ainsi que des organismes non aquatiques comme le flamant rose, né blanc et devenu rose à cause des pigments que contiennent les micro-organismes halophiles présents dans sa nourriture (Ghai *et al.*, 2011 ; DasSarma et DasSarma, 2012). Les invertébrés sont beaucoup plus nombreux et incluent des mouches comme *Ephydra cinerea*, des crevettes comme *Artemia franciscana*, ou encore des rotifères tels *Keratella quadrata*, des vers de terre comme les espèces de *Macrostomum*, des copépodes comme *Robertsonia salsa* et des ostracodes comme *Cyprideis torosa*. Des plantes

sont aussi présentes dans les environnements hypersalins comme *Atriplex halimus*, *Mesembryanthemum crystallinum* et des espèces de mangrove du genre *Laguncularia* qui peuvent survivre dans des sols avec une concentration en sels modérée.

3.3.6 Distribution des espèces en fonction de la salinité

Les marais salants sont des environnements particulièrement intéressants pour des études de répartition des organismes halophiles en fonction de la salinité puisque la composition microbienne des bassins a montré une assez bonne stabilité au cours du temps, même en étant sujets à des perturbations environnementales (Ghai *et al.*, 2011). Aussi, les salines ont souvent été décrites comme des systèmes simples où il existe une faible diversité d'espèces, une haute densité de procaryotes et des chaînes alimentaires courtes.

Des études de répartition, réalisées par pyroséquençage du gène codant l'ARNr 16S, ont été menées dans 4 environnements de salinités différentes : la mer Méditerranée où la concentration saline est de 38 g.L⁻¹, le lagon Punta Cormoran situé dans les îles Galapagos où la concentration saline est de 60 g.L⁻¹, un bassin d'un marais salant où la concentration est de 190 g.L⁻¹ et enfin un bassin de cristallisation d'un marais salant où la concentration atteint 370 g.L⁻¹ (Figure 20) (Ghai *et al.*, 2011). Cette étude montre que l'augmentation de la salinité s'accompagne d'une diminution de la diversité microbienne. En effet, une grande diversité de groupes taxonomiques est retrouvée dans l'eau de mer alors qu'un seul taxon est largement dominant lorsque la concentration saline atteint 370 g.L⁻¹ (Figure 20). Il s'agit du taxon des *Euryarchaeota*, comprenant la majorité des archées halophiles, et qui est d'ailleurs dominant dès que la salinité atteint 190 g.L⁻¹. Les espèces retrouvées aux concentrations salines les plus fortes appartiennent aux genres *Halorubrum*, *Haloharcula* ou *Haloferax* (Atanasova *et al.*, 2012). Les bactéries sont également très représentées dans les environnements salins mais leur diversité diminue avec l'augmentation du gradient de salinité au profit des archées. En effet, plusieurs taxons bactériens sont représentés seulement aux concentrations salines les plus faibles, comme c'est le cas pour les cyanobactéries qui sont présentes jusqu'à une salinité de 60 g.L⁻¹. Les alphaprotéobactéries sont dominantes dans l'eau de mer (notamment grâce à l'espèce *Candidatus pelagibacter*) mais leur nombre diminue avec l'augmentation de la salinité jusqu'à être totalement absente à une salinité de 370 g.L⁻¹. La transition des bactéries vers les archées, c'est-à-dire le moment où les archées deviennent dominantes en nombre par rapport

aux bactéries, se produit à 240 g.L⁻¹ de salinité (Figure 20). Au-delà de cette concentration, un petit nombre de bactéries subsistent. Il s'agit de bactéries du phylum des *Bacteroidetes*, notamment représenté par les espèces du genre *Salinibacter* (*Salinibacter ruber*) (Atanasova *et al.*, 2012). La dominance des archées halophiles dans les environnements hypersalins les plus extrêmes est souvent visible à l'œil nu. En effet, la plupart des archées halophiles ont une couleur rouge clair, orange ou parfois même violette qui sont dus à des pigments photosynthétiques présents dans leur membrane. Grâce à la grande densité de cette communauté de micro-organismes colorés dans les milieux hypersalins, la couleur rouge est visible, par exemple, au niveau du bras nord du Grand Lac Salé, de la Mer Morte, de lacs hypersalins comme le lac Magadi au Kenya ou encore au niveau des bassins de cristallisation des salines (Figure 16).

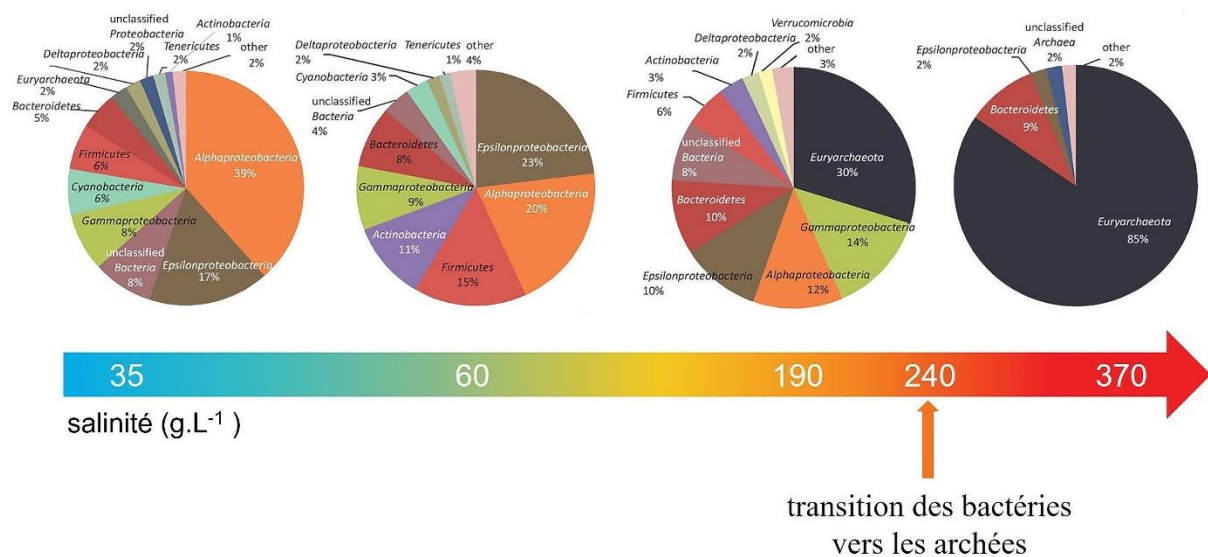


Figure 20. Diversité des micro-organismes halophiles en fonction du gradient de salinité.

Les études ont été réalisées à partir de prélèvements dans 4 environnements de salinités différentes : la mer méditerranée (NaCl 35 g.L⁻¹), le lagon Punta Cormoran en Equateur (60 g.L⁻¹), la saline Bras del Port situé près d'Alicante en Espagne dans les bassins avec une salinité de 190 et 370 g.L⁻¹. Le pourcentage des communautés procaryotes présentes a été calculé sur la base des séquences codantes les ARNr 16S (Ghai *et al.*, 2011).

3.3.7 Virus halophiles

Bien que n'appartenant à aucun des trois règnes du vivant, les virus halophiles peuvent être considérés comme partie intégrante des environnements hypersalins où ils sont 10 à 100 fois plus nombreux que les cellules (Atanasova *et al.*, 2015a). Dans ces environnements, ils pourraient être les seuls prédateurs et, de ce fait, représenter une force majeure affectant l'évolution des halophiles extrêmes (Atanasova *et al.*, 2012).

Les virus halophiles ont été étudiés depuis les années 1970, date de la découverte du virus HS-1 infectant l'archée *Halobacterium salinarum* (Torsvik et Dundas, 1974). Aujourd'hui plus de 100 virus halophiles ont été décrits. La plupart d'entre eux possèdent des hôtes procaryotes. Néanmoins, une étude récente fait état de cinq virus infectant un même hôte eucaryote : le protozoaire halotolérant *Acanthamoeba polyphaga* (Boughalmi *et al.*, 2013). Aucun virus n'a été décrit pour les champignons halophiles, ni pour l'algue verte *Dunaliella salina* pourtant présente à de fortes concentrations salines. Parmi les 100 virus halophiles infectant les procaryotes, environ 10 possèdent des hôtes bactériens et 90 des hôtes appartenant au domaine des archées (Atanasova *et al.*, 2015a). La large majorité de virus halophiles infectant les archées par rapport à ceux qui infectent des bactéries n'est pas surprenante puisque les archées halophiles sont dominantes dans les environnements hypersalins.

Les virus halophiles peuvent adopter plusieurs morphologies : icosaédrique avec une queue, icosaédrique avec une double membrane interne, en forme de fuseau ou pléomorphes (Figure 21). Sur la base de leur morphologie, les virus halophiles ont été classés dans 5 familles : *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Pleolipoviridae*, *Sphaerolipoviridae* et *Fuselloviridae* (Tableau 6) (Atanasova *et al.*, 2016 ; Luk *et al.*, 2014).

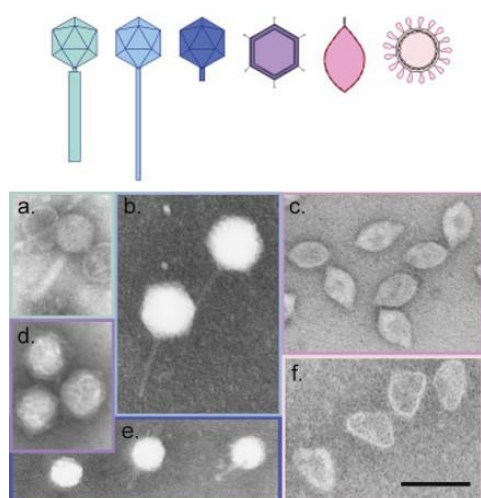


Figure 21. Morphologie des virus halophiles.

Les virus halophiles possèdent 6 morphologies différentes : icosaèdres avec une queue contractile (vert, photo a), icosaèdres avec une queue non contractile moyenne (bleu clair, photo b), icosaèdres avec une queue non contractile courte (bleu foncé, photo e), icosaèdres avec membrane interne (violet, photo d), forme de fuseaux (rose foncé, photo c) et pléomorphes (rose pâle, photo f). Les clichés ont été pris en microscopie électronique à transmission. La barre d'échelle représente 100 nm.

Morphologie	Famille	Virus	Genre de l'hôte
icosaèdre avec queue contractile	Myoviridae	φCh1, φgspC , φH, HATV-1, HATV-2, HCTV-6, HCTV-7, HCTV-8, HCTV-9, HCTV-10, HCTV-11, HCTV-12, HCTV-13, HCTV-14, HCTV-15, HF1, HF2, HGTV-1, HJTV-1, HJTV-2, HJTV-3, HRTV-1, HRTV-2, HRTV-3, HRTV-5, HRTV-6, HRTV-7, HRTV-8, HRTV-9, HRTV-10, HTV-1, HRTV-11, HRTV-12, HRTV-13, HRTV-14, HRTV-15, HRTV-16, HRTV-17, HRTV-18, HRTV-19, HRTV-20, HRTV-21, HRTV-22, HRTV-23, HRTV-24, HRTV-25, HRTV-26, HRTV-27, Hs1, HSTV-2, HSTV-3, HSTV-4, Ps-G3 , S5100, SCTP-2 , SCTP-3 et UTAK	A : <i>Haloarcula</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Haloferax</i> , <i>Halogramum</i> , <i>Halorubrum</i> et <i>Natrialba</i> B : <i>Halomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salicola</i> et <i>Salinivirbio</i>
icosaèdre avec queue non contractile de longueur moyenne	Siphoviridae	φN, B10, BJ1, F9-11 , HATV-3, HCTV-1, HCTV-2, HCTV-5, HCTV-16, HCTV-17, Hh1, Hh3, HHTV-1, HHTV-2, HRTV-4, HRTV-28, HRTV-29, HVTV-1, HVTV-2, Ja1, S45 et SCTP-1	A : <i>Haloarcula</i> , <i>Halobacterium</i> et <i>Halorubrum</i> B : <i>Halomonas</i> et <i>Salicola</i>
icosaèdre avec queue non contractile courte	Podoviridae	CW02 et HSTV-1	A : <i>Haloarcula</i> B : <i>Salinivibrio</i>
pléomorphe	Pleolipoviridae	HRPV-1, HHPV-1, HRPV-2, HRPV-3, HRPV-6, HGPV-1, His2, HRPV-7, HRPV-8, HAPV-1, HHPV-2	A : <i>Haloarcula</i> , <i>Halogeometricum</i> et <i>Halorubrum</i>
icosaèdre avec membrane interne	Sphaerolipoviridae	HCIV-1, HHIV-2, PH1, SH1, SSIP-1 et SNJ1	A : <i>Haloarcula</i> et <i>Natrinema</i> B : <i>Salisaeta</i>
forme de fuseau	Fuselloviridae	His1	A : <i>Haloarcula</i>

Tableau 6. Virus halophiles de procaryotes.

Les virus infectant les bactéries sont indiqués en rouge. A : hôte archée, B : hôte bactérienne (Atanasova *et al.*, 2015b)

Les virus icosaèdres avec une queue, contractile ou non, ou une membrane interne infectent des archées et des bactéries alors que les virus pléomorphes et en forme de fuseau sont présents que dans des hôtes archées (Tableau 6). Parmi les virus halophiles infectant les archées, 80 % ont une morphologie icosaèdre et possèdent une queue contractile (myovirus, 58 %) ou non (siphovirus, 22 %) (Figure 22). Cependant, des études réalisées par microscopie électronique ont permis de montrer que des particules rondes (icosaèdres avec membrane interne) ou en forme de fuseaux étaient les morphotypes dominants dans les environnements hypersalins (Sime-Ngando *et al.*, 2011).

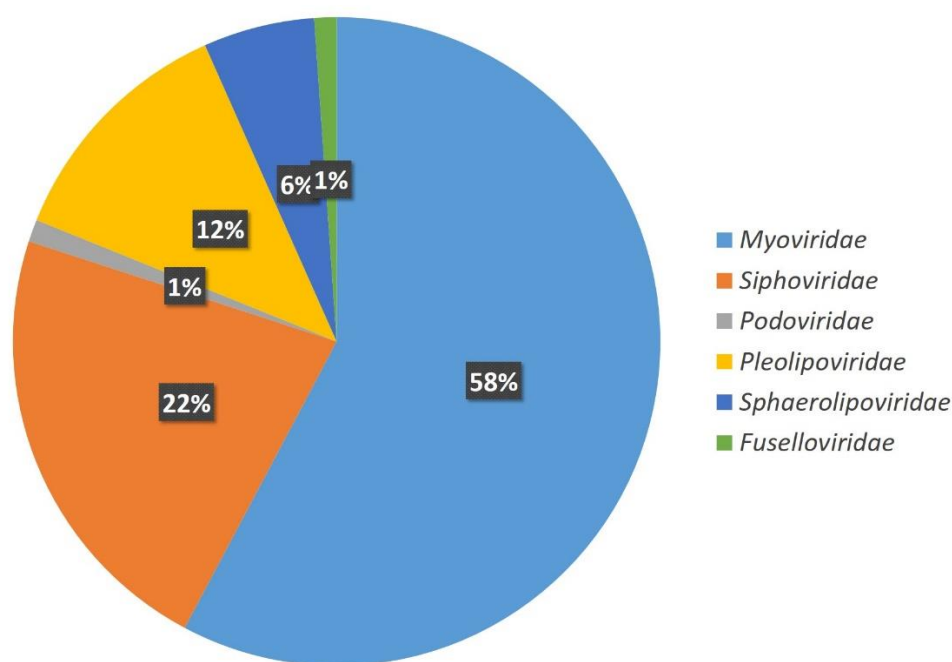


Figure 22. Répartition des virus halophiles infectant les archées.

Les pourcentages sont calculés sur la base des 90 virus d'archées décrits (Atanasova *et al.*, 2015a).

On distingue les virus dont l'interaction avec l'hôte est appelée modérée, lytique ou chronique (Luk *et al.*, 2014). Les virus halophiles lytiques sont libérés par la lyse de la cellule hôte alors que les virus halophiles qui possèdent un cycle d'infection tempéré peuvent être libérés par la lyse de la cellule ou un mécanisme non lytique (Atanasova *et al.*, 2016). Il existe deux types de virus halophiles tempérés : ceux qui s'intègrent dans le chromosome ou ceux qui se répliquent dans le cytoplasme. Alors que les bactériophages ont une activité modérée ou lytique, la grande majorité des virus infectant les archées halophiles établissent une infection chronique durant laquelle des virions sont continuellement produits et l'hôte demeure intact (Porter *et al.*, 2007). C'est par exemple le cas des virus His1 et HRV-1 (Atanasova *et al.*, 2016). La libération de ces virus se ferait grâce au bourgeonnement de la membrane plasmique mais cette hypothèse devra être confirmée par des études futures.

En fonction de la salinité, le cycle d'infection des virus halophiles est modifié. Des études récentes montrent que le virus SNJ-1 possède un cycle de réplication lysogénique lorsque la salinité est de 180 g.L⁻¹, salinité optimale pour la croissance de l'hôte *Natrinema* sp. J7-1. Cependant, lorsque la salinité est supérieure à 180 g.L⁻¹, le cycle de réplication du virus est lytique dans la majorité des cas (Mei *et al.*, 2015).

3.3.8 Applications des halophiles

Les micro-organismes halophiles possèdent de nombreuses applications dans le domaine environnemental, en tant que biorémédiateurs, ainsi que dans le domaine industriel en tant que producteurs de nombreux métabolites intéressants.

Le sel est utilisé dans de nombreux secteurs industriels qui, de ce fait, génèrent des eaux usées avec une concentration élevée en sel. La libération de ces eaux usées, contenant une forte salinité ainsi que des agents toxiques, a un impact négatif sur la vie aquatique, la potabilité de l'eau ou encore l'agriculture (Lefebvre et Moletta, 2006). Ces effluents salins sont traités par des techniques physico-chimiques, étant donné que la plupart des traitements biologiques sont inhibés par la forte concentration en NaCl. Dans ce contexte, les halophiles sont de bons candidats dans la biorémédiation des eaux usées industrielles grâce à leurs capacités métaboliques qui restent actives lorsque la concentration en sel est élevée. A titre d'exemples, les organismes halophiles qui utilisent des hydrocarbures comme source d'énergie sont utilisés dans la dépollution biologique des déversements de pétrole dans la mer (Uratani *et al.*, 2014). Aussi, des halophiles dénitrificateurs, comme *Haloferax mediterranei*, sont utilisés dans l'élimination de nitrite et nitrate dans les bassins de salinité des marais salants (DasSarma et DasSarma, 2015). Enfin, des organismes haloalkaliphiles sont utilisés dans le traitement des eaux usées hypersalées et alcalines qui résultent du processus de décoloration du papier (Singh *et al.*, 2012).

Grâce à leur métabolisme original et leur capacité à évoluer dans des environnements extrêmes hypersalins, les halophiles produisent des métabolites uniques, notamment synthétisés lors de l'osmorégulation, dont les applications sont nombreuses. A titre d'exemple, l'éctoïne (Tableau 3), est utilisée pour la conservation *in vitro* d'enzymes et d'acides nucléiques commerciaux (Oren, 2010 ; Uratani *et al.*, 2014). Ce soluté est également utilisé dans des produits cosmétiques dermatologiques pour ses propriétés dans la prévention du vieillissement prématuré de la peau en contrant les effets des rayons ultraviolets (<http://www.ectoin.net/EN/home/>). Aussi, la production de poly- β -hydroxyalkanoate, accumulé par des bactéries et archées comme polymère de stockage est utilisé dans la production de plastique biodégradable avec des propriétés similaires à celle du polypropylène (Biopol®). Enfin, l'algue *Dunaliella salina*, produit une grande quantité de pigment β -carotène pour se protéger des radiations solaires. Ce pigment est utilisé en tant qu'anti-oxydant, source

de pro-vitamine A ou encore colorant alimentaire (Oren, 2010) et est utilisé dans des cosmétiques (<http://eclae.com/fr/>). Le développement d'applications biotechnologiques pour les métabolites produits par les archées est en plein essor et de nombreux autres composés (molécules, peptides, protéines...) pourraient être de bons candidats dans la recherche de nouvelles applications.

4. PEPTIDES ANTIMICROBIENS PROCARYOTES

D'après la base de données LAMP qui recense tous les peptides antimicrobiens (<http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/>), plus de 3900 peptides antimicrobiens d'origine naturelle ont été découverts. Les peptides antimicrobiens sont produits par des organismes appartenant aux trois règnes du vivant, des animaux et plantes jusqu'aux micro-organismes. Ils contribuent à la stratégie de défense des organismes qui leur permet de combattre les pathogènes (immunité innée) ou de se développer au détriment d'autres colonisateurs dans un même habitat (compétitions) (Rebuffat, 2011). Les gènes conduisant à la biosynthèse des peptides antimicrobiens sont ubiquitaires dans les génomes séquencés et dans les transcriptomes (Arnison *et al.*, 2012). Dans ce paragraphe, seront évoqués exclusivement aux peptides antimicrobiens produits par les organismes procaryotes. On distingue les peptides antimicrobiens synthétisés par le règne des bactéries, appelés bactériocines, décrits ci-dessous, et les peptides antimicrobiens synthétisés par les archées, appelés archéocines qui feront l'objet du 1^{er} chapitre de cette thèse.

4.1 Bacteriocines

La plupart des connaissances actuelles sur les peptides antimicrobiens procaryotes se rapportent aux bactériocines. Celles-ci sont douées d'une activité antagoniste vis-à-vis de souches phylogénétiquement proches des souches productrices, ce qui les différencie des antibiotiques conventionnels qui ont généralement un large spectre d'action (Nes, 2011). Les composés antibactériens de nature peptidique, qu'ils comportent ou non des modifications post-traductionnelles, peuvent résulter de deux voies de biosynthèse différentes : (i) la voie ribosomique (ribosomal peptide synthesis, RPS) qui produit un précurseur protéique subissant un clivage protéolytique pour conduire au peptide mature actif ; ce clivage est parfois précédé de modifications post-traductionnelles du précurseur réalisées par des enzymes dédiées et (ii) la voie non ribosomique (Non-Ribosomal Peptide Synthesis, NRPS) qui procède par un assemblage d'acides aminés (dont certains sont non conventionnels et modifiés) par des enzymes multifonctionnelles de très hauts poids moléculaires (Arnison *et al.*, 2012). Enfin, une autre caractéristique qui différencie les bactériocines des antibiotiques de nature peptidique d'origine NRPS est leur capacité à inhiber la croissance des souches cibles à une concentration de l'ordre du nanomolaire, alors que les antibiotiques requièrent des concentrations beaucoup

plus élevées pour exercer leur action antimicrobienne (Nes, 2011). La découverte des bactériocines date de plus de 90 ans. C'est en 1925 qu'A. Gratia démontre l'existence d'une substance inhibitrice provenant d'un dialysat d'un milieu de culture d'*Escherichia coli* V (Gratia, 1925). Cette substance, qui fut plus tard nommée colicine V, inhibe la croissance d'*E. coli* ϕ . Depuis cette découverte, les recherches sur les bactériocines se sont intensifiées du fait de leur utilisation potentielle dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Aujourd'hui, la famille des bactériocines rassemble une très grande diversité de peptides ou protéines en termes de taille, d'organisation génétique, de cibles microbiennes, de modes d'actions et de mécanismes d'immunités. Tous ces aspects seront développés dans cette partie dans laquelle, après avoir présenté brièvement la classification des bactériocines produites par la voie ribosomique, je décrirai les différentes voies de biosynthèses des bactériocines, les modes d'actions connus à ce jour, le rôle des bactériocines dans un contexte écologique et enfin leurs applications dans les domaines pharmaceutiques et biotechnologiques.

4.1.1 Ubiquité de la production de bactériocines

La production de bactériocines a été mise en évidence chez toutes les lignées majeures de bactéries. Aussi, chez une espèce donnée, des dizaines de bactériocines différentes peuvent être produites (Riley et Wertz, 2002). Deux grands groupes de bactériocines peuvent être distingués, avec d'une part les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif et d'autre part, les bactériocines produites par les bactéries à Gram négatif représentées par les colicines et les microcines. Aujourd'hui, le terme bactériocine est souvent utilisé dans sa forme restrictive, c'est-à-dire pour désigner exclusivement les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif, principalement par les bactéries lactiques.

4.1.1.1 Production par les bactéries à Gram positif

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif forment un groupe très hétérogène de peptides. Les bactériocines produites par des bactéries lactiques, et notamment par les genres *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, et quelques membres du genre *Streptococcus*, ont suscité un grand intérêt car leurs applications potentielles sont multiples, notamment dans la conservation des aliments ou la

médecine vétérinaire ou humaine (Rea *et al.*, 2011). La découverte de nombreuses bactériocines produites par des bactéries lactiques a conduit à proposer plusieurs classifications, dont l'une peut s'appliquer à toutes les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif, lactiques ou non (Klaenhammer, 1993). Cette classification reposait sur la répartition des bactériocines en quatre classes en fonction de leurs structures et leurs caractéristiques (Klaenhammer, 1993). Les classifications proposées ultérieurement admettent l'existence des classes I et II, alors que la légitimité des classes III et IV est discutée (Diep et Nes, 2002 ; Cotter *et al.*, 2005 ; Willey et van der Donk, 2007 ; Heng *et al.*, 2007).

Bactériocines de classe I

Les composés qui forment ce groupe sont des peptides dont la masse moléculaire est inférieure à 5 kDa et qui subissent d'importantes modifications post-traductionnelles. Ces modifications conduisent à la présence d'acides aminés inhabituels comme la lanthionine (Lan) et/ou β -méthyl lanthionine (MeLan) ainsi qu'à des résidus déshydratés dans leur séquence (Figure 23). Les résidus Lan et MeLan résultent de la formation d'une liaison thioéther entre le groupement sulphydryl d'une cystéine et la double liaison C=C de la didéhydrobutyrine ou de la didéhydroalanine conduisant à la cyclisation du peptide (Figure 23). Les peptides antimicrobiens qui possèdent des résidus Lan et MeLan sont appelés lantibiotiques. Aujourd'hui plus de 30 lantibiotiques sont connus dont la nisine, la subtiline, Pep5, l'épidermine ainsi que des lantibiotiques possédant une structure plus compacte : la mersacidine, la cinnamycine ou encore la mutacine II.

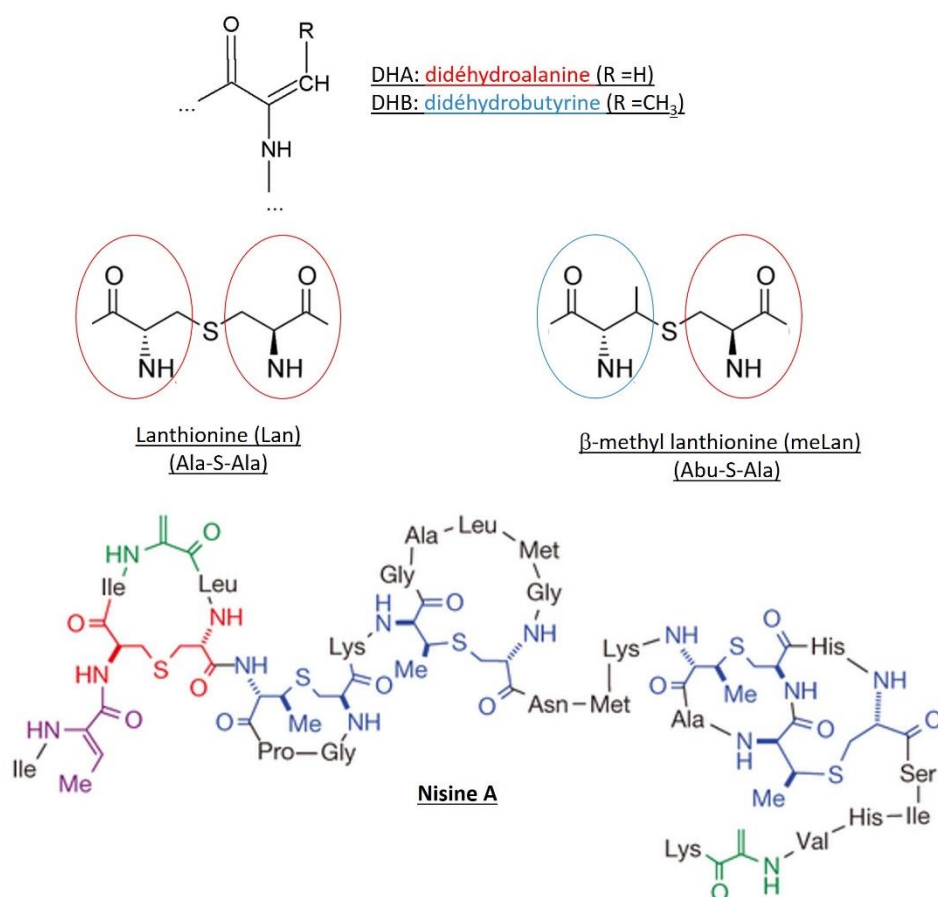
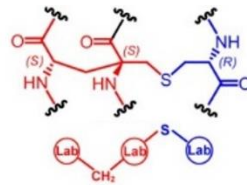


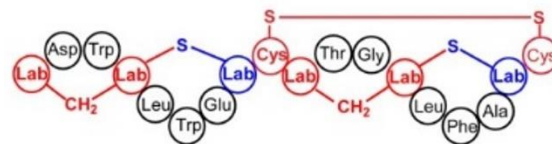
Figure 23. Structures des acides aminés modifiés des lantibiotiques et de la nisine.

La didéhydroalanine (rouge) est la structure de base des lanthionines. La didéhydrobutyrine (bleu) est la structure de base des β-méthyl lanthionines. La nisine A est un lantibiotique avec un acide aminé lanthionine (rouge), quatre acides aminées β-méthyl lanthionine (bleu) et des acides aminés déshydratés ; déhydroalanine (vert) et déhydrobutyrine (violet) (McAuliffe *et al.*, 2001 ; Ortega *et al.*, 2015).

Originellement, la classe I des bactériocines était exclusivement composée des lantibiotiques. Cependant, plusieurs bactériocines subissant d'importantes modifications post-traductionnelles ont récemment été découvertes et bien qu'elles ne possèdent pas de résidus lanthionines, peuvent être associées à cette classe. De ce fait une nouvelle classification de la classe I des bactériocines a été proposée comportant la classe Ia (la plus fournie, comprenant les lantibiotiques) et les classes Ib et Ic, regroupant respectivement les labyrinthopeptides et les lactibiotiques. Les labyrinthopeptides sont des peptides qui ont fait l'objet des modifications post-traductionnelles conduisant à une structure "labyrinthe". Ils sont caractérisés par la présence d'un résidu labionine (Lab) : un acide-aminé carbocyclique modifié post-traductionnellement grâce à la protéine LanKC qui a une double activité de kinase et de cyclisation de la lanthionine (Wang et van der Donk, 2012) (Figure 24).



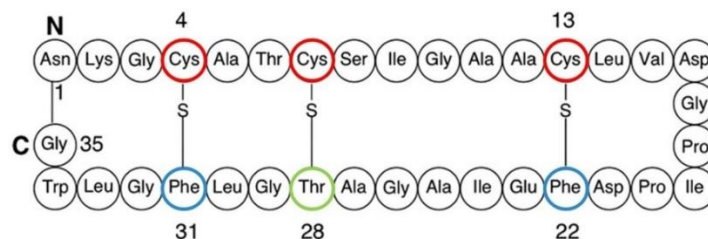
résidu labionine



Labyrinthopeptide A2

Figure 24. Structure de la labyrinthopeptine A2 contenant des résidus labionine.
La structure de l'acide aminé labionine est représenté en haut. Lab : labionine (Wang et van der Donk, 2012).

Les sactibiotiques forment le troisième groupe des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif de classe I. Ce groupe est constitué de la subtilosine A, la thuricine CD, la thuricine H et la propionicine F qui sont des peptides cycliques, fortement modifiés post-traductionnellement, avec une liaison croisée entre les atomes de soufre des résidus cystéines et les carbones α de deux phénylalanines et une thréonine (Figure 25) (Mathur *et al.*, 2015).



Subtilosin A

Figure 25. Structure de la subtilosine A.
Les acides aminés impliqués dans les liaisons sont entourés en rouge pour les cystéines, bleu pour les phénylalanines et vert pour la thréonine (Kawulka *et al.*, 2004).

Bactériocines de classe II

Les bactériocines de classe II sont des peptides cationiques avec une masse moléculaire inférieure à 5 kDa, résistants à la chaleur et qui ne subissent peu ou pas de modifications post-traductionnelles. Ils sont constitués d'acides aminés standards, qui peuvent néanmoins être

associés par des ponts disulfure, ou former des peptides cycliques. Les bactériocines de la classe II sont subdivisées en quatre sous-classes :

- La sous-classe **IIa** regroupe des bactériocines nommées « pediocin-like ». Les bactériocines qui composent cette sous-classe ont toutes en commun une région très bien conservée, située à l'extrémité N-terminale, qui contient la séquence cationique hydrophobe Y-G-N-G-V-X₁-C-X₂-K/N-X₃-X₄-C (avec X correspondant à n'importe quel acide aminé) souvent appelée « boîte pédiocine ». Les deux cystéines de cette séquence forment un pont disulfure (Figure 26).

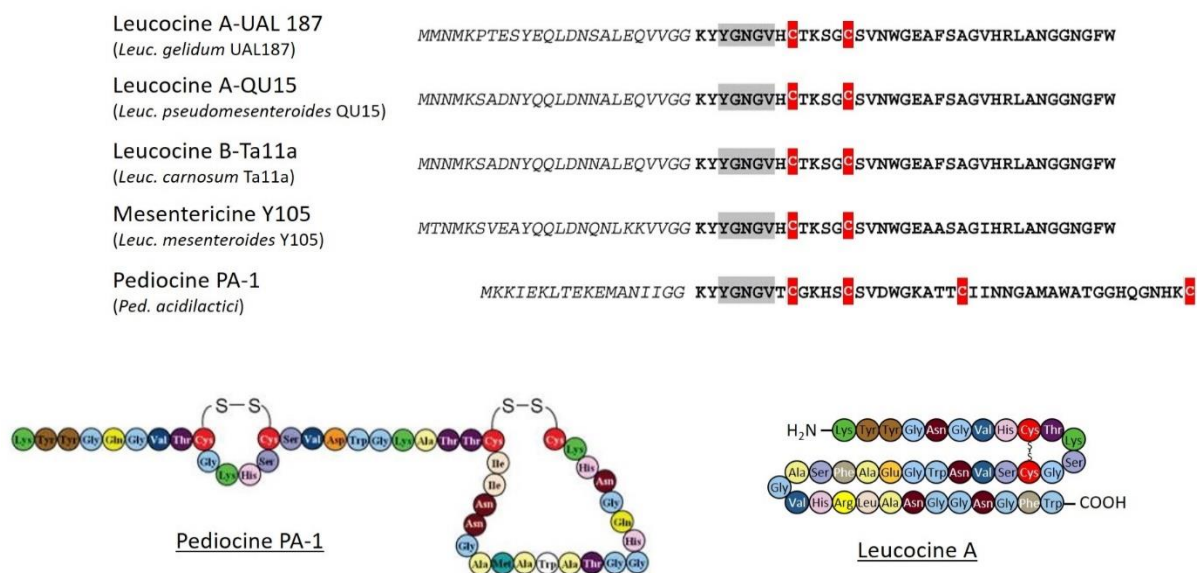


Figure 26. Structure primaire des bactériocines de classe IIa.

Alignement des séquences en acides aminés des précurseurs de bactériocines de classe IIa. Les séquences des bactériocines matures actives sont en gras ; la séquence consensus des bactériocines « pediocin-like » est surlignée en gris et les cystéines en rouge (Desriac *et al.*, 2010 ; Makhouloufi *et al.*, 2013).

- La sous-classe **IIb** regroupe des bactériocines de type « two-peptides ». Ces bactériocines requièrent l'action de deux peptides distincts pour avoir une activité antimicrobienne optimale. En effet, les deux peptides ont, dans une grande majorité des cas (sauf pour la lactacine F et les plantaricines EF et JK (Allison *et al.*, 1994 ; Anderssen *et al.*, 1998)), très peu ou pas du tout d'activité de manière isolée et ont besoin d'interagir physiquement pour former un complexe actif. Alors que la séquence en acides aminés et la structure des deux peptides est variable, un motif commun GXXXG est présent sur les deux

peptides (Figure 27). Ce motif est impliqué dans une hélice α , structure secondaire via laquelle les deux peptides interagissent. Actuellement, il y a environ 16 bactériocines dans ce groupe, quasiment toutes produites par des bactéries lactiques à l'exception de la bactériocine brochocine C produite par *Brochotrix campestris* (Rea *et al.*, 2011). Les bactériocines appartenant à ce groupe sont composées (i) soit de peptides de moins de 40 acides aminés, comme c'est le cas pour la plantaricine S (26 et 24 acides aminés pour le premier et le deuxième peptide) ou lactococcine G (39/35 acides aminés) ; (ii) soit de peptides de plus grande taille comme c'est le cas des brochocine C, sakacine T, gassericine T et lactacine F chez lesquelles au moins l'un des deux peptides renferme plus de 50 acides aminés (Figure 27).

Bactériocine		1	10	20	30	40	50
Lactocine 705	Lac705 α	GMS	GYIQGH	PDFLNGYLHC	ISAANKHKKRLGY		
	Lac705 β	GFWGG	GYIACRVG	GAAYCH	AQASANNHSPING		
Lactococcine G	LcnG α	GTWDDH	GGGIGR	VAYWVG	KKAMG	NMSDVNQASRINRKKKH	
	LcnG β	KKWGWLA	WDPAYEFIR	GFPGK	AIKEGNKDKWKNI		
Lactococcine Q	LcnQ α	SIWGDH	GGGIGR	VAYWVG	KKAMG	NMSDVNQASRINRKKKH	
	LcnQ β	KKWGWLA	WVEPAGEFLK	GFPGK	AIKEGNKDKWKNI		
Lactacine F	Laf A	RNNWQ	TNNGGAV	GGAVGSAMH	GATVGGTTCG	PACAVAGAHYLPILWTGVTAAATGGPGKIRK	
	Laf X	NRWGD	TVLSAAS	GAGTG	IKACKSFGPWGMAICGVG	GAAIGGYFGYTHN	
Plantaricine E/F	Pln E	FNRG	GYNPG	KSVRHVDAI	GSVAG	IRGILKSIR	
	Pln F	VFHAY	SARGVRN	NYKSAVGPADW	ISAVRG	GFINGG	
Plantaricine J/K	Pln J	GAWKN	FWSLSLRK	GFYDG	EAGRAIR		
	Pln K	RRSRKNGI	GYAIGYAFG	KAVERAVLGG	SRDYNK		
Plantaricine NC8	PlnNC8 α	DLTTKLWSSW	GYTLG	KKARWNLKHPYVQF			
	PlnNC8 β	SVPTS	VYTLG	IKILW	SAYTHRTTIKIS	FNKGFYH	
Plantaricine S	Pls α	RNKLAYNM	GHTYAG	KATIFGLAAWALLA			
	Pls β	KKKKQSWY	AAAGD	IVISFGEGLNAW			
Salivaricine P	Sln 1	KRGPN	CVGNFLGGLFAG	AAAGVPLG	PPG	GIVGGANLGMVGG	ALTCL
	Sln 2	KNGYGGSGNRWVHCG	GIVGGALIGAIGG	PWSAVF	GGISGG	FASCH	
ABP-118	Abp118 α	KRGPN	CVGNFLGGLFAG	AAAGVPLG	PPG	GIVGGANLGMVGG	ALTCL
	Abp118 β	KNGYGGSGNRWVHCG	GIVGGALIGAIGG	PWSAVF	GGISGG	FTSCR	
Entéroccine 1071	Ent1071A	ESVFSKI	GNVAG	PAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH			
	Ent1071B	GPGKWLPWLQPAYDFVT	GLAKG	IGKEGNKDKWKNV			
Entéroccine C	Ent C1	ESVFSKI	GNVAG	PAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH			
	Ent C2	GPGKWLPWLQPAYDFVT	GLAKG	IGKEGNKDKWKNV			
Mutacine IV	Nlm A	KVSGGE	AVAAIGICATASAAT	GGIAC	ATLVTPYCVGTWGLIRSH		
	Nlm B	DKQAAD	TFLSAVG	GAASC	FTYCASNGVWHPILAGCAGVGAVGSVVFP		
Thermophiline 13	Thm A	AYSQK	DCLKDMGGYALF	GAGSGALNGAPAG	GVGALPGAFVGAHVGA	IAGGFACMGGMIG	NKFN
	Thm B	QINK	GSVVHCIGG	AIIGGAIFSGGAAAG	VCCLVCSGKAIINGL		
Brochocine C	Brc A	YSSKD	CLKDI	GKIGAGTVAGAAGGGLAAG	GAIPGAFVGAHFGVIGG	SAACH	IGILLN
	Brc B	KINW	GNVGGSCVGG	AVIGGALGGLGAGGGCITG	AIKSIWDQW		

Figure 27. Séquence en acides aminés des bactériocines de classe IIb.

Le motif GXXXG caractéristique des bactériocines de classe IIb est surligné en bleu où X représente n'importe quel acide aminé. Les plantaricines S β et NC8 β possèdent respectivement un motif AXXXXA et SXXXXS au lieu de GXXXG ; ils sont surlignés en vert (Makhoulfi, 2011).

- La troisième sous-classe, ou classe **IIc** regroupe les bactériocines qui subissent des modifications post-traductionnelles liant de façon covalente les extrémités N- et C-terminales, formant ainsi des bactériocines circulaires, via un mécanisme enzymatique encore mal connu à ce jour (Figure 28). La structure circulaire est responsable de la protection de ces bactériocines

à l'égard de la protéolyse, en raison de l'absence de site de clivage aux exopeptidases (Maqueda *et al.*, 2008). Aujourd'hui 8 bactériocines circulaires ont été identifiées, en excluant la subtilosine A et la thuricine CD qui, malgré le fait qu'elles soient circulaires, sont considérées comme des bactériocines de classe I en raison des importantes modifications post-traductionnelles qu'elles comportent (Rea *et al.*, 2011). Parmi elles, l'entérotoxine AS-48, la première et la plus étudiée, produite par *Streptococcus faecalis* (Gálvez *et al.*, 1986). Toutes les bactériocines de classe IIc sont produites par des bactéries lactiques à l'exception de la circularine A produite par *Clostridium beijerinckii* et la butyrivibriocine AR10 produite par *Butyrivibrio fibrisolvens* (Rea *et al.*, 2011).

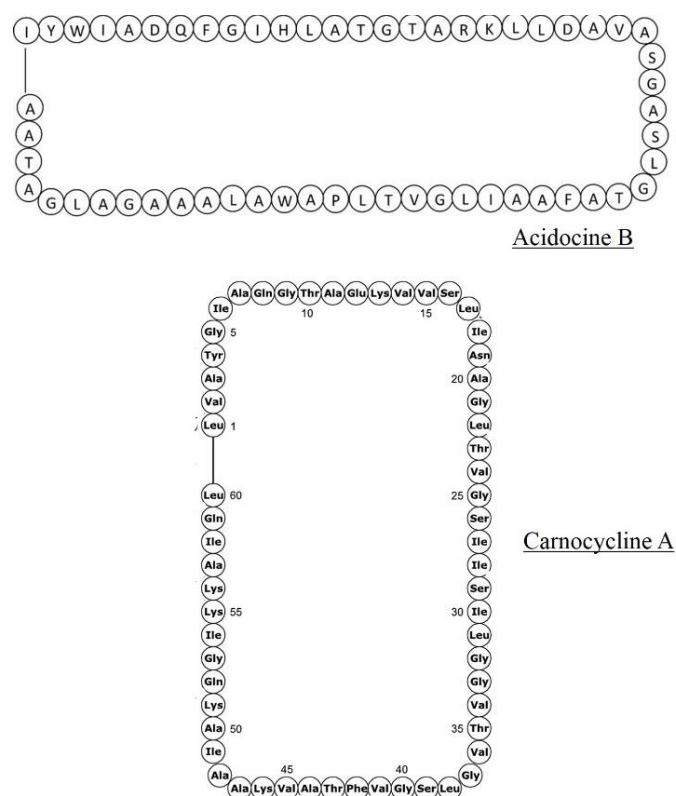


Figure 28. Structure des bactériocines de classe IIc : l'acidocine B et la carnocycline A. Les extrémités N- et C- terminales sont liées de façon covalente formant ainsi des bactériocines circulaires (liaison représentée par un trait noir) (Acedo *et al.*, 2015 ; Martin-Visscher *et al.*, 2008).

- Le quatrième sous-classe est la classe **IIId** qui regroupe toutes les bactériocines qui ne sont pas modifiées post-traductionnellement, ni « pediocin-like », à un seul peptide et qui sont linéaires (Rea *et al.*, 2011). Ainsi, ce groupe est très hétérogène et contient des peptides antimicrobiens qui ne possèdent aucun critère leur permettant d'être classés dans l'une des

3 sous-classes précédentes. Trente et une bactériocines appartiennent à cette sous-classe, dont la lactococcine A, la première à avoir été isolée et la mieux caractérisée. Elles sont principalement produites par des bactéries lactiques, mais ont aussi été isolées chez *Staphylococcus*, *Weissella* sp. ou encore *Propionibacterium* sp. (Heng *et al.*, 2007 ; Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

Bactériocines de classe III et IV

Ces deux classes de bactériocines sont beaucoup moins étudiées que les classes I et II. Contrairement aux bactériocines de classe I et II qui sont des peptides de moins de 5 kDa, les bactériocines des classes III et IV sont, respectivement, des protéines et des complexes protéiques composés d'un ou plusieurs groupes fonctionnels, de nature lipidique ou carbohydrate. Les protéines de classe III sont sensibles à la chaleur et sont souvent associées à une activité enzymatique. En 2005, Paul Cotter a proposé que dans la mesure où les peptides de la classe III sont des enzymes lytiques, ils devraient en fait être considérés comme des bactériolysines, et non comme des bactériocines (Cotter *et al.*, 2005).

4.1.1.2 Production par les bactéries à Gram négatif

En plus des peptides antimicrobiens produits par les bactéries lactiques à Gram positif, des bactériocines ont également largement été caractérisées chez les bactéries à Gram négatif, en particulier *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries. Pour des raisons historiques, les plus étudiées sont des protéines appelées colicines. Parallèlement aux colicines, d'autres bactériocines également produites par la famille des Enterobacteriaceae, mais de plus petite masse molaire et résistantes aux protéases ont été identifiées dès 1976 et sont appelées microcines (Asensio et Pérez-Díaz, 1976). Il est amusant de noter que la première bactériocine mise en évidence en 1925 par Gratia, la colicine V, est en réalité une microcine du fait de sa faible masse moléculaire et de ses caractéristiques structurales.

Colicines

Les colicines sont des protéines bactéricides de hautes masses moléculaires (30-80 kDa) produites par de nombreuses souches d'*E. coli* en situation de stress (Rebuffat, 2011). Contrairement à la classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif qui repose principalement sur des critères structuraux, la classification des colicines repose sur deux critères, leur mode d'action et les mécanismes de reconnaissance utilisés par les colicines pour être internalisées par les bactéries cibles (Rebuffat, 2011 ; Zamaroczy et Chauleau, 2011). Les récepteurs impliqués dans l'étape de reconnaissance sont associés à une ou deux machineries protéiques appelées Ton et Tol (Cascales *et al.*, 2007). Ces deux machineries sont ancrées dans la membrane et fournissent de l'énergie aux récepteurs. Les colicines de groupe A requièrent le système Tol et celles du groupe B, le système Ton. Les groupes A et B sont aussi séparés en fonction de la taille du plasmide qui code les colicines des deux groupes et le mécanisme de libération des colicines : les colicines du groupe A sont codées par des petits plasmides et libérées dans le milieu de culture alors que les colicines de groupe B sont codées par de grands plasmides et ne sont pas libérés dans le milieu extracellulaire (Cascales *et al.*, 2007). Le groupe A est composé des colicines A, E1 à E9, K, N, U et S4 alors que le groupe B comprend les colicines B, D, Ia, M, 5 et 10 (Rebuffat, 2011).

Microcines

Les microcines sont des peptides de masse moléculaire comprise entre 1 et 10 kDa et qui sont généralement résistantes aux protéases ainsi qu'aux pH et températures extrêmes (Duquesne *et al.*, 2007). Etant donné la diversité structurale des microcines et l'hétérogénéité de leurs modes d'action, l'élaboration d'une classification de ces peptides antimicrobiens est une tâche difficile. Les microcines sont aujourd'hui divisées en deux classes établies selon trois critères : (1) la présence, nature et localisation des modifications post-traductionnelles, (2) l'organisation du cluster de gènes responsable de leur biosynthèse et (3) la séquence de leurs peptides précurseurs (Duquesne *et al.*, 2007). La première classe regroupe les peptides ayant une masse moléculaire inférieure à 5 kDa et qui ont subi d'importantes modifications post-traductionnelles. Cette classe est composée des microcines B17, C7/C51 et J25. Pour la microcine B17, 14 acides aminés sur 43 sont modifiés post-traductionnellement pour conduire à des structures originales comme des cycles thiazoles et oxazoles résultant de la déshydratation et la déshydrogénation des acides aminés Gly-Ser (oxazole) et Gly-Cys (thiazole) (Bayer *et al.*,

Les cycles oxazole de la microcine B17 sont entourés en rouge et les cycles thiazoles son entourés en vert. (Maksimov *et al.* ; Severinov *et al.*, 2007 ; Yorgey *et al.*, 1993)

et qui ne subissent pas de modifications post-traductionnelles, mais dont certaines possèdent des ponts disulfures. A l'opposé, la classe IIb regroupe les microcines codées par un gène localisé sur le chromosome qui présentent une modification post-traductionnelle ancrée à l'extrémité C-terminale. Cette modification est un sidérophore. Les microcines qui composent ce groupe sont les microcines E492, M, H47 et potentiellement I47 et G47 (Duquesne *et al.*, 2007 ; Vassiliadis *et al.*, 2010).

Autres bactériocines produites par les bactéries à Gram négatif

Bien que les colicines et les microcines soient les peptides antimicrobiens les plus étudiés chez les bactéries à Gram négatif, *E. coli* n'est pas la seule espèce à produire des bactériocines. En effet, un nombre limité de bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif différentes d'*E. coli* ont été mises en évidence. Certaines d'entre elles présentent des caractéristiques communes avec les colicines, comme les pyocines produites par les espèces du genre *Pseudomonas*, les lumicines produites par *Photorhabdus luminescens*, les pesticines produites par *Yersinia pestis*, ou encore les klebicides produites par *Klebsiella pneumoniae* (Chhibber et Vadehra, 1986 ; Elgat et Ben-Gurion, 1969 ; Osman, 1965 ; Sharma *et al.*, 2002).

D'autres peptides antimicrobiens, s'apparentant davantage aux microcines qu'aux colicines, sont produits principalement par des souches des genres *Vibrio*, *Myxococcus* et *Aeromonas*. Ces bactériocines sont appelées BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances) (Rebuffat, 2011). Un nombre restreint de BLIS ont été bien identifiées. Pour la plupart, elles ont été purifiées et/ou caractérisées partiellement et ne sont de ce fait pas sujettes à entrer dans une classification. Bien que beaucoup de bactériocines aient été découvertes à ce jour, un nombre limité d'entre elles ont été entièrement caractérisées au niveau de leur structure, mécanisme d'action... La suite de cette partie illustre les caractéristiques connues à ce jour pour les bactériocines.

4.1.2 Biosynthèse

Bien qu'une bactériocine soit souvent reliée à sa souche productrice, nous savons maintenant qu'un grand nombre de souches sont capables de produire deux bactériocines ou plus (Gordon et O'Brien, 2006 ; Vassiliadis *et al.*, 2010). Une étude a montré que parmi 102 souches bactériennes productrices de bactériocines isolées de matière fécale humaine, 42 %

étaient capables de produire un type de bactériocine, 41 % d'en produire deux, 16 % d'en produire trois et une souche était capable de produire quatre bactériocines différentes (Gordon et O'Brien, 2006). A titre d'exemple, les gènes codant les deux microcines H47 et M sont souvent présents chez la même souche (Vassiliadis *et al.*, 2010). Cependant, une souche peut posséder un seul cluster de gènes qui conduira à la biosynthèse de plusieurs bactériocines. C'est le cas des souches d'*E. coli* qui hébergent un seul cluster de gènes codant les microcines M et H47 (Vassiliadis *et al.*, 2010).

4.1.2.1 Localisation des gènes

Les gènes codant les bactériocines peuvent être plasmidiques ou bien portés par le chromosome de la souche productrice. Parmi les microcines, celles appartenant aux classes I et IIa sont codées par des gènes plasmidiques, alors que les microcines de la classe IIb sont codées par des gènes localisés sur le chromosome (Duquesne *et al.*, 2007). Pour les colicines, les gènes de biosynthèse sont localisés sur un plasmide, à l'exception de la bactériocine 28b colicin-like produite par *Serratia marcescens* dont le gène codant est chromosomique (Cascales *et al.*, 2007 ; Riley et Wertz, 2002). Plusieurs plasmides peuvent coder la même colicine. C'est le cas de la colicine E1 codée par les plasmides pML30 et pJC411 qui possèdent une séquence et une organisation plasmidique différentes ainsi que des produits de gènes avec des compositions en acides aminés différentes (Cascales *et al.*, 2007). Enfin, le gène codant la pyocine est localisé sur le chromosome de *Pseudomonas aeruginosa* (Kaur et Kaur, 2015). Pour les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif, aucune généralité ne peut être formulée puisque les gènes peuvent aussi bien être localisés sur un plasmide conjugatif (exemples : bactériocine de classe I : nukacine ; bactériocines de classe IIc : entéroline AS-48, gasséricine A), ou sur le chromosome (exemples : classe I : subtiline ; classe IIa : divercine V41, entéroline A, sakacine P ; classe IIc : butyrivibriocine AR10, circularine A, subtilosine, ubérolisine) ou bien sur des éléments transposables présents sur le chromosome (exemple : nisine (Horn *et al.*, 1991)), tels que des transposons (Nishie *et al.*, 2012). Ces dernières caractéristiques peuvent expliquer le fait que la production de bactériocines par les bactéries lactiques soit très répandue puisque les gènes impliqués dans la biosynthèse sont associés à des éléments qui permettent le transfert entre bactéries (Cotter *et al.*, 2005).

4.1.2.2 Organisation génétique

Les bactériocines ne sont pas codées par un gène unique mais par un système génétique composé d'au moins quatre gènes impliqués dans la régulation, la maturation, l'export et l'immunité de la souche productrice contre sa propre toxine. Des gènes codant des enzymes de modification post-traductionnelles peuvent également être présents. Ces gènes sont souvent organisés en clusters avec une ou plusieurs unités de transcription.

Chez les bactéries à Gram positif, le système génétique le plus étudié est celui de la nisine (Figure 30). Ce cluster est composé de 11 gènes : - le gène *nisA*, gène codant le peptide précurseur inactif de la nisine, - les gènes *nisB* et *nisC*, impliqués dans les modifications post-traductionnelles : ils codent deux enzymes réalisant la déshydratation de la sérine et de la thréonine respectivement en Dha et Dhb, - le gène *nisI* codant la protéine d'immunité, - les gènes *nisE*, *nisF*, *nisG*, qui codent un transporteur ABC impliqué dans le mécanisme d'immunité de la souche productrice (pompe d'efflux), - les gènes *nisT* et *nisP* qui codent respectivement un transporteur ABC et une enzyme responsable du clivage du peptide précurseur et enfin - les gènes *nisR* et *nisK* impliqués dans la régulation de la biosynthèse de la nisine (Figure 30).

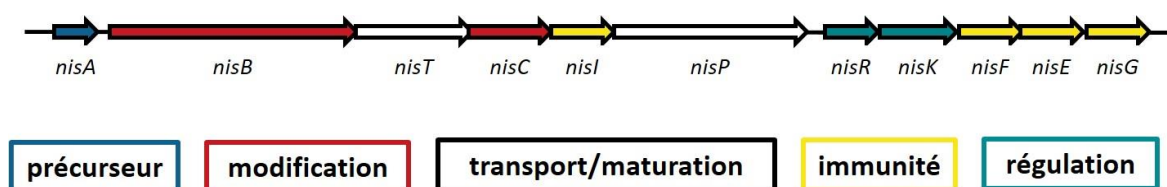


Figure 30. Organisation génétique du cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la nisine, bactériocine de classe I.

Les gènes sont représentés par des flèches dont la direction indique le sens de transcription. Le gène codant le précurseur est représenté en bleu. Les gènes dont la fonction est similaire sont représentés de la même couleur : rouge pour les gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles, blanc pour les gènes impliqués dans la maturation et le transport, jaune pour les gènes impliqués dans le mécanisme d'immunité et vert pour les gènes de régulation (McAuliffe *et al.*, 2001).

Chez les bactéries à Gram négatif produisant des colicines, les systèmes génétiques sont composés d'un gène codant la colicine, d'un ou plusieurs gène(s) impliqués dans le mécanisme d'immunité de la souche productrice et d'un gène qui code une protéine de lyse ou de relargage impliquée dans l'excrétion de la colicine vers le milieu extracellulaire, quel que soit le groupe A ou B auquel appartient la colicine (Figure 31).

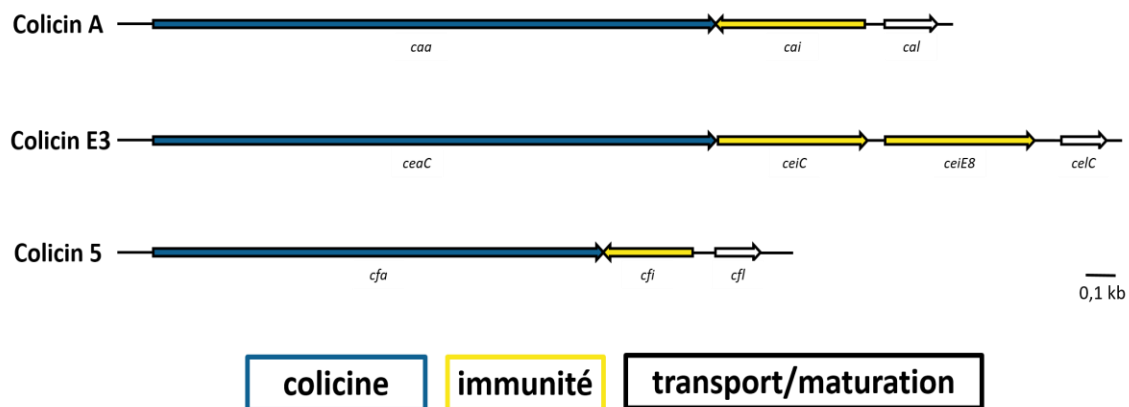


Figure 31. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des colicines A et E3, de groupe A et de la colicine 5 du groupe B (Braun *et al.*, 2002).

Les gènes sont représentés par des flèches dont la direction indique le sens de transcription. Les gènes codant la colicine (gènes cxa pour « colicin x activity », avec x le nom de la colicine) sont représentés en bleu, les gènes impliqués dans le mécanisme d'immunité (gènes cxi pour « colicin x immunity », avec x le nom de la colicine) sont représentés en jaune et les gènes impliqués dans l'export (gènes cxi pour « colicin x lysis », avec x le nom de la colicine) sont représentés en blanc.

Les systèmes génétiques des microcines sont plus complexes et contiennent un nombre plus élevé de gènes que ceux des colicines. Les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des microcines incluent le gène codant le précurseur de la microcine, qui peut être inactif mais qui dans certains cas possède une activité antimicrobienne, un ou plusieurs gènes impliqués dans la fonction d'immunité de la souche productrice, des gènes impliqués dans l'export et la maturation des microcines, et dans certains cas, des gènes impliqués dans des modifications post-traductionnelles. Les différents gènes peuvent être sous le contrôle d'un ou de plusieurs promoteurs, étant ainsi organisés en une ou plusieurs unités de transcription. A titre d'exemple chez les microcines de classe I, le système génétique de la microcine B17 possède trois promoteurs différents alors que celui de la microcine C7/C51 n'en possède qu'un (Figure 32).

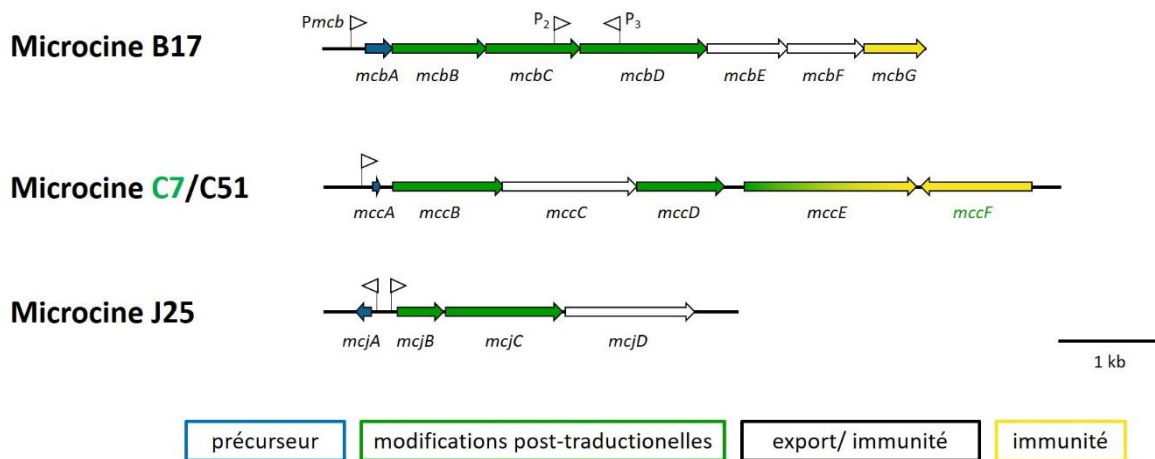


Figure 32. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des microcines B17, C7/C51 et J25.

Les gènes sont représentés par des flèches dont la direction indique le sens de transcription. Les gènes codant le précurseur de la microcine sont représentés en bleu. Les gènes dont la fonction est similaire sont représentés de la même couleur : vert pour les gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles, blanc pour les gènes impliqués à la fois dans l'export de la microcine et le mécanisme d'immunité et jaune, pour les gènes impliqués dans le mécanisme d'immunité exclusivement. (Duquesne *et al.*, 2007).

4.1.2.3 Maturation des bactériocines et sécrétion

Pour décrire les principes de base de la maturation des bactériocines, nous utiliserons ici la dernière nomenclature mise en place en 2012 à l'initiative de W. van der Donk et approuvée par l'ensemble de la communauté scientifique concernée (Figure 33) (Arnison *et al.*, 2012). Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif sont en général synthétisées sous forme de protéines précurseurs. Ces précurseurs incluent un peptide leader N-terminal attaché au futur peptide mature nommé peptide-cœur (core peptide) C-terminal (Figure 33). Le peptide leader peut assurer plusieurs fonctions : (i) il constitue un site de reconnaissance et dirige le prépeptide vers les protéines de maturation et de transport ; (ii) il protège la souche productrice en conservant la bactériocine dans sa forme inactive lorsque celle-ci est à l'intérieur de la souche productrice ; (iii) il interagit avec le domaine peptide-cœur et joue un rôle de protéine chaperone pour lui donner la bonne conformation afin qu'il interagisse avec les enzymes de la machinerie de modification (Perez *et al.*, 2014).

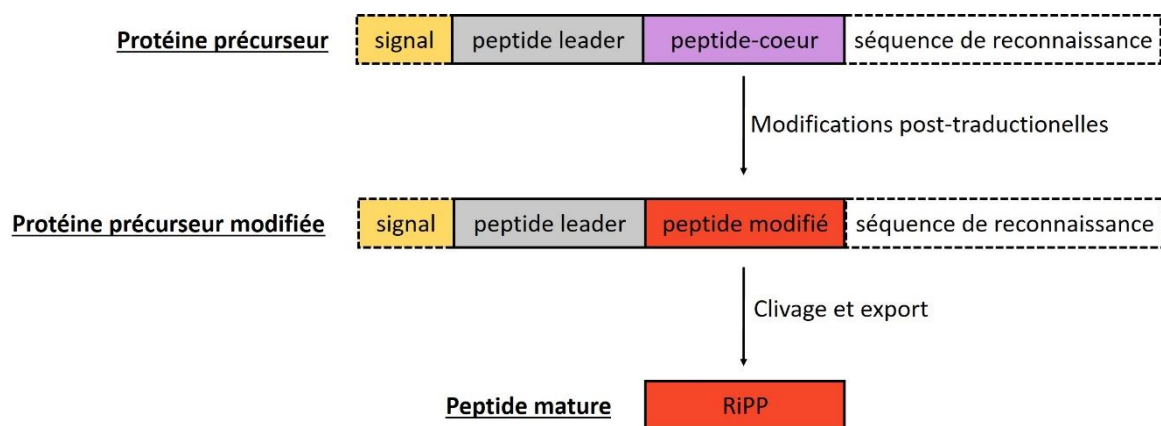


Figure 33. Maturation des bactériocines.

Le peptide cœur d'une protéine précurseur est modifié post-traductionnellement qui résulte en une protéine précurseur modifiée. Beaucoup de modifications post-traductionnelles sont guidées par le peptide leader. Le clivage de la protéine précurseur modifiée libère le peptide mature qui est un RiPP (peptide modifié post-traductionnellement synthétisé par la voie ribosomique). Certains peptides possèdent une séquence de reconnaissance à l'extrémité C-terminale importante pour l'excision et la cyclisation du peptide mature actif (Arnison *et al.*, 2012).

Les lantibiotiques sont les bactériocines qui subissent le plus de modifications post-traductionnelles. Ils sont traduits sous forme d'un précurseur qui contient le peptide leader et un peptide-cœur modifiable. Après que le précurseur ait subi des modifications (déshydratation des acides aminés et cyclisation), il est transporté à travers la membrane cytoplasmique et le peptide leader subit un clivage protéolytique par des enzymes spécifiques (Perez *et al.*, 2014). L'exemple de ce mécanisme est illustré dans la figure 34, avec la nisine A où le précurseur est adressé aux enzymes de modification NisB et NisC, respectivement une déshydratase et une cyclase, ainsi qu'à la protéine NisT, un transporteur ABC.

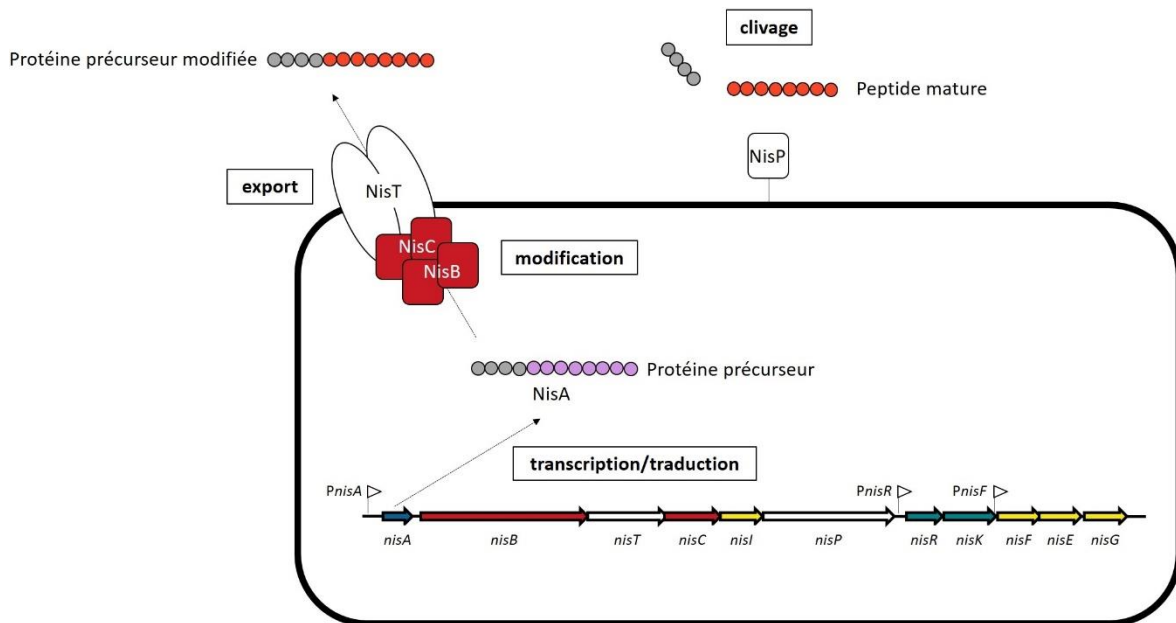


Figure 34. Maturation des lantibiotiques : exemple de la nisine A.

La protéine précurseur est codée par *nisA*. Elle est ensuite modifiée par les enzymes NisB et NisC avant d'être exportée par NisT. Le clivage de la protéine précurseur modifiée est catalysé par NisP. Les gènes *nisR*, *nisK*, *nisF*, *nisE* et *nisG* codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes d'immunité et de régulation de la production de nisine ne sont pas représentés sur ce schéma (Perez *et al.*, 2014).

Les bactériocines de classe II sont également synthétisées sous forme d'un précurseur inactif qui contient généralement un site de maturation protéolytique qui consiste en une double glycine. Le précurseur ne subit pas de modification importante, mais il est mûré par des enzymes spécifiques qui clivent le peptide leader simultanément à la translocation du peptide dans l'espace extracellulaire par un transporteur ABC (Ennahar *et al.*, 2000 ; Drider *et al.*, 2006).

Les microcines sont elles aussi traduites sous la forme d'un peptide précurseur qui comporte un peptide leader, à l'exception de la microcine C7/C51 (Guijjaro *et al.*, 1995). A titre d'exemple, la microcine B17 est traduite sous la forme d'un précurseur de 69 acides aminés qui est modifié et replié par l'action des trois protéines McbBCD, pour conduire au peptide-coeur. Ce dernier est ensuite converti en microcine B17 active suite à l'élimination du peptide leader N-terminal de 26 acides aminés par une protéase codée par le chromosome (Yorgey *et al.*, 1993). Le système d'export des microcines est généralement composé de trois éléments qui sont : un transporteur ABC, une protéine accessoire ancrée dans la membrane interne, et la protéine de la membrane externe TolC, codée par le chromosome et utilisée chez les bactéries pour l'excrétion de diverses molécules (Zgurskaya *et al.*, 2011).

Les colicines ne sont pas synthétisées sous la forme de protéine précurseur mais sous une forme active qui sera sécrétée dans le milieu extracellulaire grâce à une protéine de lyse. Les protéines de lyse permettent la libération des colicines en provoquant la lyse de la souche productrice. La production d'une colicine est donc un processus létal pour la souche productrice.

4.1.3 Mode d'action

Un grand nombre de bactériocines possèdent des cibles externes comme la paroi ou la membrane cytoplasmique. Les parois des bactéries à Gram positif et Gram négatif ont une composition différente et le mécanisme d'action qui les cible sera donc différent (Figure 35).

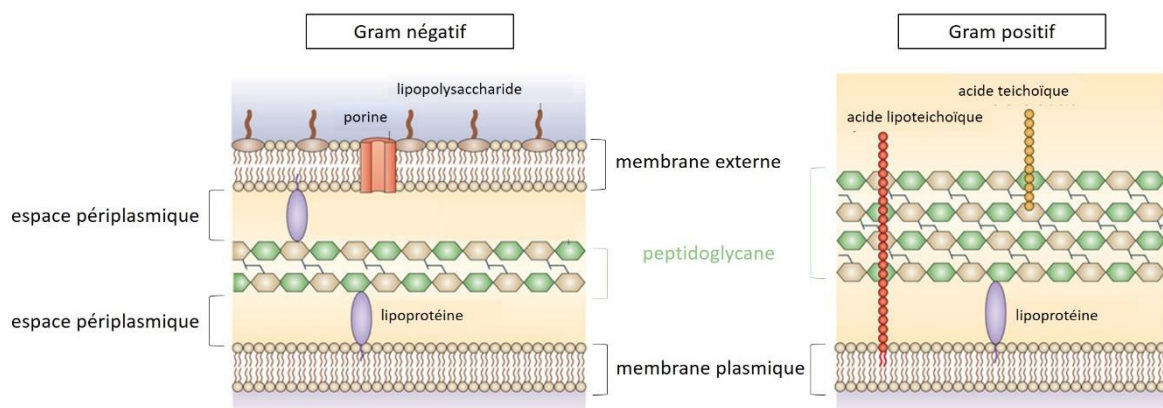


Figure 35. Paroi des bactéries à Gram négatif et Gram positif.

L'espace intracellulaire est représenté en violet, l'espace périplasmique est représenté en jaune et l'espace extracellulaire est représenté en bleu. La paroi des bactéries à Gram négatif consiste en un polymère fin dans l'espace périplasmique entre la membrane interne et la membrane externe. La membrane externe contient des lipopolysaccharides et des porines impliquées dans le transport. Les bactéries à Gram positif possèdent une unique membrane plasmique, entourée d'une paroi composée du peptidoglycane et des acides lipoteichoïques (Brown *et al.*, 2015).

Certains antibiotiques ont un double mécanisme d'action : la perméabilisation de la membrane plasmique et l'inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane. Dans ce double mécanisme d'action, le lipide II, qui est un intermédiaire de la biosynthèse du peptidoglycane, sert de molécule d'ancrage, à la fois pour provoquer l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et la formation de pores dans la membrane plasmique. L'exemple de ce double mécanisme d'action est illustré par le cas de la nisine. La nisine possède cinq cycles a, b, c,

d et e dans sa structure finale (Figure 36). Les deux cycles N-terminaux, a et b, piègent le lipide II de la membrane cible. Ce complexe est stabilisé par des liaisons hydrogène établies avec les molécules de phosphate du lipide II (Figure 36). Le lipide II étant un intermédiaire de la biosynthèse du peptidoglycane ancré dans la membrane cytoplasmique, sa séquestration par la nisine inhibe la biosynthèse du peptidoglycane (Breukink et de Kruijff, 2006 ; de Kruijff *et al.*, 2008).

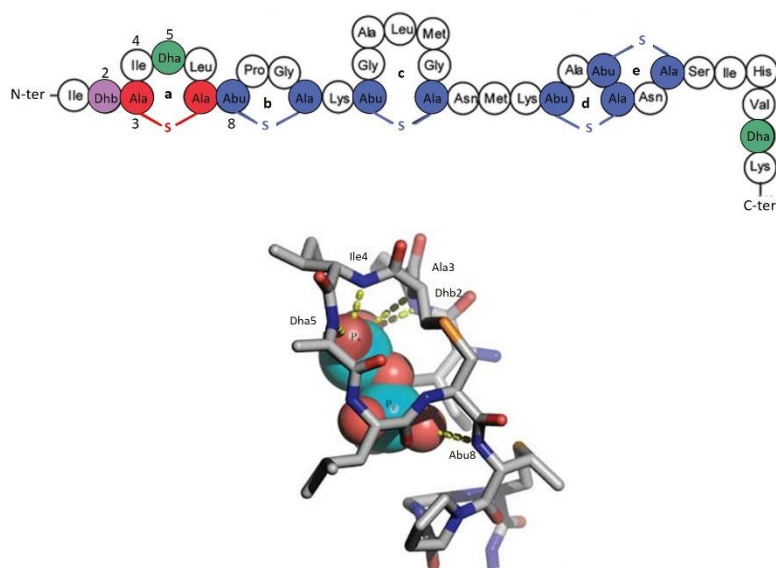


Figure 36. Interaction de la nisine avec le lipide II.

La nisine possède cinq cycles (indiqués par les lettres a à e). Les cycles a et b piègent le motif pyrophosphate du lipide bleu (représenté en bleu). Le complexe est stabilisé par des liaisons hydrogène représentées en jaune. Les résidus Lan sont indiqués en rouge et les résidus MeLan sont indiqués en bleu (Breukink et de Kruijff, 2006).

L'interaction de la nisine et du lipide II est aussi la première étape de la formation de pores dans la membrane cytoplasmique : (a) les monomères de nisine atteignent la membrane plasmique où (b) ils se fixent au lipide II ; (c) les monomères de nisine adoptent une orientation transmembranaire qui résulte en la formation d'un pore constitué de 8 molécules de nisine et de 4 molécules de lipide II (Figure 37) (Breukink *et al.*, 2003). La formation de pores conduit à l'efflux des molécules intracellulaires et à la mort de la cellule. Les deux mécanismes de cette double action sont associés et s'exercent conjointement, ce qui explique les très faibles CMI de la nisine, de l'ordre du nanomolaire. La nisine n'est pas le seul antibiotique à avoir un double mécanisme d'action puisqu'il est aussi utilisé par d'autres antibiotiques de type A comme la lacticine 481, la nukacine ISK-1 ou encore la mutacine II.

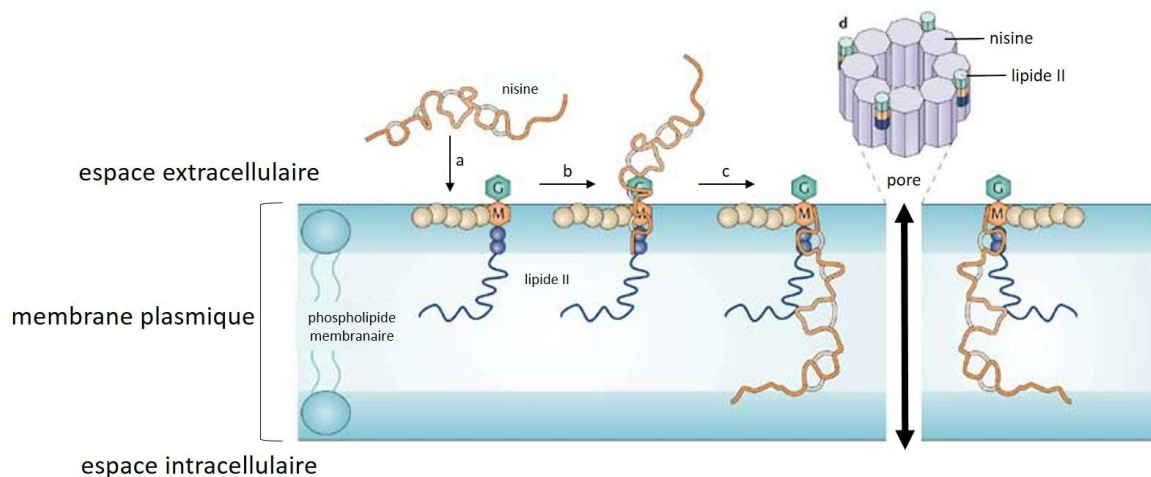


Figure 37. Mécanisme de la formation de pores dans la membrane plasmique par la nisine. Les monomères de nisine atteignent parallèlement la membrane plasmique de la cellule cible (a) et se fixent au lipide II (b). L'interaction de la nisine et du lipide II conduit à un changement d'orientation de la nisine dont l'extrémité C-terminale insérée dans la membrane forme un pore (c). La membrane plasmique est représentée en bleu (Breukink et de Kruijff, 2006).

Les bactériocines de classe IIa forment aussi des pores dans la membrane de la bactérie cible. Cependant, le lipide II n'est pas toujours impliqué dans ce processus. C'est le cas de la pédiocine PA-1 qui utilise en tant que récepteur un composant du transport du mannose, la phosphotransférase (Man-PTS), et exerce son activité antimicrobienne par dissipation de la force proto-motrice *via* la formation de pores (Figure 38). Des études récentes ont permis d'identifier de nouvelles cibles localisées dans la membrane des bactéries à Gram positif : le transporteur ABC du maltose est la cible des bactériocines circulaires de la classe IIc, la metallopeptidase zinc-dépendante est la cible des bactériocines de la classe IId et la pyrophosphate phosphatase semble être la cible des bactériocines de la classe IIb (Gabrielsen *et al.*, 2012 ; Uzelac *et al.*, 2013 ; Kjos *et al.*, 2014) (Figure 38).

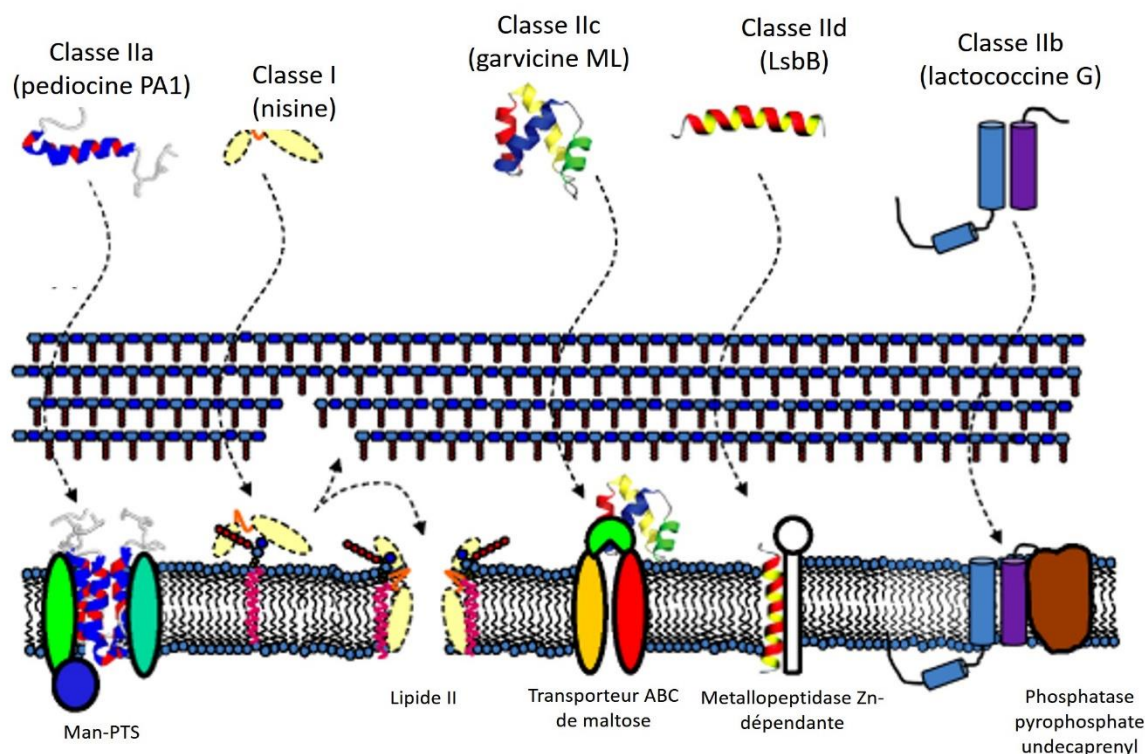


Figure 38. Cibles des bactériocines contre les bactéries à Gram positif.

Les bactériocines de classe IIa cible le système de transport du mannose (man-PTS), les bactériocines de classe I ont un mécanisme d'action qui implique le lipide II. Les bactériocines de la classe IIc cible le transporteur ABC du maltose. Le mécanisme cible des bactériocines de la classe IIId implique la metallopeptidase dépendante au zinc et les bactériocines de classe IIb cibleraient la phosphatase pyrophosphate (Cotter, 2014).

Il existe également des bactériocines qui ont des cibles intracellulaires. C'est le cas des microcines de classe I qui ciblent des enzymes impliquées dans la synthèse ou la structure de l'ADN/ARN. La microcine B17 inhibe l'ADN gyrase, enzyme de la famille des topoisomérases de classe II impliquée dans la topologie de l'ADN et la réplication chez les bactéries (Herrero et Moreno, 1986 ; Laviña *et al.*, 1986 ; Vizán *et al.*, 1991 ; del Castillo *et al.*, 2001). A ce jour, le mécanisme de cette inhibition n'est pas complètement élucidé mais il a été montré que la microcine B17 provoquait un piège irréversible pour le complexe ADN-gyrase, conduisant à l'accumulation de cassures de l'ADN double brin et une inhibition de la réplication (Vizán *et al.*, 1991). La microcine C7/C51 a pour cible l'aspartyl-ARNt synthétase, et est donc un inhibiteur de traduction des protéines (Garcia-Bustos *et al.*, 1985 ; Guijarro *et al.*, 1995). La microcine J25 cible l'ARN polymérase et inhibe ainsi la transcription. La microcine J25, en se fixant dans le deuxième canal de l'ARN polymérase, l'obstrue et bloque le passage des nucléosides triphosphate *via* ce canal (Delgado *et al.*, 2001 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2004) (Figure 39).



Figure 39. Obstruction du second canal de l'ARN polymérase par la microcine J25.

Les modèles du complexe ARNp-microcine J25 sont représentés en vue latérale (en haut) et vue de haut. L'ARNp est représentée en bleu. La microcine J25 est représentées en vert, rouge et violet. Les chiffres jaunes indiquent les sites de substitutions de l'ARNp qui confère la plus grande résistance à la microcine J25 (Mukhopadhyay *et al.*, 2004).

4.1.4 Mécanisme d'immunité

La production de bactériocines s'accompagne toujours d'un mécanisme d'immunité permettant aux bactéries productrices de se protéger contre l'action de leur propre toxine. Les bactéries produisant des bactériocines possèdent un système d'immunité, dont les gènes codants sont localisés dans les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines.

4.1.4.1 Protéines d'immunité

La fonction de résistance, ou d'immunité, peut être assurée par des protéines impliquées dans une double fonction de transport et d'immunité de la bactériocine, par des protéines exclusivement dédiées à la fonction d'immunité (appelées protéines d'immunité), ou encore par une combinaison des deux.

Le système d'immunité des souches de *Lactococcus lactis* produisant la nisine implique plusieurs gènes différents : les gènes *nisI*, *nisF*, *nisE* et *nisG* (Figure 30, page 87) (Stein *et al.*, 2003). Seul le gène *nisI* code une protéine dédiée uniquement à l'immunité, alors que les trois autres gènes *nisF*, *nisE* et *nisG* sont aussi impliqués dans l'export de la nisine (Stein *et al.*, 2003). Pour les microcines de classe I, les mécanismes d'immunité et de transport sont également étroitement liés, avec au moins un gène impliqué dans les deux mécanismes. Pour la microcine J25, le mécanisme d'immunité implique une seule protéine McjD, impliquée dans l'export et l'immunité, alors que pour les microcines C7 et B17, le mécanisme d'immunité implique plusieurs protéines, dont au moins l'une est impliquée à la fois dans l'export et l'immunité de la microcine (Figure 32, page 91) (Garrido *et al.*, 1988 ; González-Pastor *et al.*, 1995 ; Solbiati *et al.*, 1996 ; Duquesne *et al.*, 2007). Enfin, les souches productrices de microcines de la classe II possèdent des protéines uniquement dédiées à la fonction d'immunité. Pour ces microcines, le gène codant la protéine d'immunité est situé en tandem avec celui qui code le précurseur de la microcine (Figure 40).

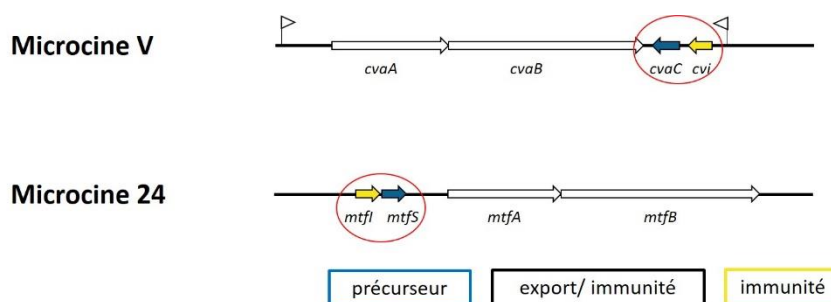


Figure 40. Cluster des gènes de biosynthèse des microcines V et 24.

Les gènes codant le précurseur (en bleu) et la protéine d'immunité (en jaune) sont situés en tandem et entourés en rouge. Les gènes sont colorés selon la fonction dans laquelle ils sont impliqués (Duquesne *et al.*, 2007).

4.1.4.2 Mécanismes d'immunité

Bien que plusieurs gènes aient été identifiés comme impliqués dans la fonction d'immunité, les mécanismes propres d'immunité sont seulement partiellement compris pour la plupart des bactériocines (Bastos *et al.*, 2015). Des mécanismes d'immunité différents sont rencontrés au sein d'une même famille de bactériocine. A titre d'exemple, parmi les bactériocines de classe II, au moins deux mécanismes d'immunité reposant sur des bases différentes ont été décrits. Le

premier repose sur la formation d'un complexe protéine d'immunité-peptide actif. C'est par exemple le cas de la lactococcine A, dont la protéine d'immunité LciA forme un complexe à trois composants avec le peptide actif et son récepteur cible, Man-PTS, conférant ainsi l'immunité à la cellule productrice (Diep *et al.*, 2007). Le second mécanisme d'immunité utilisé par des souches productrices de bactériocines de classe II est basé sur l'activité de metalloprotéases fixées dans la membrane. Ces protéases sont susceptibles de dégrader directement la bactériocine ou de modifier le récepteur de cette bactériocine (Kjos *et al.*, 2010).

Pour les lantibiotiques, le mécanisme d'immunité repose sur l'action d'une ou plusieurs protéine(s) d'immunité, LanI ou LanH, qui se fixe(nt) à la bactériocine au niveau de la membrane cellulaire, ainsi que d'un transporteur ABC, LanFEG qui exporte la bactériocine (Figure 41) (Nishie *et al.*, 2012 ; Bastos *et al.*, 2015). Les protéines LanI et LanH seules ne sont pas capables de conférer une entière immunité et doivent coopérer avec LanFEG pour efficacement protéger la souche productrice (Nishie *et al.*, 2012). LanI et LanH peuvent être de plusieurs natures : lipoprotéines (NisI de la nisine et SpaI de la subtiline) (Figure 41, A), peptides présents sur la membrane ou dans l'espace extracellulaire (PepI de Pep5 et EciI de l'épicidine), ou encore protéines transmembranaires (LtnI de la lacticine 3147 et NukH de la nukacine ISK-1) (Figure 41, B) (Nishie *et al.*, 2012).

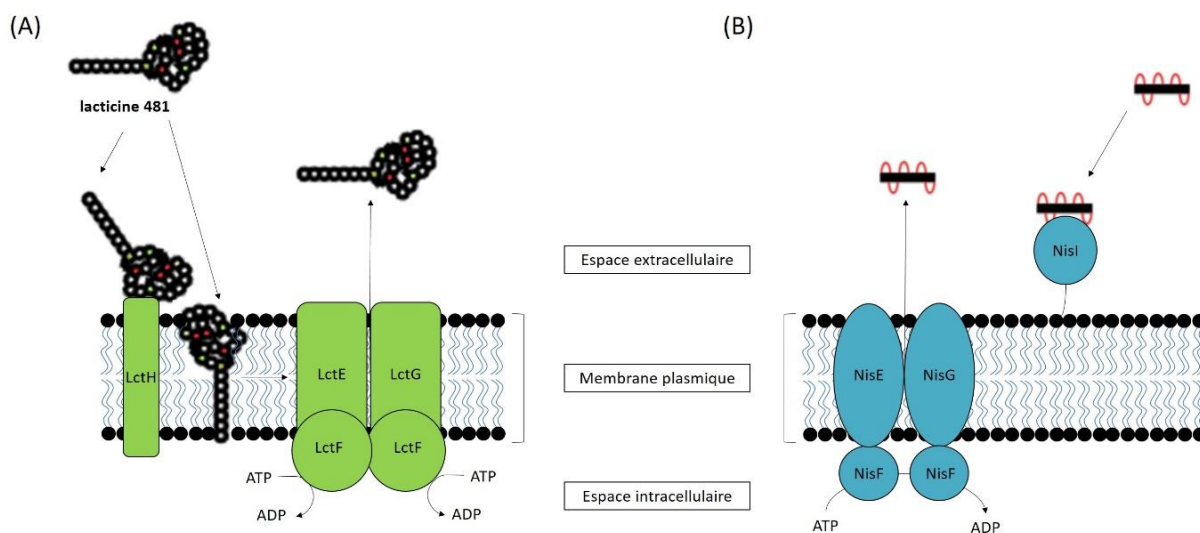


Figure 41. Mécanisme d'immunité des lantibiotiques du groupe de la lacticine 481 (A) et de la nisine (B).

Les protéines d'immunité LanI ou LanH (respectivement LctH et NisI pour les lantibiotiques du groupe de la lacticine 481 et la nisine) sont des lipoprotéines (NisI pour la nisine) ou des protéines transmembranaires (LctH pour les lantibiotiques du groupe de la lacticine 481) qui fixent la toxine. Les bactériocines sont expulsées vers l'espace extracellulaire par les transporteurs ABC LanFEG (Dufour *et al.*, 2007 ; Nishie *et al.*, 2012).

Pour les colicines, le mécanisme d'immunité varie en fonction du mécanisme d'action mais la base du mécanisme est toujours la même : formation d'un complexe entre la colicine et la protéine d'immunité. Dans le cas des colicines qui présentent une activité nucléase et dont la cible est l'ADN/ARN qu'elles dégradent, la protéine d'immunité est exprimée constitutivement afin de neutraliser la colicine endogène synthétisée sous sa forme active. Cette dernière est synthétisée sous la forme d'un complexe inactif, protéine d'immunité-colicine. La protéine d'immunité se détachera ensuite de la colicine qui sera transportée dans le cytoplasme afin d'exercer son activité nucléase et tuer les cellules cibles. Pour les colicines qui forment des pores dans la membrane des bactéries cibles, comme la colicine A, la protéine d'immunité interagit directement avec le domaine responsable de la formation des pores à la membrane interne et bloque la formation ou l'activité du canal (Espesset *et al.*, 1996). Les colicines qui ont pour cible le peptidoglycane, comme la colicine M, la protéine d'immunité est localisée dans le périplasme et interagit avec la colicine avant que celle-ci n'atteigne le peptidoglycane (Cascales *et al.*, 2007).

4.1.5 Rôle écologique des bactériocines

Selon Klaenhammer, 99 % des bactéries produiraient au moins une bactériocine (Klaenhammer, 1988). En raison de leur conservation au sein du phylum des bactéries, il est facilement concevable que les bactériocines aient une fonction essentielle au sein des communautés microbiennes (Riley et Wertz, 2002). Ces dernières pourraient être une arme employée par les bactéries pour leur conférer un avantage sélectif dans la compétition pour la colonisation d'un même habitat et pour l'accès aux ressources, notamment nutritionnelles (Besse *et al.*, 2015). Les bactériocines ont un spectre d'activité relativement étroit et sont toxiques pour des bactéries proches de la bactérie productrice, ce qui implique qu'elles pourraient avoir un rôle dans la compétition contre des souches colonisant les mêmes niches écologiques. Les bactériocines pourraient tuer les compétiteurs pour permettre l'invasion d'une souche dans une communauté microbienne établie. Elles pourraient avoir également un rôle de défense et agir pour empêcher l'invasion d'autres souches ou espèces dans l'environnement que les bactéries productrices occupent. Néanmoins, des études récentes sur le rôle écologique des bactériocines ont inclus un troisième membre, en plus de la souche productrice de la toxine et de la souche sensible à cette même toxine. Ce troisième membre est une souche résistante à la

toxine mais qui n'est pas capable de la produire. Le mécanisme de résistance de cette souche a un coût énergétique, mais qui est inférieur au coût énergétique de la production de toxine. Un modèle écologique pour ces trois espèces a été proposé, se basant sur le jeu « pierre-feuille-ciseau ». Dans ce modèle, la souche productrice gagne contre la souche sensible grâce à l'effet de la toxine qu'elle produit. La souche sensible gagne contre la souche résistante car la souche résistante dépense plus d'énergie pour mettre en place son mécanisme de résistance. Enfin, la souche résistante gagne contre la souche productrice car le coût énergétique du mécanisme de résistance est inférieur à celui de production de la toxine (Riley et Wertz, 2002).

4.1.6 Applications

En plus de leur caractère naturel, les bactériocines ingérées avec la nourriture n'exercent pas d'effet significatif sur le microbiote intestinal puisqu'elles sont inactivées par les protéases digestives du tractus intestinal (Gálvez *et al.*, 2011). Grâce aux nombreux avantages que présentent les bactériocines, elles sont aujourd'hui utilisées dans l'industrie agroalimentaire, notamment en tant que conservateurs ou additifs. La nisine est la seule bactériocine dont l'utilisation en tant que conservateur a été approuvée pour de nombreux aliments par l'administration américaine U.S. Food et Drug Administration. Ce lantibiotique est commercialisé pour la préservation des aliments contre la contamination par les micro-organismes sous le nom de Nisaplin®. La pédiocine PA-1, qui inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* dans les produits carnés est aussi commercialisée sous le nom d'Alta®2341 (Settanni et Corsetti, 2008). Aussi, certaines bactériocines peuvent être incorporées aux aliments, en tant qu'additifs, afin d'améliorer leurs propriétés. C'est le cas de la nisine utilisée pour contrôler la croissance de *Lactobacilli mesenteroides*, majoritairement responsable du vieillissement du kimchi, plat traditionnel de Corée à base de légumes fermentés (Choi *et al.*, 2000). Aussi, l'enterocine AS-48 est utilisée comme additif dans le cidre car elle permet d'inactiver *Bacillus licheniformis*, productrice d'exopolysaccharides responsables de l'aspect gluant du cidre et de son apparence filamenteuse (Grande *et al.*, 2006).

Les bactériocines sont de bonnes molécules candidates dans la recherche d'alternatifs aux antibiotiques pour le traitement de maladies infectieuses. En effet, elles ciblent quatre des cinq cibles classiques des antibiotiques, à savoir la synthèse de la paroi cellulaire, la structure

de l'ADN, la synthèse des protéines ou encore l'intégrité membranaire (Figure 42) (Cavera *et al.*, 2015). A l'heure actuelle, plusieurs lantibiotiques présentent une activité antimicrobienne *in vitro* contre des pathogènes multi-résistants responsables d'infections nosocomiales : la lacticine 3147, les mutacines N-Ny266 et 1140, la nisine, la mersacidine, l'épidermine, Pep5 et la planosporicine présentent des activités contre des cibles cliniques pertinentes à savoir *Propionibacterium acne*, *Streptococcus mutants*, *Streptococcus pyogènes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Listeria* et des espèces de *Bacillus* (Field *et al.*, 2015). Plusieurs études *in vivo* ont confirmé les résultats obtenus *in vitro* et des lantibiotiques sont en cours d'essais cliniques et précliniques. Le lantibiotique NVB302 est entré en phase d'essais cliniques 1 en 2011 pour son utilisation contre *C. difficile* et a montré de bons résultats en 2012 (<http://midven.co.uk/new-antibiotic-compound-enters-phase-1-clinical-trial/>).

Les bactériocines inhibent également la croissance de pathogènes d'animaux et de plantes, tels que les souches d'*E. coli* productrices de shiga-toxine, les souches d'*E. coli* entérotoxigéniques, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium*, *Brenneria* spp. (Cotter *et al.*, 2013 ; Grinter *et al.*, 2012). Les colicines E1 et N purifiées présentent une forte activité *in vitro* contre les souches pathogènes entérotoxigéniques *E. coli* F4 et F18 qui sont responsables de diarrhées post-sevrage des porcelets. L'ajout de colicines E1 au régime alimentaire des porcelets conduit à une réduction de l'incidence des diarrhées post-sevrage et à une amélioration de la croissance des porcelets (Cutler *et al.*, 2007). En 2013, Jozefiak et son équipe ont utilisé une alimentation supplémentée en nisine pour nourrir des poulets. Cela leur a permis de réduire le nombre de *Bacteroidetes* et d'*Enterobacteriaceae* dans le tube digestif des poulets et d'obtenir des poulets avec une masse plus importante (Józefiak *et al.*, 2013). Ainsi, les bactériocines présentent un fort potentiel en vue de remplacer les antibiotiques dans l'alimentation des volailles et autres animaux d'élevage.

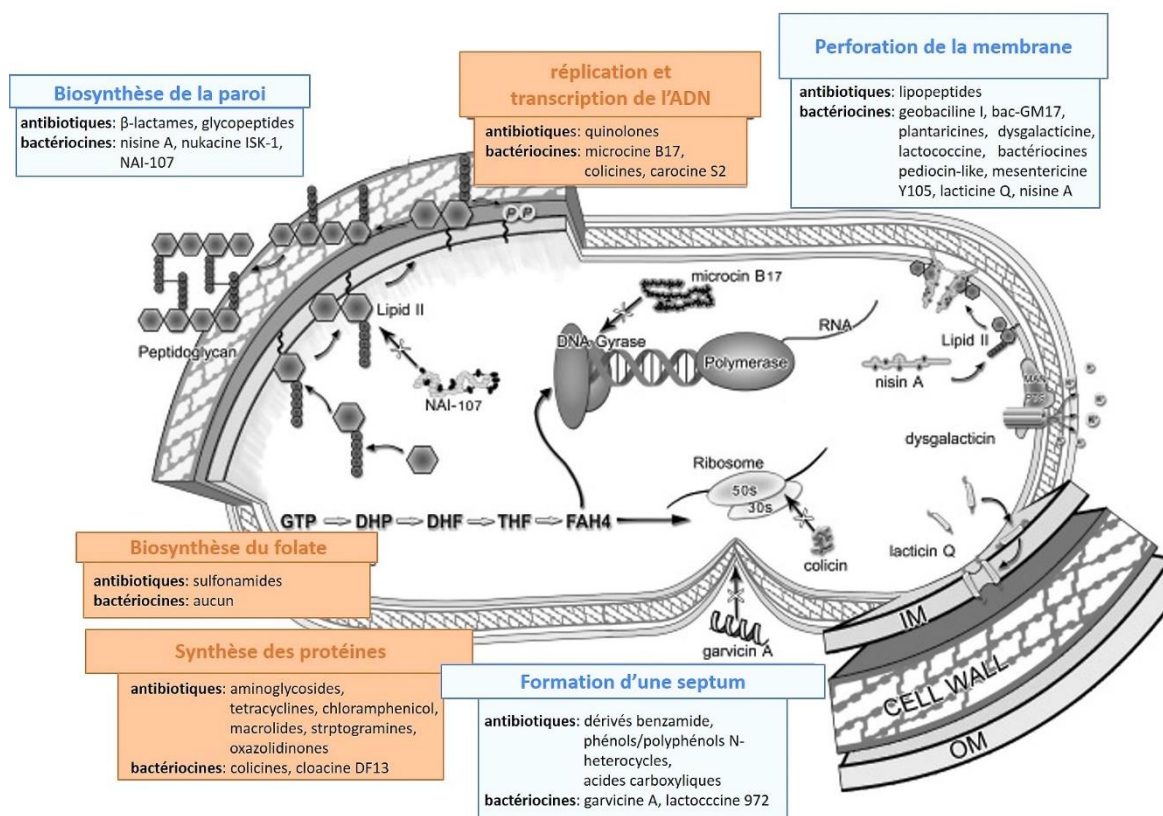


Figure 42. Localisation des cibles des antibiotiques et bactériocines.

Les cibles externes sont indiquées par des rectangles bleus et les cibles intracellulaires par des rectangles oranges. Les antibiotiques et bactériocines indiqués dans chaque rectangles sont capables d'inhiber les cibles indiquées (Cavera *et al.*, 2015).

Plusieurs études réalisées *in vitro* ont démontré que les bactériocine pourraient également être utilisées dans les traitements anti-tumoraux. En effet, les colicines A et E1 inhibent la croissance des lignées de fibroblastes tumorales humaines MRC5 et 11, les colicines D, E2, E3 et A pourraient inhiber la viabilité des cellules murines leucémique P388 et les colicines E1 et E3 celles des monoblastes transformés v-myb de poulet (Chumchalová et Smarda, 2003 ; Lancaster *et al.*, 2007 ; Kaur et Kaur, 2015). Aussi, seulement 41,6 % des patients atteints de carcinomes colorectaux possèdent des bactéries productrices de bactériocines contre 63,8 % chez les sujets sains. Les colicines produites par les bactéries intestinales pourraient être un facteur de réduction des carcinomes colorectaux chez l'homme en agissant comme des composés anticancéreux à potentiel modéré (Yang *et al.*, 2014). La nisine possède également la capacité à prévenir la croissance de cellules cancéreuses en augmentant la fragmentation de l'ADN ou l'apoptose, stoppe le cycle cellulaire et réduit la prolifération des cellules HNSCC (three head et neck squamous cell carcinoma). Après l'administration orale de 150 mg.kg⁻¹ de

nisine à des souris pendant trois semaines, le volume des tumeurs a significativement diminué par rapport aux souris contrôle qui ont reçu uniquement de l'eau (Kaur et Kaur, 2015). Ces résultats indiquent que la nisine pourrait être utilisée dans une nouvelle thérapie, pour le traitement du carcinome HNSCC.

4.2 Archéocines

Les bactéries ne sont pas les seuls organismes procaryotes à synthétiser des peptides antimicrobiens. En effet, les archées qui constituent le troisième domaine du vivant, produisent des peptides antimicrobiens appelés archéocines. Les archéocines feront l'objet du premier chapitre de cette thèse.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. METHODES BACTERIOLOGIQUES

1.1 Souches et plasmides

1.1.1 Souches

L'étude a été réalisée avec des souches provenant d'Algérie, de Tunisie et des souches provenant de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Germany, <http://www.dsmz.de/>) ou the Japan Collection of Microorganisms (JCM, Japan, <http://jcm.brc.riken.jp/>). Toutes les souches utilisées sont listées dans le tableau 7.

Souche	Origine	Conditions de culture
Archées halophiles		
<i>Natrinema</i> sp. SI14	Saline d'Ichakaben (Algérie)	M372, 37 °C
<i>Natrinema</i> sp. SW115	Saline d'Ichakaben (Algérie)	M372, 37 °C
<i>Natrinema</i> sp. SS13	Saline d'Ichakaben (Algérie)	M372, 37 °C
<i>Natrinema</i> sp. SSI9	Saline d'Ichakaben (Algérie)	M372, 37 °C
<i>Natrinema</i> sp. SSI3	Saline d'Ichakaben (Algérie)	M372, 37 °C
<i>Natrinema</i> sp. SW16	Saline d'Ichakaben (Algérie)	M372, 37 °C
<i>Natrinema ejinorensis</i> DSM18194	Lac salé d'Ejinor (Chine)	M372, 37 °C
<i>Natrinema pallidum</i> DSM15623	Morue salée	M372, 37 °C
<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM15624	Cuir salé	M372, 37 °C
<i>Natrinema altunense</i> JCM12890	Lac salé de Xinjiang (Chine)	M372, 37 °C
<i>Natrinema gari</i> JCM14663	Sauce de poisson (Thaïlande)	M372, 37 °C
<i>Natrinema salaciae</i> DSM25055	Lac salé profond Medee, (Mer Méditerranée)	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM5511	Saline sulfatée (Turkmenistan)	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena hispanica</i> DSM18328	Marais salant (Espagne)	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena jeotgali</i> DSM18794	Crevettes Jeotgal (Corée)	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena thermotolerans</i> DSM11552	Puerto Rico	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena salina</i> JCM13891	Lac salé Xilinhot (Mongolie)	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena longa</i> JCM13562	Chine	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena limicola</i> JCM13563	Chine	M372, 37 °C
<i>Haloterrigena saccharovitans</i> JCM12889	Chine	M372, 37 °C
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM1411	Marais salants (Espagne)	M372, 37 °C
<i>Haloferax volcanii</i> DSM3757	Sédiments de la mer morte (Israel)	M372, 45 °C
<i>Haloferax volcanii</i> H98 ¹		YPC, 45 °C
<i>Haloferax volcanii</i> H295 ²		M372, 37 °C
<i>Halorubrum chaoviator</i> sp. ETD3	Saline de Sfax (Tunisie)	M372, 37 °C
<i>Halorubrum saccharovorum</i> DSM1137	Russie	M372, 37 °C
<i>Halorubrum chaoviator</i> sp. ETR14		SW25, 37 °C
Bactéries halophiles		
<i>Chromohalobacter salexigens</i> SM5	Viande salée de mouton (Algérie)	M372, 37 °C
<i>Halomonas elongata</i> SWO32B	Lac salé d'Ouargla (Algérie)	M372, 37 °C
Bactéries non halophiles		
<i>Escherichia coli</i> DH5α		LB, 37 °C
<i>Escherichia coli</i> dam ⁻		LB, 37 °C

Tableau 7. Identification et origine des souches utilisées.

¹ souche donnée par Roxanne Lestini du LOB Palaiseau

² souche donnée par le Professeur Savilahti de l'Université d'Helsinki

1.1.2 Plasmides

Trois plasmides ont été utilisés pour les différents clonages de cette étude. Les plasmides utilisés sont recensés dans le tableau 8 et illustrés dans les figures 43 à 45.

Nom	Utilisation	Antibiotique de sélection
<i>pGEM-T (Promega)</i>	Clonage des inserts à séquencer	ampicilline
<i>pTA963 / pTA962</i>	Expression hétérologue de <i>halC8</i> chez <i>Haloferax volcanii</i>	ampicilline
<i>pUC19 (NEB)</i>	Clonage de mutants résistants à l'HalC8	ampicilline

Tableau 8. Plasmides utilisés dans cette étude.

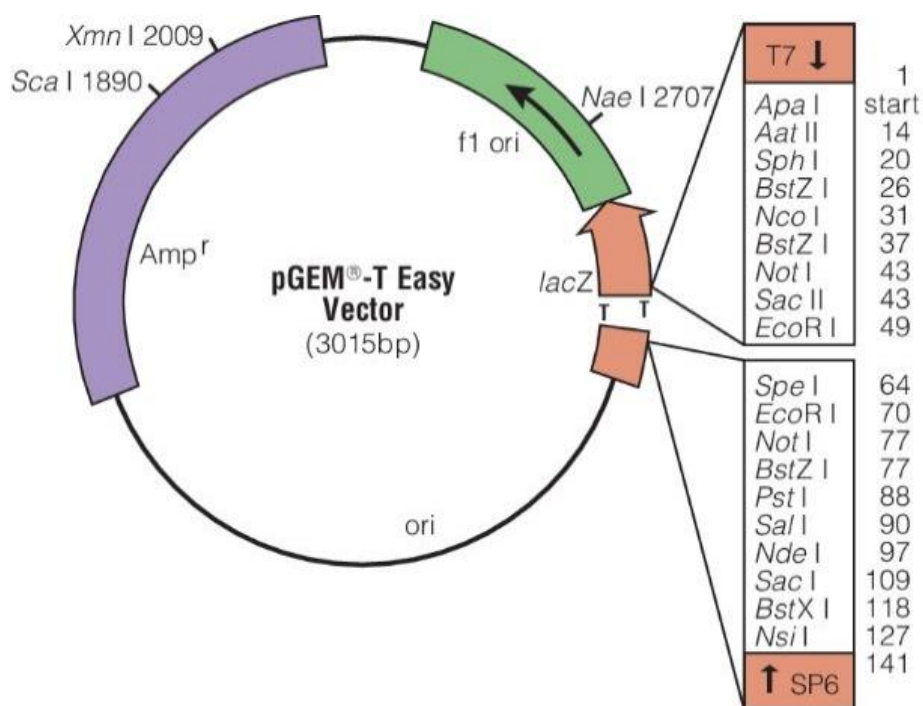


Figure 43. Carte du plasmide pGEM-T.

Le plasmide a été acheté chez Promega. Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline. f1 ori : origine de répllication bactérienne. *lacZ* : gène codant la β -galactosidase.

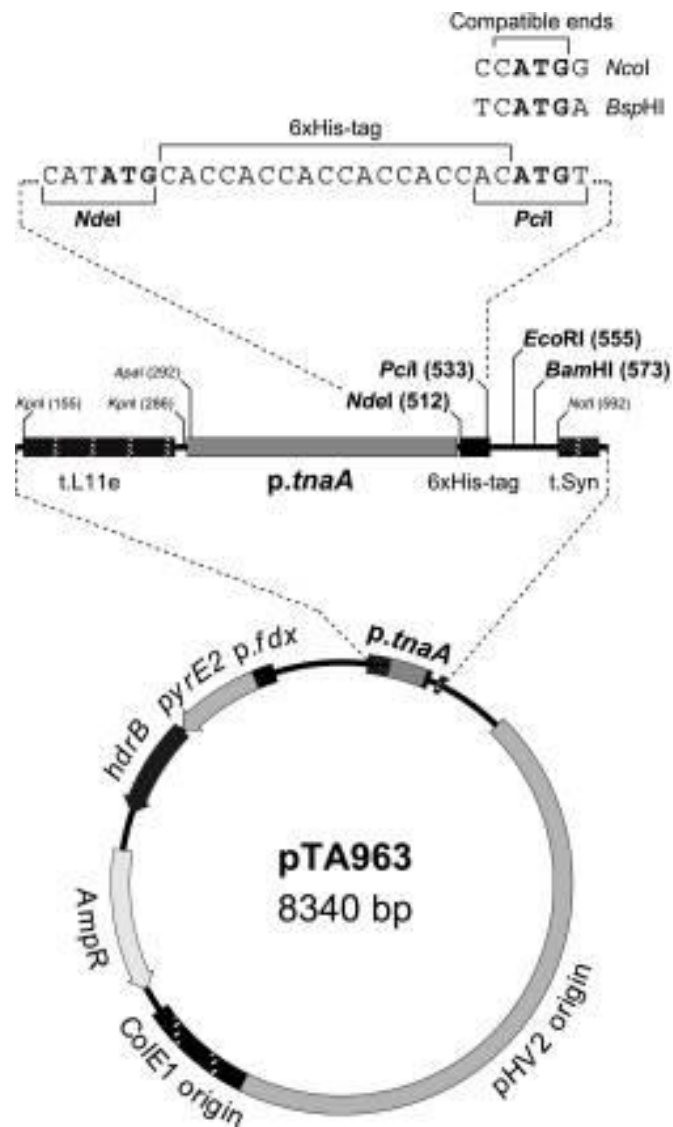


Figure 44. Plasmide pTA963. AmpR : gène de résistance à l'ampicilline. ColE1 origin : origine de réplique chez *E. coli*. pHV2 origin : origine de réplique d'archées. *p.tnaA* : promoteur inducible au tryptophane. *hdrB* et *pyrE2* sont les gènes de sélection chez *Haloferax volcanii*. (Allers et al., 2010).

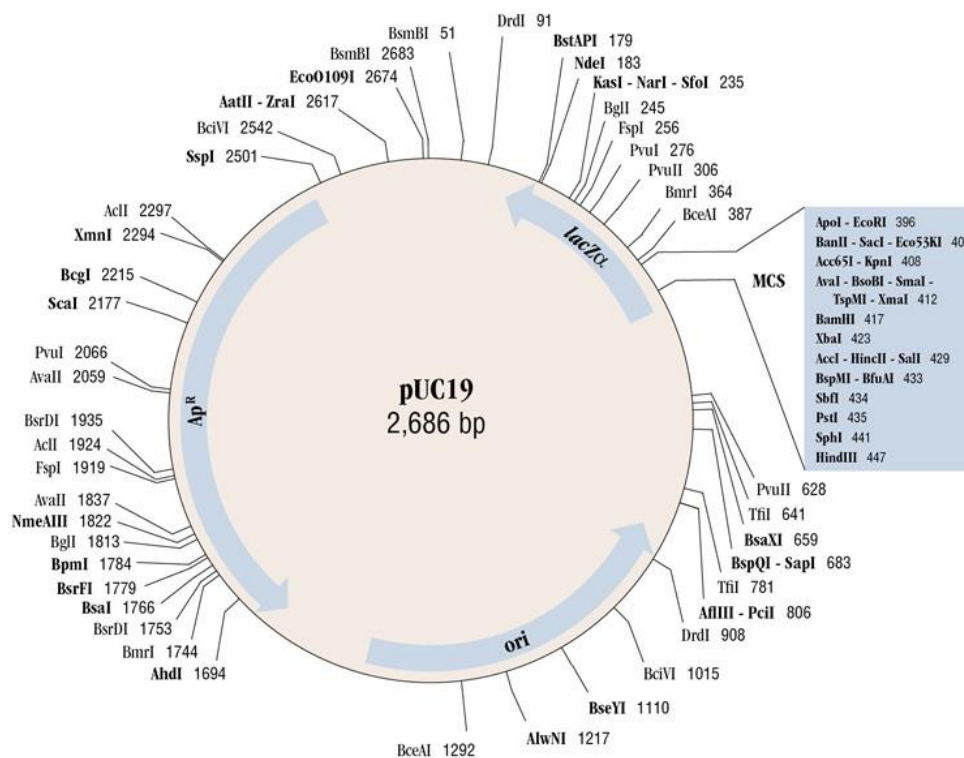


Figure 45. Carte du plasmide pUC19.

La plasmide pUC19 a été acheté chez New England Biolabs.

Ap^R : gène de résistance à l'ampicilline. ori : origine de répllication bactérienne. MCS : site multiple de clonage. *lacZα* code une des deux sous-unités de l'enzyme β-galactosidase. Les chiffres indiquent les positions des sites de restriction de chacune des enzymes.

1.2 Milieux de culture

Les archées halophiles doivent être cultivées dans des milieux respectant les concentrations molaires en sels des milieux hypersalins. Les milieux hypersalés utilisés dans cette étude sont représentés dans le tableau 9. Les milieux utilisés pour cultiver des souches non halophiles sont présentés dans le tableau 10.

Nom	Composition	
M372	Extrait de levure (BD)	5 g.L ⁻¹
	Acides casaminés (BD)	5 g.L ⁻¹
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O (Roth)	20 g.L ⁻¹
	NaCl (Roth)	200 g.L ⁻¹
	Na-Glutamate (Acros Organic)	1 g.L ⁻¹
	KCl (Roth)	2 g.L ⁻¹
	Na ₃ -citrate (Sigma)	3 g.L ⁻¹
	MnCl ₂ , 4 H ₂ O (Sigma Aldrich)	0,36 mg.L ⁻¹
	FeCl ₂ , 4 H ₂ O (Sigma Aldrich)	36 mg.L ⁻¹
	pH 7,0-7,2	
SW25	Extrait de levure (BD)	5 g.L ⁻¹
	NaBr (Sigma)	0,65 g.L ⁻¹
	NaHCO ₃ (Sigma)	0,167 g.L ⁻¹
	NaCl (Roth)	195 g.L ⁻¹
	KCl (Roth)	5 g.L ⁻¹
	CaCl ₂ , 2 H ₂ O (Roth)	0,723 g.L ⁻¹
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O (Roth)	49,492 g.L ⁻¹
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O (Roth)	34,567 g.L ⁻¹
	pH 7,2	
YPC	Extrait de levure (BD)	5 g.L ⁻¹
	Peptone (Oxoid)	1 g.L ⁻¹
	Acides casaminés (BD)	1 g.L ⁻¹
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O (Roth)	18 g.L ⁻¹
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O (Roth)	21 g.L ⁻¹
	NaCl (Roth)	144 g.L ⁻¹
	KCl (Roth)	4,2 g.L ⁻¹
	KOH (Carlo Erba, SDS)	99 mg.L ⁻¹
	Tris-HCl pH 7,5 (Sigma)	14,5 g.L ⁻¹
	pH 7,0-7,2	
	CaCl ₂ ¹ (Roth)	333 mg.L ⁻¹
CASA	Acides casaminés (BD)	5 g.L ⁻¹
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O (Roth)	18 g.L ⁻¹
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O (Roth)	21 g.L ⁻¹
	NaCl (Roth)	144 g.L ⁻¹
	KCl (Roth)	4,2 g.L ⁻¹
	KOH (Carlo Erba, SDS)	792 mg.L ⁻¹
	Tris-HCl pH 7,5	14,5 g.L ⁻¹
	pH 7,0-7,2	
	CaCl ₂ ¹ (Roth)	333 mg.L ⁻¹
	Thiamine ¹ (Sigma)	0,889 µg.mL ⁻¹
	Biotine ¹ (Sigma)	0,111 µg.mL ⁻¹

Tableau 9. Milieux hypersalés utilisés pour la culture de souches halophiles.

La concentration en NaCl de chaque milieu est surlignée en rose.

¹ solutions à ajouter après autoclave et à filtrer sur des membranes de 0,22 µm.

Les concentrations indiquées sont les concentrations finales.

Nom	Composition	
LB	Extrait de levure (BD)	5 g.L ⁻¹
	Peptone (Oxoid)	10 g.L ⁻¹
	NaCl (Roth)	5 g.L ⁻¹

Tableau 10. Milieux utilisés lors de la manipulation d'organismes non extrêmophiles.

Pour réaliser des milieux gélosés, de l'agar a été ajouté au milieu de culture et autoclavé. L'agar est utilisé à une concentration finale de 20 g.L⁻¹ pour obtenir une gélose « ferme » (gélose classique) ou à une concentration finale de 8 g.L⁻¹ pour une gélose molle (utilisées lors de tests antimicrobiens pour une meilleure diffusion des composés actifs). L'agar utilisé est de marque Becton Dickinson & Co (BD) pour les milieux d'ensemencement bactérien et de marque Conda pour les ensemencements d'archées. Ce dernier étant un agar avec un degré de pureté plus élevé, son utilisation permet une meilleure qualité des tests antimicrobiens.

Les antibiotiques et additifs utilisés dans cette étude sont respectivement listés dans les tableaux 11 et 12.

Nom	Concentration des solutions stock	Concentration de travail (solvant de dilution)	Utilisation
<i>Ampicilline</i>	10 mg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹ / 100 µg.mL ⁻¹ (H ₂ O)	Clonage pGEM-T/ Clonage pUC19
<i>Novobiocine</i>	10 µg.mL ⁻¹	10 ng.mL ⁻¹ (H ₂ O)	Tests antimicrobiens
<i>Chloramphénicol</i>	10 mg.mL ⁻¹	10 µg.mL ⁻¹ (éthanol)	Clonage mutants résistants

Tableau 11. Antibiotiques utilisés.

Nom	Concentration de travail (solvant de dilution)	Utilisation
<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal)</i>	80 µg.mL ⁻¹ (DMSO)	Clonage pGEM-T
<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)</i>	0,5 mM (H ₂ O)	Clonage pGEM-T

Tableau 12. Additifs utilisés.

1.3 Curage du plasmide

Une culture de 5 mL de *Nm. altunense* JCM12890 a été cultivée jusqu'en début de phase stationnaire. Cent µL de cultures ont été inoculés dans des tubes de 5 mL de milieu frais de M372 contenant 0, 25, 50, 75, 100 ou 125 µg.mL⁻¹ d'acridine orange. La croissance des souches a été suivie en mesurant la DO₆₀₀. Après 10 jours, les cultures qui ont atteint une DO₆₀₀ supérieure à 0,9 ont été centrifugées et le surnageant obtenu a été testé pour son activité antimicrobienne.

1.4 Tests antimicrobiens

1.4.1 Préparation des échantillons à tester

Les substances antimicrobiennes étant sécrétées et majoritairement produites en fin de phase exponentielle, les expériences ont été réalisées sur des surnageants de culture pour une DO_{600} comprise entre 0,9 et 1,3. Les activités ont été testées avec des surnageants : bruts, filtrés sur des membranes de 0,45 μm ou 0,22 μm afin d'éliminer les cellules résiduelles et/ou chauffés à 100 °C pendant 10 minutes.

1.4.2 Tests en milieu solide

Une souche indicatrice en début de phase stationnaire ($0,9 < DO_{600} < 1,3$) a été ensemencée dans 10 mL de gélose molle de M372 ou SW25 (M372/SW25 + agar 8 g.L^{-1}), pour une DO_{600} finale de 0,001. Le mélange a ensuite été coulé sur une boîte de Pétri contenant une gélose de M372 ou SW25. Après polymérisation, des puits ont été creusés avec un cône stérile (compatible P200) retourné permettant ainsi de déposer 50 à 100 μL d'échantillon. Les boîtes ont été incubées jusqu'à formation d'un tapis microbien dans une étuve à 37 °C dans des sachets en plastique hermétiquement fermés afin d'éviter le dessèchement de la gélose. Le diamètre des halos d'inhibition a été mesuré et exprimé en mm.

1.4.3 Gel overlay

Le gel de polyacrilamide a été lavé rapidement sous l'eau du robinet avant d'être incubé dans une solution de fixation (40 % éthanol, 5 % acide acétique) pendant 30 minutes. Le gel a été lavé dans différents bains d'eau MilliQ pendant 24 heures avant d'être déposé sur une gélose de SW25 à 20 g.L^{-1} d'agar. Le gel a ensuite été recouvert par 10 mL de gélose molle de SW25, inoculée avec 100 μL d'une culture d'*Hrr. chaoviator* ETR14 ($DO_{600} \approx 1,8$). Après polymérisation, les boîtes ont été incubées à 37 °C jusqu'à l'apparition d'un tapis homogène.

1.5 Induction de la production de ProC8, HalC8 et HalI par expression hétérologue

Afin de surexprimer ProC8, HalC8 ou HalI, les six souches résultants des constructions génétiques, avec ou sans étiquette histidine, chez *Haloferax volcanii* ont été mises en culture dans 250 mL de milieu CASA supplémenté avec 750 μL de CaCl_2 0,1 M et 22,5 μL de solution

thiamine- biotine (9,6 mL de thiamine 1 mg.mL⁻¹, 1,2 mL de biotine 1 mg.mL⁻¹, qsp 10,8 mL). Après 18 heures de culture à 45 °C sous agitation 180 rpm, les cultures ont été induites avec 0, 0,25, 0,5, 10 ou 25 mM de tryptophane entre 2 et 68 heures.

1.6 Criblage banque de mutants

Une banque de mutants de la souche d'*Hfx. volcanii* H295 a été générée par le chercheur Kiljunen et son équipe en 2014 (Kiljunen *et al.*, 2014). Cette équipe finlandaise a généré, pour la première fois chez les archées halophiles, une banque de mutants par insertion aléatoire d'un transposon. Les clones de cette banque contiennent une insertion génomique unique. Le transposon utilisé pour inactiver les gènes est composé d'un gène de résistance au chloramphénicol : chloramphénicol acetyltransférase (*cat*) sous le contrôle du promoteur *Pcat*, qui permet une sélection chez *E. coli* lors d'utilisation de chloramphénicol. La présence d'un gène *trpA*, sous le contrôle du promoteur *Pfdx*, codant la sous unité α de l'enzyme tryptophane synthase, indispensable dans la synthèse du tryptophane permet la sélection des souches *Hfx. volcanii* transformées avec le transposon, souches prototrophes pour le tryptophane. Ces gènes sont entourés par des extrémités de 50 paires de bases (pb) d'ADN du bactériophage Mu, qui utilise la transposition de l'ADN pour répliquer son génome et qui est le système de transposition le mieux connu (Figure 46).

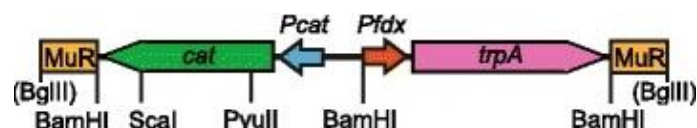


Figure 46. Transposon TrpA-cat-Mu utilisé pour la génération d'une banque de mutants par insertion aléatoire. *cat* : chloramphénicol acetyltransférase, *Pcat* et *Pfdx* : promoteurs, *trpA* : tryptophane synthase. (Kiljunen *et al.*, 2014).

Le transposon TrpA-cat-Mu a été utilisé comme donneur d'ADN dans la réaction de transposition du système Mu. L'ADN de la souche *Haloferax volcanii* H53 a été utilisé comme cible de cette transposition. La stratégie de mutagenèse mise en place pour générer la banque de mutants est illustrée dans la figure 47 et a été construite sur plusieurs étapes : (1) après avoir partiellement été digéré par les enzymes de restriction *HpaII*, *Acil* et *TaqI*, les fragments d'ADN

de la souche cible *Haloferax volcanii* H53 obtenus sont mis en présence du donneur d'ADN, le transposon TrpA-cat-Mu, et de la transposase Mua qui catalyse la réaction de transposition ; (2) les transposons obtenus sont sélectionnés selon leur taille qui doit être entre 4 et 6 kb ; (3) ils sont ensuite clonés dans la plasmide pBlueScript SK+ afin de générer une banque de plasmides ; (4) cette banque de plasmide est digérée par les enzymes HindIII et XhoI ou KpnI et EcoRV afin de libérer l'insert qui, après purification ; (5) sera utilisé pour transformer les cellules d'*Haloferax volcanii* H295 et générer une banque de mutants par insertion d'un transposon. Cette banque de mutants est un outil indispensable pour l'identification du rôle des gènes dont très peu sont connus chez les archées halophiles.

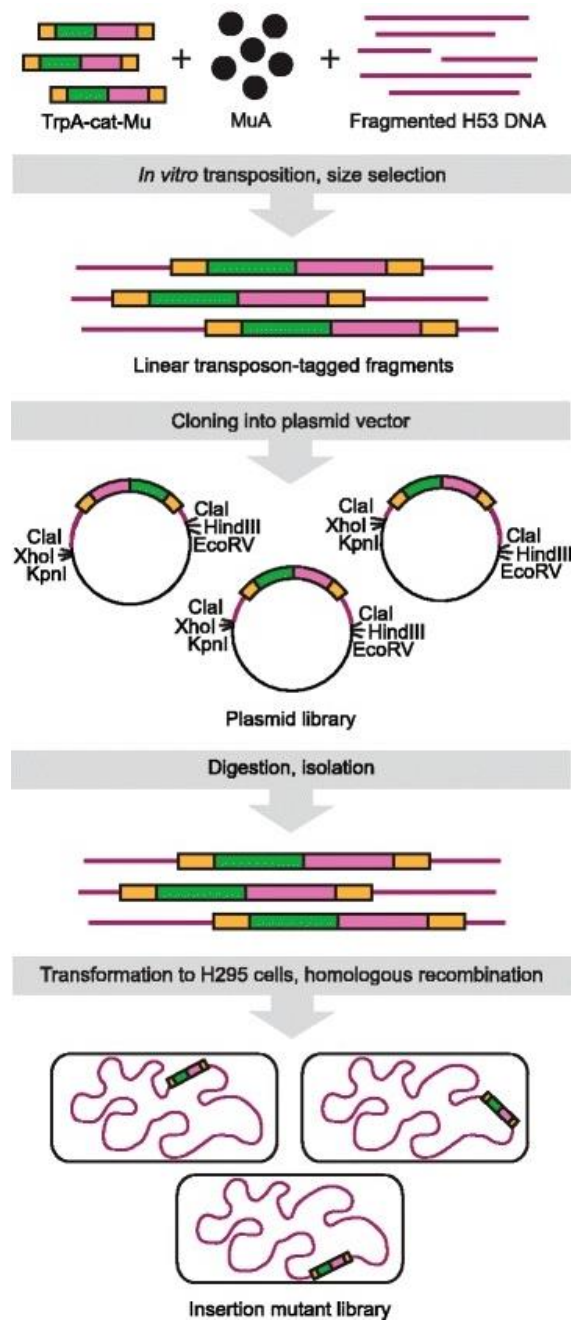


Figure 47. Stratégie de mutagénèse utilisée pour générer une banque de mutants de la souche *Haloferax volcanii* H295. (Kiljunen *et al.*, 2014)

1.6.1 Amplification de la banque

La banque de mutants d'*Hfx. volcanii* nous a été fournie par l'équipe finlandaise qui l'a générée, dans un tube de 800 μL contenant 10^9 cellules par mL. La banque a été diluée 100 fois dans du milieu frais M372 de façon à obtenir une quantité finale de 10^7 cellules par mL. Afin d'étaler tous les clones contenus dans la banque, 100 μL de la dilution à 10^7 cellules.mL⁻¹ ont

été étalés sur 15 filtres (Immobilon transfer membranes, Merck, ref ; HATF 08250, pores 0,45µm, diamètre 82 mm) imbibés de milieu M372 et placés dans 15 boîtes contenant 20 mL de milieu gélosé M372, avant d'être incubées à 45 °C jusqu'à confluence des cellules. Les cellules de chacune des boîtes ont été récupérées dans 1 mL de milieu frais par boîte par un grattage avec un râteau. Les cellules en suspension récupérés des 15 boîtes ont été poolées et comptées sur cellules de Malassez. La banque de mutants a ensuite été aliquotée par 500 µL avant d'être congelée à -80 °C dans 15 % de glycérol final.

1.6.2 Criblage de la banque

Des géloses de M372 (50 mL) ont étéensemencées avec 500 µL de surnageant de *Nm. altunense* JCM12890, préalablement filtré sur des membranes de 0,22 µm puis chauffé à 100 °C pendant 10 minutes. Après polymérisation de la gélose, 200 µL de la banque de mutants à une concentration de 10^7 cellules.mL⁻¹ ont été étalés sur 15 boîtes afin de statistiquement cribler tous les mutants présents dans la banque. Les boîtes ont été incubées à 45 °C pendant 1 semaine. Les colonies obtenues ont été resuspendus dans du milieu M372 liquide contenant du surnageant de *Nm. altunense* JCM12890 filtré sur 0,22 µm et chauffé à 100 °C pendant 10 minutes.

2. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1 Techniques utilisant de l'ADN

2.1.1 Purification

2.1.1.1 Purification des produits PCR

Les produits PCR obtenus ont été purifiés sur colonne avec le kit Clean-up for PCR (Macherey-Nagel).

2.1.1.2 Extraction d'ADN génomique

Les cultures de *Natrinema* et *Haloterrigena* en M372 en fin de phase exponentielle ($0,9 < DO_{600} < 1,2$), d'un volume de 20 mL, ont été centrifugées à 8000 g pendant 15 minutes. Le culot obtenu a été resuspendu dans 1,8 mL de tampon SET (20 % saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,0) et 20 mL de lysozyme (Biosolve) à 20 mg.mL^{-1} avant d'être placé 15 minutes sur glace. Vingt μL d'une solution de SDS à 10 % ont ensuite été ajoutés, puis l'échantillon a été incubé 1 heure à température ambiante sous agitation (150 rpm). Cinquante mL de protéinase K (20 mg.mL^{-1} , AppliChem) ont été ajoutés avant d'incuber la solution à 55 °C sous agitation (150 rpm) pendant 2 heures. Une dialyse de l'échantillon a été réalisée avec des membranes permettant le passage de molécules de masse inférieure à 3500 Da (SpectrumLabs) contre 2 L d'eau distillée sous agitation, pendant la nuit afin d'éliminer le maximum de NaCl présent dans l'échantillon. Après une centrifugation à 25 000 g pendant 30 minutes, la partie aqueuse a été prélevée (et la partie visqueuse laissée dans l'échantillon). Cinq mL de chloroforme (Sigma, 99 %, densité : $1,48 \text{ g.cm}^{-3}$) ont été ajoutés et la phase aqueuse (phase supérieure) a été récupérée. Un volume égal d'isopropanol a été ajouté à la phase aqueuse permettant de précipiter l'ADN. Le précipité blanc ainsi obtenu a été récupéré après centrifugation (4000 g, 5 minutes) puis lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % avant d'être dissous dans 500 μL d'eau distillée et conservé à 4 °C jusqu'à utilisation. Les ADN extraits ont été quantifiés grâce au spectrophotomètre Nano Vue plus (GE Healthcare) sur 2 μL d'échantillon.

2.1.1.3 Extraction d'ADN plasmidique

Les plasmides ont été purifiés en utilisant deux techniques différentes, en fonction de la quantité d'ADN nécessaire pour la suite des expérimentations. La première technique consiste à purifier l'ADN plasmidique à partir de 2 mL d'une culture de 12 heures dans du milieu LB supplémenté avec les antibiotiques adaptés. La culture a été centrifugée 5 minutes à 18 407 g et l'ADN plasmidique présent dans le culot a été extrait avec le kit de purification sur colonne (Qiagen).

Une deuxième technique d'extraction d'ADN plasmidique, appelée lyse alcaline, a été utilisée afin d'obtenir une quantité plus importante de plasmide. Une culture de 12 heures d'un volume de 20 mL dans du milieu LB supplémenté avec les antibiotiques adaptés a été centrifugée 15 minutes à 8000 g. Le culot obtenu est resuspendu dans 250 μ L de solution P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) et 3,5 μ L d'une solution de RNase A à 10 mg.mL⁻¹. 250 μ L de solution P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) ont ensuite été ajoutés, mélangés en inversant le tube plusieurs fois (sans vortexer), jusqu'à ce que la solution soit homogène. Trois cents μ L de solution P3 (3 M KOAc, pH 5,5 ajusté avec de l'acide acétique) ont été ajoutés et la solution a été mélangée en inversant le tube plusieurs fois. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, l'échantillon a été centrifugé à 17 092 g pendant 10 minutes. Le surnageant a été délicatement transféré dans un tube Eppendorf propre et 560 μ L d'isopropanol ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN en inversant le tube plusieurs fois. L'ADN précipité a été culoté par une centrifugation à 17 092 g pendant 10 minutes puis lavé avec 300 μ L d'éthanol à 70 %. L'ADN est ensuite dissous dans 50 μ L d'eau MilliQ et conservé à -20 °C.

2.1.2 Amplification

2.1.2.1 PCR

Les amorces utilisées pour les réactions de PCR sont indiquées dans le tableau 13.

Nom	Séquence 5'-3'	Sens ¹	Localisation
C8-12-R	RTCGGCGACGGTACAGA	AS	Gène <i>halC8</i> :
Hal C8-F1	CTCATATGGATATCGACATCACGGG	S	région codant HalC8
HalC8-F2	CCATGGATATCGACATCACGGG	S	
HallC8-R2	GAATTCTAACAGAGCCCCGCTCGATT	AS	
C8-Imm1	GAGGAACCGAAACTGCTCAC	S	Gène <i>halC8</i> :
C8-Imm2	GTAATCGAGGTTGGCGACTT	AS	région de l'immunité
Hall-F1	CGCATATGAAGGAAGATAATAACACA	S	
Hall-F2	CGTCATGAAGGAAGATAATAACACATCAG	S	
Hall-R	GAATTCTACGCCGGCGTGGGTGCGGCGTT	AS	
halU-F1	GCTGTGACGATCGGKGT	S	Gène <i>halU</i>
halU-F2	CGTGGTTCGTCGGCGG	S	
halU-R2	CCGCCGACGAACCACG	R	
halR-F1	CATCGAACGACSCTCMG	S	Gène <i>halR</i>
halR-F2	CATGMTBRTCGCGTACAACGA	S	
halR-R1	CKGAGSGTGCTTCGATG	AS	
halR-R2	TCGTTGTACGCGAYVAKCATG	AS	
halT2-F1	GCGTCGCVGGCTGTCTGA	S	Gène <i>halT2</i>
halT2-R2	GTCGAGTAGGAGACGAYCAT	AS	
halT3-F1	GTCGGSgtCGTCTTCGT	S	Gène <i>halT3</i>
halT3-R3	CTCGAACCTCCCGCCGAC	AS	
C8-IG1	ACGCTGTGCGAGTAGGAGTT	S	région intergénique entre <i>halU</i> et <i>halC8</i>
C8-IG2	GAGACGACGTTCGAGGAATC	AS	région intergénique entre <i>halC8</i> et <i>halT1</i>
ARNr16S-F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	S	ARN 16 S des archées
ARNr16S-R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	AS	

Tableau 13. Amorces utilisées dans les réactions de PCR.

Dans les séquences nucléotidiques des amorces dégénérées, la lettre R peut représenter les nucléotides A ou G, la lettre K les nucléotides G ou T, la lettre M les nucléotides A ou C et la lettre B les nucléotides C, G ou T.

¹ sens de l'amorce par rapport au gène amplifié : S pour une amorce sens et AS pour une amorce anti-sens

Pour chaque réaction de PCR, 1 µL d'échantillon nucléotidique à tester est mis en présence de 1 µL d'amorce sens 10 µM, 1 µL d'amorce anti-sens 10 µM, 1 µL d'une solution de dNTPs (25 mM, Promega), 0,25 µL d'enzyme polymérase Taq (VWR, 5 U.µL⁻¹) et 2,5 µL de tampon Extra10X MgCl₂ (25 mM, VWR) dans un volume final de 25 µL.

Le mélange réactionnel est chauffé à 95 °C pendant 5 minutes avant de subir 30 cycles comprenant : une phase de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes ; suivie de la phase d'hybridation des amorces avec l'ADN pendant 30 secondes pour des températures variant de 52 °C à 62 °C en fonction des températures de fusion des amorces utilisées ; puis d'une phase d'élongation à 72 °C variant de 30 secondes à 5 minutes en fonction de la taille du fragment à amplifier. Après la répétition de ces 3 phases, le programme se termine par une incubation des mélanges PCR à 72 °C pendant 7 minutes. Les amplicons obtenus ont migrés sur gel d'agarose par électrophorèse.

2.1.3 Clonage

2.1.3.1 Préparation des inserts

Les inserts utilisés dans la réaction de clonage sont des produits obtenus par amplification PCR purifiés dans le cas de la surexpression de ProC8, HalC8 et HalI et dans le cas du séquençage du gène *halC8* ou de l'ADNg des mutants résistants à HalC8 dans la cadre du criblage de la banque de mutants d'*Hfx. volcanii* H295, des produits d'amplification PCR purifiés dans le cas de la surexpression de ProC8, HalC8 et HalI et dans le cas du séquençage du gène *halC8*.

Les produits PCR obtenus dans le but de surexprimer ProC8, HalC8 et HalI ont été digérés par des doubles digestions pendant 3 heures à 37 °C avec les enzymes de restriction *NdeI* et *EcoRI*, dans le cas d'un clonage sans étiquette histidine et avec les enzymes *EcoRI* et *BspHI* (pour le gène *halC8* et la région du gène codant HalI) ou *NcoI* (pour la région du gène *halC8* codant HalI) dans le cas d'un clonage avec étiquette histidine.

L'ADNg des mutants résistants à HalC8 ont été digérés par des digestions individuelles avec les enzymes de restriction *KpnI* (NEB), *EcorI* (NEB) et *SphI* (NEB) qui ne possèdent pas de site de restriction dans le transposon, en utilisant respectivement 10, 20 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN génomique et les tampons 1X, pendant 1 heure à 37 °C.

2.1.3.2 Préparation des vecteurs

Le plasmide PGEM-T est un plasmide déjà préparé qui ne nécessite pas d'étape préalable de digestion par des enzymes de restriction. Le plasmide pUC19 a été digéré avec les enzymes de restriction *KpnI* (NEB), *EcorI* (NEB) ou *SphI* (NEB) pendant 3 heures à 37 °C. Les plasmides pTA962 et pTA963 ont été doublement respectivement digérés avec les amorces *NdeI/EcoRI* ou *PciI/EcoRI*.

2.1.3.3 Ligation

Les inserts purifiés ont été ligués avec le plasmide pGEM-T, pUC19, pTA962 ou pTA963 en présence de 50 ng de vecteur, 1 µL d'enzyme ligase T4 à ADN (Promega), de tampon de ligation 1X et une quantité d'insert calculée en multipliant la masse du vecteur à la taille de l'insert à cloner et au chiffre 3, divisé par la taille du vecteur. Dans le cas de l'expérience du criblage de la banque de mutants d'*Hfx. volcanii* H295, la taille moyenne des

inserts à cloner a été estimée à 10kDa via le logiciel molbiotools (<http://www.molbiotools.com/restrictionanalyzer.html>). Le mélange réactionnel a été incubé une nuit à 4 °C.

2.1.3.4 Préparation de cellules compétentes

Deux cents μL d'une préculture de la souche *E.coli* DH5 α ou *E.coli* Dam⁻ ont été inoculés dans 50 mL de milieu LB frais contenant les antibiotiques requis. Lorsque la culture a atteint une DO₆₀₀ comprise entre 0,2 et 0,3, les cellules sont incubées 15 minutes sur de la glace puis centrifugées 15 minutes à 4000 g à 4 °C. Le culot obtenu a été resuspendu délicatement dans 50 mL de CaCl₂ 0,1 M froid incubés 30 minutes sur glace avant d'être de nouveau centrifugés 15 minutes à 4000 g à 4 °C. Le culot a été délicatement resuspendu dans 500 μL de CaCl₂ 0,1 M, 10 % glycérol froid puis aliquotés par 50 μL et conservées à -80 °C.

Préparation de sphéroplastes :

Une préculture de 10 mL de milieu YPC a été réalisée à partir d'une colonie isolée d'*Haloferax volcanii* H98 et incubée à 45 °C avant d'être centrifugée à 3000 g pendant 10 minutes à température ambiante dans des tubes à fond rond afin de ne pas abimer les cellules. Les culots cellulaires ont été repris dans 2 mL d'une solution saline tamponnée (1 M NaCl, 27 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15 % saccharose ; solution filtrée sur 0,22 μm) puis centrifugés une nouvelle fois à température ambiante pendant 8 minutes à 4500 g. Le nouveau culot a été resuspendu dans 600 μL de solution saline tamponnée.

2.1.3.5 Transformation d'*E. coli* DH5 α et *E.coli* Dam⁻

Après décongélation sur glace des cellules compétentes *E.coli* DH5 α et *E.coli* Dam⁻, 3 μL des mélanges de ligation ont été ajoutés à 50 μL de cellules compétentes. Le mélange : cellules compétentes-mélange de ligation a été incubé 10 minutes sur de la glace avant de subir un choc thermique à 42 °C pendant 45-50 secondes et d'être replacées 2 minutes dans la glace. Neuf cents μL de milieu LB ont été ajoutés au mélange avant que l'échantillon soit incubé pendant 1h30 à 37 °C sous agitation (180 rpm). L'échantillon a ensuite été centrifugé 5 minutes à 18 407 g et le culot, repris dans 100 μL de milieu LB frais, a été étalé sur des boîtes LB-ampicilline-IPTG-XGal dans le cas d'un clonage dans pGEM-T, ou sur des boîtes LB-

ampicilline-chloramphénicol dans le cas d'un clonage dans pUC19. Les boîtes ont été incubées une nuit à 37 °C. Les clones obtenus ont été repiqués sur boîte LB-ampicilline-IPTG-XGal ou LB-ampicilline-chloramphénicol avant d'être séquencés.

2.1.3.6 Transformation d'*Haloferax volcanii* H98

Pour 200 µL de sphéroplast, 20 µL d'EDTA 0,5 M pH 8 ont été ajoutés en laissant couler la solution d'EDTA le long du tube et en inversant délicatement le tube pour remuer. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante du mélange sphéroplaste-EDTA, 30 µL d'un mélange composé de 1 µg d'ADN non méthylé, 15 µL de solution saline non tamponnée (1 M NaCl, 27 mM KCl, 15 % saccharose, pH 7,5 ; solution filtrée sur 0,22 µm), ont été ajoutés en laissant couler le mix le long de la paroi du tube. Après 5 minutes d'incubation, 250 µL d'une solution de PEG 600 (Sigma ref : 87333) à 60 % (diluée dans la solution saline non tamponnée) ont été ajoutés en laissant couler la solution sur la paroi du tube et en remuant très délicatement sans inverser le tube. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 1,5 mL de solution de dilution (18 % SW (2,46 M NaCl, 88,5 mM MgCl₂.6H₂O, 85,2 mM MgSO₄.7H₂O, 53,7 mM KCl, 12 mM Tris-HCl 1 M pH 7,5), 15 % saccharose, 3 mM CaCl₂ ; solution filtrée sur 0,22 µm) ont été ajoutés et le mélange a été centrifugé à température ambiante pendant 8 minutes à 4500 g. Le culot ainsi obtenu a été gratté puis repris dans 1 mL de solution de régénération (18 % SW, YPC 1X, 15 % saccharose, 3 mM CaCl₂ ; solution filtrée sur 0,22 µm) avant d'être incubé 1h30 sans agitation à 45 °C, puis 3 heures sous agitation à 45 °C. Les échantillons sont ensuite centrifugés à température ambiante pendant 8 minutes à 4500 g, les culots obtenus ont été resuspendus dans 1 mL de SW 18 % et étalés (non dilué ou dilué au 1/10) sur milieu minimum CASA et YPC. Les boîtes ont été incubées à 45 °C. Après une semaine environ, les transformants obtenus ont été repiqués du le même milieu minimum. L'ADN des clones obtenus a ensuite été purifié puis envoyé au séquençage afin de vérifier les constructions génétiques obtenues.

2.1.4 Séquençage

Les échantillons ont été séquencés par la société Eurofins Genomics. Quinze µL d'échantillons purifiés ont été envoyés par réaction de séquençage, à une quantité comprise entre 50 et 100 ng. Les amorces de séquençages sont listées dans le tableau 14.

Nom	Séquence 5'-3'	Localisation	Utilisation
M13rev (-29)	TTT TCC CAG TCA CGA CG	Plasmides	Séquençage <i>halC8</i>
M13uni (-43)	ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC	pGEM-T	Vérification des constructions chez <i>Haloferax volcanii</i>
HSP750	CCC CGT GGA GGT AAT AAT TGA CG	pTA963 / pTA962	Séquençage des clones résistants <i>Haloferax volcanii</i> à HalC8
HSP751	CGT CGC AAC GCC CAC CGC	Transposon TrpA-cat-Mu	(Kiljunen <i>et al.</i> , 2014)

Tableau 14. Amorces utilisées pour le séquençage.

2.2 Techniques utilisant de l'ARN

2.2.1 Extraction d'ARN

Une culture de 80 mL de *Nm. altunense* JCM12890 en fin de phase exponentielle ($DO_{600}=1,2$) a été centrifugée pendant 15 minutes à 8000 g. Un mL de Trizol (Ambion) a été ajouté au culot cellulaire et les cellules ont été lysées par plusieurs pipetages. Après une incubation de 5 minutes du mélange de Trizol/cellules, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés puis le tube a été vigoureusement agité pendant 15 secondes et incubés 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation de l'échantillon à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C, la phase aqueuse contenant l'ARN a été prélevée. Cinq cents µL d'isopropanol ont été ajoutés afin de précipiter l'ARN contenu dans l'échantillon. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante et une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4 °C, le culot d'ARN a été lavé avec 1 mL d'éthanol 75 % puis l'échantillon a été séché à l'air libre pendant 5-10 minutes. L'ARN a ensuite été resuspendu dans de l'eau dépourvue de RNase (H₂O-DEPC : 1 L d'H₂O MilliQ avec 1 mL de DEPC (Roth), agitée une nuit et autoclavée) et incubé à 55-60 °C pendant 10-15 minutes. Après quantification de l'ARN extrait, ce dernier a été soumis à une digestion par la DNase (1 unité pour 5 µg d'ARN extrait) (Promega) en présence du tampon de DNase 1X, d'ARN et d'H₂O-DEPC. Le mélange réactionnel a été incubé 1h30 à 37 °C. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 1 µL de solution de DNase STOP (Promega) par µL de DNase et incubation 10 minutes à 65 °C. L'échantillon traité aux DNases a ensuite été mis en présence de 500 µL d'éthanol 70 % avant d'être vortexé puis purifié sur une colonne du kit PureLink® RNA Mini kit (Ambion) et élué avec 30 µL d'eau dépourvue de RNase. Afin de vérifier l'absence d'ADN génomique résiduel, une PCR a été réalisée en utilisant les amorces C8-Imm1 et C8-12-R (Tableau 13). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée par migration sur un gel 1 % réalisé avec de l'agarose dépourvu en RNase (Invitrogen). Les échantillons d'ARN ont été quantifiés au Nanovue puis conservés à -80 °C.

2.2.2 Transcription inverse

La réaction de synthèse d'ADN complémentaire a été réalisée en présence de 3 µg d'ARN, 1 µL d'un mix de dNTPs 10 mM (VWR), 0,4 µL d'amorces aléatoires (random primers) à 500 µg.mL⁻¹ (Promega), et d'eau-DEPC pour un volume final de 12 µL. Le mélange a été chauffé à 65 °C pendant 5 minutes, puis placé rapidement dans la glace. Après une brève centrifugation du mélange, 4 µL de tampon premier brin (first strand buffer) 5X (Invitrogen) et 2 µL d'agent réducteur dithiothréitol 0,1 M (DTT, Invitrogen), ont été ajoutés. L'échantillon a été mélangé délicatement puis incubé 2 minutes à 25 °C. Ensuite, 200 unités d'enzyme reverse transcriptase (Invitrogen) ont été ajoutées au mélange réactionnel qui a ensuite été délicatement mélangé par plusieurs aspirations/refoulements avant d'être incubé 10 minutes à 25 °C puis 50 minutes à 42 °C. Enfin, la réaction a été arrêtée en chauffant le mélange 15 minutes à 70 °C. Les ADN complémentaires ont été conservés à -20 °C ou directement utilisés pour vérifier la transcription d'un gène spécifique par PCR.

2.2.3 q-RT-PCR

Pour chaque réaction de qPCR, 4 µL d'échantillons d'ADNc dilué au 1/10 dans H₂O ont été mis en présence de 2 µL d'amorce sens et anti-sens à 2,5 µM chacune, 2 µL de MasterMix 5X (Marque) et 2 µL d'H₂O dans des capillaires. Les capillaires ont été brièvement centrifugés et placés dans le thermocycleur LightCycler 2.0 (Roche Applied Science). Le mélange réactionnel a été chauffé à 95 °C pendant 10 minutes avant de subir 45 cycles comprenant : une phase de dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes ; suivie de la phase d'hybridation des amorces avec l'ADN à 60 °C pendant 15 secondes ; puis d'une phase d'élongation à 72 °C pendant 15 secondes. Après la répétition de ces 3 phases, le programme se termine par une incubation des mélanges PCR à 65 °C pendant 15 secondes puis une augmentation lente de la température jusqu'à atteindre 95 °C. Les résultats ont été analysés avec le logiciel LightCycler® Software 4.1. Les amplicons obtenus ont migrés sur gel d'agarose 2 % par électrophorèse.

3. ANALYSE *IN SILICO* DES SEQUENCES

3.1 Recherche de similarités de séquences

La présence des gènes *halC8* ont été recherchés parmi la base de données Genbank en utilisant les algorithmes BLASTN, BLASTX, et BLASTP (Dereeper *et al.*, 2008) et les sequences de la souche *Natrinema* sp. AS7092 dans la requête (numéro d'accension : DQ137141.1). Quand plusieurs identités ont été trouvées pour la même souche, l'identité avec le score le plus faible a été écartée de l'analyse. Les schémas des groupes de gènes ont été construits sur la base de la localisation de chacun des gènes dans le génome des souches. Les manipulations de séquences ont été réalisées avec les programmes recensés sur <http://bioinformatics.org/sms/>.

3.2 Alignements multiples

Les alignements multiples des séquences ont été générés grâce aux logiciels Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) et ClustalW (Corpet, 1988 ; Thompson *et al.*, 1994). Les alignements de séquences protéiques ont été réalisés grâce à la matrice Blosum62 et les alignements nucléotidiques grâce à la matrice ADN. Les valeurs de pénalités de gap sont celles associées par défaut aux matrices.

3.3 Arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques ont été construits en se basant sur la méthode « Neighbour-Joining method » (algorithme BioNJ, <http://www.atgc-montpellier.fr/fastme/>) (Lefort *et al.*, 2015) et en utilisant 1000 réplicats dans le test bootstrap. L'arbre a été visualisé avec TreeDyn. La prédiction des séquences signales Tat a été réalisée avec PRED-TAT (<http://www.comp-gen.org/tools/PRED-TAT>) (Bagos *et al.*, 2010). Les structures secondaires ont été prédites avec le logiciel JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4>) (Drozdetskiy *et al.*, 2015).

4. METHODES DE BIOCHIMIE

4.1 Purification d'HalC8

4.1.1 Purification à partir d'une culture liquide de *Natrinema* sp. SWI6

Huit litres d'une culture de *Natrinema* sp. SWI6 ont été cultivés dans du milieu M372 jusqu'en début de phase stationnaire ($DO_{600} = 1,5-1,9$). La culture a été centrifugée pendant 30 minutes à 8000 g et le surnageant résultant a été chauffé à 100 °C pendant 10 minutes. Le surnageant chauffé a été déposé sur une colonne C8 Sep-Pak 35 cc (Waters) pré-équilibrée avec 10 % d'acétonitrile (ACN) dans H₂O puis différentes étapes d'élutions ont été réalisées avec 600 mL d'ACN 20, 60, 80 et 100 % (v/v). Les fractions d'élutions ont été lyophilisées, resuspendues dans 10 mL d'ACN et testées pour leur activité antimicrobienne contre *Hrr. chaoviator* ETD3 en utilisant la technique de diffusion à partir de puits creusés dans une gélose ensemencée avec la souche cible, précédemment décrite. La fraction possédant la plus forte activité antimicrobienne a été fractionnée par HPLC sur une colonne Uptisphere® C4 (250 x 4,6 mm, 5 µm 300 Å, Interchim, France), éluée avec un débit de 1 mL.min⁻¹ par un gradient ACN / H₂O allant de 0 à 80 % en 20 minutes, suivi d'une étape isocratique à 80 % d'ACN pendant 5 minutes. Le volume d'injection était de 200 µL. Le profil d'élution a été suivi à 226 nm. Quarante fractions de 500 µL ont été collectées entre 5 et 25 minutes puis les fractions ont été concentrées sous vide dans un SpeedVac® (Savant) puis solubilisées dans un mélange ACN/H₂O 80 :20. Dix µL de chaque fraction ont été testés pour leur activité antimicrobienne contre *Hrr. chaoviator* ETD3. La fraction possédant la plus forte activité antimicrobienne a été fractionnée par HPLC sur une colonne Uptisphere® C4 (250 x 4.6 mm, 5 µm 300 Å, Interchim, France), dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Le pic majoritaire a été détecté à 16,17 minutes et analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Voyager DE Pro spectrometer, AB-Sciex).

4.1.2 Purification à partir d'une culture solide de *Nm. altunense* JCM12890

Seize boîtes de gélose de M372 ensemencées avec *Nm. altunense* JCM12890 ont été cultivées pendant 14 jours à 30 °C. L'agar ensemencé a été découpé en petits fragments qui ont été macérés dans du méthanol pendant 4 heures. La phase liquide a été évaporée sous une

pression réduite (rotavap, Buchi), solubilisée dans H₂O contenant 0,1 % d'acide formique et extrait dans par du butanol. La phase du butanol a été évaporée sous une pression réduite (rotavap, Buchi), solubilisée dans 50 mL d'H₂O contenant 0,1 % d'acide formique et déposée sur une colonne C8 Sep-Pak 35 cc (Waters) pré-équilibrée avec 10 % d'acétonitrile (ACN) dans H₂O puis éluée avec 600 mL d'ACN/H₂O (80 : 20). La fraction d'élution a été évaporée, solubilisée dans 500 µL d'ACN 80 % et analysée par LC-MS.

4.2 Extraction des protéines

Afin d'extraire les protéines d'un culot cellulaire, notamment dans le cas de la surexpression de ProC8, HalC8 et HalI, les cultures ont été centrifugées 10 minutes à 3300 g. Les culots ont été repris dans 1 mL de tampon HEPES (2 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5) avant d'être soniquées 4 fois 15 secondes à une amplitude de 20 %.

4.3 Gels d'électrophorèse

4.3.1 Gels d'agarose

Afin de visualiser la taille des fragments d'ADN (obtenus après amplification par PCR et qPCR, ou encore après digestion de plasmides par des enzymes de restriction), 5 µL de chacun des échantillons PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 1 ou 2 % en présence de tampon de charge 1X (Ozyme) permettant de suivre leur migration sous 90 Volts dans du tampon Tris acide acétique EDTA (TAE : 40 mM Tris, 20 mM acetate, 1 mM EDTA, pH=8,0). Les éventuelles bandes de migration obtenues ont été visualisées sous UV (E-Box, Vilber) et comparées au marqueur de masses moléculaire 2log (Ozyme).

4.3.2 Gels de polyacrylamide SDS-PAGE

Des gels ont été réalisés à 12 % et 17 % d'acrylamide. Les différentes compositions des deux gels sont indiquées dans le tableau 15.

<i>Composant</i>	<i>Gel séparation</i>		<i>Gel de concentration</i>
	12 %	17 %	5 %
<i>Acrylamide-bis acrylamide 40 %</i>	3 mL	5,666 mL	500 µL
<i>Tris</i>	2,5 mL (1,5 M pH 8,8) ¹	4,123 mL (3 M pH 8,8) ¹	380 µL (1 M pH 6,8) ¹
<i>SDS 10 %</i>	100 µL	100 µL	30 µL
<i>APS 10 %</i>	100 µL	107 µL	30 µL
<i>TEMED</i>	4 µL	4,3 µL	3 µL
<i>H₂O</i>	qsp 10 mL	/	qsp 3 mL

Tableau 15. Composition des gels d'acrylamide de séparation et de concentration.

SDS : Sodium dodécyl sulfate ; APS : persulfate d'ammonium (solution à préparer extemporanément) ; TEMED : tétraméthyléthylènediamine.

¹ concentration de Tris à ajouter

Cinq µL de tampon de LaemmLi 2X (Tris 80 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1 % (m/v), dithiothréitol (DTT) 40 mM, glycérol 7 % (v/v), bleu de bromophénol 0,1 %, pH 8,8) ont été ajouté à 20 µL de chacun des échantillons à déposer sur le gel. Le mélange a été chauffé 5 minutes à 95 °C, centrifugé rapidement puis déposé dans les différents puits du gel d'acrylamide. La migration est réalisée à 110 Volts pendant 2 heures dans du tampon Tris-Glycine (1,92 M Glycine, 248 mM Tris base, 1 % (m/v) SDS, pH 8,3) pour le gel à 12 % ou Tris-Tricine (0,1 M tricine, 0,1 M Tris base, 0,1 % (m/v) SDS, pH 8,3) pour le gel à 17 %. Trois marqueurs de masses moléculaire ont été utilisés (5 µL/puit) : PageRuler low range unstained protein ladder (Thermo) pour des masses moléculaires allant de 3,4 à 100 kDa, PageRuler Biorad range unstained protein ladder (Thermo) pour des masses moléculaires allant de 5 à 250 kDa et Low range rainbow (Thermo), marqueur coloré, pour des masses moléculaires allant de 3,5 à 38 kDa. Les gels ont ensuite été colorés ou bien découpés pour qu'une partie soit colorée et l'autre utilisée pour la détection d'une éventuelle activité antimicrobienne (gel overlay).

4.3.3 Colorations des gels

Après la migration, les gels ont été démoulés et placés dans des boîtes de Petri en verre pour être soumis à différentes coloration qui permettent de révéler les protéines présentes dans l'échantillon.

4.3.3.1 Coloration au bleu de Coomassie

Le gel a été incubé dans une solution de coloration (40 % éthanol, 7 % acide acétique, 0,0025 % (m/v) bleu de Coomassie G-250) sous agitation pendant une nuit. Le gel a ensuite été

rincé à l'eau MilliQ puis décoloré dans plusieurs bains successifs de solution de décoloration (40 % éthanol, 13,5 % formaldéhyde) sous agitation jusqu'à ce que seules les bandes protéiques soient colorées.

4.3.3.2 Coloration au nitrate d'argent

Le gel a été rincé rapidement sous l'eau du robinet avant d'être incubé dans une solution de fixation (40 % éthanol, 7 % acide acétique) pendant une nuit. Le gel a ensuite été lavé 2 fois 5 minutes dans de l'eau MilliQ avant d'être incubé 1 minute dans une solution de sensibilisation (0,02 % (m/v) de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)). Le gel a été lavé deux fois 20 secondes dans de l'eau MilliQ avant d'être incubé, à l'abri de la lumière, dans une solution de coloration au nitrate d'argent (0,1 % (m/v) de nitrate d'argent (AgNO_3)) préparée extemporanément. Le gel a ensuite été lavé rapidement successivement dans de l'eau MilliQ puis plongé dans 1 mL de solution de développement (3 % (m/v) carbonate de sodium (Na_2CO_3), 0,0004 % (m/v) de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)). Le développement a été réalisé par l'incubation du gel dans 30 mL de solution de développement supplémentée avec 25 μL de formaldéhyde jusqu'à l'apparition de bandes. Après l'apparition de bandes, le gel a été rincé dans la solution de développement puis incubé dans un mélange de 30 mL de solution de développement et 500 μL de solution STOP (1 M trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_9$)) avant d'être rincé à l'eau MilliQ.

4.4 Purification des nanoparticules

Deux cents mL d'une culture de *Nm. altunense* JCM12890 en fin de phase exponentielle ($\text{DO}_{600} = 1,6$) a été centrifugée 30 minutes à 8000 g. Le culot cellulaire a été repris dans 18 mL de tampon phosphate KCl (2,5 M KCl, 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4). Le surnageant a été filtré sur 0,22 μm avant d'être ultracentrifugé à 125 000 g pendant 45 minutes. Le culot obtenu a été repris dans 10 mL de tampon phosphate KCl puis ultracentrifugé une nouvelle fois à 150 000 g pendant 1h45. Le culot obtenu a été repris dans 1 mL de tampon phosphate KCl. Les culots et surnageants obtenus ont été testés pour leur activité antimicrobienne dans leur état brut ou bien dialysés pour les surnageants et soniqués pour les culots avant d'être déposés sur gels SDS-PAGE.

5. METHODES D'ANALYSE

5.1 Analyse physique des nanoparticules

Une culture de *Nm. altunense* JCM12890 a été cultivée jusqu'en début de phase stationnaire. La culture a été centrifugée 30 minutes à 8000 g et le surnageant obtenu a été concentré 50 fois sur des colonnes Vivaspin® de 30 kDa (Sartorius Stedim). Le surnageant concentré a été analysé avec un nouveau microscope optique développé par les Professeurs Martine Boccarda et Albert Claude Boccarda qui mesure le mouvement Brownien des nanoparticules ainsi que la dispersion de la lumière par ces nanoparticules utilisant les interférences pour amplifier le signal. Dans l'échantillon concentré, 2434 particules ont été détectées au-dessus du bruit de fond et donc prises en compte dans l'analyse. A partir des données brutes, les diamètres des nanoparticules ont été estimés et une analyse statistique a été réalisée, montrant la totalité des nanoparticules sur un graphique avec en abscisse le diamètre calculé à partir du mouvement Brownien et en ordonnée, le diamètre calculé à partir de la dispersion de la lumière par les nanoparticules.

5.2 Spectrométrie de masse

Les extraits ou les peptides purifiés ont été analysés par spectrométrie de masse « matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight » (MALDI-TOF MS) sur un spectrophotomètre Voyager DE-Pro mass spectrometer (Applied Biosystems) en utilisant comme matrice l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, ou par LC-MS sur une chaîne d'HPLC Ultimate 3000 micro-HPLC system (Thermo Scientific) connectée à un spectrophotomètre ESI-Qq-TOF Q-STAR mass spectrometer (AB Sciex). La séparation a été réalisée sur une colonne en phase inverse (1 mm, 10 mm, ACE). Le gradient d'élution a été de 0 à 80 % ACN dans 0,1 % de d'acide trifluoroacétique pendant 20 minutes avec un débit de 40 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. La détection de la longueur d'onde a été réglée à 226 nm et la source ESI a été utilisée en mode positif avec un voltage de 5200 volts.

5.3 Microscopie

Les expériences ont été réalisées à la plate-forme de microscopie électronique du MNHN.

5.3.1 Coloration négative

5.3.1.1 Coloration à l'acide phosphotungstique

Une goutte d'échantillon a été déposée sur des grilles 150 Mesh avant d'être recouverte par une goutte d'acide phosphotungstique dilué à une concentration finale de 0,1 %. La préparation a été séchée en un seul geste grâce à du papier Whitman par aspiration puis séchée à l'air libre pendant 5 minutes avant d'être observée au microscope électronique.

5.3.1.2 Fixation au tétraoxyde d'osmium

Certains échantillons ont été préalablement fixés avant d'être colorés afin de conserver les structures cellulaires. Une goutte de culture en fin de phase exponentielle ($0,9 < DO_{600} < 1,4$) a été déposée dans une boîte de Petri en présence d'une goutte de tétraoxyde d'osmium pur. Après 30 minutes de fixation, une grille « carbon-formvar » 150 mesh a été déposée sur la goutte de culture fixée. La grille a ensuite été récupérée et déposée sur une goutte de contrastant, le phosphotungstate de potassium, dilué au 1/30. Après 10 minutes d'incubation, une aspiration de la préparation par capillarité a été réalisée et les préparations ont été observées au microscope électronique.

5.3.2 Inclusion dans des résines

Le culot d'une culture fraîche de 10 mL (centrifugation 4000 g, 10 minutes) a été lavé 3 fois 10 minutes dans du tampon phosphate KCl 5,2 M (tampon à saturation : 5,2 M KCl dissous dans du tampon Sorensen 0,1 M pH 7,2). L'échantillon lavé a subi une double fixation dans du tampon de fixation à 5,2 M KCl (glutaraldéhyde 2,5 %, 1 % acide picrique, qsp tampon phosphate KCl 5,2 M) et au tétraoxyde d'osmium 2,5 % pendant 2 heures. Après avoir lavé l'échantillon fixé dans le tampon KCl, 5,2 M, l'échantillon est déshydraté dans 5 bains successifs de 30 minutes à 30, 50, 70, 90 et 100 % d'éthanol. L'échantillon est ensuite inclus dans les résines par un premier bain résine/éthanol (50/50) d'une heure puis dans 3 bains de résines SPURR (0,23 g.L⁻¹ vinyl cyclohexane dioxide, 0,14 g.L⁻¹ diglycidyl ether de

polypropylene glycol, 0,61 g.L⁻¹ nonenyl succinic anhydride et 9,4 mg.L⁻¹ de S-1 DMAE, Agar Scientific) d'une heure chacun avant d'être polymérisé à 60 °C dans des capsules pendant 48 heures. Les blocs ont ensuite été découpés en coupes ultra-fines au microtome puis observées par microscopie électronique à transmission.

5.4 Observation des échantillons

Les échantillons ont été observés sur un microscope HITACHI H-7100 équipé d'un système de numérisation d'images (caméra CCD HAMAMATSU couplée à un ordinateur avec un logiciel AMT d'acquisition et de traitement d'images) avec une tension d'accélération des électrons de 75 kVolts.

Chapitre 1

Les archéocines

Chapitre 1

Les archéocines

1. RESUME

Les archéocines sont des protéines ou peptides antimicrobiens, produits par les archées et synthétisés par la voie ribosomique. Les premières études sur les archéocines datent du début des années 1980 avec des expériences qui démontraient la présence d'interactions antagonistes entre des souches d'archées halophiles isolées de la saline d'Alicante en Espagne (Rodríguez-Valera *et al.*, 1982). Les protéines et peptides antimicrobiens produits par des souches halophiles ont été nommés halocines. Aujourd'hui, une quinzaine d'halocines ont été décrites, de manière plus ou moins approfondie. En effet, seulement trois gènes, *halC8*, *halS8* et *halH4*, codant respectivement les halocines C8, S8 et H4 ont été identifiés (Cheung *et al.*, 1997 ; Price et Shand, 2000 ; Sun *et al.*, 2005). De plus, l'halocine H6 est la seule halocine pour laquelle une cible a été clairement identifiée : l'échangeur Na^+/H^+ , indispensable pour l'osmo-adaptation des cellules halophiles (Meseguer *et al.*, 1995).

En 2000, Prangishvili *et al.* ont décrit pour la première fois une archéocine produite par des archées vivant dans des conditions différentes (Prangishvili *et al.*, 2000). Ces archéocines, nommées sulfolobicines, sont produites par des souches hyperthermophiles et acidophiles qui appartiennent au genre *Sulfolobus* (Ellen *et al.*, 2011 ; Prangishvili *et al.*, 2000). Les gènes codant les sulfolobicines ont été identifiés et l'activité antimicrobienne présente dans le surnageant a été associée à des vésicules membranaires, susceptibles de contenir les sulfolobicines (Ellen *et al.*, 2011).

Toutes les archéocines décrites à ce jour sont produites par des micro-organismes extrêmophiles. Les archéocines sont donc confrontées à des conditions environnementales non hospitalières et destructrices. De ce fait, leurs caractéristiques structurales et leurs mécanismes d'action sont susceptibles d'être originaux mais sont néanmoins encore inconnus à ce jour.

Les études sur les archéocines ont donné lieu à deux revues publiées en 2002 et 2007 regroupant les résultats obtenus jusqu'alors (O'Connor et Shand, 2002 ; Shand et Leyva, 2007). Cependant, un certain nombre de données sur les archéocines ont été obtenues depuis la publication de la dernière revue en 2007. Par ailleurs, certaines informations apparaissent

incohérentes parmi les résultats recensés, comme par exemple, deux archéocines présentant les mêmes caractéristiques, notamment en termes de taille moléculaire ou de séquence protéique, mais décrites de manière complètement isolée (Price et Shand, 2000 ; Haseltine *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2003).

Dans le contexte de recherche actuel sur les archéocines, la parution d'une nouvelle revue, incluant les résultats les plus récents et organisant de façon plus claire et logique les résultats précédemment compilés, était une nécessité. Ce travail a fait l'objet d'un article de revue intitulé « Antimicrobial peptides et proteins in the face of the extremes : Lessons from archéocins » publiée dans le journal Biochimie en 2015. Cette revue constitue le premier chapitre de cette thèse et décrit les archéocines découvertes à ce jour ainsi que leurs caractéristiques.

2. ARTICLE



Review

Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins



Alison Besse, Jean Peduzzi, Sylvie Rebuffat, Alyssa Carré-Mlouka*

Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Sorbonne Universités, Muséum national d'Histoire naturelle, Centre National de la Recherche Scientifique, CP 54, 57 rue Cuvier 75005, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2015

Accepted 8 June 2015

Available online 17 June 2015

Keywords:

Antimicrobial compounds

Bacteriocin

Archaeocin

Halocin

Sulfolobocin

ABSTRACT

Archaeocins are ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins produced by archaea. Halocins and sulfolobocins are produced by archaea belonging to the order *Halobacteriales* (*Euryarchaeota*) and *Sulfolobales* (*Crenarchaeota*), respectively. These weapons contribute helping the producer to prosper in spite of the microbial warfare. Given the fact that many archaea thrive in various extreme environments, archaeocins are challenged with inhospitable and destructive environmental conditions. Their structural features and mechanisms of action, which could be original, mostly remain to be deciphered. This review summarizes the present knowledge on halocins and sulfolobocins, the two classes of archaeocins that have been evidenced until now, and brings light on aspects of emerging research such as their ecological role or potential applications. Other antimicrobial compounds produced by archaea are also considered.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Antimicrobial compounds are produced in the whole living kingdom, from animals and plants to microorganisms. Ribosomally-synthesized antimicrobial peptides/proteins (AMPs) and peptide/protein-derived antibiotic natural products contribute to innate immunity in multicellular organisms and to competitions in microbial communities [1,2]. Nomenclature for AMPs has sometimes been confusing in the literature. In this review, we have chosen to use AMP names according to the domain of life from which they originate: bacteriocins and archaeocins are produced by bacteria and archaea, respectively [3]. AMPs are considered a potent means to compete with other microorganisms and establish niches in various environments [4]. It has been estimated that between 30 and 99% of the *Bacteria* and *Archaea* produce at least one AMP [1,5,6]. Their potent antimicrobial activity is generally directed

against species closely related to the producing strain (narrow spectrum of activity), but some have been shown more recently to be active across genera, phyla, and even domains (broad spectrum) [6–8].

Much of the current knowledge comes from studies of AMPs produced by bacteria. They all result from the ribosomal pathway that leads to protein/peptide precursors. These precursors can be either unmodified, thus leading to unmodified bacteriocins, or extensively modified by dedicated post-translational modification enzymes. In this last case ribosomally-synthesized and post-translationally-modified peptides (RiPPs) are formed through the post-ribosomal peptide synthesis (PRPS) pathway [2]. This is the case for examples of lantibiotics [9,10] and siderophore-microcins [11,12] produced by lactic acid bacteria and enterobacteria, respectively.

AMP producers are immune to their own toxins due to different mechanisms including co-expression of immunity proteins rendering the toxin inefficient, or the action of expelling pumps that decrease the concentration of the toxin as it is produced. This field of research still remains seldom explored [8,11,13]. Most bacteriocins are encoded in gene clusters with one or several operons, including genes involved in regulation, maturation, export, and immunity [7–9,11,14]. Bacterial AMPs exhibit various and complex mechanisms of action, which in many cases involve specific receptors [15,16].

Abbreviations: AMP, antimicrobial peptide/protein; Da, dalton; Hal, halocin; HLH, helix-loop-helix; ORF, open reading frame; NHE, Na⁺/H⁺ exchanger; NRPS, nonribosomal peptide synthetase; PKS, polyketide synthase; PRPS, post-ribosomal peptide synthesis; Tat, twin-arginine translocation; RiPP, ribosomally-synthesized and post-translationally-modified peptide; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

* Corresponding author. Tel.: +33 140793132; fax: +33 140793135.

E-mail address: acarre@mnhn.fr (A. Carré-Mlouka).

In every natural environment, the diverse populations of microorganisms form communities that have to face a constant battle for niche space and resources, among which nutritional resources play a critical part [4]. Archaea thrive in many different types of habitats, where environmental conditions can be extreme (heat and cold, acidic and basic pHs, high salinity, high pressure and radiations) [17]. The molecules driving their metabolism and physiology are adapted to these specific conditions [18–20]. The structural features and mechanisms of action of archaeocins, which could be original, mostly remain to be deciphered.

This review focuses on the present knowledge on the different aspects of research on antimicrobial compounds from archaea, and concerns more particularly halocins and sulfobolins, which are produced by archaea belonging to the orders *Halobacteriales* (*Euryarchaeota*) and *Sulfolobales* (*Crenarchaeota*), respectively.

2. Halocins

Pioneering studies on archaeocins date back to the early '80, with assays demonstrating antagonistic interactions between halophilic strains, presumably members of the *Halobacteriales*, isolated from salterns in Alicante (Spain). Initially six halocin categories, H1 to H6, were proposed based on a classification relying solely on the spectrum of inhibition of the culture supernatant of the 39 strains studied [21]. However, in a general manner, the data identifying the spectrum of inhibition of halocins obtained with culture supernatant have to be considered with extreme caution. Indeed, they are highly dependent on the conditions of culture (medium, temperature, stirring ...) of the producing strain and its growth phase. In fact, the production of AMPs by bacteria is well-known to be finely tuned by complex regulation mechanisms [7,8,11,14] and it is presumably similar for archaea. Therefore, to be reliable, the spectrum of inhibition of halocins should be determined only with known quantities of purified AMP, but this is often hindered by technical difficulties to cultivate archaea and purify the produced active compounds. Optimization of the production yields of the AMP is often required to obtain sufficient amounts. Furthermore, subsequent multiple step purification processes are required. They are most often particularly delicate and laborious, due essentially to the presence of high amounts of salt in the samples and the dependency of the antimicrobial activity on the salt concentration.

Initial studies have suggested that all haloarchaeal strains would be able to produce halocins [22,23]. Although this assertion may be true, it must still be proven using rigorous methods, as the first work on halocins mentioned that only 7 strains among 39 displayed antimicrobial activity [21]. In fact, a more recent study on interactions among halophilic prokaryotes from diverse origins suggests that at least one third of the tested strains produced halocins [6]. To date, and compared to the wealth of knowledge on bacteriocins, only a few halocins have been described and their characterization is rarely complete [24]. Taken together, the available data indicates that halocins can be divided into two groups, high molecular mass and low molecular mass halocins (that have been sometimes termed microhalocins), depending on their molecular masses and main properties, essentially their heat-stability, and the NaCl concentration needed to remain active [24]. Low molecular mass halocins, which have molecular masses below or in the range of 10 kDa, are in general more hydrophobic and more stable than the higher molecular mass halocins. Those are proteins in the 30–35 kDa range, which are more sensitive to high temperature and desalting. In this sense low molecular mass halocins resemble microcins, as compared to colicins from enterobacteria [25,26]. However, the term halocin being quite general, such as the term bacteriocins for the AMPs produced by bacteria [5], and taking

into account the low number of representatives that have been identified until now and the lack of complete data for most of them, we think that the use of the term microhalocins is dispensable in the current state of knowledge on archaeocins.

2.1. Halocins H4 and H1

Among the halocins with high molecular mass, halocin H4 (HalH4) was the first to be studied (Table 1). HalH4 was purified from *Haloferax mediterranei* R4 (ATCC33500) isolated from a Spanish solar salt pond in Alicante [21,27]. The *halH4* gene is located on the pHM300 megaplasmid. *Hfx. mediterranei* R4 was shown to display halocin redundancy associated to the presence of multiple megaplasmids. Indeed, both a hybrid lacking pHM300, and a *Hfx. mediterranei* deletion mutant of *halH4* retained the capacity to inhibit the growth of *Hbt. salinarum* and *Hfx. volcanii* [28,29]. The *halH4* gene encodes a single polypeptide, with a sequence much larger than that of HalH4. The HalH4 39.6 kDa precursor polypeptide is composed of a 46 amino acid N-terminal leader region, which is highly cationic (net charge +6) and a 313 amino acid C-terminal region that corresponds to a 34.9 kDa mature halocin (Fig. 1) [27,30]. HalH4 exhibits several features of halophilic proteins (Fig. 1): a high content in negatively charged amino acids, especially Asp, a low content in Lys, and high content in non-bulky residues (Pro, Gly, Val, Thr). Furthermore its pI (4.4, Table 1) is one of the lowest among the halophilic proteins for which pI values range from 3.5 to 6.8 [19,20]. Surprisingly, in contradiction with several halophilic proteins for which the content of hydrophobic residues is decreased [20], HalH4 exhibits a hydrophobic 32 amino acid fragment (residues 178–209, Fig. 1) [30]. The mechanisms driving maturation of the precursor into the mature halocin are unknown. A typical consensus sequence has been identified at the N-terminus of the precursor, suggesting it is likely to be translocated by the twin-arginine translocation (Tat) pathway. The Tat pathway is a general active translocation mechanism responsible for the export of folded proteins across the cytoplasmic membrane of archaea and bacteria [31]. It was proposed by the authors that the HalH4 synthesis would be regulated post-transcriptionally [27]. HalH4 activity is sensitive to proteases, high temperature, and the absence of salt. It remains stable until 51 °C, which is in agreement with the optimal growth temperature of *Hfx. mediterranei*, but disappears when HalH4 is kept at 60 °C for 24 h, or 70 °C for 4 h or 80 °C for 30 min [3]. The HalH4 activity was detected when the cells started their transition to the stationary phase and reached a maximum at the midpoint between exponential and stationary phases (Table 1) [27,30]. The *halH4* promoter sequence was carefully dissected, as a model of a stationary phase-regulated gene, and shown to be regulated by the general transcription factors TBP and TFB [32]. HalH4 inhibits many members of the *Halobacteriales*, such as *Hbt. salinarum* (formerly *Hbt. halobium*) CCM2090. Cells treated with HalH4 became swollen and spherical, while changes in the cytoplasm were observed, as well as cell lysis in some cases [33]. HalH4 was proposed to use the membrane bilayer as primary target and modify its permeability. This halocin seems to involve the disruption of ion-gradients across the membrane of target cells and finally lead to cell lysis and death. Uptake of protons through the membrane from the external medium to the internal cell compartment appeared to be decreased, but neither ATPase nor the Na⁺/H⁺ antiporter were considered to be concerned in the process. A possible effect on passive H⁺ permeability of the membrane was suggested [33,34], but the details of this mechanism of action were not further studied.

Halocin H1 (HalH1) (Table 2) was purified from *Hfx. mediterranei* strain M2a (previously Xia3) isolated from salt ponds in Santa Pola (Alicante, Spain) [21,35,36]. HalH1 is a polypeptide of

Table 1
Archaeocins with identified genes.

		Halocins			Sulfolobocins
		HalH4	HalS8	HalC8	
Producing strain	Identification (16S accession number)	<i>Haloflex mediterranei</i> R4 (D11107)	Uncharacterized halophilic strain S8 (ND)	<i>Natrinema</i> sp. AS7092 (AY899297) ^b	<i>Sulfolobus tokodaii</i> DSM16993 (NR_074348) ^c
	Origin	Solar saltern, Alicante, Spain	Great Salt Lake, USA	Chaidan Salt Lake, China	Beppu Hot Springs, Kyushu Island, Japan
Encoding ORF	Name (accession number)	<i>halH4</i> (U16389)	<i>halS8</i> (AF276080)	<i>halC8</i> (DQ137141)	<i>sulA</i> (1459641) and <i>sulB</i> (15921900) ^d
	Length (bp)	1080	933	852	804 (<i>sulA</i>) and 633 (<i>sulB</i>)
	Neighbouring genes	Putative genes involved in an ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system: <i>HFX_5266</i> (putative substrate binding protein), <i>HFX_5267</i> (permease), <i>HFX_5268</i> (permease II), <i>HFX_5269</i> (ATP binding protein), <i>HFX_5270</i> (ATPase protein II)	ND ^a	<i>halU</i> (putative transmembrane protein), <i>halR</i> (putative transcriptional regulator), <i>halT1</i> (putative permease), <i>halT2</i> (putative periplasmic protein), <i>halT3</i> (putative ABC transporter)	<i>sulC</i> (homolog of <i>sulB</i>), mobile genetic elements ^e
	Localisation	Megaplasmid pHM300 (322 kb, accession number NC_017943)	Unknown megaplasmid (approximately 200 kb)	ND	Chromosome
	Maximal activity	Transition from exponential to stationary phase	Stationary phase	Transition from exponential to stationary phase	Mid-exponential phase ^f
	Number of amino acids	359	311	283	267 (<i>SulA</i>), 210 (<i>SulB</i>)
	Secretion signal	N-terminal Tat signal sequence	N-terminal Tat signal sequence	N-terminal Tat signal sequence	Yes
	Maturation	Processing into a N-terminal 46 amino acids signal peptide, and a C-terminal 313 amino acids HalH4 mature protein	Processing into a N-terminal 230 amino acids fragment, a central HalS8 mature peptide (36 amino acid), and a C-terminal 45 amino acids fragment	Processing into a N-terminal signal peptide (40 amino acids), the Hal immunity protein (167 amino acids), and the C-terminal 76 amino acids HalC8 mature peptide	ND
Mature active entity	Molecular weight (kDa)	34.9	3.6	7.4	42
	pI	4.4	3.6	4.4	4.49 (<i>SulA</i>), 8.73 (<i>SulB</i>)
	Number of cysteines	2 in HalH4	4 in HalS8, 4 in the C-terminal 45 amino acids fragment	10 in HalC8	3 (<i>SulA</i>)
	Stability	<60 °C irreversible loss of activity following desalting	94 °C for 1 h salt-independent storage at 4 °C for months	>100 °C for 1 h salt-independent storage at 4 °C for over 1 year organic solvents (methanol, ethanol, acetonitrile)	<78 °C pH 3–10.7 storage at 4 °C for 17 months
	Sensitivity to proteases	ND	Sensitive to proteinase K, resistant to trypsin	Sensitive to proteinase K, resistant to trypsin	Sensitive to proteinase K, resistant to trypsin
	Localisation	Culture supernatant	Culture supernatant	Membrane fraction and culture supernatant	Membrane vesicles and cleared culture supernatant
	Spectrum of activity	Members of the <i>Halobacteriales</i>	Members of the <i>Halobacteriales</i> , <i>Sulfolobus</i> sp. strains	Members of the <i>Halobacteriales</i>	<i>Sulfolobus</i> sp. strains
	Effect on sensitive cells	Swelling followed by lysis of cells in less than 24 h [3,24,27,30,33,34]	Cytostatic [3,24,40–42]	Swelling followed by lysis of cells in less than 24 h [24,43,46,48,50]	Cytostatic, no visible modification of sensitive cells [59]
References					

ND, not determined.

^a No data is available in the producing strain S8. However, mobile genetic elements of the IS240 family are found upstream *halS8* in megaplasmid 2 of strain GN101 producing HalR1 (Carré-Mlouka, unpublished results).

^b Other *Natrinema* sp. strains, all from Algeria, have also been reported to produce HalC8 [44,45].

^c The same sulfolobocin is produced by *S. acidocaldarius* DSM639, isolated from Yellowstone National Park, USA.

^d *sulA* and *sulB* are also found in the genomes of *S. acidocaldarius* strains Ron12/1 and N8; *sulA* is found in the genome of *S. islandicus* REY15; *sulB* and *sulC* can also be found in the genome of *Acidianus hospitalis* W1 (Carré-Mlouka, unpublished results).

^e Neither *sulC* nor mobile genetic elements are found in *S. acidocaldarius* DSM639.

^f Data obtained in *S. acidocaldarius* DSM639.

approximately 31 kDa, as determined with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), but neither the amino acid sequence of the halocin nor the nucleotide sequence of the encoding gene(s) has been determined. Its activity is directed only towards other members of the *Halobacteriales*. Like HalH4, HalH1 activity is temperature- and salt-dependent: HalH1 is stable

until 50 °C only and its activity requires NaCl concentrations higher than 1 M [3,36]. The activity cannot be fully recovered after dialysis by restoring the initial NaCl concentration, thus indicating that the decrease of ionic strength irreversibly inactivates HalH1 [36], presumably by perturbation in its three-dimensional structure. The available data suggest that many features are common to HalH4

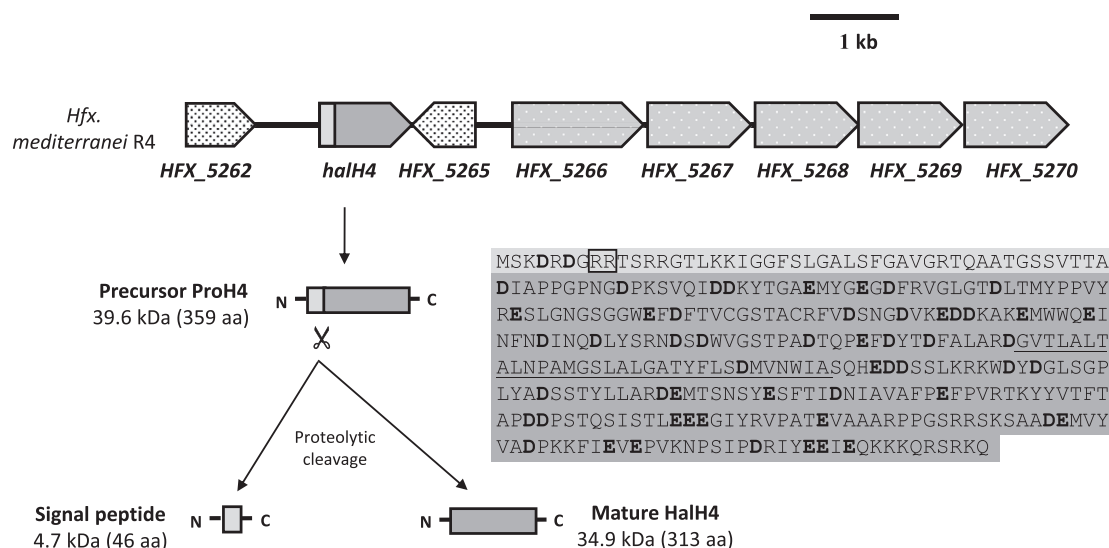


Fig. 1. Halocin H4. Genetic locus around the *halH4* gene involved in the biosynthesis of HalH4, maturation pathway and amino acid sequence of the precursor protein. Open reading frames are indicated by arrows: genes encoding the archaeocin precursor (*halH4*), with the mature entity part (plain dark grey), the signal peptide part (plain light grey); genes encoding proteins potentially involved in export of the mature archaeocin (*HFX_5266*, *HFX_5267*, *HFX_5268*, *HFX_5270*, light grey with clear dots); genes encoding proteins of unknown function (*HFX_5262*, *HFX_5265*, white with black dots). Proteins are indicated by boxes. Along the precursor amino acid sequence (Uniprot Q48236), the two arginines typical of the Tat signal sequence are surrounded by a black box. The sequence of the mature halocin is indicated in shaded dark grey. Negatively charged residues are indicated in bold type. The 32-amino acid hydrophobic region is underlined (adapted from Ref. [30]). aa, amino acid.

Table 2
Other archaeocins.

		Producing strain	Origin	Maximal activity	Molecular weight (kDa)	Stability	Sensitivity to proteases	Spectrum of activity	References
Halocins	HalH1	<i>Haloferax mediterranei</i> strain M2a (previously Xia3)	Solar salterns, Alicante, Spain	Mid-exponential phase	31	<50 °C Irreversible loss of activity below 1 M NaCl	ND	Members of the <i>Halobacteriales</i>	[3,21,24, 35,36]
	HalH6 ^a	<i>Haloferax gibbonsii</i> Ma2.39	Solar salterns, Alicante, Spain	Beginning of stationary phase	32 (or 37) ^a	<90 °C salt-independent	Sensitive to pronase, resistant to trypsin	Members of the <i>Halobacteriales</i>	[22,24,34, 37,38,76]
	HalR1 ^b	<i>Halobacterium</i> sp. GN101	Guerrero Negro, Mexico	Transition from exponential to stationary phase	6.2, 29, or 3.5	<93 °C	Sensitive to proteinase K, pronase and elastase, resistant to papain, trypsin and thermolysin	Members of the <i>Halobacteriales</i> , Strains of <i>Sulfolobus</i> sp., <i>Methanosarcina thermophile</i>	[3,24,41]
	HalA4 ^{c,d}	Uncharacterized halophilic strain	Solar salterns, Tunisia	ND	7.4	>100 °C salt-independent	ND	Members of the <i>Halobacteriales</i> , Strains of <i>Sulfolobus</i> sp.	[3,24,41]
	HalSech7A	<i>Haloferax mediterranei</i> Sech7a	Secovlje solar saltern, Slovenia	Beginning of stationary phase	10.7	<80 °C pH 2–8 partially reversible loss of activity following desalting 5 days at 85 °C pH 3.5–6.5	ND	<i>Halobacterium salinarum</i> NRC817	[51]
Sulfolobocins		<i>Sulfolobus islandicus</i> HEN2/2	Solfataric fields, Iceland	Stationary phase	20		Sensitive to pronase E, proteinase K, and trypsin	Strains of <i>Sulfolobus</i> sp.	[57]

ND, not determined.

^a HalH6 was initially described as a 32 kDa protein as determined by SDS-PAGE analysis, but would be a 3 kDa peptide released from a carrier protein. HalH6 targets the Na⁺/H⁺ exchanger of archaeal and eukaryotic cells.

^b Partial characterization of amino acid sequence revealed that HalR1 is a variant of HalS8.

^c Partial characterization of amino acid sequence revealed that HalA4 is a variant of HalC8.

^d HalA4 has also been designated as HalU1, because it is not produced by strain TuA4 from which it was initially described.

and HalH1: both are produced by *Hfx. mediterranei* strains from Spanish salterns, have a molecular mass of approximately 30 kDa, and their activities are unstable at high temperatures and low NaCl concentrations. Besides, no cross inhibition is detected between the

two strains [21], as confirmed by the lack of inhibition of strain R4 (ATCC33500) by purified HalH1 [36]. It is therefore possible that HalH1 and HalH4 are related halocins, or might even be the same halocin.

2.2. Halocin H6

Halocin H6 (HalH6) (Table 2), produced by *Hfx. gibbonsii* Ma2.39, from Spanish salt ponds in Alicante [37], was initially named halocin H7 in the first studies [22], and both nomenclatures are found in the literature. A halocin-overproducing mutant of the Ma2.39 strain, named strain Alicante SPH7 is also reported to produce HalH6 [37,38]. HalH6 was revealed by SDS-PAGE analysis to be a 32 kDa protein, but the amino acid sequence was not determined [36,37]. R. Shand and K. Leyva [24] mention a personal communication by I. Meseguer indicating that mature HalH6 would be in fact a 3 kDa peptide released from a precursor protein, but experimental data supporting this hypothesis are not available. Like HalH4, maximum halocin activity was detected at the transition from exponential to stationary stage [37]. Unlike those of HalH1 and HalH4, HalH6 antimicrobial activity is heat-resistant and salt-independent [37], and it therefore is clearly a different halocin. HalH6 is resistant to trypsin, but is sensitive to pronase [37]. Despite such different characteristics, HalH6 induces an increase in the intracellular volume of exposed cells, similar to what is observed for HalH4, but with higher efficacy [34]. Cell swelling and lysis suggest that the cell membrane could be the target involved in the mechanism of action of this halocin. However, the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE), which mediates unidirectional Na⁺ efflux and H⁺ influx, was shown to be the primary target of HalH6 [34]. This transmembrane protein, which controls cytosolic pH and intracellular Na⁺ concentration in all living organisms, is of primary importance for *Halobacteriales*, where it constitutes the central unit for cell adaptation to highly saline environments [39]. Interestingly, a latter study showed that HalH6 could also inhibit the eukaryotic NHE [38], implying similarities in the structure of these proteins

from the archaeal and the eukaryotic domains. It is currently unknown whether HalH6 has any effect on the function of this transporter in bacteria.

2.3. Halocins S8 and R1

Halocin S8 (HalS8) (Table 1) was the first low molecular mass halocin to be clearly identified [40]. It was purified from the uncharacterized haloarchaeal strain S8a isolated from the Great Salt Lake in Utah, USA [40]. The S8a strain supernatant activity was salt-independent, thermoresistant, even at very high temperatures (up to 94 °C), and resistant to trypsin, but sensitive to proteinase K [40]. The spectrum of activity of HalS8, determined using culture supernatants of the producing strain is fairly narrow, as among several genera and species of *Halobacteriales*, only *Hbt. salinarum* NRC817, *Hbt. sp.* GRB and *Hfx. gibbonsii* were inhibited [40]. As also observed for the higher molecular mass HalH4 and HalH6, the maximum HalS8 activity occurred at the transition to the stationary phase of growth [40]. Edman sequencing revealed a 36 amino acid polypeptide of 3.6 kDa (Fig. 2A), which is relatively hydrophobic. Four cysteines are found along the sequence that might be involved in the formation of two disulfide bridges. DNA sequencing of a 2873 bp restriction fragment revealed a 933 bp open reading frame (ORF) encoding a 311 amino acid protein, the sequence of which contains the HalS8 sequence, as determined by Edman degradation with only one amino acid substitution (a proline in the DNA-derived sequence instead of glycine at position 34 in the amino acid sequence) [40]. This difference, as well as the identification of the mature peptide sequence based solely on Edman degradation, may raise questions on the genuine C-terminus and exact molecular mass of the mature HalS8. Like in the N-terminus of the HalH4

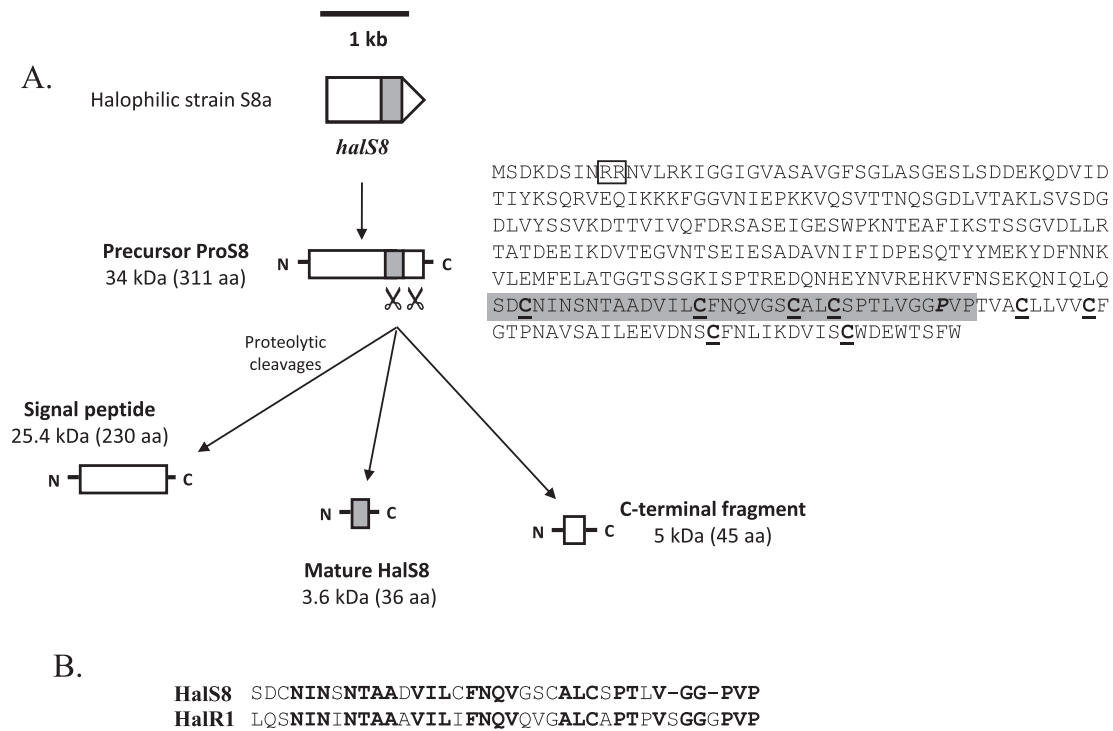


Fig. 2. Halocin S8. A. Genetic locus showing the *halS8* gene involved in the biosynthesis of HalS8, maturation pathway and amino acid sequence of the precursor protein. The open reading frame encoding the archaeocin precursor (*halS8*) is indicated by an arrow, with the mature entity part (plain dark grey). Proteins are indicated by boxes. Along the precursor amino acid sequence (Uniprot Q9HHA8), the two arginines typical of the Tat signal sequence are surrounded by a black box. The sequence of the mature halocin is indicated in shaded dark grey. Cysteines are in bold type and underlined. The amino acid which differs between the gene-derived and Edman-derived HalS8 amino acid sequences (P to G substitution) is italicized (adapted from Ref. [40]). aa, amino acid. B. Alignments of amino acid sequences of the related halocins HalS8 and HalR1. Identical amino acids are indicated in bold letters. The sequence of HalR1 was determined by Edman sequencing (adapted from Ref. [22]).

precursor, a typical Tat sequence was identified. The *halS8* gene is located on a 200 kb megaplasmid. Although a single transcription start site exists, Northern blot analysis revealed the unexpected presence of *halS8* transcripts of different lengths [40]. Preliminary experiments revealed that the length variations resulted from differential termination and/or posttranscriptional processing. The authors hypothesized that mature HalS8 is processed from a larger precursor protein of 34 kDa, by an unknown mechanisms involving two processing sites, thus yielding a 230 amino acid N-terminal and a 45 amino acid C-terminal protein (Fig. 2A, Table 1) [40]. Presumably, these two proteins should play a role in regulation or induction of the halocin production, export of the halocin and/or immunity of the producing strain to its halocin, but these aspects have not been investigated and no clue can be inferred from BLAST comparison.

No detailed characterization is currently available for halocin R1 (HalR1) (Table 2). The only unpublished results are referred to in three review articles on halocins [3,24,41]. HalR1 is produced by *Halobacterium* sp. GN101 originally isolated from Guerrero Negro (Mexico). As also observed for other halocins, its activity is detected in culture supernatants at the transition to stationary phase of growth. HalR1 activity resists to desalting and to papain, trypsin and thermolysin, but is sensitive to proteinase K, pronase and elastase [3,24]. HalR1 activity is resistant to 60 °C for 24 h, but disappears after treatment at 93 °C for 5 min. The exact molecular mass of purified active HalR1 is unclear: it has been reported to be 6.2 kDa as determined by SDS-PAGE, or 29 kDa by gel filtration, or 3.5 kDa following heating of the culture supernatant [3,24]. N-terminal Edman sequencing of an active purified fraction was performed, yielding a sequence of 38 amino acids, 63% of which are identical to the sequence of HalS8 (Fig. 2B) [3,24,41]. Interestingly, the complete sequence of the 283 kb-megaplasmid 2 of *Halobacterium* sp. GN101 is available in GenBank database (accession number EU080936), and carries a *halS8* gene with neighboring IS 240 mobile genetic elements (Carré-Mlouka, unpublished results).

These observations suggest that halocins S8 and R1 are strongly related, and would be encoded by the same gene or multiple deriving copies of the *halS8* gene. HalS8 and HalR1 have been shown both to inhibit the growth of *Sulfolobus* sp., an hyperthermophile from the crenarchaeal phylum, with HalR1 also inhibiting *Methanosarcina thermophila* [42].

2.4. Halocins C8 and A4

Halocin C8 (HalC8) (Table 1) is a halocin of 7.4 kDa, which was purified for the first time from the haloarchaeon *Natrinema* sp. AS7092 (formerly *Halobacterium* sp. AS7092) isolated from the Great Chaidan salt lake in Qinghai province, China [43]. Interestingly, HalC8 has been reported as being produced by other strains belonging to the *Halobacteriales* [44,45]. HalC8 has been purified using the pilot-scale Platotex technology, an agar-supported cultivation mode, from an Algerian strain from the Sidi Ben Ameur sebkha, indicated by the authors to belong to the *Halorubrum* genus [44]. However, careful BLAST analysis of the 16S rRNA gene sequence (GenBank accession number JQ-522952) showed that this strain is in fact affiliated to *Natrinema* sp. (Carré-Mlouka, unpublished results). Additionally, five *Natrinema* sp. strains isolated from the Ichekaben salterns also located in Algeria, revealed to contain a *halC8* gene, while they produced antimicrobial compounds sensitive to papain treatment [45]. It thus appear that several *Natrinema* strains would have the capacity to produce HalC8.

The *halC8* gene was shown to encode a 283 amino acid precursor protein, named ProC8 (Fig 3A) [46]. Transcriptional analysis showed that expression of *halC8* began at the transition from exponential to stationary phase of growth and remained stable during the stationary phase, which correlated with detection of the antimicrobial activity [46]. The antimicrobial activity of HalC8-containing *Natrinema* sp. AS7092 supernatant was shown to remain stable after one year storage at 4 °C and 1 h treatment at 100 °C. It was also maintained upon desalting, trypsin and organic

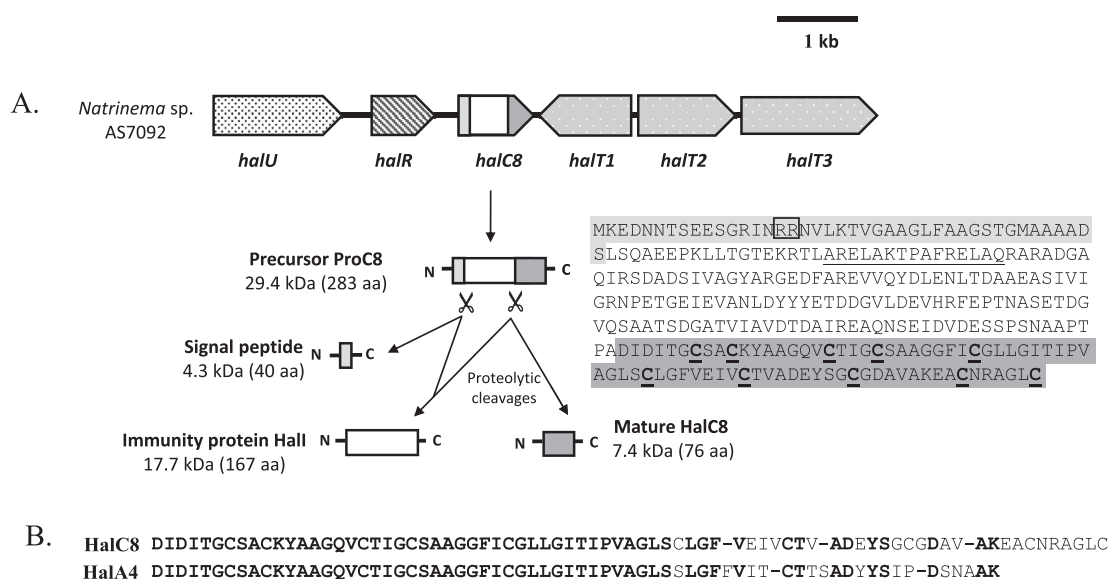


Fig. 3. Halocin C8. A. Genetic locus around the *halC8* gene involved in the biosynthesis of HalC8, maturation pathway and amino acid sequence of the precursor protein. Open reading frames are indicated by arrows: genes encoding the archaeocin precursor (*halC8*), with the mature entity part (plain dark grey), the immunity part (white), the signal peptide part (plain light grey); genes encoding putative regulators (*halR*, white with stripes); genes encoding proteins potentially involved in export of the mature archaeocin (*halT1*, *halT2*, *halT3*, light grey with clear dots); genes encoding proteins of unknown function (*halU*, white with black dots). Proteins are indicated by boxes. Along the precursor amino acid sequence (Uniprot P83716), the two arginines typical of the Tat signal sequence are boxed, with the putative signal peptide indicated in shaded light grey. The sequence of the mature halocin is indicated in shaded dark grey. Cysteines are in bold type and underlined. The helix-loop-helix region essential to the immunity function of HalI is underlined (adapted from Refs. [46,48,50]), aa, amino acid. B. Alignment of amino acid sequences of the related halocins HalC8 and HalA4. Identical amino acids are indicated in bold letters. The sequence of HalA4 was determined by Edman sequencing (adapted from Ref. [41]).

solvent (such as methanol, ethanol or acetonitrile) treatments, making HalC8 a quite stable peptide [46]. Interestingly, HalC8 contains a surprisingly high number of cysteines as regards to the peptide length, with ten cysteines along the 76 amino acid sequence (Fig. 3A). If these cysteines are all involved in disulfide bridges, this might constitute the basis for the high stability of HalC8, thus explaining its resistance to harsh conditions.

The antimicrobial activity of HalC8-containing *Natrinema* sp. AS7092 supernatant was shown to target most of the halophilic archaeons among 21 strains tested, including alkaliphilic halobacteria (*Natronobacterium gregoryi*, *Nbt. magadii*, *Natronomonas pharaonis*) [43]. Transmission electron micrographs of *Haloarubrum saccharovororum* sensitive cells treated with HalC8 showed morphological changes accompanied with extrusion of the cellular content out of the cells and suggesting that the peptide target would be located at the cell wall [43], rather than being the membrane bilayer itself as for many other antimicrobial peptides and bacteriocins [8,12,47]. A complete destruction of most of the target cells occurred after 24 h exposure [43]. Therefore, HalC8 appears to have a rather broad spectrum of activity directed against several species and genera of *Halobacteriales* through a mechanism of action that would be distinct from a classical permeabilization of the membrane bilayer.

Maturation of ProC8 (Fig. 3A, Table 1) would result in release of the C-terminal acidic, hydrophobic and cysteine-rich 76 amino acid HalC8, with a molecular mass of 7.4 kDa, and a N-terminal protein Hall [46,48], which was hypothesized to be an immunity protein aiming to protect the producer strain against its antimicrobial peptide, similar to what is observed for bacteriocins. Evidence that Hall protein indeed assumed this function was obtained both *in vitro* and *in vivo*: (i) *in vitro* the strain AS7092 culture supernatant mixed with recombinant Hall failed to inhibit the growth of sensitive strains; (ii) *in vivo*, overexpression of Hall in *Haloarcula hispanica* conferred resistance to HalC8 [46]. Expression of an antimicrobial peptide and its immunity protein from a common gene encoding a mixed precursor is a unique feature of HalC8, as in the case of bacteriocins, when immunity of the producer is afforded by a specific immunity protein, it is generally encoded by a distinct and independent gene of the operon [7,11]. Hall would exert its immunity function by direct binding of a N-terminal helix-loop-helix (HLH) motif to multiple HalC8 monomers, thus forming large complexes and sequestering HalC8 [48]. This is reminiscent of the mechanism by which the immunity protein protects the producing *Lactococcus lactis* from the action of nisin, a bacteriocin secreted by lactic acid bacteria [49]. Hall is the only immunity protein identified in archaea, but such an original maturation pathway might be a more general phenomenon for halocins. Indeed, for HalH4 and HalS8, the two other halocins for which a gene has been identified, the gene was also encoding a precursor [30,40], presumably processed by proteolytic cleavage yielding other fragments which might be involved in immunity. For HalC8, the maturation process leading to both the active halocin and the immunity protein remains a mystery. However, a typical consensus sequence has also been identified at the N-terminus of Hall, suggesting ProC8 is likely to be translocated by the Tat pathway, which allows export of folded proteins through the cell membrane [31]. In fact, analysis of the ProC8 sequence with Pred-Signal program (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-SIGNAL/>) suggests that the 40 N-terminal amino acids (Peduzzi, unpublished results) constitute a signal peptide (Fig. 3A), which would be released by an unknown mechanism. Moreover, using antibodies targeting Hall, both ProC8 and Hall were found to be associated with membrane fractions [46]. This suggests that ProC8 is first translocated to the cellular membrane before being cleaved to release HalC8, while Hall remains exclusively in the membrane. The maturation

mechanism could be effective at the beginning of the stationary phase of growth [46]. In addition, a group of putative genes, which might be organized in at least three operons, has been suggested to be involved in HalC8 biosynthesis [50]. Indeed, the *halC8* gene is surrounded by five ORFs (Fig. 3A). Upstream *halC8* are found a gene named *halU*, which encodes a putative membrane-spanning protein, and a gene named *halR*, for which identities with regulator protein encoding genes suggest it might regulate HalC8 expression. Downstream *halC8*, the *halT1*, *halT2* and *halT3* genes would be involved in export of HalC8 outside of the cell, using an ATP-transport system [50]. Similar to what is the case for bacteriocins, gene clusters may also be involved in biosynthesis of archaeocins.

Halocin A4 (HalA4) (Table 2) has been initially purified from the uncharacterized haloarchaeon strain TuA4 isolated from a Tunisian saltern [24]. HalA4 has also been called halocin U1, due to the fact that it is apparently produced by an unidentified strain different from strain TuA4 [41]. No detailed characterization is currently available for HalA4. Purification of HalA4 enabled to determine a molecular mass of 7.4 kDa by mass spectrometry [24,41]. HalA4 activity is salt-independent and highly heat-stable, since it is resistant to boiling for up to a week [24,41]. Thus, HalA4 and HalC8 have identical molecular masses and a similar stability pattern. Interestingly, HalA4, like HalS8 and HalR1, is able to inhibit the crenarchaeal hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* [42]. N-terminal sequencing of HalA4 (Fig. 3B) revealed 75% identity to HalC8 [41]. It thus appears that HalA4 is not a distinct halocin but a variant of HalC8.

2.5. Halocin Sech7a

Halocin Sech7a (HalSech7a) (Table 2) was purified from *Hfx. mediterranei* Sech7a, isolated from an Adriatic solar saltern in Slovenia [51]. Mass spectrometry indicated HalSech7a has a molecular mass of 10.7 kDa, in agreement with SDS-PAGE estimation. The activity of *Hfx. mediterranei* Sech7a supernatants monitored against *Hlb. salinarum* NRC817 was detected as soon as the *Hfx. mediterranei* cells entered the exponential phase of growth, and reached a maximum when entering the stationary phase [51]. This activity, which was attributed to HalSech7a, is quite stable in a wide range of pH (2–8) and resistant to temperature increases up to 80 °C. It is also stable in a wide range of NaCl concentrations (0.1–5.2 M), while further desalting diminished the intensity of the antimicrobial activity, which could be partially recovered upon restoring the initial saline conditions [51]. Upon treatment with HalSech7a-containing supernatants, the morphology of *Hlb. salinarum* sensitive cells remained unchanged during the first hours, then underwent gradual swelling before complete lysis, as observed by phase contrast microscopy [51].

2.6. Other putative halocins

Many strains belonging to the *Halobacteriales* have been screened for antimicrobial activity. The authors have often considered as halocins the antimicrobial agent, or the mixture of antimicrobial agents, responsible for the inhibitory activity observed. In most cases, further experiments would have to be performed in order to demonstrate with absolute certainty that the antimicrobial activities observed are indeed due to halocin biosynthesis. Besides, in the few cases for which the proteinaceous nature of the compound has been demonstrated, one cannot preclude the possibility that these halocins are in fact redundant with other known halocins, as observed in the case of HalH4 [29] or bacteriocins [52,53]. Halocins H2, H3 and H5 have been reported to be produced by the uncharacterized halophilic strains GLA22, GAA12 and MA220, respectively, all being isolated from a solar

saltern in Alicante in Spain [21]. They were initially classified as different halocins based solely on their activity spectrum against other halophilic strains. Protease sensitivity was examined, and the possibility that an archaeolytic phage could account for the antimicrobial activity was ruled out [22]. No further data is available concerning their size, stability or salt-dependence. Halocin G1 was mentioned to be produced by strain *Halobacterium* sp. GRB isolated from a solar saltern in France, but no further information is available [54].

Natrinema sp. BTSH10, isolated from soil samples from salt pans of the Kanyakumari district (Tamilnadu, India), was selected for the strong antimicrobial activity of its supernatant against halophilic isolates from the saltern pond, and particularly against *Halorubrum* sp. BTSH3 [55]. Under phase contrast microscope photomicrographs, *Halorubrum* sp. BTSH3 cells lysis was complete after 12 h incubation with *Natrinema* sp. BTSH10 supernatant, supposedly containing halocin SH10, similar to what was observed for HalC8 [43]. No indication on the proteinaceous nature of the antimicrobial activity was mentioned. As for other halocins, the antimicrobial activity was maximal during the transition to the stationary phase of growth [55].

The *Hfx. volcanii* KPS1 rod strain was isolated from crystallizer ponds of Kovalam salt pan, in India [56]. *Hfx. volcanii* KPS1 showed a strong antimicrobial activity against *Hbt. sodomense* S2. The antimicrobial activity of the cell-free supernatant of *Hfx. volcanii* KPS1, presumably containing halocin KPS1 (HalKPS1), is sensitive to trypsin and proteinase K, salt-dependent, thermostable until 80 °C, and functions over a wide range of pH (3–9) [56]. Maximal activity was detected during the stationary phase of growth. Surprisingly, *Hfx. volcanii* KPS1 supernatant was also found to inhibit several bacteria, including *Escherichia coli* MTCC 1671, *Streptococcus mutans* MTCC 896, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 6538, *Bacillus subtilis* MTCC1134, and *Staphylococcus aureus* MTCC 916 [56]. This appears in contrast with what has been described for bacterial AMPs, which are most often active with a narrow spectrum of activity directed against phylogenetically-related strains [10]. However, one study reveals several cases of proteinaceous antimicrobial compounds of archaeal origin which can inhibit the growth of bacterial strains [6].

3. Sulfolobocins

The only other archaea from which antimicrobial proteinaceous compounds have been isolated, live in entirely different environments. They are hyperthermophiles and acidophiles belonging to the *Crenarchaeota*, all affiliated to the much-studied genus *Sulfolobus*. Prangishvilli et al. (2000) first described the occurrence of proteinaceous antimicrobial compounds, which they named sulfolobocins [57]. Using a “spot-on lawn” procedure, antimicrobial activity against *Sulfolobus solfataricus* P1 and *Sulfolobus shibatae* DSM5389 was detected for 41 strains of *Sulfolobus islandicus*, isolated from solfataric fields throughout Iceland, showing these compounds exhibit an archaeocin type antimicrobial activity. More detailed analysis of the produced compound(s) (Table 2) was performed for one strain, *S. islandicus* HEN2/2 [57]. The antimicrobial activity appeared to be associated both to late stationary growth phase cells and cell-free culture supernatants, but most of the activity was essentially associated to the cells (about 30-times-higher amount of AMP estimated associated to the cells) [57]. Following purification from the membrane fraction, an active 20 kDa protein band was detected on an SDS-PAGE gel covered with a layer of *S. solfataricus*-seeded solid medium [57].

A transmission electron microscopic examination mentioned the presence of membrane vesicles associated to the antimicrobial activity in the cell-free supernatant [57]. Membrane vesicles are 50–200 nm extracellular spherical vesicles, formed by budding of

the cytoplasmic membrane but with specific protein composition [58]. Recent studies suggest involvement of vesicles in cell–cell communication, as they can transfer quorum-sensing agents, toxins, pathogenicity factors, DNA, and RNA [58,59]. Using a procedure involving ultracentrifugation, Ellen et al. [59] purified membrane vesicles from *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639 and *Sulfolobus tokodaii* DSM16993. Both strains displayed antimicrobial activity against *S. solfataricus*, associated both to the cells and the cell-free supernatant containing membrane vesicles. SDS-PAGE analysis of the protein content of the membrane vesicles from *S. tokodaii* revealed numerous bands, among which a 42 kDa-band with antimicrobial activity (Table 1). Proteomic analysis allowed the identification of several proteins, among which St1599 (SulA) and St1600 (SulB), two hypothetical proteins of 29 and 23 kDa, respectively [59]. The genes encoding these proteins are adjacent in the genome of *S. tokodaii*, and a homolog of *sulB*, named *sulC* (*st1601*) is localized immediately downstream (Fig. 4). The genetic organization of this locus in the three available *S. acidocaldarius* genomes (strains DSM639, Ron12/I and N8) is similar, with the presence of *sulA* and *sulB* but not *sulC*. A truncated version of *sulA* was detected in the genome of *S. islandicus* REY15, but this strain has been reported to be devoid of antimicrobial activity [59]. Our recent search in the databases also revealed the presence of *sulB* and *sulC* at separate loci in the genome of *Acidianus hospitalis* W1, another member of the *Sulfolobales* distantly related to *Sulfolobus* (Carré-Mlouka, unpublished results). The *sulB* and *sulC* genes are located within the two variable genomic regions where DNA regions are exchanged [60]. Also, genetic mobile elements have been noted in close proximity to the *sulA* genes in *S. tokodaii* and *S. acidocaldarius* [59]. In bacteria, genes encoding bacteriocins are often mobile [8,11], as they are plasmid-encoded or localized next to transposable elements, and the scarce data concerning sulfolobocins suggest this is also the case for cells from the phylum *Crenarchaeota*.

Genetic deletion of the *sulAB* locus in *S. acidocaldarius*, followed by full complementation, demonstrated that *sulA* and *sulB* genuinely encode the sulfolobocin AMP [59]. Moreover, single-deletion mutants lost the ability to produce antimicrobial activity, showing that both genes are essential to sulfolobocin production and activity. Interestingly, the Δ *sulAB* mutant was not inhibited by sulfolobocin, suggesting that the immunity factor conferring resistance of the producing strain to sulfolobocin is not encoded by *sulA* or *sulB* and/or exists in multiple copies. The *sulA* and *sulB* genes are organized as an operon, since they are co-transcribed with highest expression at mid-exponential phase, as shown by qPCR experiments [59].

Altogether, these data suggest that archaeocins related to sulfolobocins are restricted to the *Sulfolobales*. The 20-kDa sulfolobocin isolated by Prangishvilli et al. [57] from *S. islandicus* and the SulAB sulfolobocin identified by Ellen et al. [59] in *S. tokodaii* and *S. acidocaldarius* are unlikely the same archaeocin. In fact, Ellen et al. [59] report that the membrane vesicles of *S. tokodaii* containing the SulAB sulfolobocin are capable of inhibiting the growth of *S. islandicus* HEN2/2. The SulAB active sulfolobocin would be a protein complex with an apparent mass of approximately 40 kDa, constituted of at least two subunits (SulA and SulB) with very strong interactions, as they remained associated following SDS-PAGE [59]. SulA and SulB both display predicted secretion signals, and the majority of the active sulfolobocin appears to be excreted associated to membrane vesicles. It is possible that packaging of the sulfolobocin into membrane vesicles occurs through the SulA subunit, the sequence of which carries a predicted lipoprotein lipid attachment site [61]. It is currently unknown whether membrane vesicles are mechanistically linked to the secretion process and mode of action of sulfolobocins, but this unprecedented feature will be a particularly interesting point to address in future studies.

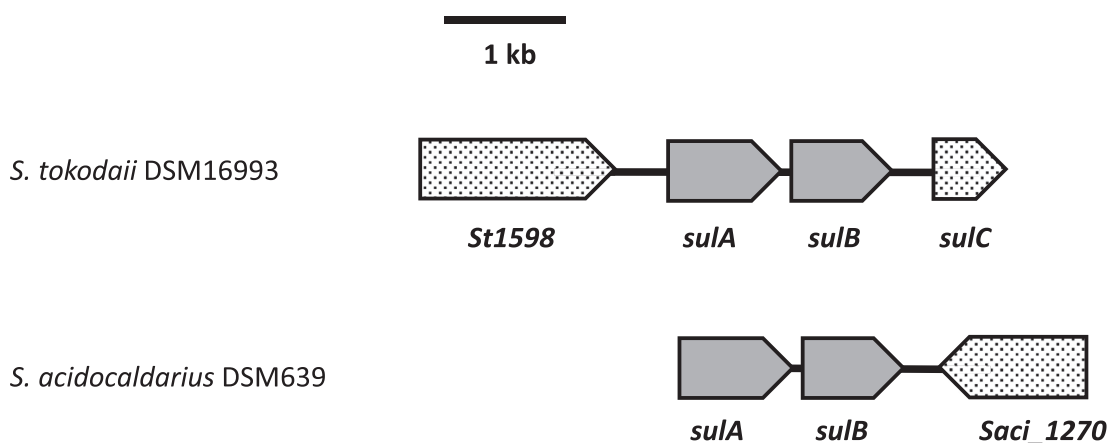


Fig. 4. Sulfolobins. Genetic locus around the genes involved in the biosynthesis of sulfolobicin, in *Sulfolobus tokodaii* DSM16993 and *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639. Open reading frames are indicated by arrows: genes encoding the archaeocin precursors (*sulA*, *sulB*, plain dark grey); genes encoding proteins of unknown function (*St1598*, *Saci_1270*, white with black dots). Data adapted from Ref. [59].

Like for most halocins, culture supernatant containing the SulAB sulfolobicin is very stable and resistant to harsh environmental conditions: the antimicrobial activity is retained following exposure to 78 °C, SDS treatment, and long-term storage and at pH ranging from 3 to 10.7. The mode of action of sulfolobins remains elusive, but seems to imply growth arrest rather than cell lysis [59].

4. Other antimicrobial compounds

Reports on antimicrobial compounds produced by archaea, other than halocins and sulfolobins, are extremely scarce. As is often the case for archaea, the first evidence came from genomic studies. Studying interdomain horizontal gene transfer, Metcalf et al. focused on a gene encoding a glycosyl hydrolase 25 (GH25) muramidase, a peptidoglycan-degrading lysozyme that hydrolyzes the 1,4- β -linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine in the bacterial cell wall [62]. Cloning and expression of the GH25 muramidase domain resulted in the production of a fully functional potent antibacterial molecule targeting members of the family *Bacillaceae* [62]. Co-culture of the deep-sea hydrothermal vent archaeon *Aciduliprofundum boonei* with *Mesoaciditoga lauensis*, a thermophilic bacterium isolated from the same environment revealed over-expression of the GH25 muramidase lysozyme gene. Moreover, *A. boonei* showed faster growth rates when grown in co-culture with *M. lauensis* than when it is grown as a monoculture. These results strongly suggest that the GH25 muramidase lysozyme produced by *A. boonei* plays a role in cellular communication and competition in hydrothermal vent microbiome [62].

The presence of other genes encoding potential antimicrobial compounds in archaeal genomes has also been reported [63–66], with no direct evidence of the functionality of these genes. For example, the presence of genes encoding modular nonribosomal peptide synthetase (NRPS) and polyketide synthase (PKS) complexes involved in the synthesis by bacteria of a variety of molecules including many antimicrobial ones, has been investigated [63]. Only three NRPS, and no PKS gene clusters were identified in the 128 analyzed archaeal genomes, indicating they are marginal biosynthesis pathways, which here again might have been acquired by horizontal transfer. It is currently unknown which compound is produced by the enzymatic complexes encoded by these gene clusters, if any [63]. Another example is afforded by the toxin-antitoxin systems that can be considered as non-secreted molecules with antimicrobial activity, involved in cell death rather than microbial competitions. However, the molecular target of toxins

and antimicrobial compounds are often similar. In the archaeal domain, toxin-antitoxin system genes have been identified in *Thermoplasmatales*, several methanotrophs, and in the symbiotic archaeon, *Nanoarchaeum equitans* [64,65]. One study also mentions the use of a stoichiometric ion-complex of archaeal poly- γ -L-glutamate and hexadecylpyridinium cation, called PGAIC, which showed antimicrobial activity against several bacterial and eukaryotic microorganisms, and was suggested for use as an antimicrobial coating agent [66].

5. Roles in microbial communities

The role of archaeocins and bacteriocins in microbial competitions remains controversial [1,6,22,23,67,68]. A study aiming at pointing interspecies competitions between different types of halophilic microorganisms in saltern crystallizer ponds of different geographic origins and at different seasons was conducted [67]. Environmental samples from hypersaline lakes and ponds were concentrated and assayed for antimicrobial activity against selected indicator strains. Finding no antimicrobial activity in the environmental samples led the authors to the conclusion that the contribution of halocins in the competition was probably negligible [67]. This is in apparent contradiction with other studies conducted on a wide number of both collection strains and freshly collected strains from hypersaline environments, which have pointed that a large proportion produced antimicrobial compounds [6,22,23]. However, Kis-Papo et al. only assayed cell-free extracts devoid of membranes [67]. Yet some clues point the membrane as the main location of halocins [46], possibly via secretion in membrane vesicles as is the case of sulfolobins [57,59]. This might explain they could not observe antimicrobial activity in natural hypersaline environments. Besides, clear phylogenetic identification of the strains studied by Atanasova et al. [6] demonstrated that among 60 archaeal strains, 27 were halocin producers, with *Halorubrum* and *Haloferax* as the preponderant halocin-producing genera. Interestingly, cross-domain inhibition was regularly observed, with members of the archaeal genera *Halorubrum*, *Haloferax*, or *Halogranum* being active against bacterial members of the genera *Halomonas*, *Rhodovibrio*, *Salisaeta*, or *Pontibacillus*, all isolated from hypersaline samples [6]. It was thus suggested that, such as bacteriocins, halocins would function as weapons to dominate a given niche occupied by microorganisms having similar adaptations and nutritional requirements. It appears more and more probable for bacteria and presumably archaea that AMPs not only exert a killing action to

combat enemies in their natural settings, but also play a role in communication between cells and are in charge of fine-tuning interactions in bacterial populations and communities [1,69]. Very few studies have afforded information on quorum sensing in archaea [70] since the first initial evidence [71]. Another direction, which remains largely unexplored, is deciphering what kinds of molecules and mechanisms act in quorum sensing in archaea and in the microbial communities where they live in extreme environments [70], and if archaeocins could contribute to these intra and inter-domain communication processes, as it is progressively shown for bacteria [72,73].

6. Biotechnological applications

Discovery of active molecules for medical, pharmaceutical, or biotechnological applications has often found inspiration in biological extracts. Traditionally, research has focused on organisms known to produce a diversity of secondary metabolites, such as plants, filamentous fungi, or bacteria. Due to their recent discovery, archaea have been totally disregarded as a potential source of active compounds.

Reasoned applications of archaeal antimicrobial compounds could be inferred from deciphering their mechanisms of action and precise molecular targets. Few studies have addressed this issue. HalH6 is the only archaeal antimicrobial proteinaceous compound for which the molecular target has been clearly identified, the archaeal Na^+/H^+ antiporter [34]. In humans, the Na^+/H^+ exchanger (NHE) is involved in essential functions such as regulation of intracellular pH, sodium homeostasis and cell volume [74]. Recent data show that dysfunction of the NHE is associated to several serious or life-threatening diseases, like cardiac diseases and cancers [74]. Inhibitors of the eukaryotic NHE could therefore be interesting drug candidates [75]. In fact, one study has demonstrated that halH6 is also capable of inhibiting the eukaryotic NHE in different mammalian cell types [38]. In a dog model of myocardial ischaemia and reperfusion, halH6 protected the myocardium, provoking a decrease of infarct size and the number of ectopic beats [38,76]. Therefore, this halocin represents a promising candidate for the treatment of heart failure, and further studies are required for possible pharmaceutical applications. Determining the mechanisms of action of other archaeocins, if they differ from that of HalH6, might thus lead to identify unexpected drug candidates. Most halocins (at least lower molecular mass ones) and sulfolobocins revealed potent stability [37,40,41,43,57]. For sulfolobocin, association to membrane vesicles is clearly documented as a means of secretion [57,59]. Although it has not been investigated as such, reports on halocin activity associated to a cellular or membrane fraction suggest that membrane vesicles might also be involved [46].

With the emergence of multi-resistant infections, research for new active compounds against pathogenic microbes is a major challenge in our modern societies. Halocins and sulfolobocins, like bacteriocins, generally exert their antimicrobial action against phylogenetically-related strains [5,7,11], therefore belonging to the archaeal domain from which only very few members have been associated with human diseases. However, halocins S8/R1 and A4 produced by members of the euryarchaeotal *Halobacteriales* have been reported to inhibit the growth of crenarchaeal *Sulfolobus* sp. strains [41]. For halocins and sulfolobocins, a few reports on antimicrobial assays against bacteria (*E. coli*, *S. aureus*, *B. megaterium*, *P. aeruginosa*) and fungi (*Saccharomyces cerevisiae*) have proven unsuccessful [36,41,43]. One report has shown that several archaeal strains isolated from hypersaline environments produce halocins capable of inhibiting bacterial strains [6]. No clear indication of cross-domain growth inhibition by a purified archaeocin has been

reported, but this point certainly deserves further investigation. Indeed, the fact that HalH6 inhibits the eukaryotic NHE [38], and the recent discovery of an active lysozyme produced by a deep-sea hydrothermal vent archaeon [62], demonstrate that some archaeocins are active against bacterial or eukaryotic targets.

Exploitation of archaeocin-producing archaea in diverse biotechnological processes or medical applications may also be considered. For example, halophilic archaea have been suggested for use in the biological treatment of saline wastewaters, discharged from many industries like seafood processing, textile dyeing, oil and gas production, tanneries and drinking water treatment processes [77]. Biological treatment relies on the capacity of methanogens and members of the *Halobacteriales* to degrade organic compounds [77]. Although investigation of archaeocin activity against methanogenic strains has not been reported yet, this aspect might prove interesting, as several gut methanogens have been suggested to be associated with human diseases [78]. Methanogenic archaea have long been known as regular inhabitants of the human gastrointestinal tract, and are strongly suspected to be involved in periodontal disease, inflammatory bowel disease, obesity, and colorectal cancer [78]. Members of the *Halobacteriales* and *Sulfolobus* sp. strains have also been repeatedly identified in human stools, but it is unclear whether they are permanent or transient inhabitants of the human gastrointestinal tract [78].

7. Conclusions and future prospects

Microorganisms, essentially bacteria and archaea, have developed strategies to survive and grow despite harsh conditions of pH, temperature or ionic strength. In the domain archaea, where adaptation to life in extreme environments is particularly developed, knowledge on archaeocins and understanding how they act in such inhospitable environments represents an emerging domain of research. This field has been seldom explored until now. One of the intriguing questions especially raised by halocins and sulfolobocins, concerns the properties and mechanisms necessary to maintain stability and activity in destructuring media, such as high ionic strength or high temperature. To conserve their proteins stable in such environments, bacteria and archaea generally use as a main strategy to specifically balance and localize particular amino acids at the surface of the protein, as well as stabilize their three-dimensional structures through disulfide bonds and ionic interactions [18]. Therefore, it would be interesting to examine if archaeocins from archaea living in extreme environments have special features allowing maintenance in the unfavorable environmental conditions. Future studies will aim clarifying different aspects of the production and roles of these AMPs, such as archaeocin distribution and potential horizontal transfer among archaea, biosynthesis and maturation pathways, tridimensional structures and mechanisms of action, as well as ecological roles. Presumably, research on archaeocins should reveal original mechanisms and/or structures, with potential applications for mankind in the next few years.

Author agreement

Material submitted is original and all the authors approved the final version of the manuscript.

Conflict of interests

The authors declare there is no conflict of interests regarding the publication of this review paper.

Acknowledgments

A.B. is 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.

References

- [1] M.A. Riley, D.M. Gordon, The ecological role of bacteriocins in bacterial competition, *Trends Microbiol.* 7 (1999) 129–133.
- [2] P.G. Arnison, M.J. Bibb, G. Bierbaum, A.A. Bowers, T.S. Bugni, G. Bulaj, et al., Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature, *Nat. Prod. Rep.* 1 (2013) 108–160, <http://dx.doi.org/10.1039/C2NP20085F>.
- [3] E.M. O'Connor, R.F. Shand, Halocins and sulfobactins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2002) 23–31, <http://dx.doi.org/10.1038/sj/jim/7000190>.
- [4] M.E. Hibbing, C. Fuqua, M.R. Parsek, S.B. Peterson, Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 15–25, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2259>.
- [5] T.R. Klaenhammer, Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie* 70 (1988) 337–349.
- [6] N.S. Atanasova, M.K. Pietilä, H.M. Oksanen, Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier, *Microbiol. Open* 2 (2013) 811–825, <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.115>.
- [7] P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 777–788, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1273>.
- [8] D. Drider, G. Fimland, Y. Hécard, L.M. McMullen, H. Prévost, The continuing story of class IIa bacteriocins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 564–582, <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00016-05>.
- [9] P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential, *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 (2005) 61–75.
- [10] J.M. Willey, W.A. van der Donk, Lantibiotics: peptides of diverse structure and function, *Annu. Rev. Microbiol.* 61 (2007) 477–501, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093501>.
- [11] S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, S. Rebuffat, Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 708–734, <http://dx.doi.org/10.1039/b516237h>.
- [12] G. Vassiliadis, D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, Class II Microcins, in: D. Drider, S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrob. Pept.*, Springer, 2011, pp. 309–332, http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-7692-5_16/fulltext.html.
- [13] Y. Cui, C. Zhang, Y. Wang, J. Shi, L. Zhang, Z. Ding, et al., Class IIa bacteriocins: diversity and new developments, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 16668–16707, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131216668>.
- [14] C. Gabrielsen, D.A. Brede, I.F. Nes, D.B. Diep, Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 6854–6862, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02284-14>.
- [15] P.D. Cotter, An “Upp”-turn in bacteriocin receptor identification, *Mol. Microbiol.* 92 (2014) 1159–1163, <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12645>.
- [16] S. Rebuffat, Microcins in action: amazing defence strategies of *Enterobacteria*, *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 1456–1462, <http://dx.doi.org/10.1042/BST20120183>.
- [17] G. Caetano-Anollés, A. Nasir, K. Zhou, D. Caetano-Anollés, J.E. Mittenenthal, F.J. Sun, K.M. Kim, Archaea: the first domain of diversified life, *Archaea* (2014), <http://dx.doi.org/10.1155/2014/590214>.
- [18] C.J. Reed, H. Lewis, E. Trejo, V. Winston, C. Evilia, Protein adaptations in archaeal extremophiles, *Archaea* (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/373275>.
- [19] T. Anwar, R.S. Chauhan, Computational analysis of halotolerance genes from halophilic prokaryotes to infer their signature, *Int. J. Adv. Biotechnol. Bioinforma.* 1 (2012) 69–77.
- [20] S. Paul, S.K. Bag, S. Das, E.T. Harvill, C. Dutta, Molecular signature of hyper-saline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes, *Genome Biol.* 9 (2008), <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r70>.
- [21] F. Rodríguez-Valera, G. Juez, D.J. Kushner, Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods, *Can. J. Microbiol.* 28 (1981) 151–154.
- [22] I. Meseguer, F. Rodríguez-Valera, A. Ventosa, Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production, *FEMS Microbiol. Lett.* 36 (1986) 177–182.
- [23] M. Torrealbanca, I. Meseguer, A. Ventosa, Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods, *Lett. Appl. Microbiol.* 19 (1994) 201–205, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00943.x>.
- [24] R.F. Shand, K.J. Leyva, Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfobactins, in: M.A. Riley, M.A. Chavan (Eds.), *Bacteriocins*, Springer, Berlin Heidelberg, 2007, pp. 93–109, http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-36604-1_5.
- [25] M. de Zamaroczy, M. Chauleau, Colicin killing: foiled cell defense and hijacked cell functions, in: D. Drider, S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrob. Pept.*, Springer, New York, 2011, pp. 255–287, http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-7692-5_14.
- [26] S. Rebuffat, Bacteriocins from gram-negative bacteria: a classification?, in: D. Drider, S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrob. Pept.*, Springer, New York, 2011, pp. 55–72, http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-7692-5_4.
- [27] I. Meseguer, F. Rodríguez-Valera, Production and purification of halocin H4, *FEMS Microbiol. Lett.* 28 (1985) 177–182.
- [28] A. Naor, P. Lapiere, M. Mevarech, R.T. Papke, U. Gophna, Low species barriers in halophilic archaea and the formation of recombinant hybrids, *Curr. Biol.* 22 (2012) 1444–1448, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.056>.
- [29] A. Naor, Y. Yair, U. Gophna, A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea, *Extrem. Life Extreme Cond.* 17 (2013) 973–979, <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-013-0579-8>.
- [30] J. Cheung, K.J. Danna, E.M. O'Connor, L.B. Price, R.F. Shand, Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 548–551.
- [31] T. Palmer, B.C. Berks, The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway, *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (2012) 483–496, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2814>.
- [32] X. Liu, L. Wang, J. Liu, L. Cai, H. Xiang, 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 (2013) 441–444, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2013.04.009>.
- [33] I. Meseguer, Rodríguez-Valera, Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 3061–3068.
- [34] I. Meseguer, M. Torrealbanca, T. Konishi, Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 6450–6455.
- [35] G. Platas, I. Meseguer, R. Amils, Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xla3, *Microbiologia* 12 (1996) 75–84.
- [36] G. Platas, I. Meseguer, R. Amils, Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a, *Int. Microbiol.* 5 (2002) 15–19, <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-002-0053-4>.
- [37] M. Torrealbanca, I. Meseguer, F. Rodríguez-Valera, Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 2655–2661, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-135-10-2655>.
- [38] J.L. Lequerica, J.E. O'Connor, L. Such, A. Alberola, I. Meseguer, M. Dolz, et al., A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of *Haloarchaea* as a new type of inhibitor in NHE of mammals, *J. Physiol. Biochem.* 62 (2006) 253–262, <http://dx.doi.org/10.1007/BF03165754>.
- [39] C. Paulino, D. Wöhlert, E. Kapotova, Ö. Yildiz, W. Kühlbrandt, Structure and transport mechanism of the sodium/proton antiporter MjNhaP1, *eLife* (2014), <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.03583>.
- [40] L.B. Price, R.F. Shand, Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 4951–4958.
- [41] R.F. Shand, K.J. Leyva, Archaeal antimicrobials: an undiscovered country, in: P. Blum (Ed.), *Archaea: New Models for Prokaryotic Biology*, Horizon Scientific Press, 2008, pp. 233–243.
- [42] C. Haseltine, T. Hill, R. Montalvo-Rodriguez, S.K. Kemper, R.F. Shand, P. Blum, Secreted euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic crenarchaea, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 287–291, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.1.287-291.2001>.
- [43] Y. Li, H. Xiang, J. Liu, M. Zhou, H. Tan, Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092, *Extremophiles* 7 (2003) 401–407, <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-003-0335-6>.
- [44] R. Meknaci, P. Lopes, C. Servy, J.-P. Le Caer, J.-P. Andrieu, H. Hacène, et al., Agar-supported cultivation of *Halobutrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex, *Extremophiles* 18 (2014) 1049–1055, <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-014-0682-5>.
- [45] N. Imadalou-Idres, A. Carré-Mlouka, M. Vandervennet, H. Yahiaoui, J. Peduzzi, S. Rebuffat, Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites, *J. Life Sci.* 10 (2013) 1057–1069, <http://dx.doi.org/10.17265/1934-7391/2013.10.006>.
- [46] C. Sun, Y. Li, S. Mei, Q. Lu, L. Zhou, H. Xiang, A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092, *Mol. Microbiol.* 57 (2005) 537–549, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04705.x>.
- [47] H. Sato, J.B. Feix, Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1245–1256, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.021>.
- [48] S. Mei, C. Sun, X. Liu, Q. Lu, L. Cai, Y. Li, et al., The helix-loop-helix motif at the N terminus of Hall is essential for its immunity function against Halocin C8, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 6501–6508, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00665-08>.
- [49] T. Stein, S. Heinzmann, I. Solovieva, K.-D. Entian, Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 89–94, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M207237200>.
- [50] S. Mei, Y. Li, Q. Lu, H. Xiang, Cloning and analysis of genes in the halocin C8 gene cluster, *Wei Sheng Wu Xue Bao* 46 (2006) 318–322.
- [51] L. Pasic, B.H. Velikonja, N.P. Ulrhi, Optimization of the culture conditions for the production of a bacteriocin from halophilic archaeon Sech7a, *Prep.*

- Biochem. Biotechnol. 38 (2008) 229–245, <http://dx.doi.org/10.1080/10826060802164637>.
- [52] D.M. Gordon, C.L. O'Brien, Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*, Microbiology 152 (2006) 3239–3244, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28690-0>.
- [53] S. Sablé, M. Duarte, D. Bravo, I. Lanneluc, A.M. Pons, G. Cottenceau, et al., Wild-type *Escherichia coli* producing microcins B17, D93, J25, and L; cloning of genes for microcin L production and immunity, Can. J. Microbiol. 49 (2003) 357–361, <http://dx.doi.org/10.1139/w03-047>.
- [54] J. Soppa, D. Oesterhelt, *Halobacterium* sp. GRB: a species to work with!? Can. J. Microbiol. (1989) 205–209.
- [55] P. Karthikeyan, S.G. Bhat, M. Chandrasekaran, Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India, Saudi J. Biol. Sci. 20 (2013) 205–212, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.02.002>.
- [56] P. Kavitha, A.P. Lipton, A.R. Sarika, M.S. Aishwarya, Growth characteristics and halocin production by a new isolate, *Haloflex volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India), Res. J. Biol. Sci. 6 (2011) 257–262.
- [57] D. Prangishvili, I. Holz, E. Stieger, S. Nickell, J.K. Kristjansson, W. Zillig, Sulfolobins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*, J. Bacteriol. 182 (2000) 2985–2988, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.10.2985-2988.2000>.
- [58] E. Marguet, M. Gaudin, E. Gauliard, I. Fourquaux, S. le Blond du Plouy, I. Matsui, et al., Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of the genus *Thermococcus*, Biochem. Soc. Trans. 41 (2013) 436–442, <http://dx.doi.org/10.1042/BST20120293>.
- [59] A.F. Ellen, O.V. Rohulya, F. Fusetti, M. Wagner, S.-V. Albers, A.J.M. Driessen, The sulfolobin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins, J. Bacteriol. 193 (2011) 4380–4387, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.05028-11>.
- [60] X.Y. You, C. Liu, S.Y. Wang, C.Y. Jiang, S.A. Shah, D. Prangishvili, Q. She, S.J. Liu, R.A. Garrett, Genomic analysis of *Acidianus hospitalis* W1 a host for studying crenarchaeal virus and plasmid life cycles, Extremophiles 15 (2011) 487–497, <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-011-0379-y>.
- [61] Y. Kawarabayashi, Y. Hino, H. Horikawa, K. Jin-no, M. Takahashi, M. Sekine, et al., Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7, DNA Res. 8 (2001) 123–140.
- [62] J.A. Metcalf, L.J. Funkhouser-Jones, K. Briley, A.-L. Reysenbach, S.R. Bordenstein, Antibacterial gene transfer across the tree of life, eLife 3 (2014), <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.04266>.
- [63] H. Wang, D.P. Fewer, L. Holm, L. Rouhiainen, K. Sivonen, Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111 (2014) 9259–9264, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1401734111>.
- [64] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, E.V. Koonin, Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria, Nucleic Acids Res. 41 (2013) 4360–4377, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt157>.
- [65] C.F. Schuster, R. Bertram, Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate, FEMS Microbiol. Lett. 340 (2013) 73–85, <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12074>.
- [66] M. Ashiuchi, K. Fukushima, H. Oya, T. Hiraoki, S. Shibata, N. Oka, et al., Development of antimicrobial thermoplastic material from archaeal poly- γ -L-glutamate and its nanofabrication, ACS Appl. Mater. Interfaces 5 (2013) 1619–1624, <http://dx.doi.org/10.1021/am3032025>.
- [67] T. Kis-Papo, A. Oren, Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds? Extremophiles 4 (2000) 35–41, <http://dx.doi.org/10.1007/s007920050005>.
- [68] H. Majeed, O. Gillor, B. Kerr, M.A. Riley, Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins, ISME J. 5 (2011) 71–81, <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.90>.
- [69] M. Kjos, J. Borrero, M. Opsata, D.J. Birri, H. Holo, L.M. Cintas, et al., Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria, Microbiology 157 (2011) 3256–3267, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.052571-0>.
- [70] K. Montgomery, J.C. Charlesworth, R. LeBard, P.T. Visscher, B.P. Burns, Quorum sensing in extreme environments, Life 3 (2013) 131–148, <http://dx.doi.org/10.3390/life3010131>.
- [71] R.A. Paggi, C.B. Martone, C. Fuqua, R.E. De Castro, Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*, FEMS Microbiol. Lett. 221 (2003) 49–52.
- [72] G.J. Lyon, R.P. Novick, Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria, Peptides 25 (2004) 1389–1403, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2003.11.026>.
- [73] V. Monnet, V. Juillard, R. Gardan, Peptide conversations in Gram-positive bacteria, Crit. Rev. Microbiol. (2014) 1–13, <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2014.948804>.
- [74] M. Donowitz, C. Ming Tse, D. Fuster, SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers, Mol. Asp. Med. 34 (2013) 236–251, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.001>.
- [75] S.Y. Loo, M.K.X. Chang, C.S.H. Chua, A.P. Kumar, S. Pervaiz, M.V. Clement, NHE-1: a promising target for novel anti-cancer therapeutics, Curr. Pharm. Des. 18 (2012) 1372–1382.
- [76] A. Alberola, I. Meseguer, M. Torreblanca, A. Moya, S. Sancho, B. Polo, et al., Halocin H7 decreases infarct size and ectopic beats after myocardial reperfusion in dogs, J. Physiol. 509P (1998) 148.
- [77] Y. Xiao, D.J. Roberts, A review of anaerobic treatment of saline wastewater, Environ. Technol. 31 (2010) 1025–1043, <http://dx.doi.org/10.1080/09593331003734202>.
- [78] N. Gaci, G. Borrel, W. Tottey, P.W. O'Toole, J.-F. Brugère, Archaea and the human gut: new beginning of an old story, World J. Gastroenterol. 20 (2014) 16062–16078, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16062>.

Chapitre 2

Halocine C8, un peptide antimicrobien
distribué parmi quatre genres d'archées halophiles,
Natrinema, *Haloterrigena*, *Haloferax*, *Halobacterium*

Chapitre 2

Halocine C8, un peptide antimicrobien distribué parmi quatre genres d'archées halophiles, *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax*, *Halobacterium*

1. RESUME

L'halocine C8 (HalC8) est un peptide antimicrobien de 7,4 kDa, initialement isolé de la souche *Natrinema* sp. AS7092 qui provient du lac salé Chaidan en Chine (Li *et al.*, 2003). Le gène *halC8* code une protéine précurseur ProC8, qui est clivée et maturée *via* un mécanisme encore inconnu à ce jour. La maturation de la protéine précurseur résulte en la libération du peptide mature actif HalC8, une protéine d'immunité HalI qui protège la souche contre sa propre toxicité ainsi qu'un peptide signal de 40 acides aminés comportant une séquence consensus typique du signal Tat (Sun *et al.*, 2005). La voie Tat permet la translocation de peptides et protéines repliées à travers la membrane cytoplasmique, *via* la reconnaissance d'un motif double arginine (Wickner et Schekman, 2005). Au même titre que les bactériocines, un groupe de gènes pourrait être impliqué dans la production d'HalC8. En effet, cinq gènes aux fonctions putatives ont été identifiés en amont et en aval du gène *halC8* (Mei *et al.*, 2006). En amont d'*halC8*, on trouve le gène *halU*, qui code une protéine transmembranaire dont la fonction est inconnue et *halR*, qui possède des identités de séquence avec des gènes codant des protéines de régulation (Mei *et al.*, 2006). En aval d'*halC8*, les gènes *halT1*, *halT2* et *halT3* pourraient être impliqués dans l'export d'HalC8 *via* un système d'ABC transporteurs (Mei *et al.*, 2006). Bien qu'un tel groupe de gènes soit fréquemment impliqué dans la production de bactériocines, c'est la première fois qu'une telle organisation génétique est décrite pour une halocine (Duquesne *et al.*, 2007 ; Lancaster *et al.*, 2007 ; Kuipers *et al.*, 2011).

Des études précédemment menées ont permis de démontrer qu'HalC8 est produite par d'autres souches d'archées de l'ordre *Halobacteria*, appartenant toutes au genre *Natrinema*¹ (Imadalou-Idres *et al.*, 2013 ; Meknaci *et al.*, 2014 ; Quadri *et al.*, 2016). Dans ce contexte, notre étude s'est portée sur la répartition de la production d'HalC8 dans les milieux hypersalins afin de savoir si elle était restreinte aux archées du genre *Natrinema*. Par des approches *in silico* et PCR complémentaires, nous avons montré que le gène *halC8* était présent chez d'autres archées halophiles isolées d'environnements géographiquement éloignés (Tableau 1). En fait, le gène *halC8* est systématiquement retrouvé dans les génomes des souches appartenant aux genres *Natrinema* et *Haloterrigena*, deux genres phylogénétiquement très proches. Chez ces souches, les gènes impliqués dans les mécanismes de transport et de régulation d'HalC8 ont également été retrouvés. L'expression fonctionnelle d'*halC8* chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* a été montrée par RT-PCR et par des tests antimicrobiens contre *Halorubrum chaoviator* ETR14, *Halobacterium salinarum* DSM3754 et/ou *Halorubrum chaoviator* ETD3 (Tableau 16). Chez les genres *Haloferax* et *Halobacterium*, des gènes *halC8*, codant HalC8 mais avec une protéine d'immunité de séquence divergente, ont été retrouvés par des analyses *in silico*. Cependant, une analyse phylogénétique basée sur les séquences en acides aminés d'HalC8 des différentes souches a révélé qu'ils appartiennent à des clades distincts. Les résultats obtenus au cours de cette étude font l'objet d'une publication intitulée « Halocin C8, an antimicrobial peptide widely distributed among the genera *Natrinema* et *Haloterrigena* » en préparation pour une soumission prévue en août dans le journal FEMS Microbiology Ecology.

¹ Dans Meknaci *et al.*, l'archée productrice avait été initialement affiliée au genre *Halorubrum* mais il s'agit en réalité de la souche appartenant au genre *Natrinema*, comme corrigé dans Besse *et al.* (Besse *et al.*, 2015).

Souche	Origine	Présence des gènes ¹				Expression d'HalC8	
		<i>halC8</i>	<i>halU</i>	<i>halR</i>	<i>halT</i>	RT-PCR ²	Activité antimicrobienne ³
<i>Natrinema</i>							
<i>pallidum</i> DSM15623	Morue salée	+	+	+	+	+	+
<i>pellirubrum</i> DSM15624	Espagne	+	+	+	+	+	+
<i>versiforme</i> DSM16034	Chine	+	+	-	+	+	+
<i>gari</i> JCM14663	Chine	+	+	-	+	+	+
<i>altunense</i> JCM12890	Chine	+	+	+	+	+	+
sp. J7-2	Chine	+	+	-	+	+	+
sp. SS19	Algérie	+	non séquencée			+	+
sp. SWI6	Algérie	+	non séquencée			+	+
<i>ejinorensis</i> DSM18194	Thaïlande	+	non séquencée			+	+
<i>salaciae</i> DSM25055	Espagne	+	non séquencée			+	+
<i>Haloterrigena</i>							
<i>hispanica</i> DSM18328	Espagne	+	+	-	+	+	+
<i>jeotgali</i> DSM18794	Corée	+	+	-	+	+	+
<i>turkmenica</i> DSM5511	Turkménistan	+	+	+	+	+	+
<i>thermotolerans</i> DSM11552 ⁴	Puerto Rico	+	+	-	+	+	+
<i>salina</i> JCM13891 ⁴	Mongolie	+	+	+	+	+	+

Tableau 16. Etude de la répartition de la production d'HalC8 chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena*.

Les résultats présentés dans ce tableau sont le résumé de la publication « Halocin C8 : an antimicrobial peptide distributed among four halophilic genera : *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax*, *Halobacterium* ».

¹ la présence des gènes (+) a été recherchée par des analyses *in silico* dans les bases de données publiques avec les algorithmes blastp et tblastn et par PCR avec les amorces C8-Imm1 (5'-GAGGAACCGAAACTGCTCAC-3') et C8-12-R (5'-RTCGGCGACGGTACAGA-3') dans le cas de *halC8*

² Les tests de transcription inverses ont été réalisés sur de l'ARN extrait en début de phase stationnaire et rétro-transcrit en ADNc. L'analyse PCR a été réalisée avec les amorces C8-Imm1 et C8-12-R. Les signes + indiquent la détection d'amplicons.

³ le signe + indique l'observation d'un halo d'inhibition de 13 mm minimum contre les souches *Halorubrum chaoviator* ETR14, *Halobacterium salinarum* DSM3754 et/ou *Halorubrum chaoviator* ETD3

⁴ souches pour lesquelles deux séquences protéiques différentes ont été obtenues pour HalC8

2. ARTICLE

RESEARCH ARTICLE

**Halocin C8: an antimicrobial peptide distributed among four
halophilic archaeal genera: *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax*,
*Halobacterium***

Alison Besse, Manon Vandervennet, Christophe Goulard, Jean Peduzzi,
Stéphanie Isaac, Sylvie Rebuffat & Alyssa Carré-MLouka

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

Correspondence: Alyssa Carré-MLouka, 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

Tel : +33 1 40 79 31 32 ;

fax: +33 1 40 79 31 35 ;

e-mail : acarre@mnhn.fr

Abstract

Halophilic archaea belonging to the *Halobacteria* are prokaryotic microorganisms that require high-salt conditions for living. They thrive in hypersaline ecosystems and produce antimicrobial peptides (AMPs) named halocins. Halocin C8 (HalC8) is a 7.4 kDa peptide produced by the Chinese halophilic strain *Natrinema* sp. AS7092. Surrounded by genes involved in regulation and transport, the *halC8* gene encodes a ProC8 precursor, processed into the mature HalC8 peptide and a HalI immunity protein, protecting the producing strain against its own AMP. By complementary *in silico* and PCR-based approaches, we have shown the presence of *halC8* in other halophilic archaea from various sites of collection in the world. The full-length *halC8* gene is restricted and consistently found in the genomes of strains belonging to the two phylogenetically closely related genera *Natrinema* and *Haloterrigena*, along with transport and regulation genes. Functional expression of *halC8* was demonstrated by RT-PCR and antimicrobial assays. In other archaeal genera, *Haloferax* and *Halobacterium*, *halC8* genes encoding HalC8 with diverging immunity protein moiety were evidenced. A phylogenetic analysis of HalC8 was conducted. Implications of sequence analysis on regulation, processing, export and function of HalC8 in natural environments are discussed.

Keywords: hypersaline ecosystems, halophilic archaea, antimicrobial peptides, halocin C8, *Natrinema*, *Haloterrigena*

Introduction

The diverse populations of organisms that share a unique ecological niche have to compete against each other for niche space and resources (Hibbing *et al.*, 2010). This is most particularly the case in extreme ecosystems where colonizers are subjected to scarcity of nutrients and harsh environmental conditions. Among those, hypersaline environments are characterized by high salt concentrations in the range 35-390 g.L⁻¹ (Oren, 2008). Such conditions can be found in natural areas such as inland lakes (e.g. The Dead Sea, Israel), salt deserts (e.g. Atacama desert, Chile), deep-sea pools, ancient underground salt deposits; or in man-made evaporation ponds and crystallizer basins of multi-pond solar saltern systems (Oren, 20036; DasSarma and DasSarma, 2012). Although hostile to most macroscopic forms of life, hypersaline environments are colonized by microorganisms adapted to life at high salt concentrations, called halophiles. Halophiles are found in all three domains of life: *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya* (Ma *et al.*, 2010). Highly diverse prokaryote communities can be found in hypersaline environments with, as shown by both culture-dependent and molecular environmental studies, members of the archaeal class *Halobacteria* as the dominant colonizers (Øvreås *et al.*, 2003).

Antimicrobial compounds are essential effectors of microbial interactions in natural ecosystems. In hypersaline environments, such compounds called halocins, have been found to be produced by halophilic archaea belonging to the class *Halobacteria*. Being synthesized by extremophilic organisms, halocins are proteinaceous antimicrobial compounds with promising biotechnological applications, as active molecules with original targets and modes of action. 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 a peptide with antimicrobial activity directed against several genera of

halophilic archaea (Li *et al.*, 2003). This peptide 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 *et al.*, 2012). Maturation of ProC8 involves proteolytic cleavage by an unknown mechanism, to yield the active 7.4 kDa-mature peptide HalC8 and a 17.7 kDa-immunity protein HalI that protect 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 unknown function; *halR* displays identities to regulator genes; *halT1*, *halT2* and *halT3* encode components of an 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). Bacterial AMPs have been widely studied and described both in Gram-positive and Gram-negative bacteria (Kuipers *et al.*, 2011, Rebuffat 2011)

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 indicate production of HalC8. Five *Natrinema sp.* strains isolated from the Ichekaben salterns carry the *halC8* gene and display papain sensitive antimicrobial compounds (Imadalou-Idres *et al.*, 2013). The peptide has also been purified from an isolate from the Sidi Ben Ameer sebkha, indicated to belong to the genus *Halorubrum* but in fact affiliated to *Natrinema sp.* (Meknaci *et al.*, 2014, Besse *et al.*, 2015). Isolated from the Chott Melghir, the

88 El Golea, Sidi Ameur and Adrar sebkhas, six strains belonging to the *Natrinema* genus
89 displayed antimicrobial activity and their genome contained a *halC8* gene (Quadri *et al.*,
90 2016). Variants of HalC8 have also been reported: the unidentified Tunisian strain TuA4
91 produces halocin A4, a 7.4 kDa peptide whose amino acid sequence is 75% identical to that of
92 HalC8 (Shand and Leyva, 2007). Interestingly, there is no study reporting a HalC8-producing
93 strain that belongs to another genus than *Natrinema*.

94 This study thus focuses on HalC8, with the aim of determining whether the capacity to
95 produce this AMP can be correlated with a phylogenetic affiliation to the *Natrinema* genus. *In*
96 *silico* analysis of the *halC8* and surrounding genes was conducted, using available public
97 databases. Using a wide range of *Natrinema* isolates, as well as isolates belonging to the
98 closely related genus *Haloterrigena*, PCR-amplification of the *halC8* gene was performed, as
99 well as a transcriptional analysis and antimicrobial assays to determine whether the peptide
100 was expressed.

101

Materials and methods

Strains and growth conditions

Archaeal strains used in this study are listed in Table 1; they 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.

Strain	Origin	Reference
<i>Halobacterium salinarum</i> DSM3754	salted cow hide	Colwell <i>et al.</i> 1979
<i>Halorubrum chaoviator</i> ETD3	Sfax salterns, Tunisia	Ghanmi <i>et al.</i> 2016
<i>Halorubrum chaoviator</i> ETR14	Sfax salterns, Tunisia	Ghanmi <i>et al.</i> 2016
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM1411	Alicante solar salterns, Spain	Rodríguez-Valera <i>et al.</i> 1983
<i>Haloterrigena hispanica</i> DSM18328*	Fuente de Piedra salt lake, Spain	Romano <i>et al.</i> 2007
<i>Haloterrigena jeotgali</i> DSM18794*	Shrimp jeotgal, Korea	Roh <i>et al.</i> 2009
<i>Haloterrigena thermotolerans</i> DSM11552*	Solar salterns, Puerto Rico	Montalvo-Rodríguez <i>et al.</i> 2000
<i>Haloterrigena salina</i> JCM13891*	Xilinhot salt Lake, Inner Mongolia, China	Gutiérrez <i>et al.</i> 2008
<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM5511*	Saline soil, Turkmenistan	Zvyagintseva and Taravov 1988
<i>Natrinema altunense</i> JCM12890*	Ayakekum salt Lake, Xinjiang, China	Xu <i>et al.</i> 2005
<i>Natrinema ejinorensense</i> DSM18194*	Lake Ejnor, Inner Mongolia, China	Castillo <i>et al.</i> 2006
<i>Natrinema gari</i> JCM14663*	Anchovy fish sauce, Thailand	Tapingkae <i>et al.</i> 2008
<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM15624*	salted hide	McGenity <i>et al.</i> 1998
<i>Natrinema pallidum</i> DSM15623*	salted cod	McGenity <i>et al.</i> 1998
<i>Natrinema versiforme</i> DSM16034*	Aibi salt Lake, Xinjiang, China	Xin <i>et al.</i> 2000
<i>Natrinema salaciae</i> DSM25055*	Lake Medee, Eastern Mediterranean Sea, Italy	Albuquerque <i>et al.</i> 2012
<i>Natrinema</i> sp. SWI15*	Algeria	Imadalou-Idres <i>et al.</i> 2013
<i>Natrinema</i> sp. SSI9*	Algeria	Imadalou-Idres <i>et al.</i> 2013
<i>Natrinema</i> sp. SWI6*	Algeria	Imadalou-Idres <i>et al.</i> 2013

Table 1. Halophilic archaeal strains used in this study

*Strains tested by PCR for the presence of *halC8*, using primers C8-Imm1 and C8-12-R.

Antimicrobial assays

The detection of antimicrobial activity was conducted by using the agar well-diffusion method.

Fifteen mL of medium 372 molten soft agar (agar 8 g.L⁻¹) was inoculated with 1-50 µL of an early stationary phase culture (OD₆₀₀ = 1.2-1.8) so as to obtain a final OD₆₀₀ 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 around the well of a clear inhibition halo, measured in mm.

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 mg.mL⁻¹) and incubating for 15 min at room temperature. twenty µL of 10% (w/v) SDS were added before the sample was incubated for 1 h at room temperature with stirring. Fifty µL of 20 mg.mL⁻¹ proteinase K were added, followed by incubation for 2 h at 55°C. After centrifugation, the lysate was dialyzed (3500 Da membranes, Spectrum) against MilliQ® water extensively overnight. DNA was extracted with chloroform and precipitated with isopropanol, as described (Sambrook *et al.* 1989).

RNA extraction was performed using a 100 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 at 37°C, RNA was further purified by 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 (300 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), 1 µL of 0.1 M DTT (Invitrogen) 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 10 min at 25°C and then 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'-ACGCTGTGCGAGTAGGAGTT-3') and C8-IG2 (5'-GAGACGACGTTTCGAGGAATC-3') for amplification of the complete *halC8* gene; or primers C8-Imm1 (5'-GAGGAACCGAACTGCTCAC-3') and C8-12-R (5'-RTCGGCGACGGTACAGA-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 under accession numbers KX382973-KX3829982.

***In silico* sequence analysis**

The presence of the *halC8* gene sequence was searched in the Genbank database using the BLASTN, BLASTX, and BLASTP algorithms (Dereeper *et al.*, 2008) and the sequences of *Natrinema* sp. AS7092 as query (accession number: DQ137141.1). 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, Lefort *et al.*, 2015, <http://www.atgc-montpellier.fr/fastme/>), using 1,000 replicates in the bootstrap test. The tree was visualised using TreeDyn. Prediction of Tat signal sequences was assayed using PRED-TAT (Pantelis *et al.*, 2010, <http://www.compgeen.org/tools/PRED-TAT>). Secondary structures were predicted using JPRED (Drozdretskiy *et al.*, 2015, <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4>).

Purification of HalC8

From liquid culture of *Natrinema* sp. SWI6

Eight liters of a *Natrinema* sp. SWI6 culture were grown to early stationary phase (OD₆₀₀= 1.5-1.9). The culture was centrifuged for 30 min at 8,000 g and the resulting supernatant was heated for 10 min at 100°C. The heated culture supernatant was passed on a C8 Sep-Pak cartridge 35 cc (Waters) pre-equilibrated with 10% acetonitrile (ACN) in H₂O and successive elution steps were performed with 600 mL of 20, 60, 80, and 100% (v/v) ACN. The Sep-Pak elution fractions were freeze-dried, resuspended in 10 mL ACN and tested for their antimicrobial activity against *Halorubrum chaoviator* ETD3 using the agar well-diffusion

method, as described above. The fraction displaying the higher antimicrobial activity was fractionated by HPLC with a analytical C4 Uptisphere® column (250 x 4.6 mm, 5 µm 300 Å, Interchim, France) eluted with a flow rate of 1 mL.min⁻¹ using an ACN/H₂O gradient from 0 to 80% in 20 min, followed by an isocratic step at 80% ACN for 5 minutes,. Injection volume was 200 µL. The elution profile was monitored at 226 nm. Forty fractions of 500 µL were collected between 5 and 25 minutes. They were concentrated under vacuum in a SpeedVac® concentrator (Savant) and solubilized in a mixture of ACN/H₂O 80:20. Ten µL of each fraction were tested for their antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. The fraction with the higher activity was further fractionated by HPLC on C4 Uptisphere® column in the same conditions as described previously. The main peak was detected at 16.17 min and analyzed by mass spectrometry using MALDI-TOF (Voyager DE Pro spectrometer, AB-Sciex).

From solid culture of *Natrinema altunense* JCM12890

Sixteen Petri dishes of DSMZ Halobacteria solid medium 372 sowed with *Natrinema altunense* JCM12890 were grown for 14 days at 30°C. The sowed agar was cut out into small pieces, which were macerated for 4 hours in methanol. The liquid phase was evaporated under reduced pressure (rotary evaporator, Buchi) and solubilized in H₂O containing 0.1% formic acid which was extracted with butanol. The butanol phase was evaporated under reduced pressure (rotary evaporator, Buchi), solubilized in 50 mL of H₂O containing 0.1% formic acid and passed on a C8 Sep-Pak cartridge 35 cc (Waters) pre-equilibrated with 10% ACN in H₂O and eluted with 600 mL ACN/H₂O (80:20). The eluted fraction was evaporated, solubilized in 500 µL of ACN 80% and submitted to LC-MS analysis.

MALDI-TOF MS and LC-MS analyses

Extracts or purified peptides were analyzed either by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using a Voyager DE-Pro mass spectrometer (Applied Biosystems) with α-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix,

215 or by LC-MS on an Ultimate 3000 micro-HPLC system (Thermo Scientific) connected to an
216 ESI-Qq-TOF Q-STAR mass spectrometer (AB Sciex). The separation was achieved on a C18
217 column (1 mm, 100 mm, ACE). The elution gradient was 0 to 80% ACN in 0.1% TFA over
218 40 min at a flow rate of 40 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Detection wavelength was set at 226 nm and ESI source
219 was operated in positive mode with a spray voltage of 5,200 V.
220

Results

In silico analysis of the presence of the *halC8* gene

To date, the *halC8* gene has been detected exclusively in strains belonging to the *Natrinema* genus. In order 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 *halC8* sequence of *Natrinema* sp. AS7092. The results are summarized in Table 2.

Using BLASTN default parameters, only a few hits could be detected, using the complete nucleotide sequence of *halC8*: *Natrinema* sp. SWI15 HalC8 precursor (Genbank accession n°KF516080; identity 99%, query cover 100%); *Natrinema* sp. J7-2 complete genome (Genbank accession n°CP003412; identity 93%, query cover 63%); *Natrinema pellirubrum* DSM15624 complete genome (Genbank accession n°CP003372; identity 73%, query cover 94%). However, when using the translated sequence of *halC8* with the BLASTP or TBLASTN algorithm, a larger number of sequences presenting similarities to the ProC8 precursor could be identified, either previously identified as HalC8 precursor or annotated as hypothetical proteins (Table 2 and Table 3, 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 order *Halobacteria*, which belonged to only a few genera: *Natrinema*, *Haloterrigena* (identified only with BLASTP algorithm, Table 2), *Haloferax*, and *Halobacterium*. The BLASTP analysis 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).

Name	Sequence accession no	ProC8			HalI			HalC8		
		Score	Identity	Query cover	Score	Identity	Query cover	Score	Identity	Query cover
halocin C8 precursor [<i>Natrinema</i> sp. SWI15]	AII25935	556	98%	100%	404	97%	100%	154	100%	100%
halocin C8 precursor [<i>Natrinema altunense</i> JCM12890]	ELY84479	495	99%	87%	343	99%	87%	153	100%	100%
halocin C8 precursor [<i>Natrinema</i> sp. SSI9]	AII25940	425	73%	100%	308	74%	100%	115	70%	100%
halocin C8 precursor [<i>Haloterrigena salina</i> JCM13891]	ELZ21917	412	82%	87%	269	78%	83%	143	91%	100%
halocin C8 precursor [<i>Natrinema pellirubrum</i> JCM15624]	ELY70477	332	61%	100%	206	56%	98%	127	80%	98%
halocin C8 precursor [<i>Natrinema gari</i>]	WP_008456182	240	89%	46%	101	86%	27%	137	92%	100%
hypothetical protein [<i>Haloterrigena thermotolerans</i>]	WP_006648340	154	40%	86%	81.6	41%	65%	65.5	49%	98%
halocin C8 (TBD) [<i>Haloferax gibbonsii</i>]	WP_004975848	154	36%	99%	ND	ND	ND	85.9	58%	93%
halocin C8 (TBD) [<i>Haloferax lucentense</i>]	WP_004064530	152	36%	99%	ND	ND	ND	85.9	58%	93%
halocin C8 (TBD) [<i>Haloferax volcanii</i>]	WP_004043226	148	36%	99%	ND	ND	ND	85.9	58%	93%
hypothetical protein J07HB67_00644 [halophilic archaeon J07HB67]	ERH11636	130	34%	79%	ND	ND	ND	57.8	41%	97%
hypothetical protein [<i>Haloferax larsenii</i>]	WP_007541953	124	33%	76%	ND	ND	ND	63.9	47%	97%
hypothetical protein [<i>Halobacterium salinarum</i>]	WP_012289233	108	29%	75%	52	33%	41%	52	38%	98%
Vng6329h (plasmid) [<i>Halobacterium salinarum</i> NRC-1]	AAG20958	103	30%	72%	ND	ND	ND	45.4	48%	63%
hypothetical protein J07HX5_02037 [halophilic archaeon J07HX5]	ERG89865	ND	ND	ND	ND	ND	ND	60.8	47%	94%

Table 2. *In silico* search results for the presence of the halocin C8 gene, using the BLASTP algorithm

ND: not detected

Name	Sequence accession no	ProC8			HalI			HalC8		
		Score	Identity	Query cover	Score	Identity	Query cover	Score	Identity	Query cover
halocin C8 precursor gene [<i>Natrinema</i> sp. SWI15]	KF516080	535	94%	100%	380	92%	100%	153	100%	100%
halocin C8 precursor gene [<i>Natrinema</i> sp. SS19]	KF516085	404	70%	100%	287	70%	100%	115	70%	100%
hypothetical gene [<i>Natrinema pellirubrum</i> JCM15624]	CP003372	331	59%	100%	205	53%	98%	126	80%	98%
hypothetical gene [<i>Natrinema</i> sp. J7-2]	CP003412	329	89%	65%	184	85%	53%	142	95%	100%
hypothetical gene [<i>Haloferax gibbonsii</i> ARA6]	CP011947	147	34%	99%	ND	ND	ND	85.5	58%	93%
hypothetical gene, plasmid pHV4 [<i>Haloferax volcanii</i> DS2]	CP001955	144	35%	99%	ND	ND	ND	85.5	58%	93%
hypothetical gene, megaplasmid 2 [<i>Halobacterium</i> sp. GN101]	EU080936	135	31%	95%	ND	ND	ND	69.7	50%	97%
hypothetical gene, plasmid PHS3 [<i>Halobacterium salinarum</i> R1]	AM774415	107	28%	86%	51.2	33%	41%	45.4	48%	63%
hypothetical gene, plasmid pNRC200 [<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1]	AE004437	107	28%	85%	52	33%	41%	43.5	40%	96%

Table 3. *In silico* search results for the presence of the halocin C8 gene, using the TBLASTN algorithm
ND: not detected

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 the AMP HalC8 presented better similarity. Therefore, we artificially split the sequence of the *halC8* gene in two, and used either the 5' part of the gene (nucleotides 1-621) encoding the HalI immunity protein, or the 3' part of the gene (nucleotides 622-852) encoding the mature HalC8 peptide, as queries to conduct a similar analysis (Table 2 and 3, 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 (HalI+HalC8), while this was not the case for *Haloferax* and *Halobacterium* strains. No HalI immunity protein moiety could be detected for *Haloferax* strains, and, for some *Halobacterium* strains, it could be detected only with very low identity (33%) or 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 the mature HalC8 peptide, without identified similarity to HalI immunity protein moiety, although in all cases HalC8 was part of a larger sequence.

PCR amplification of the *halC8* gene

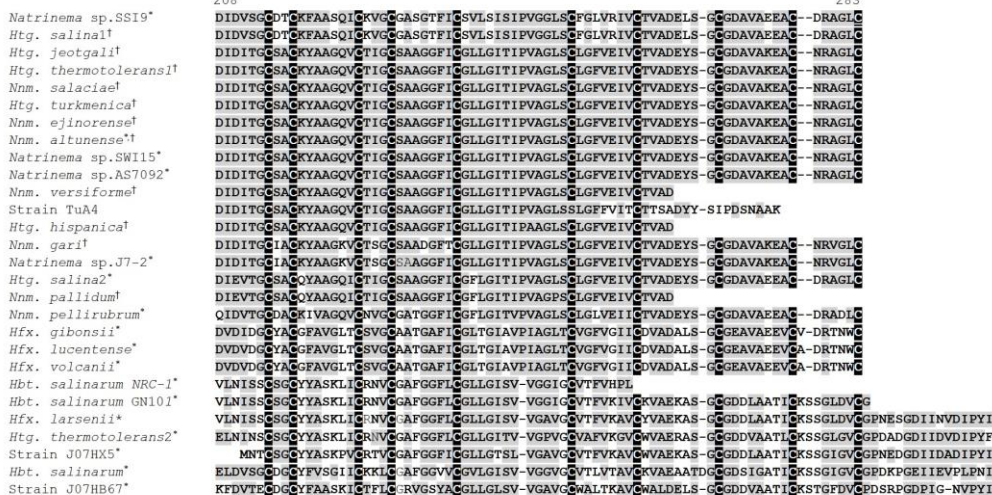
Since our *in silico* analysis showed that the full-length *halC8* gene is conserved in *Natrinema* and *Haloterrigena* genomes, we aimed to determine whether the presence of this gene was a characteristic of these genera. For this, we designed specific nucleotide primers, based on a multiple alignment 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. 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, *Nm. altunense* JCM12890, *Nm. pellirubrum* JCM15624, *Nm. gari* JCM14663, *Htg. thermotolerans* DSM11552). Despite the fact that the genome sequences for *Nm. pallidum* DSM15623, *Nm. versiforme* DSM16034, *Htg. jeotgali* DSM18794, *Htg. turkmenica* DSM5511, and *Htg. salina* JCM13891 are available in the public databases, we were not able to identify a *halC8* gene by *in silico* analysis. However, a *halC8* gene was amplified using the primers C8-Imm1 and C8-12-R, as well as for strains *Nm. ejinorensis* DSM18194, *Nm. salaciae* DSM25055 and *Htg. hispanica* DSM18328 for which no genome sequence was available. Moreover, a 1058 bp-fragment was amplified with the primers C8-IG1 and C8-IG2 localized upstream and downstream the coding sequence of *halC8*, for *Nm. altunense* JCM12890, *Nm. ejinorensis* DSM18194, *Nm. salaciae* DSM25055, *Htg. turkmenica* DSM5511, *Htg. jeotgali* DSM18794, *Htg. thermotolerans* DSM11552, and *Htg. salina* JCM13891. Amplicons were cloned and sequenced. Interestingly, while the *Nm. 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. This sequences were named *Htg. thermotolerans*1 and *Htg. salina*1 were 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 (Fig. 1A) sequences from *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax*, and *Halobacterium*, or the HalI (Fig. 1B) sequences from *Natrinema* and *Haloterrigena* were aligned, and phylogenetic trees were constructed

based on these multiple alignments (Fig. 2). For ProC8, 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. Some sequences were shorter, based on gene prediction in Genbank: ProC8 of *Hbt. salinarum* NRC-1 in the C-terminal end; ProC8 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 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.



B

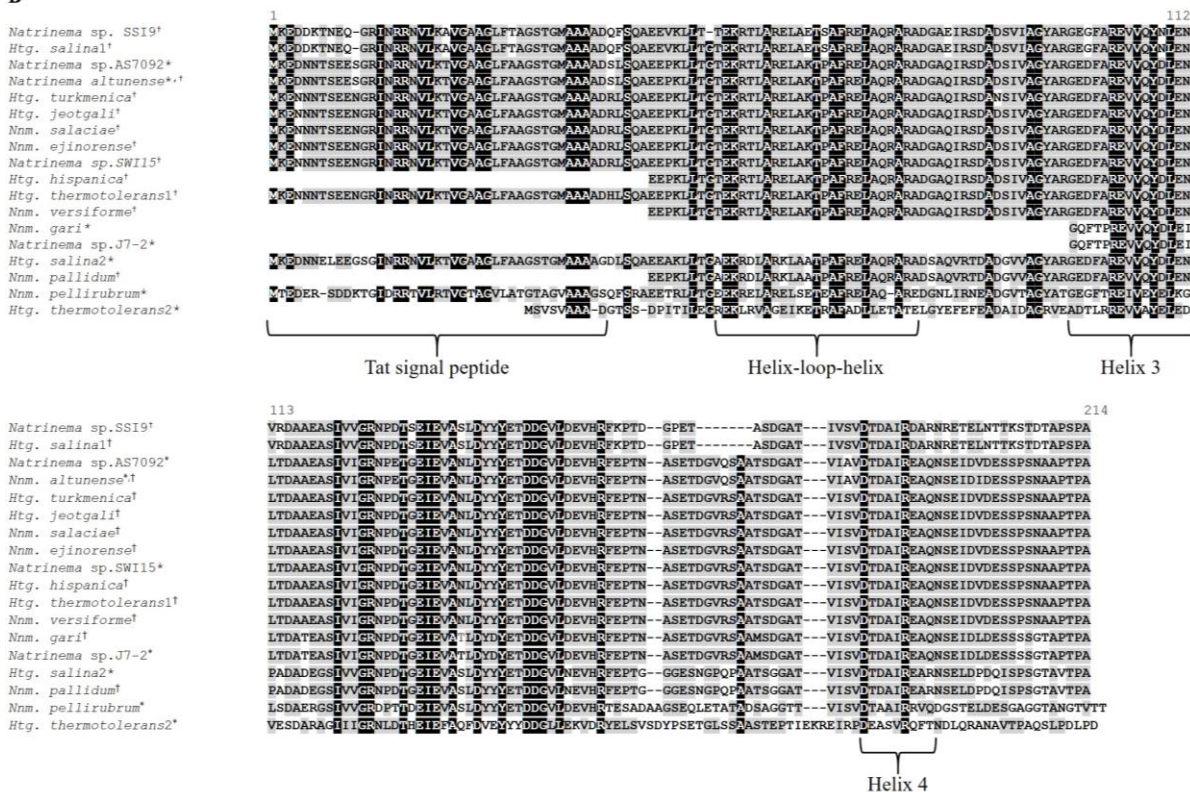


Fig. 1. Multiple alignment of the mature HalC8 peptide sequences (A) and and HalI immunity protein (B), generated by ClustalW.* sequences from the Genbank database, identified by the *in silico* analysis (Table 2 and 3). * sequences from this study. The sequences of *Nnm. pallidum*, *Nnm. versiforme*, *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 (accession n°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.

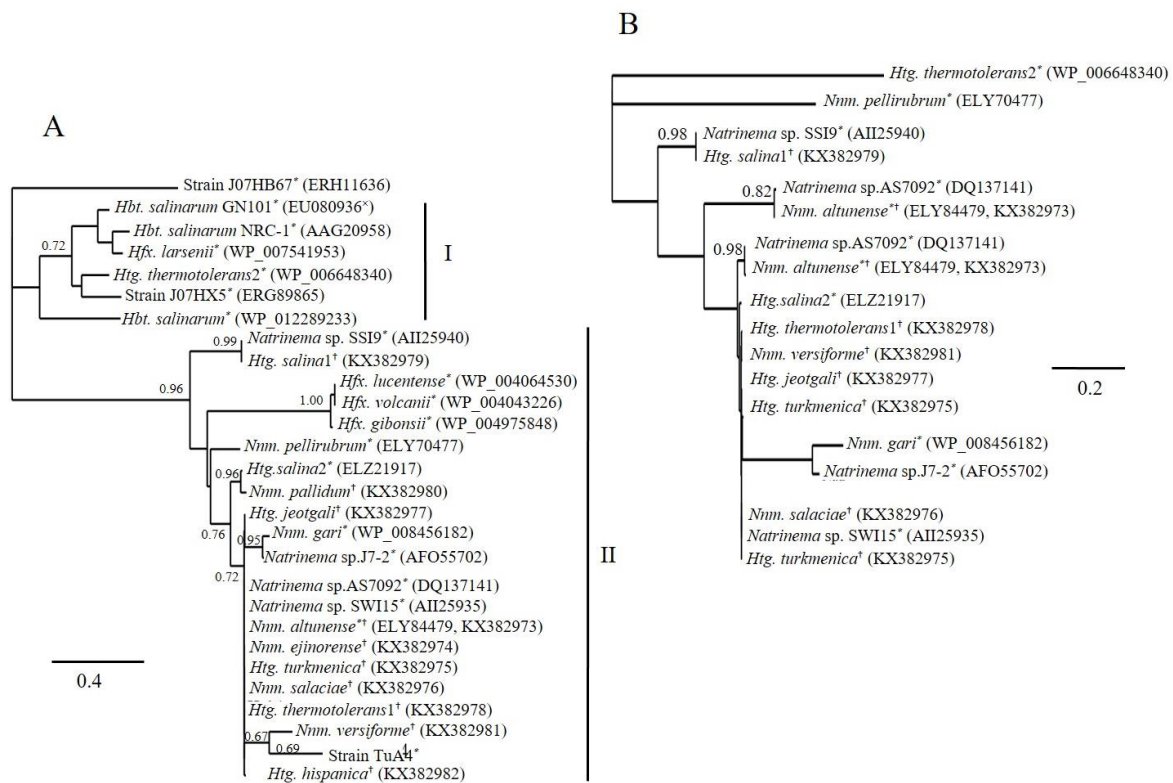


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree of mature HalC8 peptide sequences (A) and HalI immunity protein (B). * sequences from the Genbank database, identified by the *in silico* analysis (Table 2 and 3). + sequences from this study. Accession numbers of the sequences are indicated in parenthesis. Bootstrap values are based on 1,000 replicates and are noted on main branches with over 60% bootstrap support.

For the totality of the HalC8 sequences, the position of the 10 cysteine residues are perfectly conserved, with the exception of the HalA4 sequence in which C268 is instead I268 (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 consists of *Natrinema*, *Haloterrigena*, and *Haloferax* sequences, including a very-well supported *Haloferax* sub-clade. Clade II clusters the *Halobacterium* sequences with the sequence from the unaffiliated strain J07HX5, but also one *Haloferax* and one *Haloterrigena* sequence. 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.

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. 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, helixes 3 and 4, are conserved in all the analysed sequences. The phylogenetic analysis is consistent with that of HalC8, and shows similar clustering (Fig. 1B), 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. gibonsii*, *Hfx. volcanii*, and *Hfx. lucentense*, a Tat signal peptide and a helix-loop-helix motif are found at equivalent locations along the sequences, which display 92-98% identity with each other (data not shown). 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 (data not shown).

HalC8 biosynthesis gene cluster

For *halC8* sequences identified by the in silico analysis (Table 2 and 3), the surrounding ORFs were examined. In *Natrinema* sp. AS7092, the surrounding genes may be involved in the production of HalC8: *halU* would encode a membrane-spanning protein with 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* 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 unknown function in *Nnm. gari* (ELY79089) and *Natrinema* sp. J7-2 (AFO55701), and the absence of *halT2* and *halT3* in *Htg. salina*. Remarquably, 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.

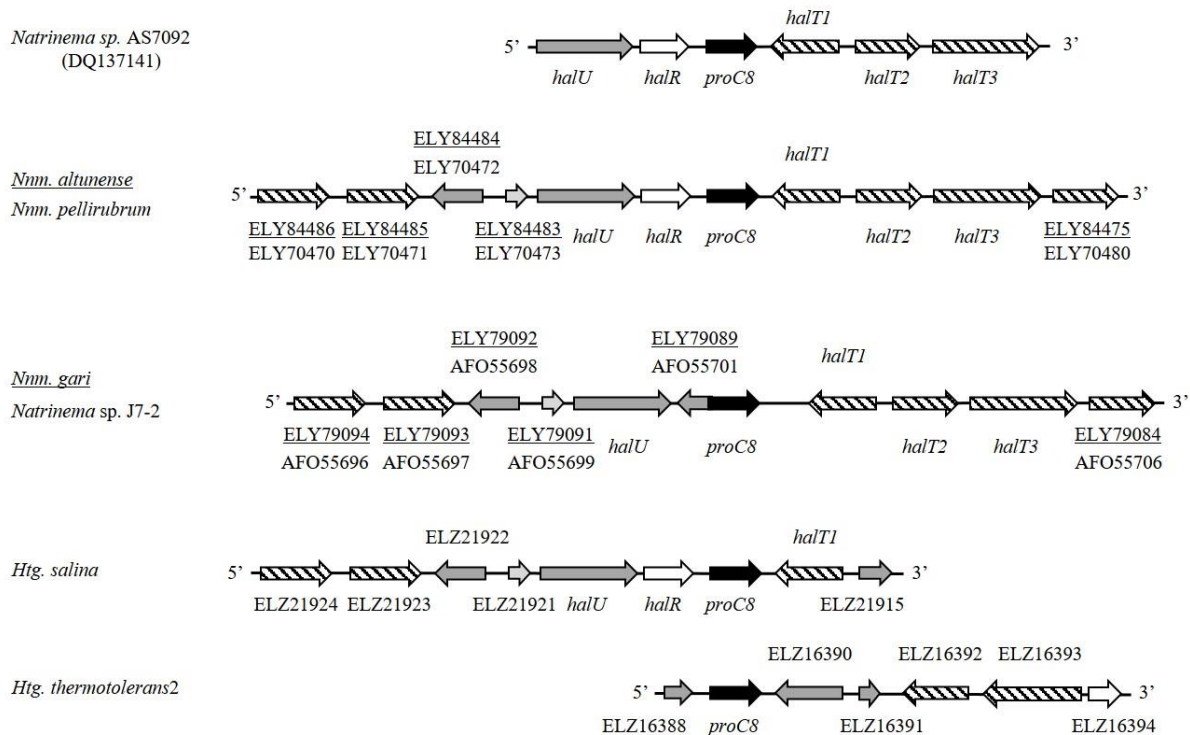


Fig. 3. Genetic organization at the *hal* locus. Names of the *hal* genes or protein accession numbers are indicated. *Nm. altunense* and *Nm. pellirubrum* on one hand, and *Nm. gari* and *Natrinema* sp. J7-2 on the other hand, display the same organization. The nucleotide sequences accession numbers are: *Natrinema* sp. AS7092, DQ137141; *Nm. altunense*, AOIK01000035, nucleotides 55867-43075; *Nm. pellirubrum*, AOIE01000110, nucleotides 22881-34423; *Nm. gari*, AOIJ01000052, nucleotides 28929-17862; *Natrinema* sp. J7-2, CP003412, nucleotides 411127-422193; *Htg. salina*, AOIS01000017, nucleotides 59628-49774; *Htg. thermotolerans*, AOIR01000031, nucleotides 67606-74225. The precursor *halC8* gene is indicated in black arrows. Transcriptional regulator genes are indicated in white arrows. Striped arrows correspond to ABC transporter genes. Dark grey arrows are genes with unknown function. Light grey arrows are genes involved in competence.

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* 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 *proC8*: insertion sequence ISH9 in *Hfx. larseni* (ELZ79605) and *Hfx. volcanii* (HVO_RS03235); XerC/D-like integrase in *Hbt. salinarum* R1 (CAP13563); insertion

427 sequences ISH3, ISH5 and ISH8 (nucleotides 251224-266840, AE004438) in *Hbt. salinarum*
428 NRC-1.

429 **Expression of *halC8***

430 All tested *Natrinema* and *Haloterrigena* strains have the capacity to produce HalC8, as their
431 genome contains a *halC8* gene, and evidence for the presence of other genes in the *hal* cluster
432 is demonstrated for strains *Nnm. altunense*, *Nnm. pellirubrum*, *Nnm. gari*, *Natrinema J7-2*,
433 and *Htg. salina* (Fig. 3). In order to determine whether HalC8 is expressed in all the
434 *Natrinema* and *Haloterrigena* strains studied here, RNA was extracted from end of
435 exponential growth stage cultures, which usually corresponds to maximal expression of
436 AMPs (Besse *et al.*, 2015). A RT-PCR analysis was conducted using primers C8-Imm1 and
437 C8-12-R (Fig. 4A). For all the tested strains, the presence of a *halC8* transcript was detected
438 (data not shown).

439

440

441

442

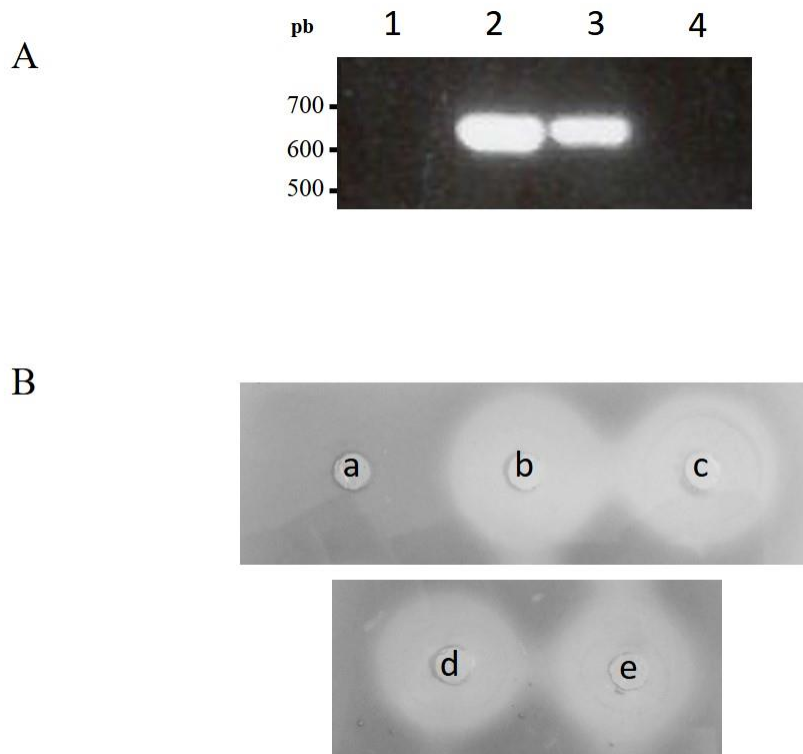


Fig. 4. Expression of HalC8. A. RT-PCR analysis of *halC8* in *Htg. salina* JCM13891 stationary stage culture, amplification with primers C8-Imm1 and C8-12-R. 1, RNase free water; 2, genomic DNA; 3, cDNA; 4, RNA. B. Antimicrobial assays using *Hrr. chaoviator* ETD3 as target strain. a, medium 372. b-e, *Htg. salina* JCM13891 stationary stage culture supernatant: untreated (b), heated (c), filtered (d), heated and filtered (e).

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 *Halorubrum 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 three different target

strains: *Halobacterium salinarum* DSM3754, *Halorubrum chaoviator* ETR14 and *Halorubrum chaoviator* ETD3. The three target strains displayed different degree of sensitivity to HalC8 containing culture supernatant, *Hrr. chaoviator* ETD3 the most sensitive target strain, and *Hrr. chaoviator* ETR14 being the less sensitive one (Table 4). Indeed, all the strains carrying *halC8* displayed an antimicrobial activity against *Halorubrum chaoviator* ETD3. The intensity of the antimicrobial activity, as measured by inhibition halos, was consistent among the three sensitive strains.

Producing strain	Inhibition halo (mm) on target strain		
	<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	<i>Hbt. salinarum</i> DSM3754	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3
<i>Natrinema altunense</i> JCM12890	26	44	53
<i>Natrinema versiforme</i> DSM16034	24	27	46
<i>Natrinema salaciae</i> DSM25055	19	35	45
<i>Natrinema</i> sp. SSI9	20	27	40
<i>Natrinema</i> sp. SWI6	24	20	37
<i>Natrinema pallidum</i> DSM15623	19	16	31
<i>Haloterrigena salina</i> JCM13891	24	25	27
<i>Natrinema gari</i> JCM14663	0	30	50
<i>Natrinema ejinorensis</i> DSM18194	0	15	24
<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM15624	0	16	21
<i>Haloterrigena thermotolerans</i> DSM11552	0	0	42
<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM5511	0	0	30
<i>Haloterrigena hispanica</i> DSM18328	0	0	17
<i>Haloterrigena jeotgali</i> DSM18794	0	0	15

Table 4. Antimicrobial assays

Purification of HalC8 from *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890

The purification of HalC8 was guided by monitoring at each step the inhibitory activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. HalC8 was purified from *Natrinema* sp. SWI6 liquid culture supernatant and *Nnm. altunense* JCM12890 solid cultures. *Natrinema* sp. SWI6 supernatant

was fractionated successively by solid phase extraction (SPE) on C8 Sep-Pak cartridge and reverse phase HPLC on C4 column. The fraction displaying the higher antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3 was analyzed by MALDI-TOF MS, which exhibited an $[M+H]^+$ at m/z 7443.91, matching with the theoretical molecular mass of HalC8 (Fig. 5). No accurate mass measurement could be obtained at this stage, a higher quantity of HalC8 being required. Since *Nnm. altunense* JCM12890 was shown to display the higher antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETR14, *Hbt. salinarum* DSM3754 and *Hrr. chaoviator* ETD3 (Table 4), HalC8 was also purified from this strain. Moreover, in a recent study, HalC8 was purified from a large number of solid cultures of *Natrinema* sp. SSR (formerly *Halorubrum* sp. SSR) (Meknaci *et al.*, 2014; Besse *et al.*, 2015). Therefore, HalC8 was purified from *Nnm. altunense* JCM12890 solid cultures, which were extracted with methanol. After extraction with butanol of the residue resuspended in 0.1% formic acid in water, the butanol fraction was submitted to SPE on Sep-Pak C8 cartridge. The active fraction was analyzed by LC-MS (chromatography profile shown in Figure 5) that allowed obtaining an accurate mass measurement. The LC peak eluting after the 52nd minutes displayed two peaks at m/z 1487.3526 and 1858.9384 matching with $[M+5H]^{5+}$ and $[M+4H]^4$ ions of HalC8, respectively (Fig. 5). These mass spectrometry results are in agreement with the presence of 5 disulphide bridges formed between the 10 cysteines of HalC8. The presence of 5 disulphide bridges in HalC8 is thus evidenced here for the first time.

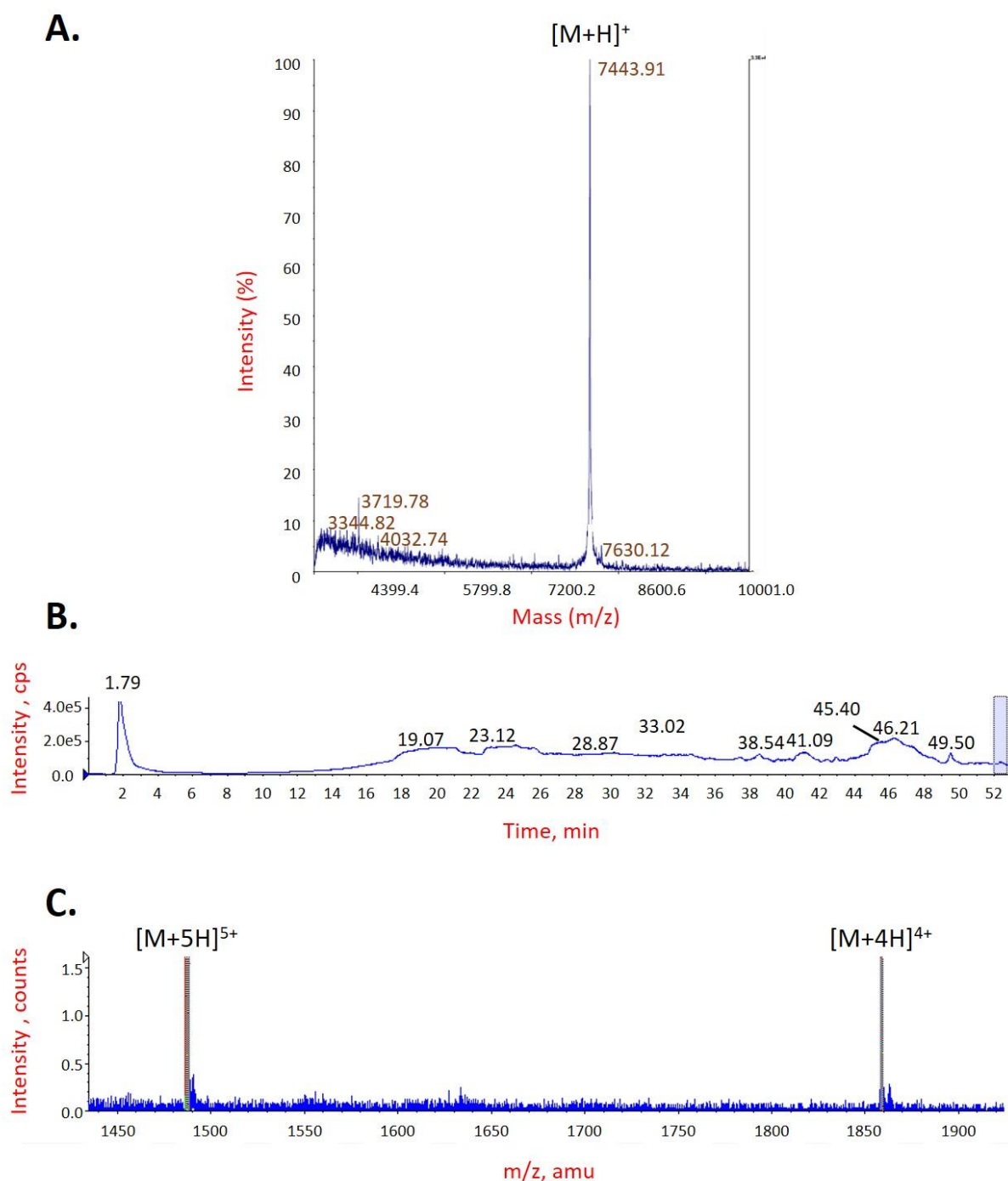


Fig. 5. Purification of HalC8. A. MALDI-TOF MS spectrum of the main peak arising from the HPLC fraction that displayed the highest antimicrobial activity in the assays against *Hrr. chaoviator* ETD3. B. Chromatography profile of the Sep-Pak fraction eluted with ACN 80%. C. ESI-qQ-TOF spectrum of the peak indicated by a blue square in B.

Discussion

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 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 production of HalC8 or 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), since 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*). The full-length *halC8* gene sequence, encoding the mature HalC8 peptide and the HalI immunity protein, is restricted to and consistently found in 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.*, 199), but 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 public 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. turkmenica* DSM5511 and *Htg. jeotgali* DSM18794 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. thermotolerans* and *Htg. salina*, 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 was also found in other isolates belonging to the *Haloferax* and *Halobacterium* genera (Table 2 and 3). However, our phylogenetic analysis of the HalC8 sequences clearly shows that they represent a distinct clade, together with the divergent *Htg. thermotolerans2* sequence (Fig. 2A). Besides, the N-terminal part of the precursors are completely different and cannot be aligned to the HalI immunity protein, although their lengths are comparable (data not shown). 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. thermotolerans2*, 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, respectively (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, Naor *et al.*, 2013).

HalC8 had been reported to contain 10 cysteine residues, potentially involved in disulphide bridges (Sun *et al.*, 2005). Mass-spectrometry data obtained in this study revealed that 5 disulphide bridges are indeed present in the final 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 10 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). 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. gibonsii*, *Hfx. volcanii*, *Hfx. lucentense*, *Hfx. larsenii*, *Hbt. salinarum* GN101, and *Hbt. salinarum* NRC-1 (data not shown). 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. gibonsii*, *Hfx. volcanii* and *Hfx. lucentense* (data not shown). 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. 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 stain could be detected at the end of the exponential stage (Fig.4 and data not shown). 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, and identification of the protease component, which is likely to be a membrane associated protease (Gimenez *et al.*, 2015), 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 AMP 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 a 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 the AMP, and gaining insight into the exact role of HalC8 in environmental conditions where the strains are challenged by biotic and abiotic constraints.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

A.B. 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 study was supported by the ATM Microorganisms of the National Museum of Natural History in Paris (France).

References

- Albuquerque L, Taborda M, La Cono V *et al.* *Natrinema salaciae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from the deep, hypersaline anoxic Lake Medee in the Eastern Mediterranean Sea. *Syst Appl Microbiol* 2012;**35**:368–73.
- Besse A, Peduzzi J, Rebuffat S *et al.* Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie* 2015, DOI: 10.1016/j.biochi.2015.06.004.
- Castillo AM, Gutiérrez MC, Kamekura M *et al.* *Natrinema ejinorensis* sp. nov., isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;**56**:2683–7.
- Cha I-T, Lee M-H, Kim B-Y *et al.* Genome sequence of the haloarchaeon *Haloterrigena jeotgali* type strain A29T isolated from salt-fermented food. *Stand Genomic Sci* 2015;**10**, DOI: 10.1186/s40793-015-0047-4.
- Colwell RR, Litchfield CD, Vreeland RH *et al.* Taxonomic studies of red halophilic bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 1979;**29**:379–99.
- DasSarma S, DasSarma P. Halophiles. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G *et al.* Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:W465–9.
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J *et al.* JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 2015:gkv332.
- Enache M, Itoh T, Fukushima T *et al.* Phylogenetic relationships within the family *Halobacteriaceae* inferred from rpoB' gene and protein sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:2289–95.
- Ghanmi F, Carré-MLouka A, Vandervennet M *et al.* Antagonistic interactions and production of halocin antimicrobial peptides among extremely halophilic prokaryotes isolated from the solar saltern of Sfax, Tunisia. *Extremophiles* 2016;**20**:363–74.
- Giménez MI, Cerletti M, De Castro RE. Archaeal membrane-associated proteases: insights on *Haloferax volcanii* and other haloarchaea. *Microb Physiol Metab* 2015;**6**:39.
- Gutiérrez MC, Castillo AM, Kamekura M *et al.* *Haloterrigena salina* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;**58**:2880–4.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR *et al.* Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:15–25.
- Imadalou-Idres N, Carre-MLouka A, Vandervennet M *et al.* Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. *Journal of Life Sciences*. 2013:1057–69.
- Kuipers A, Rink R, Moll GN. Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics. In: Drider D, Rebuffat S (eds.). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Springer New York, 2011, 147–69.

- 689 Li Y, Xiang H, Liu J *et al.* Purification and biological characterization of halocin C8, a novel
690 peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* 2003;**7**:401–7.
- 691 Ma Y, Galinski EA, Grant WD *et al.* Halophiles 2010: life in saline environments. *Appl*
692 *Environ Microbiol* 2010;**76**:6971–81.
- 693 McGenity TJ, Gemmell RT, Grant WD. Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema*
694 gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum*
695 nom. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998;**48 Pt 4**:1187–96.
- 696 Mei S-S, Li Y, Lu Q-H *et al.* Cloning and analysis of genes in the halocin C8 gene cluster.
697 *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2006;**46**:318–22.
- 698 Mei S, Sun C, Liu X *et al.* The helix-loop-helix motif at the N terminus of HalI is essential for
699 its immunity function against halocin C8. *J Bacteriol* 2008;**190**:6501–8.
- 700 Meknaci R, Lopes P, Servy C *et al.* Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and
701 production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. *Extrem Life Extreme*
702 *Cond* 2014;**18**:1049–55.
- 703 Minegishi H, Kamekura M, Itoh T *et al.* Further refinement of the phylogeny of the
704 *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (rpoB') gene.
705 *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;**60**:2398–408.
- 706 Montalvo-Rodríguez R, López-Garriga J, Vreeland RH *et al.* *Haloterrigena thermotolerans*
707 sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;**50 Pt**
708 **3**:1065–71.
- 709 Naor A, Yair Y, Gophna U. A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the
710 ability to inhibit growth of other halophilic archaea. *Extrem Life Extreme Cond*
711 2013;**17**:973–9.
- 712 Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity.
713 *Saline Syst* 2008;**4**:2.
- 714 Oren PA. Life at high salt concentrations. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, *et al.* (eds.).
715 *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, 2006, 421–40.
- 716 Øvreås L, Daae FL, Torsvik V *et al.* Characterization of microbial diversity in hypersaline
717 environments by melting profiles and reassociation kinetics in combination with
718 terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microb Ecol*
719 2003;**46**:291–301.
- 720 Palmer T, Berks BC. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev*
721 *Microbiol* 2012;**10**:483–96.
- 722 Podell S, Ugalde JA, Narasingarao P *et al.* Assembly-Driven Community genomics of a
723 hypersaline microbial ecosystem. *PLOS ONE* 2013;**8**:e61692.
- 724 Quadri I, Hassani II, l'Haridon S *et al.* Characterization and antimicrobial potential of
725 extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian
726 Sahara. *Microbiol Res* 2016;**186–187**:119–31.

- 727 Rebuffat S. Bacteriocins from Gram-negative bacteria: A classification? In: Drider D,
728 Rebuffat S (eds.). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Springer New York, 2011, 55–
729 72.
- 730 Rodriguez-Valera F, Juez G, Kushner DJ. *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new
731 carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Syst Appl Microbiol* 1983;**4**:369–81.
- 732 Roh SW, Nam Y-D, Chang H-W *et al.* *Haloterrigena jeotgali* sp. nov., an extremely
733 halophilic archaeon from salt-fermented food. *Int J Syst Evol Microbiol*
734 2009;**59**:2359–63.
- 735 Romano I, Poli A, Finore I *et al.* *Haloterrigena hispanica* sp. nov., an extremely halophilic
736 archaeon from Fuente de Piedra, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*
737 2007;**57**:1499–503.
- 738 Saunders E, Tindall BJ, Föhnrich R *et al.* Complete genome sequence of *Haloterrigena*
739 *turkmenica* type strain (4k). *Stand Genomic Sci* 2010;**2**:107–16.
- 740 Shand RF, Leyva KJ. Peptide and protein antibiotics from the domain *Archaea*: halocins and
741 sulfolobocins. In: Riley PDMA, Chavan DMA (eds.). *Bacteriocins*. Springer Berlin
742 Heidelberg, 2007, 93–109.
- 743 Sun C, Li Y, Mei S *et al.* A single gene directs both production and immunity of halocin C8
744 in a haloarchaeal strain AS7092. *Mol Microbiol* 2005;**57**:537–49.
- 745 Tapingkae W, Tanasupawat S, Itoh T *et al.* *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon
746 isolated from fish sauce in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;**58**:2378–83.
- 747 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of
748 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
749 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;**22**:4673–80.
- 750 Tindall BJ. Taxonomic problems arising in the genera *Haloterrigena* and *Natrinema*. *Int J*
751 *Syst Evol Microbiol* 2003;**53**:1697–8.
- 752 Ventosa A, Gutiérrez MC, Kamekura M *et al.* Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*,
753 *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica*
754 gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;**49 Pt 1**:131–6.
- 755 Wright A-DG. Phylogenetic relationships within the order Halobacteriales inferred from 16S
756 rRNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;**56**:1223–7.
- 757 Xin H, Itoh T, Zhou P *et al.* *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon
758 from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;**50 Pt 3**:1297–
759 303.
- 760 Xu X-W, Ren P-G, Liu S-J *et al.* *Natrinema altunense* sp. nov., an extremely halophilic
761 archaeon isolated from a salt lake in Altun Mountain in Xinjiang, China. *Int J Syst*
762 *Evol Microbiol* 2005;**55**:1311–4.
- 763 Zvyagintseva IS, Tarasov AL. Extreme halophilic bacteria from saline soils. *Microbiol USA*
764 1988.

3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION

Les gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3* ont tous des fonctions putatives ou inconnues. Néanmoins, la conservation de leur présence et de leur organisation chez *Natrinema altunense*, *Nm. pellirubrum*, *Nm. gari*, *Natrinema* sp. J7-2, *Haloterrigena salina* et *Htg. thermotolerans*² (Figure 3 de l'article « Halocin C8, an antimicrobial peptide widely distributed among the genera *Natrinema* et *Haloterrigena* ») suggère qu'ils aient un rôle important dans la biosynthèse d'HalC8. Ne disposant d'aucune information sur le processus de maturation de la protéine précurseur, on peut émettre l'hypothèse qu'un des produits des gènes, notamment *halU* dont la fonction est inconnue, serait impliqué dans le clivage de la protéine précurseur. Afin d'obtenir des informations préliminaires sur le rôle de chacun des gènes, nous avons recherché leur présence par PCR chez plusieurs souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* avant d'étudier leur transcription et leur régulation. Les expériences décrites dans ce paragraphe ont été menées sur la souche *Nm. altunense* JCM12890 car l'organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse d'HalC8 est identique à celle de la souche chinoise d'origine *Natrinema* sp. AS7092 et les halos d'inhibition résultant de l'activité antimicrobienne de son surnageant contre *Hrr. chaoviator* ETR14, *Hbt. salinarum* DSM3754 et/ou *Hrr. chaoviator* ETD3 ont les diamètres les plus importants (respectivement 26, 44 et 53 mm) par rapport aux autres surnageants testés (Tableau 4 de l'article « Halocin C8, an antimicrobial peptide widely distributed among the genera *Natrinema* et *Haloterrigena* »).

3.1 Curage du plasmide

A l'heure actuelle, aucune information n'est disponible sur la localisation chromosomique ou plasmidique du système génétique codant HalC8. Pour les halocines S8 et H4, les deux peptides avec HalC8 pour lesquels les gènes codant l'halocine ont été séquencés, il a été montré que ces derniers étaient localisés sur des mégaplasmines. Actuellement, seulement deux souches de *Natrinema* et deux souches d'*Haloterrigena* ont leur génome entièrement séquencé et assemblé : il s'agit de *Nm. pellirubrum* DSM15624, *Nm. gari* DSM14663, *Htg turkmenica* DSM5511 et *Htg. jeotgali* DSM18794 (Tableau 17) (Cha et al., 2015). *Nm. pellirubrum* DSM15624, *Nm. gari* DSM14663 et *Htg turkmenica* DSM5511 de ces souches possède au moins un mégaplasmines (Tableau 17).

Souche	Génome			Référence
	Etat	Assemblage	Taille (Mb)	
<i>Natrinema</i>				
<i>pallidum</i> DSM15623	complet	contig	3,92	(McGenity <i>et al.</i> , 1998)
<i>pellirubrum</i> DSM15624	complet	complet	Chr : 3,79 PI : 0,29 (pNATPE01) et 0,28 (pNATPE02)	(McGenity <i>et al.</i> , 1998)
<i>versiforme</i> DSM16034	complet	contig	4,19	(Xin <i>et al.</i> , 2000)
<i>gari</i> JCM14663	complet	contig	4,02	(Tapingkae <i>et al.</i> , 2008)
<i>altunense</i> JCM12890	complet	contig	3,77	(Xu <i>et al.</i> , 2005a)
sp. J7-2	complet	complet	Chr : 3,70 PI : 0,1 (pJ7-1)	(Feng <i>et al.</i> , 2012)
sp. SW16 ¹	Gènes 16S et <i>halC8</i>		/	(Imadalou-Idres <i>et al.</i> , 2013)
<i>ejinorensis</i> DSM18194	Non séquencé			(Castillo <i>et al.</i> , 2006)
<i>salaciae</i> DSM25055	Non séquencé			(Albuquerque <i>et al.</i> , 2012)
<i>Haloterrigena</i>				
<i>hispanica</i> DSM18328	Non séquencé			(Romano <i>et al.</i> , 2007)
<i>jeotgali</i> DSM18794 ²	complet	complet	4,13	(Roh <i>et al.</i> , 2009)
<i>turkmenica</i> DSM5511	complet	complet	Chr : 3,89 PI : 0,70 (pHTUR01), 0,41 (pHTUR02), 0,18 (pHTUR03), 0,17 (pHTUR04), 0,07 (pHTUR05) et 0,02 (pHTUR06)	(Ventosa <i>et al.</i> , 1999)
<i>thermotolerans</i> DSM11552	complet	contig	3,9	(Montalvo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2000)
<i>salina</i> JCM13891	complet	contig	4,84	(Gutiérrez <i>et al.</i> , 2008)
<i>limicola</i> JCM13563	complet	contig	3,52	(Cui <i>et al.</i> , 2006)
<i>longa</i> JCM13562	Non séquencé			(Cui <i>et al.</i> , 2006)
<i>daqingensis</i> JCM13563	Non séquencé			(Wang <i>et al.</i> , 2010)
<i>saccharevitans</i> JCM12889	Non séquencé			(Xu <i>et al.</i> , 2005b)

Tableau 17. Etat du séquençage des génomes des espèces appartenant aux genres *Natrinema* et *Haloterrigena*.

Les états de séquençage ont été recherchés sur le site du NCBI dans la base de données « génome ». Les tailles de génomes sont théoriques lorsque les génomes sont sous forme de contig.

Chr : chromosome, Pl : plasmide.

¹ espèce isolée de la saline algérienne d'Ichakaben intégrée dans cette étude

² génome annoté et assemblé par Cha *et al.* (Cha *et al.*, 2015)

Afin de connaître la localisation du système génétique codant HalC8, des tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés dans le but d'observer si l'activité était conservée après curage du ou des plasmide(s). Un grand nombre de composés comme des dérivés de dibenzocycloheptane, d'anthracènes, de thioxanthène, des agents intercalants de l'ADN comme l'acridine orange ou le bromure d'éthidium, ainsi que des antibiotiques comme la novobiocine,

sont capable d'inhiber la réplication des plasmides sans affecter la reproduction des cellules hôtes, conduisant à un curage des plasmides (Novick, 1969 ; Hahn et Ciak, 1976 ; McHugh et Swartz, 1977). Afin d'appliquer cette technique de curage chez les archées, il faudrait choisir un composé qui ne soit pas toxique pour les cellules. En 1985, une étude a utilisé l'acridine orange pour le curage de plasmides chez *Hfx. volcanii* (Meseguer et Rodriguez-Valera, 1985). Afin de vérifier que l'acridine orange n'inhibe pas la croissance de la souche *Nm. altunense* JCM12890, des cultures en présence 0, 25, 50, 75, 100 ou 125 mg.mL⁻¹ d'acridine orange ont été réalisées. Une croissance de *Nm. altunense* JCM12890 a été observée en présence de 25 mg.mL⁻¹ d'acridine orange, alors que la croissance a été inhibée pour des concentrations supérieures de 50, 75, 100 ou 125 mg.mL⁻¹ d'acridine orange (Figure 48).

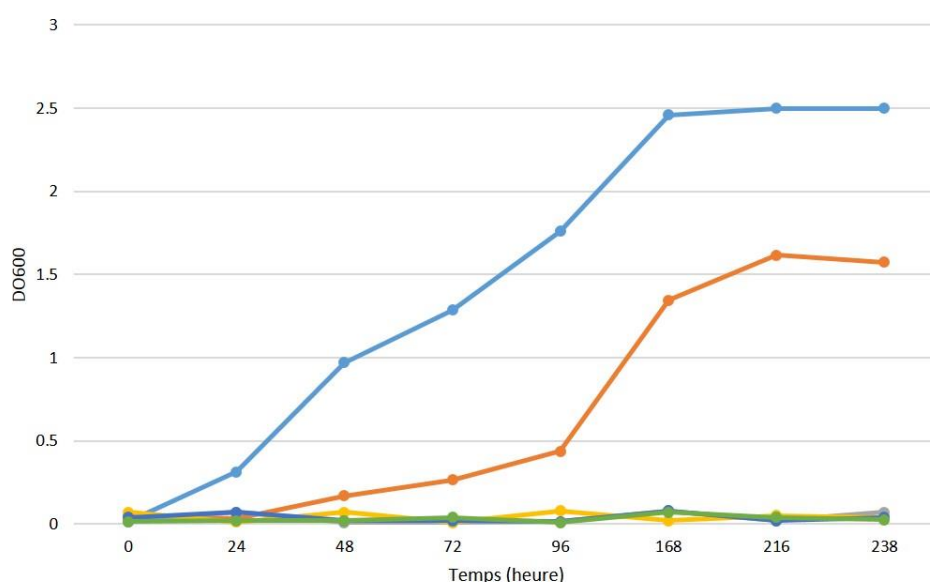


Figure 48. Croissance de *Nm. altunense* JCM12890 en présence de 0, 25, 50, 75, 100 et 125 mg.mL⁻¹ d'acridine orange.

La souche *Nm. altunense* JCM12890 a été cultivée en milieu M372, à 37 °C, sous une agitation de 140 rpm. La croissance a été suivie en mesurant la DO₆₀₀. La courbe bleue représente la croissance en absence d'acridine orange. Les courbes orange, gris, jaune, bleu foncé et vert représentent respectivement la croissance en présence de 25, 50, 75, 100 et 125 mg.mL⁻¹ d'acridine orange.

Afin de curer le plasmide, 25 mg.mL⁻¹ d'acridine orange, plus forte concentration d'acridine orange qui n'inhibe pas la croissance de la souche, ont été ajoutés à une culture de *Nm. altunense* JCM12890. Afin d'observer si l'activité antimicrobienne est conservée après traitement à l'acridine orange, l'activité antimicrobienne a été testée avec du surnageant brut,

filtré sur des membranes de 100 kDa (pour exclure les agents viraux susceptibles d'avoir une activité antimicrobienne) et/ou chauffé 10 minutes à 100 °C (l'halocine C8 étant thermorésistante, ce traitement permet de se débarrasser des éventuels agents antimicrobiens thermolabiles). Aucune activité antimicrobienne du surnageant de *Nm. altunense* JCM12890 n'a été observée lorsque la culture a poussé en présence de 25 mg.mL⁻¹ d'acridine orange (Figure 49). Ce résultat suggère qu'au moins un gène nécessaire à la biosynthèse d'HalC8 est localisé sur un plasmide.

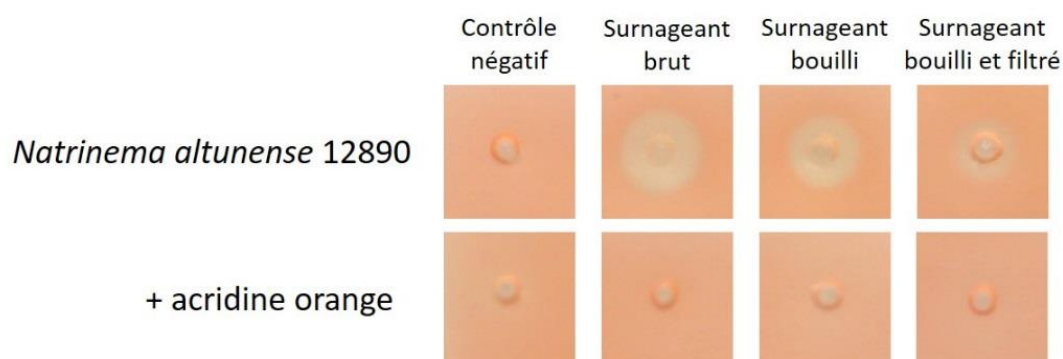


Figure 49. Activité antimicrobienne après curage des plasmides à l'acridine orange.

La souche *Nm. altunense* JCM12890 a été cultivée en présence ou non de 25 µg.mL⁻¹ d'acridine orange, jusqu'en début de phase stationnaire. Les surnageants des deux cultures ont été testés pour leur activité brute, chauffée 10 minutes à 100 °C et filtrée sur des membranes de 100 kDa. La souche indicatrice utilisée est *Halorubrum chaoviator* ETR14. Le contrôle négatif est le milieu M372 avec ou sans acridine orange.

La localisation du système génétique codant HalC8 sur un plasmide pourrait permettre le transfert horizontal et l'acquisition du caractère par des souches colonisant une même niche écologique. Ce résultat suscite un grand nombre de questions. En effet, les recherches d'identités *in silico* du gène *halC8* ont montré qu'il était retrouvé avec des identités importantes sur toute la longueur du gène, exclusivement chez des souches appartenant aux genres *Natrinema* et *Haloterrigena* (article « Halocin C8, an antimicrobial peptide widely distributed among the genera *Natrinema* et *Haloterrigena* »). Au regard de ces résultats, on peut se demander pourquoi, s'il est localisé sur un plasmide, le système génétique codant HalC8 semble restreint aux genres *Natrinema* et *Haloterrigena* ? Aussi, les études PCR réalisées sur toutes les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* disponibles au laboratoire ont permis de démontrer que le gène *halC8* était systématiquement retrouvé chez ces souches bien qu'elles proviennent de lieux géographiquement éloignés. En raison de la distance géographique qui sépare ces souches,

l'hypothèse d'une transmission du caractère par transferts horizontaux est à écarter, et on peut se demander comment ce caractère a été transmis à ces souches ?

3.2 Amplification des gènes du cluster chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena*

La présence des gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3* a été précédemment recherchée *in silico* pour les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* qui possèdent le gène *halC8*. Cependant, la recherche *in silico* ne permet pas de détecter la présence de ces gènes pour les souches dont le génome est partiellement séquencé ou pas séquencé. Etant donné qu'un grand nombre de génomes des souches *Natrinema* et *Haloterrigena* sont sous forme de contig, la recherche d'identités *in silico* n'est pas adaptée à une étude chez ces organismes (Tableau 17). Pour ces souches, l'amplification de chacun des gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3* par PCR est indispensable pour détecter leur présence.

Pour chacun des gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3*, des amorces spécifiques ont été dessinées dans les régions nucléotidiques les mieux conservées (Figure 50). Les régions conservées ont été identifiées sur la base de l'alignement des séquences des différents gènes de la base de données du NCBI pour les souches *Natrinema* sp. AS7092, *Nm. altunense* JCM12890, *Natrinema* sp. J7-2, *Nm. gari* DSM14663, *Nm. pellirubrum* DSM15624 et *Htg. salina* JCM13891. Les différents couples d'amorces ont été testés sur l'ADNg de *Nm. altunense* JCM12890 en faisant varier la température d'hybridation de 2 degrés entre 52 et 62 °C.

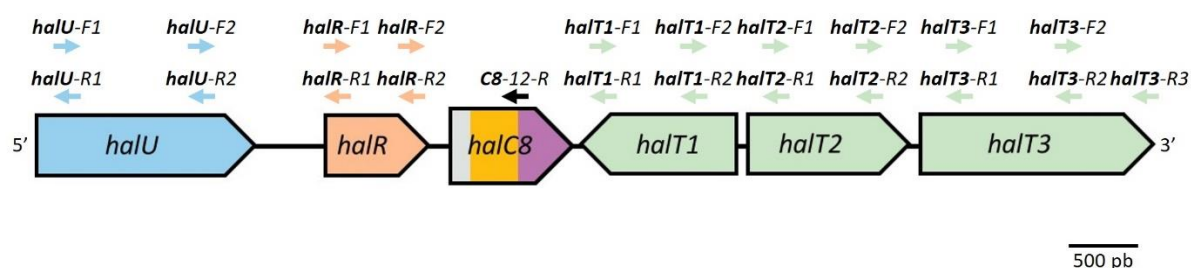


Figure 50. Localisation des amorces spécifiques des gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3*. Les amorces ont été dessinées en utilisant les logiciels OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) et Primer 3 (<http://gmdd.shgmo.org/primer3/?seqid=47>) en se basant sur la séquence des régions conservées de l'alignement nucléotidique des souches *Natrinema* sp. AS7092, *Nm. altunense* JCM12890, *Natrinema* sp. J7-2, *Nm. gari* DSM14663, *Nm. pellirubrum* DSM15624 et *Htg. salina* JCM13891. Le sens des flèches indique l'orientation de l'amorce.

Le couple d'amorces *halT1-F1/halT1-R2* n'a pas permis d'amplifier le gène *halT1* pour la souche *Nnm. altunense* JCM12890. Les couples d'amorces ***halU-F1/halU-R2***, ***halR-F1/halR-R2***, ***halT2-F1/halT2-R2*** et ***halT3-F2/halT3-R3*** ont permis d'obtenir un produit d'amplification spécifique à une température d'hybridation de 62 °C pour l'ADN de *Nnm. altunense* JCM12890. Grâce à ces amorces, les gènes ont été recherchés dans tous les génomes des souches *Natrinema* et *Haloterrigena* disponibles au laboratoire. Le gène *halU* a été amplifié chez toutes les souches à l'exception de *Nnm. gari* JCM14663, *Natrinema* sp. SWI6, *Nnm. salaciae* DSM25055, *Htg. hispanica* DSM18328, *Htg. jeotgali* DSM18794 et *Htg. saccharevitans* JCM12889. L'absence d'amplification ne signifie pas nécessairement que le gène *halU* est absent chez ces souches, d'autant plus que des identités avec le gène *halU* avaient été retrouvées *in silico* dans les génomes des souches *Nnm. gari* JCM14663, *Htg. jeotgali* DSM18794 et *Htg. hispanica* DSM18328 (Tableau 18). La séquence du gène *halU* pourrait ne pas être suffisamment conservée pour que les amorces s'hybrident. Le gène *halR* a été amplifié seulement chez les souches *Nnm. pellirubrum* DSM15624, *Nnm. altunense* JCM12890, *Htg. turkmenica* DSM5511 et *Htg. salina* JCM13891 (Tableau 18). Pour les autres souches, le gène *halR* pourrait avoir une séquence non conservée ou il pourrait être absent, suggérant que le mécanisme de régulation pourrait être différent. Les gènes *halT2* et *halT3* ont été amplifiés chez toutes les souches testées (Tableau 18). L'obtention d'amplicons, même en utilisant des amorces spécifiques, n'est pas obligatoirement due à l'amplification du gène recherché. Afin de vérifier les résultats obtenus par PCR, les amplicons devront être séquencés. L'alignement des séquences obtenues pourra permettre d'observer s'il y a une conservation de la séquence protéique entre les différentes souches.

Souches	Amplification des gènes par PCR			
	<i>halU</i>	<i>halR</i>	<i>halT2</i>	<i>halT3</i>
<i>Natrinema</i>				
<i>pallidum</i> DSM15623	+	-	+	+
<i>pellirubrum</i> DSM15624	+	+	+	+
<i>versiforme</i> DSM16034	+	-	+	+
<i>gari</i> JCM14663	-	-	+	+
<i>altunense</i> JCM12890	+	+	+	+
sp. SWI6	-	-	+	+
<i>ejinorensis</i> DSM18194	+	-	+	+
<i>salaciae</i> DSM25055	-	-	+	+
<i>Haloterrigena</i>				
<i>hispanica</i> DSM18328	-	-	+	+
<i>daqingensis</i> JCM13563	+	-	+	+
<i>longa</i> JCM13562	+	-	+	+
<i>jeotgali</i> DSM18794	-	-	+	+
<i>turkmenica</i> DSM5511	+	+	+	+
<i>thermotolerans</i> DSM11552	+	-	+	+
<i>salina</i> JCM13891	+	+	+	+
<i>limicola</i> JCM13563	+	-	+	+
<i>saccharevitans</i> JCM12889	-	-	+	-

Tableau 18. Amplification par PCR des gènes *halU*, *halR*, *halT2* et *halT3* chez les *Natrinema* et *Haloterrigena*.

Les matrices utilisées dans les réactions de PCR sont des ADNg extraits au phénol/chloroforme. Toutes les réactions de PCR ont eu lieu dans les mêmes conditions : 1 cycle de 5 minutes à 95 °C, 30 cycles de 30 secondes à 95 °C suivis de 30 secondes à 62 °C, puis de 2 minutes à 72 °C, 1 cycle de 7 minutes à 72 °C. Les couples d'amorces utilisés pour l'amplification des gènes *halU*, *halR*, *halT1* et *halT2* sont respectivement **halU-F1/halU-R2**, **halR-F1/halR-R2**, **halT2-F1/halT2-R2** et **halT3-F1/halT3-R3**.

L'amplification PCR des gènes *halU*, *halR*, *halT2* et *halT3* indique qu'ils sont présents dans le génome des souches *Natrinema* et *Haloterrigena* testées mais pas nécessairement localisés à proximité d'*halC8*. Afin de savoir si l'organisation génétique du groupe de gènes *halU*, *halR*, *halC8*, *halT1*, *halT2* et *halT3* est conservée, des amplifications PCR ont été réalisées en utilisant des couples d'amorces avec l'amorce sens s'hybridant sur le gène en amont et l'amorce anti-sens sur le gène en aval. En utilisant l'ADNg de *Nm. altunense* JCM12890 comme matrice, les couples d'amorces **halU-F1/halR-R1**, **halU-F1/halR-R2**, **halU-F2/halR-R1**, **halU-F2/halR-R2** ont été utilisés afin de vérifier que les gènes *halU* et *halR* étaient adjacents. Les couples d'amorces **halR-F1/C8-12-R** et **halR-F2/C8-12-R** ont été utilisés afin de vérifier que les gènes *halR* et *halC8* étaient adjacents (Figure 50). Pour les couples d'amorces **halU-F1/halR-R1**, **halU-F2/halR-R1**, **halR-F1/C8-12-R** et **halR-F2/C8-12-R**, l'amplification

d'un produit PCR de la taille attendue a été observée, confirmant que les gènes *halU* et *halR*, ainsi que *halR* et *halC8*, sont adjacents dans le génome de la souche *Nnm. altunense* JCM12890 (Figure 51). En utilisant les mêmes couples d'amorces et l'ADNg des souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* disponibles au laboratoire comme matrice, des expériences PCR sont actuellement en cours afin de savoir si les gènes *halU*, *halR* et *halC8* sont adjacents chez ces souches, et si l'organisation génétique associée à la production d'HalC8 est conservée.

La détermination de la localisation des gènes *halT2* et *halT3* devra également être investiguée en utilisant des amorces s'hybridant à cheval sur les gènes *halC8*, *halT2* et *halT3*. Les gènes *halT2* et *halT3* codent un transporteur ABC, transporteur utilisé dans de nombreux processus cellulaires et présent dans la majorité des génomes (Wilkins, 2015). La localisation de ces gènes est indispensable pour savoir s'ils sont à proximité d'*halC8* et s'ils pourraient être impliqués dans le transport d'HalC8.

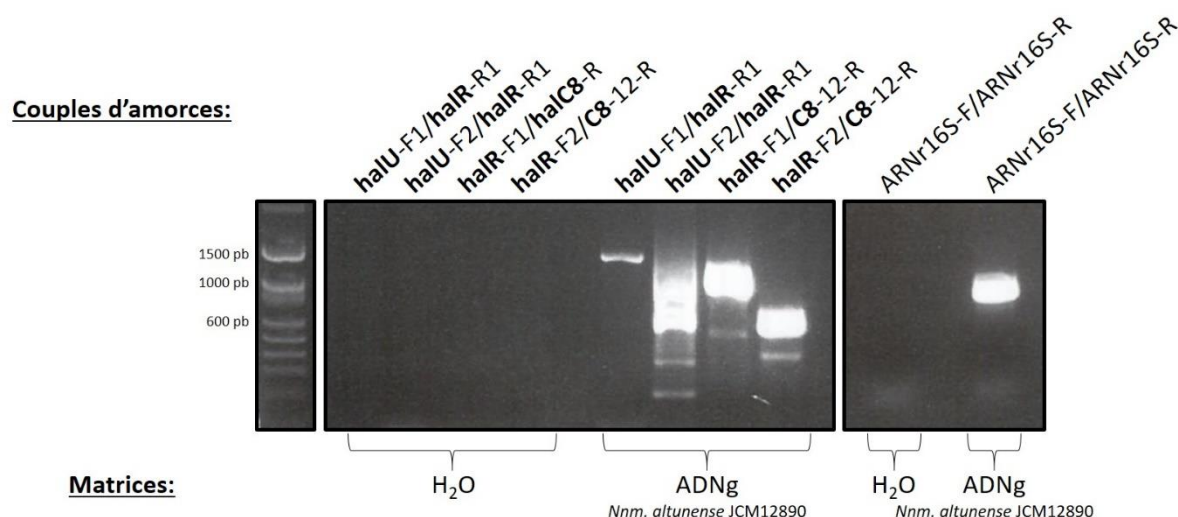


Figure 51. Localisation respective de *halU*, *halR* et *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890.

Toutes les réactions PCR ont été réalisées avec de l'H₂O et de l'ADNg de *Nnm. altunense* JCM12890 comme matrice. Les couples d'amorces utilisés sont indiqués au-dessus du gel. La température d'hybridation a été de 60 °C et l'élongation a eu lieu à 72 °C pendant 2 minutes pour tous les couples d'amorces. Le couple d'amorces ARNr16S-F/ARNr16S-R a permis d'amplifier le gène codant l'ARNr 16S chez les archées afin de vérifier l'intégrité de l'ADNg.

3.3 Co-expression des gènes *halU*, *halR* et *halC8*

A l'heure actuelle, aucune donnée concernant la transcription du groupe de gènes, potentiellement impliqué dans la production d'HalC8, n'est connue. De par l'orientation des gènes, la transcription du groupe de gènes devrait en théorie impliquer au minimum trois transcrits différents : un transcrit pour les gènes *halU*, *halR* et *halC8*, un autre pour *halT1* dont l'orientation est 3'→5' et enfin un dernier pour *halT2* et *halT3* (Figure 52).

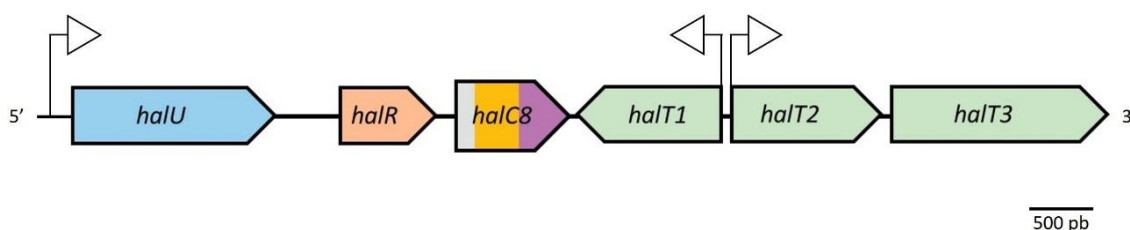


Figure 52. Hypothèse de la localisation de trois promoteurs pour le groupe de gènes impliqués dans la production d'HalC8, résultant en trois transcrits.

Le sens des flèches indique l'orientation des gènes *halU*, *halR*, *halC8*, *halT1*, *halT2* et *halT3*. Les trois promoteurs hypothétiques sont indiqués par des triangles blancs dont la pointe indique le sens de transcription.

Afin de savoir si les gènes *halU*, *halR* et *halC8* sont co-transcrits en un unique ARN, des tests d'amplifications PCR avec l'ADNc de *Nm. altunense* JCM12890 obtenu après transcription inverse de l'ARN extrait en début de phase stationnaire ont été réalisés, en utilisant une amorce sens qui s'hybride sur le gène en amont et une amorce anti-sens qui s'hybride sur le gène en aval. Etant donné qu'ils avaient montré le signal le plus spécifique et intense sur l'ADNg, les couples d'amorces **halU-F1/halR-R1** et **halU-F2/halR-R1** ainsi que **halR-F1/halC8-R** et **halR-F2/halC8-R** ont été choisis pour détecter une co-transcription respectivement entre les gènes *halU* et *halR* et les gènes *halR* et *halC8*. Dans un premier temps, l'intégrité de la matrice ADNc a été validée par son amplification avec les amorces ARNr16S-F/ARNr16S-R spécifiques du gène codant l'ARNr 16S chez les archées (Figure 53). Avec les amorces s'hybridant sur les gènes *halU*, *halR* et *halC8*, aucune amplification n'a été observée (Figure 53). Ce résultat indique que ces trois gènes ne sont pas transcrits en un unique brin. On peut donc émettre l'hypothèse que la transcription de ces gènes n'intervient pas en même temps au cours de la phase de croissance.

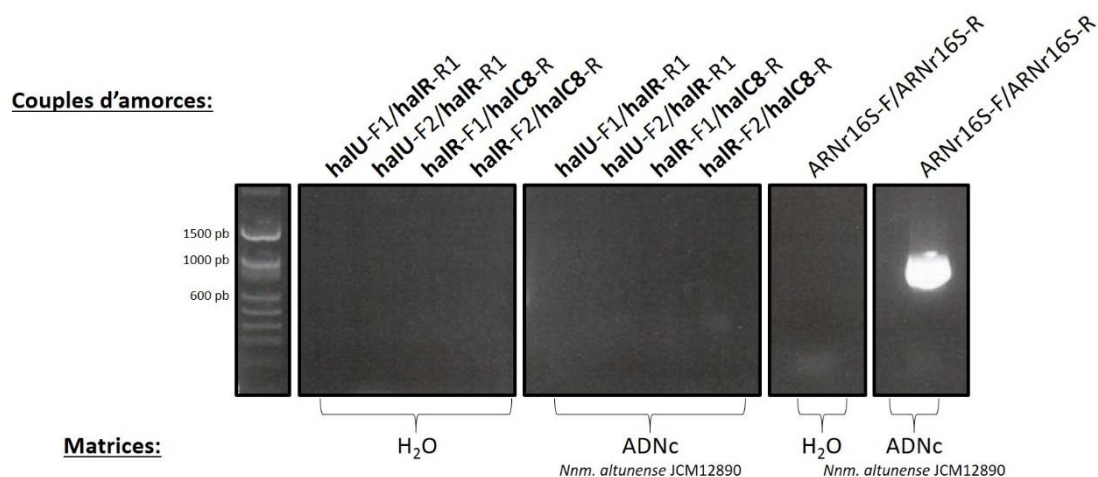


Figure 53. Co-expression des gènes *halU*, *halR* et *halC8* chez *Nnm. altunense* JCM12890. Toutes les réactions PCR ont été réalisées avec de l'H₂O et de l'ADNc de *Nnm. altunense* JCM12890 comme matrice. L'ADNc a été rétro-transcrit à partir de 500 ng d'ARN extrait en début de phase stationnaire. Les couples d'amorces utilisés sont indiqués au-dessus du gel. La température d'hybridation a été de 60 °C et l'élongation a eu lieu à 72 °C pendant 2 minutes pour tous les couples d'amorces. Le couple d'amorces ARNr16S-F/ARNr16S-R a permis d'amplifier le gène codant l'ARNr 16S chez les archées afin de vérifier l'intégrité de l'ADNc.

3.4 Co-régulation des gènes du cluster

Nous avons démontré que les gènes *halU*, *halR* et *halC8* n'était pas co-transcrits en un unique brin. Cependant, une co-régulation de ces gènes, c'est-à-dire une transcription en cascade au cours de la phase de croissance, pourrait exister. Afin d'observer si des co-régulations entre les gènes *halU*, *halR*, *halC8*, *halT1*, *halT2* et *halT3* ont lieu, leurs taux de transcription respectifs au cours de la croissance cellulaire ont été mesurés par RT-PCR quantitative (q-RT-PCR). Dans cette méthode, l'ARN extrait est rétro-transcrit en ADNc par transcription inverse. L'ADNc sert de matrice pour les réactions de PCR quantitatives. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'amplicons est mesurée grâce à un marqueur fluorescent, le SYBR Green dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplicons formés.

La q-RT-PCR implique une phase de mise au point durant laquelle la spécificité et l'efficacité des couples d'amorces s'hybridant au gène d'intérêt ainsi qu'aux gènes de référence sont vérifiés. Les gènes de référence sont des gènes de ménage, constitutivement exprimés dans la cellule, qui permettent de s'affranchir des variations de quantités d'ADNc en normalisant l'expression des gènes d'intérêt par rapport aux gènes de ménage. L'exactitude des résultats de q-RT-PCR nécessite une normalisation précise de la transcription. Cependant, selon les

conditions et l'organisme étudié, le niveau basal de transcription des gènes de référence peut être variable (Kozera et Rapacz, 2013). De ce fait, il est aujourd'hui recommandé d'inclure au minimum trois gènes de référence pour l'analyse précise des résultats de q-RT-PCR (Bustin *et al.*, 2009 ; Vandesompele *et al.*, 2002).

Durant ce travail de thèse, plusieurs couples d'amorces spécifiques des gènes de ménage codant l'ARNr 16S, la protéine de réparation et de recombinaison de l'ADN : RadA (*radA*), la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (*gapdh*), la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*), la protéine ribosomale L10 (*rpl10*) ou encore la région transcrite ITS (région de l'ARNr non codante située entre les gènes codant les sous-unités du ribosome) ont été testées. Afin de valider la spécificité d'un couple d'amorce, premièrement, le signal de fluorescence de l'échantillon (RT⁺) doit être détecté au moins 10 cycles avant le signal de fluorescence du contrôle négatif de RT réalisé en absence d'enzyme (RT⁻). 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 40 cycles d'amplification, c'est-à-dire à la fin de la réaction de q-RT-PCR pour que le signal de fluorescence soit détecté. Ainsi, l'amplification de la contamination d'ADNg doit être détectée au moins 10 cycles après l'amplification de l'ADNc pour pouvoir les dissocier. Deuxièmement, le signal de fluorescence de l'échantillon contenant la matrice H₂O doit être détecté après le trente-deuxième cycle. Troisièmement, des courbes de fusion des amplicons obtenus sont réalisées en fin de cycle de PCR quantitative. Ces courbes permettent d'identifier la température de fusion des amplicons et ainsi de différencier le produit d'intérêt des éventuelles contaminations de dimères d'amorces. Si les trois critères sont réunis, le couple d'amorce peut être validé pour sa spécificité.

A l'heure actuelle, trois couples d'amorces ont été validés pour leur spécificité : deux couples s'hybridant au gène correspondant à la région ITS et un couple spécifique de *rpl10* (Tableau 19). Pour ces trois couples, le signal de fluorescence de l'échantillon RT⁺ est détecté 10 cycles avant le signal de l'échantillon RT⁻, le signal de l'échantillon H₂O est détecté après le trente-deuxième cycle, et les courbes de fusion indiquent que les amorces ne forment pas de dimères d'amorces dans l'échantillon RT⁺ (Tableau 19 et Figure 54). Pour les autres couples d'amorces, le signal de fluorescence de l'échantillon RT⁺ est détecté moins de 10 cycles avant le signal de l'échantillon RT⁻ (Tableau 19). La spécificité de ces couples n'est pas assez grande pour qu'ils soient utilisés dans la réaction de q-RT-PCR. Le signal d'amplification du gène 16S

est détecté avant le dixième cycle, indiquant que le taux de transcription de ce gène est supérieur aux autres gènes de ménage et qu'il ne peut pas être utilisé comme gène de référence (Tableau 19). Des couples d'amorces supplémentaires sont en cours de test afin de valider la spécificité de 4 couples d'amorces pour 4 gènes de référence. L'étape suivante consistera à vérifier l'efficacité des couples choisis afin de ne conserver que les trois meilleurs couples. Ce travail sera poursuivi après mon départ et toute cette phase de mise au point sera valorisée. Une fois les mises au point terminées et les gènes de références validés, le but sera de mesurer le taux de transcription des gènes *halC8*, *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3* au cours de la phase de croissance, mais aussi dans différentes conditions environnementales susceptibles de faire varier leur expression, afin de connaître leur profil d'expression et de faire des hypothèses quant à leurs fonctions putatives. En effet, un gène transcrit avant *halC8* pourrait être impliqué dans la régulation de la transcription de l'halocine C8, un gène transcrit en même temps que le gène *halC8* pourrait être impliqué dans la maturation de la protéine précurseur, un gène transcrit après dans l'export de l'halocine. A l'heure actuelle un couple d'amorce spécifique d'*halC8* a été validé pour sa spécificité (Tableau 19).

Gène	Couples d'amorces	RT ⁺		RT ⁻		H ₂ O	
ITS	ITS-F1 / ITS-R1	22,90	23,06	32,56	32,26	33,78	34,23
	ITS-F1 / ITS-R2	23,75	23,61	32,99	32,60	33,95	33,59
rpl10	RPL-F1 / RPL-R1	22,20	22,02	36,79	35,38	35,39	35,63
16S	16S-F1 / 16S-R1	<10	<10	32,24	31,71	30,21	29,55
	16S-F2 / 16S-R2	<10	<10	31,94	32,47	29,42	30,58
gapdh	gapdh-F1 / gapdh-R1	>40,00	>40,00	-	-	-	-
	gapdh-F2 / gapdh-R2	26,54	26,65	30,52	29,65	28,81	29,46
	gapdh-F3 / gapdh-R3	29,63	30,12	33,80	33,34	>40,00	34,07
	gapdh-F4 / gapdh-R4	27,67	28,24	32,02	38,30	28,92	28,17
	gapdh-F5 / gapdh-R5	25,20	25,15	28,92	28,43	29,09	28,09
radA	radA-F1 / radA-R1	23,96	24,71	30,60	30,63	28,82	28,82
rpoB'	rpoB-F1 / rpoB-R1	32,92	31,77	30,16	30,71	29,08	28,96
	rpoB-F2 / rpoB-R2	25,17	26,85	28,73	27,13	26,33	27,56
	rpoB-F3 / rpoB-R3	29,68	30,26	30,11	28,73	27,45	27,82
halC8	halC8-ref-F1 / halC8-ref-R1	24,13	25,69	32,06	27,20	25,22	25,48
	halC8-ref-F2 / halC8-ref-R2	30,56	31,26	39,85	35,05	34,07	33,25
	halC8-ref-F3 / halC8-ref-R3	23,14	22,11	29,53	27,69	28,54	27,32
	halC8-ref-F4 / halC8-ref-R4	19,67	21,33	31,79	28,50	27,72	26,85
	halC8-ref-F5 / halC8-ref-R5	20,93	21,00	36,06	33,85	33,13	33,76

Tableau 19. Détection du signal de fluorescence par q-RT-PCR des échantillons RT⁺, RT⁻ et H₂O pour différents couples d'amorces s'hybridant à des gènes de ménage et au gène d'intérêt *halC8*.

Les amorces ont été dessinées en utilisant les logiciels OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyze>) et Primer 3 (<http://gmdd.shgmo.org/primer3/?seqid=47>) en se basant sur la séquence nucléotidique des gènes de *Nm. altunense* JCM12890. Les chiffres indiquent le numéro du cycle à partir duquel un signal de fluorescence a été détecté pour les échantillons RT⁺, RT⁻ et H₂O. Tous les échantillons ont été réalisés en duplicata : gris clair : valeurs en duplicata de RT⁺, gris moyen : valeurs en duplicata de RT⁻ et gris foncé : valeurs en duplicata de H₂O.

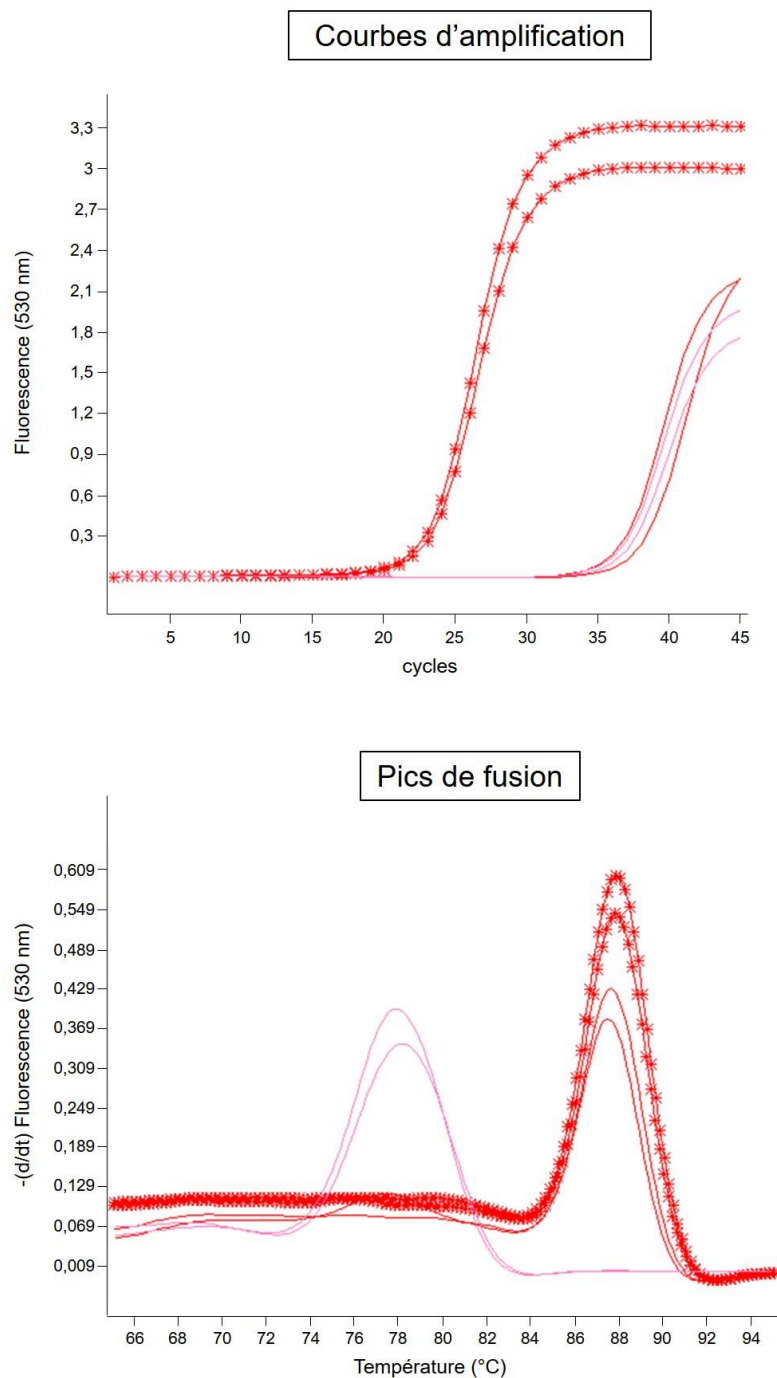


Figure 54. Test de spécificité des amorces s'hybridant à *rpl10*.

Les courbes d'amplification présentent le signal de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification. Les courbes de fusion des amplicons sont représentées en fonction de la température. Les courbes roses indiquent les échantillons où H₂O a été utilisé comme matrice, les courbes rouges correspondent aux échantillons RT⁻ en duplicata et les courbes rouges avec des étoiles correspondent aux échantillons RT⁺ en duplicata. Le signal de l'échantillon RT⁺ est détecté 10 cycles avant celui de l'échantillon RT⁻. Le signal de l'échantillon où H₂O a été utilisé comme matrice est détecté après le 32^{ième} cycle. Les courbes de fusion indiquent que le produit d'amplification de l'échantillon où H₂O a été utilisé comme matrice est probablement des dimères d'amorces dont la température de fusion est différente des amplicons obtenus pour l'échantillon RT⁺.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le gène *halC8* a été retrouvé dans le génome d'archées halophiles appartenant aux genres *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* et *Halobacterium* par des analyses *in silico*. Chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena*, les régions N- et C-terminales du gène *halC8*, codant respectivement la protéine d'immunité HalI et le peptide antimicrobien HalC8 sont conservées. Chez les souches *Haloferax* et *Halobacterium*, la région C-terminale codant HalC8 est également conservée mais la région N-terminale présente une grande variabilité de séquence, codant une protéine d'immunité de séquence protéique très différente de celle de HalI codée par le génome des souches *Natrinema* et *Haloterrigena*. Ce résultat démontre que le gène *halC8*, si l'on considère l'intégralité de sa longueur (codant HalI et HalC8), est restreint aux genres *Natrinema* et *Haloterrigena*. Des analyses PCR ont permis de montrer que le gène *halC8*, en plus d'être restreint à ces deux genres, était systématiquement retrouvé chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* testées. Chez les souches *Nm. altunense* JCM12890, *Nm. pellirubrum* DSM15634, *Nm. gari* JCM14663, *Natrinema* sp. J7-2 et *Htg. salina* JCM13891, les gènes *halU*, *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3* ont également été retrouvés, avec une organisation similaire à celle de *Natrinema* sp. AS7092. Chez les autres souches *Natrinema* et *Haloterrigena*, leur génome incomplet ou non séquencé n'a pas permis de mettre en évidence la présence de ces gènes. Des amplifications PCR avec des amorces spécifiques ont permis de démontrer que les gènes *halU*, *halT2* et *halT3* étaient présents chez la plupart des souches *Natrinema* et *Haloterrigena* testées, suggérant l'importance de ces gènes dans la biosynthèse de l'halocine C8 (Tableau 18). Le gène *halR* a été amplifié chez seulement 4 souches, suggérant que le mécanisme de régulation doit être différent pour un grand nombre de souches *Natrinema* et *Haloterrigena* (Tableau 18). Chez *Nm. altunense* JCM12890, nous avons montré que les gènes *halU*, *halR* et *halC8* étaient adjacents, confirmant ainsi les données *in silico*. Des analyses PCR sont en cours, pour toutes les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* disponibles, afin de déterminer si les gènes *halU*, *halR*, *halC8*, *halT1*, *halT2* et *halT3* sont à proximités les uns des autres et forment un groupe de gènes qui pourrait être impliqué dans la production d'HalC8. Il serait intéressant de vérifier par des analyses PCR sur de l'ADNc que les groupes de gènes qui sont conservés chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* ne sont pas cryptiques mais qu'ils sont bien transcrits chez les souches dans les conditions dans lesquelles une activité antimicrobienne a été observée.

Des essais de curage du ou des plasmide(s) à l'acridine orange ont été réalisés chez *Nm. altunense* JCM12890, démontrant que l'activité antimicrobienne disparaissait lorsque la souche *Nm. altunense* JCM12890 était traitée à l'acridine orange. Ce résultat suggère qu'au moins un des gènes nécessaires à la biosynthèse d'HalC8 est localisé sur un plasmide. Afin de valider ce résultat, il faudra vérifier que les plasmides sont effectivement curés par un traitement à l'acridine orange.

Les fonctions des gènes *halR*, *halT1*, *halT2* et *halT3* sont putatives et celle du gène *halU* est inconnue. Les études de transcription inverse chez *Nm. altunense* JCM12890 ont permis de démontrer que les gènes *halU*, *halR* et *halC8* n'étaient pas co-transcrits (Figure 53). Des analyses de q-RT-PCR sont en cours afin d'observer les profils de transcription des gènes *halU*, *halR*, *halC8*, *halT1*, *halT2* et *halT3* au cours de la phase de croissance. Ces tests de co-régulation des gènes nous permettront d'obtenir des informations sur le moment où la transcription des gènes est la plus forte, c'est-à-dire où potentiellement le produit du gène est nécessaire dans la production d'HalC8.

Il serait également intéressant d'analyser le profil de transcription du gène *halC8* par q-RT-PCR en faisant varier différents paramètres : salinité, température ou en présence d'une souche compétitrice afin de connaître les conditions qui régulent sa transcription et en déduire des hypothèses sur la fonction d'HalC8 dans les compétitions microbiennes. A plus long terme, afin d'identifier les fonctions exactes de chacun des gènes, ils devront être mutés un par un afin d'observer le phénotype résultant. Les gènes devront être mutés par la méthode de « pop-in » / « pop-out » décrit chez l'archée halophile *Hfx. volcanii* et qui consiste en deux événements 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 quantité d'HalC8 est modifiée.

Chapitre 3

Interactions microbiennes dans les environnements
hypersalins : peptides antimicrobiens et virus

Chapitre 3

Interactions microbiennes dans les environnements hypersalins : peptides antimicrobiens et virus

1. RESUME

Plusieurs agents peuvent jouer un rôle dans les interactions microbiennes en milieux hypersalins (Besse *et al.*, 2015). Parmi ces agents, on distingue les virus, qui sont particulièrement abondants dans les environnements hypersalins (Atanasova *et al.*, 2016). 90 % des virus halophiles décrits infectent des archées. En plus des virus, les halocines produites par les archées halophiles appartenant à la classe des *Halobacteria* pourraient jouer dans les interactions microbiennes en milieux hypersalins.

L'étude présentée dans le chapitre précédent montre la production d'halocine C8 (HalC8) par plusieurs souches d'archées halophiles, notamment appartenant aux genres *Natrinema* et *Haloterrigena*. En effet, le gène *halC8*, codant HalC8, a été retrouvé dans le génome des souches *Natrinema* et *Haloterrigena*, et sa transcription a été corrélée avec la détection d'une activité antimicrobienne, susceptible d'être due à HalC8. Par ailleurs, HalC8 a été purifié chez les souches *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema altunense* JCM12890, démontrant la production de cette halocine.

Dans ce contexte, le but de cette étude a été de rechercher la présence d'agents antimicrobiens, en plus d'HalC8, dans le surnageant des souches *Natrinema* sp. SWI6 et *Nm. altunense* JCM12890. Des tests antimicrobiens réalisés avec du surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema altunense* JCM12890 filtré et/ou chauffé a démontré la présence, en plus d'HalC8, d'agents antimicrobiens dont la taille est supérieure à 100 kDa. Des observations par microscopie électronique à transmission (MET) complémentées avec des analyses physiques ont permis de démontrer la présence de deux populations de nanoparticules dans le surnageant de *Natrinema altunense* JCM12890, qui sont susceptibles d'être des virus et des vésicules. La présence de virus a été confirmée par la détection d'une activité résultant d'un agent antimicrobien infectieux, capable de se multiplier dans le temps. Une activité antimicrobienne a été associée aux vésicules et l'hypothèse de la production d'HalC8 dans des vésicules a été

formulée. De telles vésicules ont déjà été observées pour les sulfolobicines produites dans des vésicules par *Sulfolobus* spp. (Prangishvili *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces résultats fera l'objet d'une publication en cours de rédaction intitulée « Antimicrobial interplays in hypersaline environments : delineating the contributions of antimicrobial peptides et viruses », intégrée à ce manuscrit et qui une fois finalisée sera soumis au journal *Extremophiles*.

2. ARTICLE

Antimicrobial interplays in hypersaline environments: delineating the contributions of antimicrobial peptides and viruses

Alison Besse¹, Manon Vandervennet¹, Jean Peduzzi¹, Martine Boccara², Sylvie Rebuffat¹ and Alyssa Carré-Mlouka^{1*}

¹ Laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245 CNRS-MNHN), Sorbonne Universités, Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN), Centre national de la Recherche scientifique (CNRS), CP 54, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

² Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB, UMR 7205 CNRS-MNHN-UPMC-EPHE)

E-mail addresses:

Alison Besse, alison.besse@edu.mnhn.fr

Manon Vandervennet, vandervennet@mnhn.fr

Jean Peduzzi, peduzzi@mnhn.fr

Martine Boccara, martine.boccara@upmc.fr

Sylvie Rebuffat, rebuffat@mnhn.fr

*Alyssa Carré-Mlouka, acarre@mnhn.fr

*Corresponding author. Tel: +33(0)1 40 79 31 32; fax: +33(0)1 40 79 31 35

E-mail: acarre@mnhn.fr

Abstract

A lot of agents contribute to interactions in hypersaline environments. Among them, halophilic viruses and halocins are the most abundant. Consequently, the antimicrobial activity displayed by halophilic strains is likely to result from the action of many contributing antimicrobial agents. The haloarchaea *Natrinema* sp. SWI6 and *Natrinema altunense* JCM12890 produce halocin C8, an antimicrobial peptide that displays antimicrobial activity against a large panel of halophilic strains (Besse *et al.*, soon to be published). In this study, we detected, in addition to HalC8, two other antimicrobial agents with a size up to 100 kDa. TEM observations revealed the presence of particles associated to *Natrinema altunense* JCM12890 supernatant were analyzed using a new optical microscope which measures the light scattered by nanoparticles, taking advantage of interferences to amplify the signals, thus revealing the presence of two distinct populations of nanoparticles that can be hypothesized as viruses and vesicles. The presence of viruses in the supernatants of five *Natrinema* and one *Haloterrigena* strains was confirmed by the observation of infectious agents, which multiply over time, likely haloviruses. The nanoparticles were purified by ultracentrifugation and analyzed by TEM, revealing the presence of vesicle-like particles to which antimicrobial activity was associated. Therefore, HalC8 could be produced in vesicles in a similar way as observed for sulfobactins.

1. Introduction

In hypersaline environments a lot of agents could contribute to the interactions between halophilic strains (Atanasova *et al.*, 2012; Besse *et al.*, 2015). Among them are viruses, which are abundant in hypersaline environments (Atanasova *et al.*, 2015a). To date, about 100 haloviruses have been described, 90% of them infecting haloarchaeal cells, which are dominant in hypersaline environments (Atanasova *et al.*, 2016). Haloarchaeal viruses outnumber their host cells up to hundred folds (Atanasova *et al.*, 2015a). They infect cells belonging to the genera *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halobacterium*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Halobellus*, *Halosarcina*, *Halogeometricum* or *Halogranum* (Pietilä *et al.*, 2014; Atanasova *et al.*, 2015b; Luk *et al.*, 2014). Haloarchaeal viruses can either have virulent, temperate or persistent infection cycles (Luk *et al.*, 2014). Many of the isolated haloarchaeal viruses have persistent infection cycles that lead to the continuous production of viruses in high numbers without host cell lysis (Atanasova *et al.*, 2016). During persistent infection, host cells continue to multiply in a slower rate than non-infected cells (Luk *et al.*, 2014). The high number of viruses, the abundance of broad host range viruses and the persistent infection mode suggest that halophilic archaea and their viruses are in constant interplay in hypersaline environments (Atanasova *et al.*, 2015b).

Besides viruses, antimicrobial peptides or proteins produced by halophilic archaea belonging to the *Halobacteria* class, can play a role in interactions in hypersaline environments (Besse *et al.*, 2015). Antagonistic interactions between microorganisms isolated from hypersaline environments have been detected since the early 80s and associated to the production of antimicrobial peptides named halocins (Meseguer *et al.*, 1986; Haseltine *et al.*, 2001; Besse *et al.*, 2015; Rodríguez-Valera *et al.*, 1982). Fifteen years later, a study has revealed that the production of halocins is widely distributed among halophiles, being almost a universal feature (Torreblanca *et al.*, 1994). Recent studies continue to describe halocin production by

halophilic species (Pasić *et al.*, 2008; Kavitha *et al.*, 2011; Karthikeyan *et al.*, 2013). However, today about 15 halocins only have been described, most often only partly. Moreover, only one halocin target has been identified and halocin biosynthesis genes have been identified only for three of them, namely halocins H4, S8 and C8 (HalC8) (Cheung *et al.*, 1997; Price and Shand, 2000; Sun *et al.*, 2005). In addition, there is a complete lack of information regarding the excretion of halocins and their import into target cells.

Secretion of sulfolobocins, the other known family of antimicrobial peptides produced by archaea has been associated to the production of vesicles in *Sulfolobus tokadaei*, *S. acidocaldarius* and *S. islandicus* (Ellen *et al.*, 2011; Prangishvili *et al.*, 2000). An active protein of approximately 20 kDa was detected from *S. islandicus* by SDS-PAGE gel covered with a layer of the sensitive *S. solfataricus*-seeded solid medium (Prangishvili *et al.*, 2000). However, purification of vesicles by ultracentrifugation from *S. tokadaei* and *S. acidocaldarius* and analyses of their protein partners by antimicrobial overlay SDS-PAGE assay and LC-MS revealed an antimicrobial activity associated with an apparent mass of about 42 kDa (Ellen *et al.*, 2011). These data suggest that the 20 kDa sulfolobocin isolated by Prangishvili *et al.* from *S. islandicus* and the sulfolobocin identified by Ellen *et al.* in *S. tokadaei* and *S. acidocaldarius* are unlikely the same archeocin but are both produced in vesicles.

In this context, we wondered if the antimicrobial activity detected for halophilic archaeal strains could be due to a mixture of several antimicrobial agents including viruses and halocins. In Besse *et al.* (Besse *et al.*, soon to be published), the antimicrobial activity observed for *Natrinema* and *Haloterrigena* strains has been correlated to the presence of an *halC8* gene, coding for the HalC8 precursor protein, which is transcribed, suggesting that the activity observed is likely to be due to HalC8. Moreover, HalC8 was purified from cultures of *Natrinema* sp. SWI6 and *Natrinema altunense* JCM12890, indicating that these strains indeed produce HalC8. This study revealed that, in addition to the HalC8 antimicrobial activity, a viral

91 activity was associated to the strains *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890.
92 Furthermore, based on MET observations and physical analyses, the hypothesis of HalC8
93 release, either free or associated with vesicles, is proposed.

2. Material and Methods

2.1 Strains and growth conditions

Archaeal strains used in this study are listed in Table 1. They 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/>) except *Halorubrum chaoviator* ETR14 which was cultivated in SW25 medium (5 g.L⁻¹ yeast extract, 49.492 g.L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 5 g.L⁻¹ KCl, 195 g.L⁻¹ NaCl, 0.65 g.L⁻¹ NaBr, 0.167 g.L⁻¹ NaHCO₃, 0.723 g.L⁻¹ CaCl₂·2 H₂O, 34.567 g.L⁻¹ MgCl₂·6 H₂O, pH=7.2) at 37°C, supplemented with 15 g.L⁻¹ agar for solid medium and 8 g.L⁻¹ for soft medium.

Strain	Origin	Reference	HalC8 production ^a
<i>Natrinema</i> sp. SWI6 ^b	Algeria	(Imadalou-Idres <i>et al.</i> , 2013)	<i>halC8</i> gene and expression
<i>Natrinema</i> sp. SSI9 ^b	Algeria	(Imadalou-Idres <i>et al.</i> , 2013)	
<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM15624	Salted hide	(McGenity <i>et al.</i> , 1998)	
<i>Natrinema versiforme</i> DSM16034	Aibi salt Lake, Xinjiang, China	(Xin <i>et al.</i> , 2000)	
<i>Natrinema salaciae</i> DSM25055	Lake Medee, Eastern Mediterranean Sea, Italy	(Albuquerque <i>et al.</i> , 2012)	
<i>Natrinema altunense</i> JCM12890	Ayakekum salt Lake, Xinjiang, China	(Xu <i>et al.</i> , 2005)	
<i>Haloterrigena thermotolerans</i> DSM11552	Solar salterns, Puerto Rico	(Montalvo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2000)	Partial <i>halC8</i> with different HalI
<i>Haloterrigena hispanica</i> DSM18328	Fuente de Piedra salt lake, Spain	(Juez <i>et al.</i> , 1986)	
<i>Haloferax volcanii</i> DSM3757	Northern end of the Dead Sea	(Mullakhanbhai and Larsen, 1975)	
<i>Haloferax mediterranei</i> DSMZ1411	Alicante solar salterns, Spain	(Rodriguez-Valera <i>et al.</i> , 1983)	No <i>halc8</i> detected
<i>Halomicrobium mukohataei</i> DSM12286	Andes highlands, Jujuy, Argentina	(Ihara <i>et al.</i> , 1997; Oren <i>et al.</i> , 2002)	
<i>Halorubrum chaoviator</i> ETD3 ^b	Sfax salterns, Tunisia	(Ghanmi <i>et al.</i> , 2016)	
<i>Halorubrum chaoviator</i> ETR14 ^b	Sfax salterns, Tunisia	(Ghanmi <i>et al.</i> , 2016)	

112

Table 1. Strains used in this study and production of HalC8.

113

^a Results obtained from Besse *et al.* (Besse *et al.*, soon to be published).

114

^b Strains isolated from Ichakaben saltern, Algeria (Imadalou-Idres *et al.*, 2013) or Sfax saltern, Tunisia (Ghanmi *et al.*, 2016).

115

116

2.2 Preparation of samples for antimicrobial assays

An early-stationary-phase of *Natrinema* sp. SWI6 or *Nnm. altunense* JCM12890 culture was centrifugated at 8,000 g for 30 minutes. The supernatants were either untreated and/or heated for 10 min at 100°C. They were concentrated 100 times on MWCO 100 kDa Vivaspin centrifugal concentrators (Sartorius Stedim) and filtered on 0.22 µm membrane. For some experiments, supernatants were dialyzed on MWCO 3.5 kDa membrane (Spectrum labs) against 2 L of water. The culture pellets were sonicated using a Digital sonifier® (Branson) with an amplification of 40% during 8 pulses of 30 sec each intercepted by pulse-off of 1 min. The sonicated sample was centrifugated for 5 min at 18,407 g. The resulting pellet was solubilized in 250 µL of KCl phosphate buffer (2.5 M KCl, 0.1 M Na₂HPO₄·2H₂O, 0.1 M NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4).

2.3 Antimicrobial assay

The detection of antimicrobial activity was conducted by using the agar well-diffusion method. Fifteen mL of medium 372 molten soft agar (agar 8 g.L⁻¹) were inoculated with 1-50 µL of an early stationary phase culture (OD₆₀₀ = 1.2-1.8) in order to obtain a final OD₆₀₀ 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 (5-10 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 around the well of a clear inhibition halo, measured in mm.

2.4 Detection of infectious activity

Crude, heated and/or filtered supernatants were tested for their antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. An agar piece of each inhibition halo obtained was cut out and added to 5 mL of DSMZ Halobacteria medium 372 sowed with *Hrr. chaoviator* ETD3. Growth was followed by measuring the optical density at 600 nm over time until stationary phase. Cultures were centrifugated for 30 min at 8,000 g and the resulting supernatants were tested for their antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3.

2.5 Purification of nanoparticles

Two hundreds ml of a late-exponential-phase growth culture of *Nnm. altunense* JCM12890 (OD₆₀₀=1.6) were centrifugated for 30 min at 8,000 g. The culture pellet was resuspended in 18 mL of KCl phosphate buffer (2.5 M KCl, 0.1 M Na₂HPO₄·2H₂O, 0.1 M NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4). The culture supernatant was filtered on 0.22 µm membranes and ultracentrifugated for 45 min at 125,000 g and then 1.5 h at 150,000 g. The resulting pellet was resuspended in 1 ml KCl phosphate buffer. Antimicrobial activities were tested with MWCO 3.5 dialyzed supernatants or sonicated pellets. After sonication the pellet samples were centrifugated at 18,407 g for 5 min and the pellet was resuspended in 500 µl KCl phosphate buffer.

2.6 Transmission electron microscopy observations

5 µl of the samples, either crude supernatant, pellet resuspended in KCl phosphate buffer (2.5 M KCl, 0.1 M Na₂HPO₄·2H₂O, 0.1 M NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4) or particle preparation, were dropped off on 150 mesh grids. The samples were negatively stained with 5 µl of 0.1% phosphotungstic acid, blotted and then allowed to dry for 5 min. Grids were directly observed using a HITACHI H-7100 with a 75 kV electron acceleration tension. AMT software was used for acquisition and picture process.

2.7 Physical analyses of vesicles densities

An early-stationary-phase culture supernatant of *Nnm. altunense* JCM12890 was concentrated 50 times on MWCO 30 kDa Vivaspin columns (Sartorius Stedim). The supernatant was analyzed with a new optical microscope, developed by Professors Martine Boccara and Albert Claude Boccara, which measures the light scattered by nanoparticles taking advantage of interferences to amplify the signals and Brownian movements of nanoparticles. Of the total number of nanoparticles, 2,434 nanoparticles were considered in the study, and the others were ruled out because we intentionally considered the diameter calculated from Brownian movement to 20 nm as a threshold, corresponding to our detection noise. From the data obtained, a statistical analysis was performed, revealing plots of diameters computed with scattered signals function of diameters computed by Brownian motion of nanoparticles detected.

3. Results

3.1 Detection of three different antimicrobial activities due to different agents in *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890

In a previous study, HalC8 was purified from cultures of *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890, which displayed antimicrobial activity. In order to distinguish from HalC8 any other antimicrobial agents that could be responsible for the antimicrobial activity observed, *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 supernatants were subjected to different treatments. Since HalC8 is a thermoresistant 7.4 kDa peptide (Li *et al.*, 2003), *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 supernatants were subjected to 100 kDa Centricon filter fractionation, allowing to approximate the size rank of the antimicrobial agent, and/or heat treatment, allowing to distinguish between thermolabile and thermoresistant antimicrobial agents. Crude or treated supernatants of *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 were assayed against a panel of sensitive strains belonging to different genera: *Haloterrigena hispanica* DSM18328, *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411, *Halomicrobium mukohataei* DSM12286, *Hfx. volcanii* DSM3757 and *Hrr. chaoviator* ETD3.

Inhibition halos with diameters of 20, 12 and 20 mm were observed for the 100 kDa filtered supernatant, against *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411, *Hfx. volcanii* DSM3757 and *Hrr. chaoviator* ETD3, respectively (Table 2, column 4). When the supernatant was heated, the activity was maintained with inhibition halos of 13, 12 and 16 mm against *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411, *Hfx. volcanii* DSM3757 and *Hrr. chaoviator* ETD3, respectively (Table 2, column 5). These results indicated that a thermoresistant antimicrobial agent of less than 100 kDa present in *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 supernatants, likely HalC8, displayed an antimicrobial activity against *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411, *Hfx. volcanii* DSM3757 and *Hrr. chaoviator* ETD3.

Target strain	Antimicrobial activities of the treated fractions ^a			
	MM>100 kDa		MM<100 kDa	
	not heated	heated	not heated	heated
<i>Haloterrigena hispanica</i> DSM18328	12	11	0	0
<i>Haloferax mediterranei</i> DSMZ 1411	10	0	20	13
<i>Halomicrobium mukohataei</i> DSM12286	11	10	0	0
<i>Haloferax volcanii</i> DSM3757	10	10	12	12
<i>Halorubrum chaoviator</i> ETD3	15 ^b	13 ^b	20 ^b	16 ^b

Table 2. Antimicrobial activities exhibited by the supernatants of *Natrinema* sp. SWI6 and *Nm. altunense* JCM12890 subjected to different treatments consisting of heating at 100°C or/and Centricon filter fractionation.

The values represent inhibition halo diameters (mm).

MM: molecular mass.

^a The antimicrobial activities were observed with *Natrinema* sp. SWI6 supernatants against all the strains except *Hrr. chaoviator* ETD3

^b Results obtained with *Nm. altunense* supernatant

The retentate of the 100 kDa filtration was indeed a concentrated sample of agents with a size higher than 100 kDa. For the retentate fraction, inhibition halos of 12, 10, 11, 10 and 15 mm were observed against all the target strains, *Htg. hispanica* DSM18328, *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411, *Hmc. mukohataei* DSM12286, *Hfx. volcanii* DSM3757 and *Hrr. chaoviator* ETD3, respectively (Table 2, column 2). These results indicated that antimicrobial agents larger than 100 kDa were present in *Natrinema* sp. SWI6 and *Nm. altunense* JCM12890 supernatants. However, the antimicrobial activity against *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411 disappeared when the supernatant was boiled, indicating that the antimicrobial agent responsible for the antimicrobial activity against this strain was thermolabile. Nevertheless, inhibition halos of 11, 10, 10 and 13 mm diameters were still observed against strains *Htg. hispanica* DSM18328, *Hmc. mukohataei* DSM12286, *Hfx. volcanii* DSM3757 and *Hrr. chaoviator* ETD3 when the supernatants were heated (Table 2, column 3). These results indicated that at least one of the antimicrobial agents responsible for this activity was thermoresistant.

All the subsequent experiments were performed exclusively with the strain *Nnm. altunense* JCM12890. Indeed, its supernatant displayed the larger halos of inhibition and the genes cluster *hal*, responsible for HalC8 production, was identified in *Nnm. altunense* JCM12890 genomes with exactly the same organization than in the original strain *Natrinema* sp. AS7092 (Besse *et al.*, soon to be published).

3.2 Detection of infectious antimicrobial agents in *Nnm. altunense* JCM12890 crude supernatant

Previous experiments showed that, in addition to HalC8, *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant contains one or more antimicrobial agent(s) larger than 100 kDa. In order to know if one of these antimicrobial agents larger than 100 kDa is indeed an infectious antimicrobial agent, which multiplies into the host over time, the sensitive strain *Hrr. chaoviator* ETD3 was treated with the antimicrobial agents contained in *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant. Indeed, fresh *Hrr. chaoviator* ETD3 culture was inoculated with an agar piece taken off from the inhibition halos obtained when performing the agar well-diffusion method to detect antimicrobial activity of *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant against *Hrr. chaoviator* ETD3 (Fig. 1,a). After several days cultivation of the inoculated *Hrr. chaoviator* ETD3, the supernatant was tested for its antimicrobial activity. In these conditions, detection of an antimicrobial activity will result from an infectious agent, which multiplies itself over time. By contrast, when a non-infectious antimicrobial agent is used to inoculate *Hrr. chaoviator* ETD3, it will be over-diluted into the fresh culture to display a detectable antimicrobial activity into our conditions.

The inhibition halo induced by the crude supernatant of *Nnm. altunense* JCM12890 had a diameter of 56 mm with unclear halo delimitation (Fig. 1, a: well 2). An agar piece of this inhibition halo was taken off and used to inoculate a fresh *Hrr. chaoviator* ETD3 culture. The growth of *Hrr. chaoviator* ETD3 showed a slight delay of growth when inoculated with agar

pieces from the crude supernatant inhibition halo (Fig. 1, b). The inoculated culture was grown to early-stationary-phase and the supernatant was then assayed for its antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. An inhibition halo was observed (Fig. 1, c), indicating that an infectious agent, likely a virus, was present in the crude supernatant of *Nnm. altunense* JCM12890.

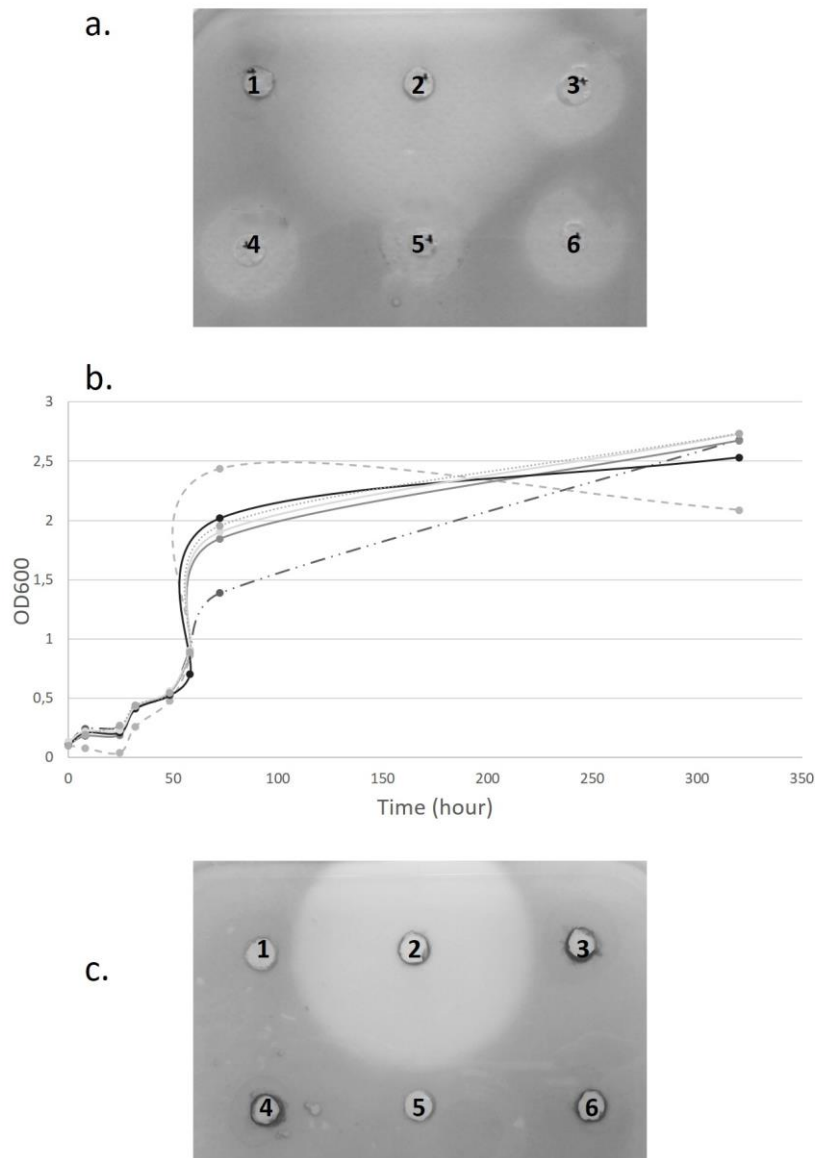


Fig. 1. Detection of the antimicrobial activity associated to an infectious agent.

a. 80 μ l of the producing strain *Nm. altunense* JCM12890 early-stationary-phase culture supernatant (OD₆₀₀ = 1.978) were tested for antimicrobial activity against the target strain *Hrr. chaoviator* ETD3. The supernatant was either tested crude (well 2), or heated at 100°C for 10 min (well 3), or filtered on 0.22 μ m membranes (well 4), or heated at 100°C and then 0.22 μ m filtered (well 5) or 0.22 μ m filtered and heated at 100°C (well 6). Well 1 is the negative control in which 80 μ l of DSMZ medium were dropped. **b.** An agar piece taken from each inhibition halo was used to inoculate 5 mL of fresh *Hrr. chaoviator* ETD3 culture. The growth was followed by measuring OD₆₀₀ over 325 hours. Dash line: culture inoculated with agar from the crude supernatant inhibition halo (**a.2**); dash/dotted line: culture not inoculated (**a.1**); black full line: culture inoculated with agar from the boiled supernatant inhibition halo (**a.3**); dotted line: culture inoculated with agar from the filtered then boiled supernatant inhibition halo (**a.5**); light grey full line: culture inoculated with agar from the filtered supernatant inhibition halo (**a.4**); dark grey full line: culture inoculated with agar from the boiled then filtered supernatant inhibition halo (**a.6**). **c.** 5 ml of each culture were centrifugated and 80 μ l of the crude resulting supernatant were tested for their antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. Well numbers are the same as in **a**.

In order to get rid of the infectious antimicrobial agent present in the crude supernatant and to be able to discriminate between the viral activity and the peptidic activity displayed by thermoresistant HalC8, *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant was heated and/or filtered on 0.22 μ m membrane and then tested for its antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. Inhibition halos of 21 mm were observed when the supernatant was heated, filtered or both, while it was of 18 mm when the supernatant was boiled and then filtered (Fig. 1, a: wells 3 to 6). This slight difference between diameters was likely to be due to the plugging of the filtration membrane by aggregation of agents of the supernatant that occurred during heating.

Fresh cultures of *Hrr. chaoviator* ETD3 were inoculated with an agar piece taken off from each of the inhibition halos. The growth of *Hrr. chaoviator* ETD3 was not affected by the inoculation with agar pieces (Fig. 1, b). The inoculated cultures were grown to early-stationary-phase and the supernatants were then assayed for their antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. No inhibition halo was observed when *Hrr. chaoviator* ETD3 was infected with heated and/or filtered *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant (Fig. 1, c). This result indicates that the infectious agent contained in *Nnm. altunense* JCM12890 crude supernatant is eliminated by heat and filtration.

A previous study showed that *Natrinema* and *Haloterrigena* strains have the *halC8* gene, which codes for HalC8, in their genome and that this gene is transcribed in conditions in which an antimicrobial activity is detected, thus suggesting that the antimicrobial activity is indeed due to HalC8 (Besse *et al.*, soon to be published). In order to detect any additional infectious antimicrobial agent contained in the supernatant of *Natrinema* and *Haloterrigena* strains, the same experiments were performed using a panel of *Natrinema* and *Haloterrigena* strains. The two *Haloterrigena* strains and the two *Natrinema* strains, which displayed the higher antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3, were selected: *Htg. salina* JCM13891, *Htg. thermotolerans* DSM11552, *Nnm. salaciae* DSM25055 and *Nnm. versiforme* DSM16034

307 (Besse *et al.*, soon to be published). *Nnm. pellirubrum* DSM15624 was also selected since it
308 has exactly the same *hal* cluster organization involved in HalC8 production as the original strain
309 *Natrinema* sp. AS7092 (Besse *et al.*, soon to be published). Finally, *Natrinema* sp. SSI9, was
310 also selected since it probably possesses *halC8* in its genome, but with a different immunity
311 protein moiety (Imadalou-Idres *et al.*, 2013). As observed for *Nnm. altunense* JCM12890, the
312 crude supernatants of *Htg. thermotolerans* DSM11552, *Nnm. salaciae* DSM25055, *Nnm.*
313 *versiforme* DSM16034, *Nnm. pellirubrum* DSM15624 and *Natrinema* sp. SSI9 displayed halos
314 twice larger than the filtered and/or heated supernatants (data not shown). Moreover, inhibition
315 halos were observed exclusively when the culture of *Hrr. chaoviator* ETD3 was inoculated with
316 an agar piece taken from the crude supernatant halo. These results indicate that the supernatants
317 of strains *Htg. thermotolerans* DSM11552, *Nnm. salaciae* DSM25055, *Nnm. versiforme*
318 DSM16034, *Nnm. pellirubrum* DSM15624 and *Natrinema* sp. SSI9, like *Nnm. altunense*
319 JCM12890, contain an infectious agent, likely a virus, which is eliminated by filtration and/or
320 heating (data not shown). *Htg. salina* JCM13891 was the only exception for which crude and
321 filtered/heated supernatants displayed inhibition halos with similar diameters, 28 and 26 mm,
322 respectively (Fig. 2). The diameter observed for the heated and then filtered supernatant was
323 only of 18 mm, probably because aggregation occurred in the supernatant during heating that
324 plugged the membrane filter. Furthermore, no inhibition halos were observed when *Hrr.*
325 *chaoviator* ETD3 was inoculated with agar pieces taken from inhibition halos (Fig. 2). These
326 results indicate that *Htg. salina* JCM13891 supernatant does not contain any infectious
327 antimicrobial agent.

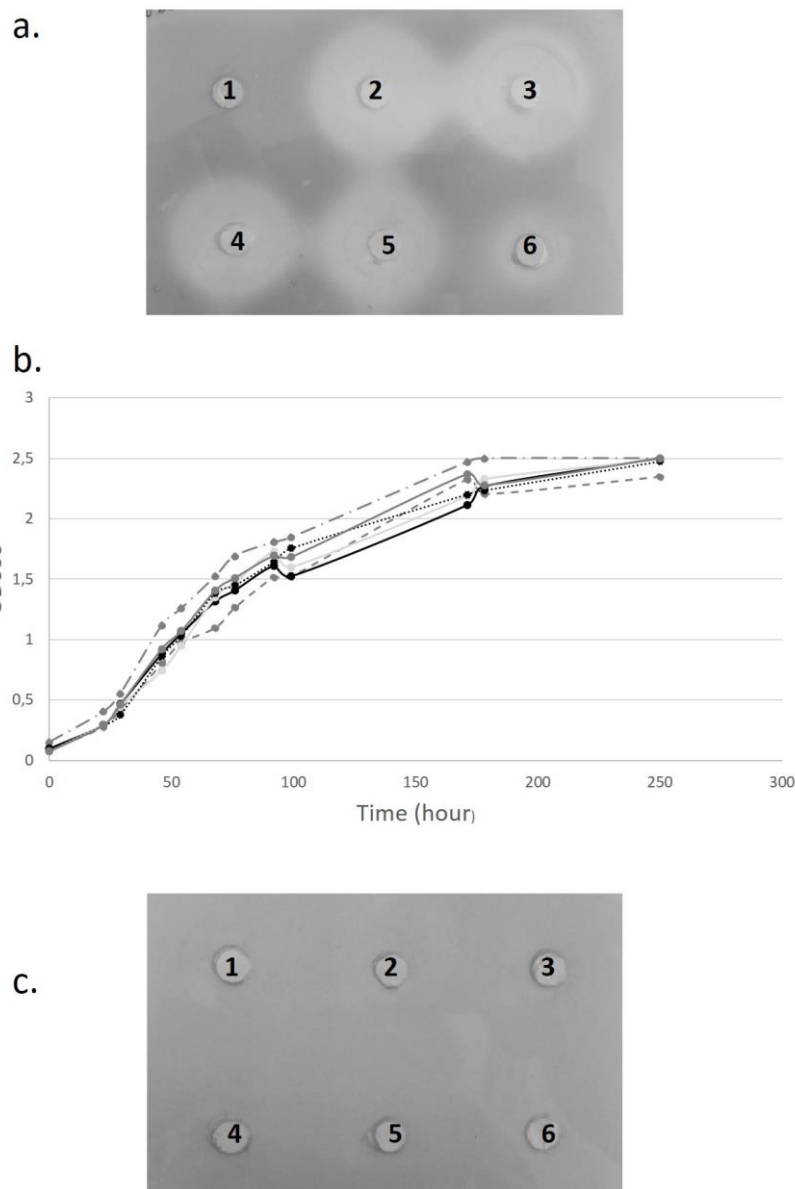


Fig. 2. Absence of infectious agent in the supernatant of *Htg. salina* JCM13891.

a. 80 μ l of the producing strain *Htg. salina* JCM13891 early-stationary-phase culture supernatant ($OD_{600} = 1.978$) were tested for antimicrobial activity against the target strain *Hrr. chaoviator* ETD3. The supernatant was either tested crude (well 2), heated at 100°C for 10 min (well 3), filtered on 0.22 μ m membrane (well 4), 0.22 μ m filtered and heated at 100°C (well 5) or heated at 100°C and then 0.22 μ m filtered (well 6). Well 1 is the negative control in which 80 μ l of DSMZ medium were dropped of. **b.** An agar piece taken from each inhibition halo was used to inoculate 5 mL of fresh *Hrr. chaoviator* ETD3 culture. The growth was followed by measuring OD_{600} over 250 hours. Dash line: culture inoculated with agar from the crude supernatant inhibition halo (**a.2**); dash/dotted line: culture not inoculated (**a.1**); black full line: culture inoculated with agar from the boiled supernatant inhibition halo (**a.3**); dotted line: culture inoculated with agar from the filtered then boiled supernatant inhibition halo (**a.5**); light grey full line: culture inoculated with agar from the filtered supernatant inhibition halo (**a.4**); dark grey full line: culture inoculated with agar from the boiled then filtered supernatant inhibition halo (**a.6**). **c.** 5 ml of each culture were centrifugated and 80 μ l of the crude resulting supernatant were tested for their antimicrobial activity against *Hrr. chaoviator* ETD3. Well numbers are the same than in **a**.

3.3 Detection of two morphologically distinct populations of nanoparticles

In order to characterize the antimicrobial agents with a size higher than 100 kDa, transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed with *Nm. altunense* JCM 12890. TEM observations of culture pellets of *Nm. altunense* JCM 12890 revealed the presence of circular nanoparticles associated with the cells (Fig. 3). The particles had a size ranging from 40 to 150 nm and seemed to be surrounded by a membrane (Fig. 3).

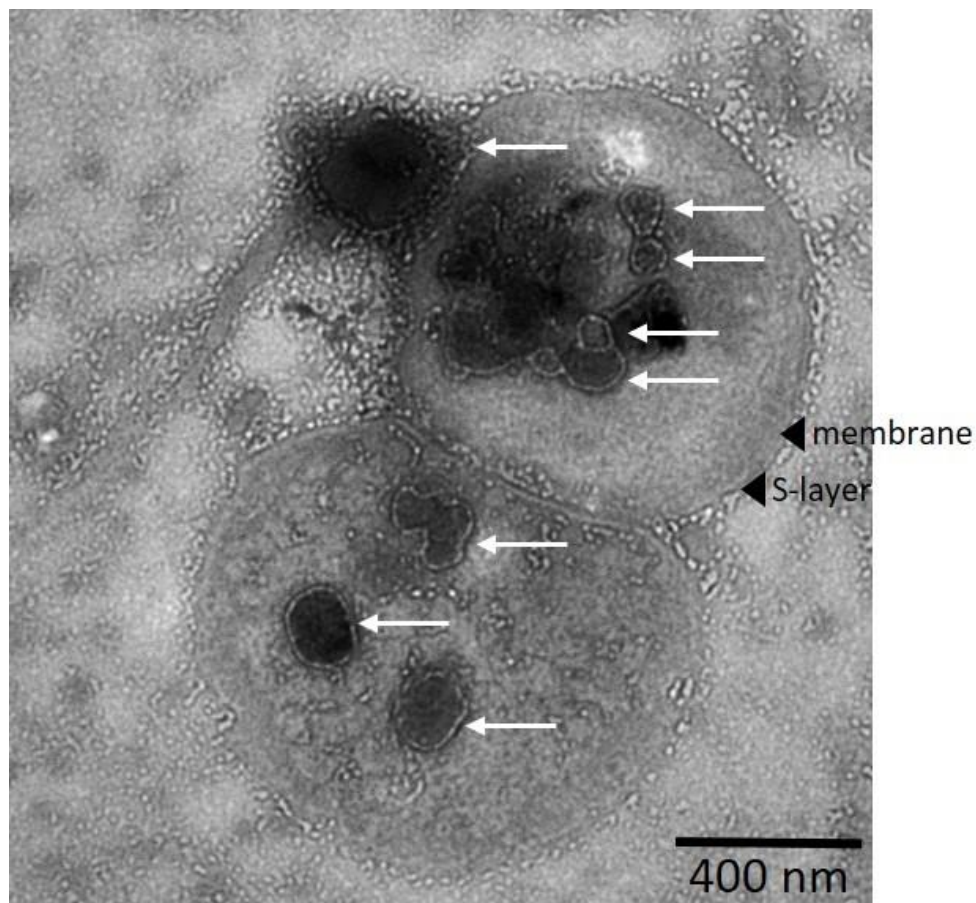


Fig. 3. *Nm. altunense* JCM12890 cells associated with nanoparticles. Cells preparation was obtained by centrifugation of early-stationary-phase culture of *Nm. altunense* JCM12890. Cells were negatively stained with 0.1% phosphotungstic acid and observed by TEM. White arrows indicate nanoparticles. Bare scale represents 400 nm.

In order to analyze these particles which are likely to be excreted by the cells, *Nm. altunense* JCM 12890 culture supernatant was concentrated 50 times on 30 kDa membranes and analyzed with a new optical microscope which measures the light scattered by nanoparticles, taking advantage of interferences to amplify the signals. The camera makes a pile of 200 images allowing diameter measurements by two methods: scattering signal and Brownian motion. When these two measurements are correlated the particles can be considered as viruses, while when they are very different they are considered as vesicles. The present results discriminate between two distinct populations in the 50 times concentrated culture supernatant: about 50% of viruses (40 nm diameter) and 50% of particles, which could correspond to vesicles (diameters from 50 to 100 nm and over) (Fig. 4).

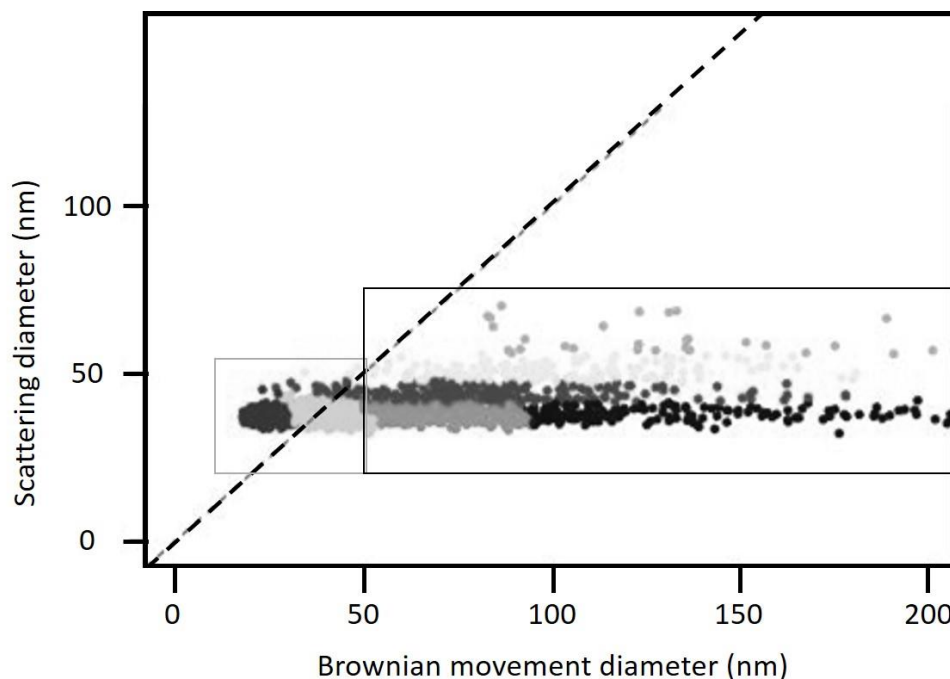


Fig. 4. Presence of two distinct populations of nanoparticles in *Nm. altunense* JCM12890 supernatant. Each dot represents one particle analyzed by the optical microscope which measures the light scattered by nanoparticles and the Brownian movements of nanoparticles. The light grey squares indicate nanoparticles considered as viruses and the dark grey squares nanoparticles considered as vesicles.

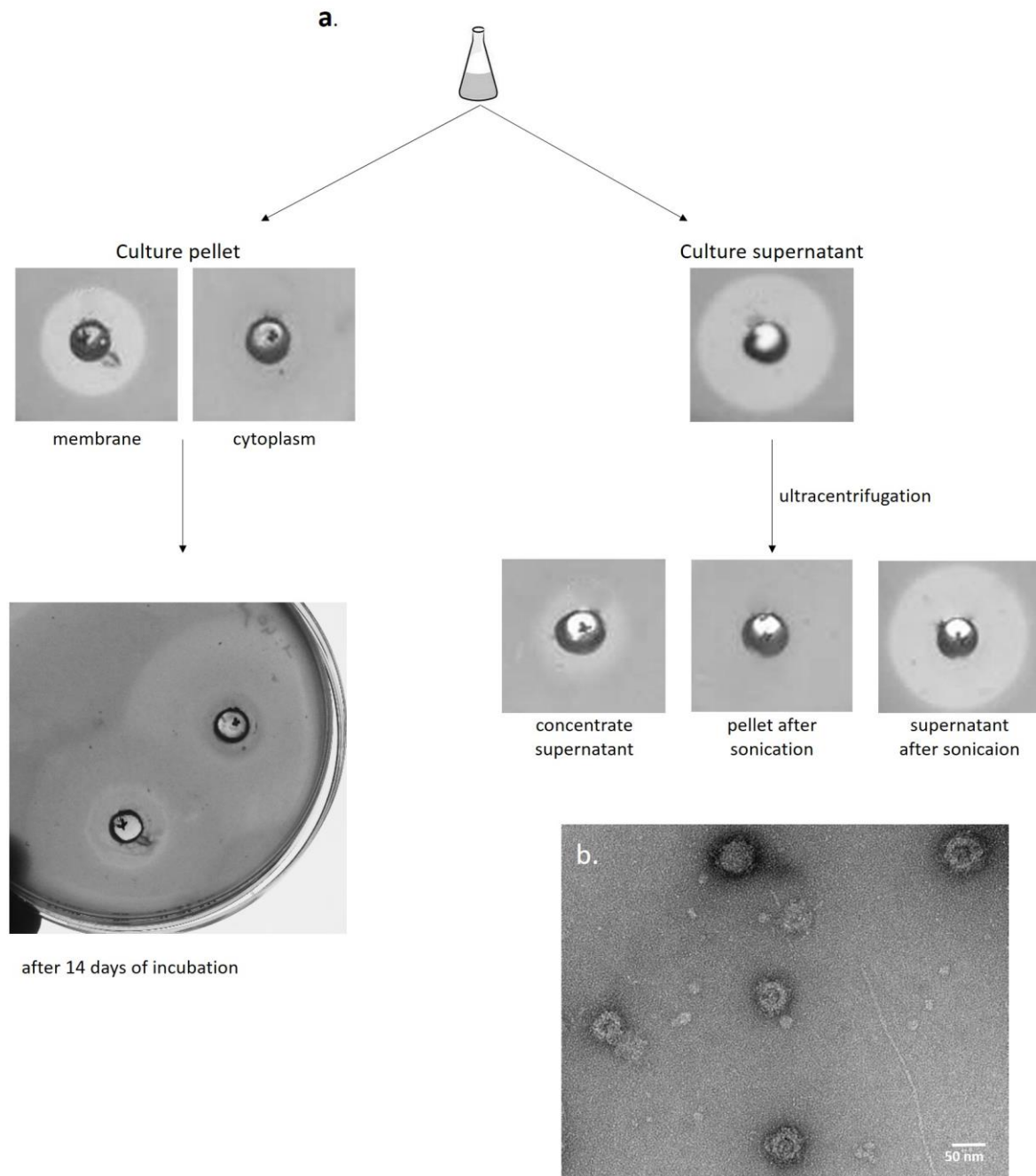
3.4 Purification of nanoparticles

In order to further characterize the two distinct populations of nanoparticles, likely viruses and vesicles, we purified them from *Nnm. altunense* JCM 12890 culture supernatant. Indeed, an early-stationary-phase culture of *Nnm. altunense* JCM 12890 was first centrifuged. The culture pellet was sonicated, resulting in the membrane and cytoplasm fractions, which were both tested for their antimicrobial activity. After 7 days of incubation, the cytoplasmic fraction displayed an inhibition halo. After 14 days of incubation, both fractions, from membrane and cytoplasm, displayed halos, which were 3 times larger than that observed after 7 days of incubation (Fig. 5, a). These antimicrobial activities are likely due to the cell-associated particles that were previously observed by TEM (Fig. 3), and more precisely to viruses since the inhibition halo diameter increased over time, suggesting that an infectious agent that multiplies over time is responsible for the antimicrobial activity detected.

Since the nanoparticles produced by the cells are likely to be excreted, they were purified from the culture supernatant. Thus, *Nnm. altunense* JCM 12890 supernatant was ultracentrifuged. The ultracentrifugation pellet was successively sonicated and centrifuged, resulting in a sonication pellet devoid of activity and a sonication supernatant, which displayed a large inhibition halo (Fig. 5, a). This result indicates that the antimicrobial activity is very likely associated to the nanoparticles. Moreover, sonication is supposed to destroy viruses and vesicles. Therefore, the antimicrobial agent, which is resistant to sonication, does not appear to be associated to particle membrane but rather released from the particles after sonication. Unfortunately, the ultracentrifugation pellet could not be analyzed by TEM for the particles, since abundant salts clotted the samples, preventing the observations. However, a small inhibition halo was observed for the dialyzed supernatant of ultracentrifugation (Fig. 5, a), indicating that not all particles were pelleted and some remained in the ultracentrifugation supernatant. Indeed, observation of the ultracentrifugation pellet by TEM revealed the presence

403 of particles (Fig. 5, b), indicating once again, that they are associated with antimicrobial
 404 activity.

405



406

407 **Fig. 5.** Purification of nanoparticles from *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant.
 408 **a:** samples obtained by centrifugation or ultracentrifugation were tested for their antimicrobial
 409 activity against *Hrr. chaoviator* ETD3, using dialyzed supernatants or sonicated pellets. **b:** The
 410 ultracentrifugation supernatant, which is called “concentrate supernatant”, was observed by
 411 TEM on crude samples.

4. Discussion

The production of halocins is widely distributed in hypersaline environments (Rodríguez-Valera *et al.*, 1982; Torreblanca *et al.*, 1994; Besse *et al.*, 2015). However, a lot of agents among which viruses, could display antimicrobial activity in such environments (Atanasova *et al.*, 2016). *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 produce HalC8 (Besse *et al.*, soon to be published). The aim of this study was to identify any additional antimicrobial agent produced by these two *Natrinema* strains.

Heated and 100 kDa-filtered *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 supernatants displayed an antimicrobial activity against five halophilic strains, *Htg. hispanica* DSM18328, *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411, *Hmc. mukohataei* DSM12286, *Hrr. chaoviator* ETD3 and *Hfx. volcanii* DSM3757. Since HalC8 is a thermoresistant 7.4 kDa peptide (Sun *et al.*, 2005), this antimicrobial activity is likely to be due to HalC8 produced by the two *Natrinema* strains.

Hfx. volcanii DSM3757 possesses *halC8* gene encoding HalC8 with diverging immunity protein moiety (Besse *et al.*, soon to be published). Thus, the sensitivity of *Hfx. volcanii* DSM3757 to HalC8 could be explained by the fact that *Hfx. volcanii* DSM3757 genome presumably encodes a different immunity protein which does not confer resistance against the HalC8 produced by *Natrinema*/*Haloterrigena* species, and in particular *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890.

When *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 supernatants were concentrated on 100 kDa centricons, an antimicrobial activity was observed against *Htg. hispanica* DSM18328, *Hfx. mediterranei* DSMZ 1411, *Hmc. mukohataei* DSM12286, *Hrr. chaoviator* ETD3 and *Hfx. volcanii* DSM3757 (Table 2), indicating that an antimicrobial agent larger than 100 kDa is present in the supernatant of *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890.

This activity is unlikely to be due to HalC8 oligomers, since the oligomerization corresponding to the supposed molecular size would be the result of the association of at least 14 monomers, which is unlikely to happen. This indicates that, in addition to HalC8, an additional antimicrobial agent is present in *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 supernatants.

In *Hfx. mediterranei*, the production of halocin H4 (HalH4) has been described to inhibit halophilic archaea (Cheung *et al.*, 1997). However, a *halH4*-mutant retains the ability to inhibit the growth of other halophilic archaea such as *Hbt. salinarum* and *Hfx. volcanii* (Naor *et al.*, 2013). These results suggest that in addition to HalH4, other antimicrobial agents are present in *Hfx. mediterranei* supernatant. This observation is consistent with our own result, which indicates that, in addition to HalC8, another antimicrobial agent is present in *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890 supernatants.

Analyses by TEM revealed two morphologically distinct populations associated with *Natrinema* sp. SWI6 and *Nnm. altunense* JCM12890. Physical analyses with a new interferometric detection method coupled with the analysis of Brownian motion allowed the detection, quantification and discrimination of two populations of nanoparticles. Fifty % of them are likely to be viruses with an approximate size of 40 nm (Fig. 4).

The presence of viruses is confirmed by the fact that an antimicrobial activity displayed by an infectious agent, likely a virus, has been detected for the selected strains (Fig. 1). These viruses were eliminated by heating, consistent with the fact that halophilic viruses have not been proved to be resistant to heat, until now. Moreover, viruses were eliminated when *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant was filtered on 0.22 µm membrane (Fig. 1). Since viruses are likely to be 40 nm in diameter, we hypothesized that filtration could indeed eliminate the residual cells from *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant to which viruses are associated. This hypothesis is consistent with the fact that particles, likely viruses, have been observed by MET

as associated to the cells (Fig. 3). Moreover, an antimicrobial activity was shown to be associated to the membrane fraction of the culture pellet, whose inhibition halo diameter is increasing over time (Fig. 5a), suggesting that a virus, which multiplies itself over time, is responsible for the lysis area observed.

Finally, a last result confirms the presence of viruses in *Nnm. altunense* JCM12890 crude supernatant. Indeed, inhibition halos observed with crude supernatants are 2.5 times larger than those observed for heated and/or filtered supernatants, with a diameter increasing with time and an unclear delimitation (Fig. 1, a). These results suggest that the inhibition halo observed is not only due to the diffusion of an antimicrobial agent present in the crude supernatant, but rather to its multiplication over time, suggesting that it could be viruses.

Crude supernatant of strains *Htg. thermotolerans* DSM11552, *Nnm. salaciae* DSM25055, *Nnm. versiforme* DSM16034, *Nnm. pellirubrum* DSM15624 and *Natrinema* sp. SSI9 were also infected by viruses. This result is not surprising since viruses are abundant in hypersaline environments (Atanasova *et al.*, 2015c), most of them infecting archaea which are dominant species of hypersaline environments (Atanasova *et al.*, 2015c; Luk *et al.*, 2014). The viruses detected in our experiments infect strains from *Natrinema* and *Haloterrigena* genera. To date, only one virus infecting *Natrinema* has been identified, virus SNJ1 which infects *Natrinema* sp. (Mei *et al.*, 2007). This virus has been described as temperate, and is the only temperate virus that replicates as an extrachromosomal genetic element that does not integrate into the host chromosome (Zhang *et al.*, 2012). The fact that *Natrinema* sp. virus is temperate could explain why the *Natrinema* hosts are not lysed when infected by viruses. A temporal screening of halophilic viruses infecting archaea, performed in the solar saltern of Samut Sakhon in Thailand, revealed, for the first time, the presence of viruses infecting *Haloterrigena* sp. (Atanasova *et al.*, 2015b).

In our experiments, the viruses seem to be non-lytic for their hosts *Htg. thermotolerans* DSM11552, *Nnm. salaciae* DSM25055, *Nnm. versiforme* DSM16034, *Nnm. pellirubrum* DSM15624, *Natrinema* sp. SSI9 and *Nnm. altunense* JCM12890. However, they seem to be lytic for *Hrr. chaoviator* ETD3. This is not surprising, since most of the viruses infecting *Halorubrum* species have a virulent mode of infection (Luk *et al.*, 2014). Moreover, the temporal screening of halophilic viruses in the solar saltern of Samut Sakhon in Thailand, revealed that 80% of the viruses isolated can interact with *Halorubrum* strains, which was the most sensitive strain, as sensitive to up to 26 different viruses (Atanasova *et al.*, 2015b).

Among all the *Natrinema* and *Haloterrigena* supernatant tested in this study, *Htg. salina* JCM13891 was the only strain to be not infected by a virus. Its supernatant displayed the same inhibition halo when crude or heated/filtered, with no increase in the inhibition halo diameter over time, revealing the absence of virus into the supernatant of *Htg. salina* JCM13891 (Fig. 2). *Haloterrigena* strains are not the host of choice for halophilic viruses since only one study has revealed the presence of viruses infecting *Haloterrigena* strains (Atanasova *et al.*, 2015b). In this study only 1.5% of the total viruses isolated interact with *Haloterrigena* strains. These observations could explain the results obtained in Besse *et al.* (Besse *et al.*, soon to be published) when testing the antimicrobial activity of *Htg. salina* JCM13891 against *Hrr. chaoviator* ETD3: indeed, the crude and treated supernatants of *Htg. salina* JCM13891 displayed similar diameters of inhibition halos, which could be explained by the fact that this strain is not infected by a virus.

Another type of nanoparticles has been observed by MET in *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant. However, since most of the viruses that infect halophilic archaea are round shaped, it is hard to differentiate viruses from other particles by TEM observations only (Atanasova *et al.*, 2015a). Physical analyses of the supernatant revealed the presence of nanoparticles with sizes varying from 50 to 100 nm, which were hypothesized to be vesicles. It is worth noting

that identities up to 37% with Vps4 proteins of the archaea *S. tokodaii* and *S. solfataricus* were found within *Natrinema* halophilic genomes by BLAST analyses. As Vps4 is an ATPase which is involved in the production of vesicles and more precisely in their release from the cell surface (Deatherage and Cookson, 2012), the hypothesis of the production of vesicles thus appears again strengthened. Recent studies suggest the involvement of vesicles in cell-cell communication as they can transfer quorum-sensing agents, toxins, pathogenicity factors, DNA, and RNA (Ellen *et al.*, 2011; Deatherage and Cookson, 2012; Gaudin *et al.*, 2013; Marguet *et al.*, 2013). In our study, nanoparticles have been purified from *Nnm. altunense* JCM12890 supernatant by ultracentrifugation. An antimicrobial activity has been observed for the ultracentrifugation pellet (Fig. 5), suggesting that the antimicrobial activity is associated to nanoparticles. The ultracentrifugation pellet was sonicated, centrifugated and the resulting supernatant and pellet were tested for their antimicrobial activity. The maximal antimicrobial activity was detected in the supernatant after sonication (Fig. 5), suggesting that the sonication released an antimicrobial agent, likely HalC8. Indeed, sonication very probably destroys viruses and vesicles, leading simultaneously to the loss of viral activity and release of the HalC8 portion initially produced associated with vesicles. This hypothesis is strengthened by the fact that sulfolobocines, the other antimicrobial peptide from archaea, are produced in vesicles (Ellen *et al.*, 2011; Prangishvili *et al.*, 2000). Moreover, TEM observations of these vesicles revealed structures that are quite similar to those we observed with the fraction of nanoparticles concentrated by ultracentrifugation (Fig. 5, b) (Prangishvili *et al.*, 2000). In order to confirm the presence of HalC8 in vesicles, the portion of halocin associated to the vesicle will have to be purified and identified. The production of HalC8 in vesicles could be a particularly efficient way for carrying HalC8 to its target, since HalC8 is a hydrophobic peptide (Sun *et al.*, 2005) which is released in an aqueous hypersaline environment. However, the target strain of HalC8 needs being identified to further speculate in this direction

535 **Conflict of interest**

536 The authors declare no conflict of interest.

537 **Acknowledgments**

538 A.B. is funded by a grant from the Doctoral School ED 227 “Sciences de la Nature et de
539 l’Homme” attributed by decision of the Doctoral Program Coordination Committee.

540 “Plateau technique de Microscopie Électronique” of National Museum of Natural History
541 for the access to MET and Chakib Djediat for his help in analysis of MET pictures.

542

References

- Albuquerque, L., Taborda, M., La Cono, V., Yakimov, M., and da Costa, M.S. (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.
- Atanasova, N.S., Roine, E., Oren, A., Bamford, D.H., and Oksanen, H.M. (2012). Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environ. Microbiol.* 14, 426–440.
- Atanasova, N.S., Bamford, D.H., and Oksanen, H.M. (2015a). Haloarchaeal virus morphotypes. *Biochimie* 118, 333–343.
- Atanasova, N.S., Demina, T.A., Buivydas, A., Bamford, D.H., and Oksanen, H.M. (2015b). Archaeal viruses multiply: temporal screening in a solar saltern. *Viruses* 7, 1902–1926.
- Atanasova, N.S., Oksanen, H.M., and Bamford, D.H. (2015c). Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 40–48.
- Atanasova, N.S., Bamford, D.H., and Oksanen, H.M. (2016). Virus-host interplay in high salt environments. *Environ. Microbiol. Rep.*
- Besse, A., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A. (2015). Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie.*
- Cheung, J., Danna, K.J., O'Connor, E.M., Price, L.B., and Shand, R.F. (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.
- Deatherage, B.L., and Cookson, B.T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* 80, 1948–1957.
- Ellen, A.F., Rohulya, O.V., Fusetti, F., Wagner, M., Albers, S.-V., and Driessen, A.J.M. (2011). The sulfolobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J. Bacteriol.* 193, 4380–4387.
- Gaudin, M., Gaudiard, E., Schouten, S., Houel-Renault, L., Lenormand, P., Marguet, E., and Forterre, P. (2013). Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 109–116.
- Ghanmi, F., Carré-Mlouka, A., Vandervennet, M., Boujelben, I., Frikha, D., Ayadi, H., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and 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.
- Haseltine, C., Hill, T., Montalvo-Rodriguez, R., Kemper, S.K., Shand, R.F., and Blum, P. (2001). Secreted euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic Crenarchaea. *J. Bacteriol.* 183, 287–291.
- Ihara, K., Watanabe, S., and Tamura, T. (1997). *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 73–77.
- Imadalou-Idres, N., Carre-Mlouka, A., Vandervennet, M., Yahiaoui, H., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2013). Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. *J. Life Sci.* 1057–1069.

- 582 Juez, G., Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., and Kushner, D.J. (1986). *Haloarcula hispanica* spec.
583 nov. and *Haloferax gibbonsii* spec. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. Syst.
584 Appl. Microbiol. 8, 75–79.
- 585 Karthikeyan, P., Bhat, S.G., and Chandrasekaran, M. (2013). Halocin SH10 production by an extreme
586 haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. Saudi J. Biol. Sci. 20,
587 205–212.
- 588 Kavitha, P., Lipton, A.P., Sarika, A.R., and Aishwarya, M.S. (2011). Growth characteristics and
589 halocin production by a new isolate, *Haloferax volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India).
590 Res. J. Biol. Sci. 257–262.
- 591 Li, Y., Xiang, H., Liu, J., Zhou, M., and Tan, H. (2003). Purification and biological characterization of
592 halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. Extremophiles 7, 401–407.
- 593 Luk, A.W.S., Williams, T.J., Erdmann, S., Papke, R.T., and Cavicchioli, R. (2014). Viruses of
594 haloarchaea. Life Basel Switz. 4, 681–715.
- 595 Marguet, E., Gaudin, M., Gaudiard, E., Fourquaux, I., le Blond du Plouy, S., Matsui, I., and Forterre,
596 P. (2013). Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of
597 the genus *Thermococcus*. Biochem. Soc. Trans. 41, 436–442.
- 598 McGenity, T.J., Gemmell, R.T., and Grant, W.D. (1998). Proposal of a new halobacterial genus
599 *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum*
600 nom. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt 4, 1187–1196.
- 601 Mei, Y., Chen, J., Sun, D., Chen, D., Yang, Y., Shen, P., and Chen, X. (2007). Induction and
602 preliminary characterization of a novel halophage SNJ1 from lysogenic *Natrinema* sp. F5. Can. J.
603 Microbiol. 53, 1106–1110.
- 604 Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F., and Ventosa, A. (1986). Antagonistic interactions among
605 halobacteria due to halocin production. FEMS Microbiol. Lett. 36, 177–182.
- 606 Montalvo-Rodríguez, R., López-Garriga, J., Vreeland, R.H., Oren, A., Ventosa, A., and Kamekura, M.
607 (2000). *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. Int. J. Syst.
608 Evol. Microbiol. 50 Pt 3, 1065–1071.
- 609 Mullakhanbhai, M.F., and Larsen, H. (1975). *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea
610 halobacterium with a moderate salt requirement. Arch. Microbiol. 104, 207–214.
- 611 Naor, A., Yair, Y., and Gophna, U. (2013). A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains
612 the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. Extrem. Life Extreme Cond. 17, 973–979.
- 613 Oren, A., Elevi, R., Watanabe, S., Ihara, K., and Corcelli, A. (2002). *Halomicrobium mukohataei* gen.
614 nov., comb. nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei*. Int. J. Syst. Evol.
615 Microbiol. 52, 1831–1835.
- 616 Pasić, L., Velikonja, B.H., and Ulrih, N.P. (2008). Optimization of the culture conditions for the
617 production of a bacteriocin from halophilic archaeon Sech7a. Prep. Biochem. Biotechnol. 38, 229–
618 245.
- 619 Pietilä, M.K., Demina, T.A., Atanasova, N.S., Oksanen, H.M., and Bamford, D.H. (2014). Archaeal
620 viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. Trends Microbiol. 22, 334–344.

621 Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J.K., and Zillig, W. (2000).
622 Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic
623 archaeal genus *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* *182*, 2985–2988.

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

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

628 Rodríguez-Valera, F., Juez, G., and Kushner, D.J. (1983). *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a
629 new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Syst. Appl. Microbiol.* *4*, 369–381.

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

632 Torreblanca, M., Meseguer, I., and Ventosa, A. (1994). Production of halocin is a practically universal
633 feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.* *19*, 201–205.

634 Xin, H., Itoh, T., Zhou, P., Suzuki, K., Kamekura, M., and Nakase, T. (2000). *Natrinema versiforme*
635 sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol.*
636 *Microbiol.* *50 Pt 3*, 1297–1303.

637 Xu, X.-W., Ren, P.-G., Liu, S.-J., Wu, M., and Zhou, P.-J. (2005). *Natrinema altunense* sp. nov., an
638 extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake in Altun Mountain in Xinjiang, China. *Int. J.*
639 *Syst. Evol. Microbiol.* *55*, 1311–1314.

640 Zhang, Z., Liu, Y., Wang, S., Yang, D., Cheng, Y., Hu, J., Chen, J., Mei, Y., Shen, P., Bamford, D.H.,
641 *et al.* (2012). Temperate membrane-containing halophilic archaeal virus SNJ1 has a circular dsDNA
642 genome identical to that of plasmid pHH205. *Virology* *434*, 233–241.

643

3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION

La purification par ultracentrifugation des nanoparticules présentes dans le surnageant de *Nm. altunense* JCM12890 a permis de démontrer une activité antimicrobienne associée à ces particules après leur sonication. De ce fait, à l'instar de ce qu'il a été observé pour les sulfolobocines, l'hypothèse de la production d'HalC8 dans des vésicules a été formulée. Afin de valider cette hypothèse et de corrélérer l'activité antimicrobienne associée aux vésicules à l'action d'HalC8, l'identification de la masse de l'agent antimicrobien contenu dans les vésicules a été investiguée. Pour cela, des gels overlay ont été réalisés. Les gels overlay sont des gels SDS-PAGE recouverts par une gélose molle ensemencée avec une souche sensible à HalC8. Après la migration, si l'un des peptides/protéines possède une activité antimicrobienne, une zone d'inhibition sera observée. Ainsi, si HalC8 est présent dans l'échantillon déposé sur le gel SDS-PAGE, une zone d'inhibition sera observée aux alentours de 7 kDa.

Les différentes fractions obtenues lors de la purification des particules par ultracentrifugation (Figure 5 de l'article « Antimicrobial interplays in hypersaline environments : delineating the contributions of antimicrobial peptides et viruses ») ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 17 % après dialyse des surnageants sur des membranes de 3,5 kDa contre de l'eau et sonication des culots. Lors de la dialyse des surnageants contre de l'eau, les virus et vésicules sont susceptibles d'être détruites à la suite d'un choc osmotique. De ce fait, les composés dont la taille est supérieure à 3,5 kDa et qui étaient contenu dans les vésicules, potentiellement HalC8, seront retrouvés dans le dialysat. La sonication des culots a pour but de lyser les cellules/nanoparticules et libérer ainsi leur contenu.

Après la migration des différents échantillons, le gel SDS-PAGE a été recouvert par une gélose molle ensemencée avec *Hrr. chaoviator* ETR14, souche sensible à HalC8. Une zone d'inhibition a été observée sur le gel où les échantillons obtenus après l'étape de centrifugation à 8000 g de la culture avaient été déposés (Figure 55). Cette zone d'inhibition semble localisée autour de 10 kDa dans le puits où l'échantillon correspondant au cytoplasme des cellules productrices a été déposé (Figure 55). Cependant, il est difficile de déterminer dans quel puits a été déposé l'agent antimicrobien responsable de cette zone d'inhibition car les puits sont trop rapprochés les uns des autres. De plus, la zone d'inhibition semble avoir diffusé et son point d'origine est difficile à identifier. Pour les échantillons obtenus après ultracentrifugation, aucune zone d'inhibition n'a été observée (Figure 55). Ce résultat est surprenant car des

activités antimicrobiennes avaient été détectées pour ces fractions par des tests antimicrobiens classiques avec la technique de diffusion à partir de puits creusés dans une gélose. L'hypothèse d'une quantité insuffisante d'échantillon déposée sur le gel pour détecter l'activité antimicrobienne a été écartée car les échantillons concentrés 4 fois n'ont pas montré de zones d'inhibition non plus. Ces expériences devront être répétées afin d'identifier la masse de l'agent antimicrobien responsable de l'activité observée par la technique classique de tests antimicrobiens.

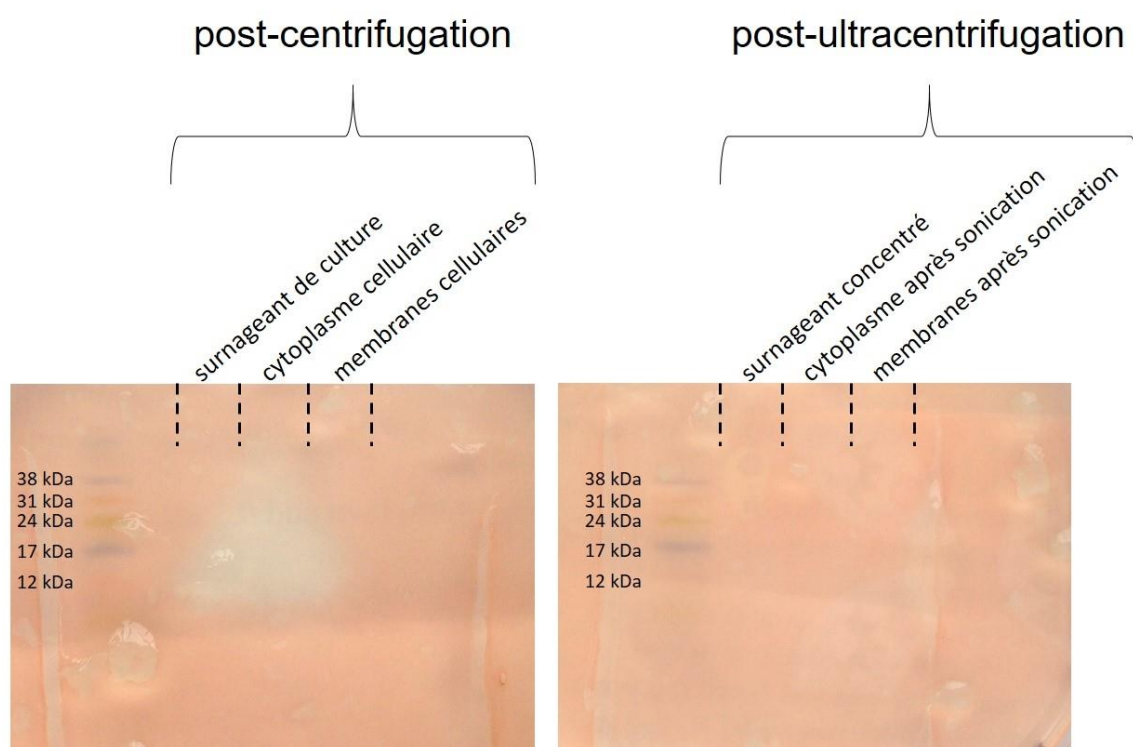


Figure 55. Gel overlay des échantillons post-centrifugation d'une culture de *Nm. altunense* JCM12890 et post-ultracentrifugation du surnageant.

20 µl de chaque échantillon ont été déposés sur des gels Tris-tricine 17 %. La souche cible avec laquelle la gélose molle a été ensemencée est *Hrr. chaoviator* ETR14.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude montre qu'en plus d'HalC8, d'autres agents antimicrobiens sont présents dans le surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 et *Nm. altunense* JCM12890. Deux populations de nanoparticules ont été mises en évidence. La première population est composée de virus, associés à *Nm. altunense* JCM12890 chez qui ils se multiplient sans induire une lyse de l'hôte, mais qui sont lytiques pour certaines souches d'archées halophiles, notamment *Hrr. chaoviator* ETD3. L'autre population de particules pourrait être des vésicules. Etant donné qu'une activité antimicrobienne a été observée associée à ces particules après une étape de sonication, étape qui lyse très probablement les vésicules, l'hypothèse de la présence d'HalC8 dans des vésicules a été formulée. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les sulfolobocines, produites par les archées thermophiles du genre *Sulfolobus*, sont produites dans des vésicules (Ellen *et al.*, 2011 ; Prangishvili *et al.*, 2000).

Dans le but de valider cette hypothèse, des gels SDS-PAGE ont été réalisés afin de détecter la masse de l'agent antimicrobien responsable de l'activité antimicrobienne observée pour les vésicules. A l'heure actuelle, ces gels overlay ne nous ont pas permis de détecter une activité antimicrobienne alors que nous l'avons détectée par des tests antimicrobiens réalisés avec la technique classique de diffusion à partir de puits creusés dans la gélose. Ces expériences devront être réitérées afin d'identifier la masse de l'agent responsable de l'activité antimicrobienne associée.

Afin d'obtenir la masse exacte des protéines associées aux vésicules, des analyses par spectrométrie de masse pourront être réalisées. Ces analyses nous permettront de détecter la présence de protéines généralement associées aux vésicules : ATPase Vps4, protéines membranaires..., mais aussi de détecter l'éventuelle présence d'HalC8, auparavant déjà détectée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et HPLC-ESI-qQ-TOF (cf. chapitre 2).

Cette étude est la première à s'intéresser à la voie de biosynthèse des halocines. Etant donné qu'HalC8 est un peptide hydrophobe, la sécrétion de ce dernier dans un milieu aqueux hypersalin est difficile à concevoir. La production d'HalC8 dans des vésicules pourrait permettre à HalC8 d'atteindre sa cible, aujourd'hui inconnue. Les essais d'identification de la cible d'HalC8 sont présentés dans le chapitre 4 de cette thèse.

Chapitre 4

Identification de la cible de l'halocine C8

Chapitre 4

Identification de la cible de l'halocine C8

1. INTRODUCTION

Les bactériocines ont été largement étudiées, notamment pour leur mécanisme d'action (voir introduction, partie 4). La perméabilisation de la membrane plasmique de la cellule cible, conduisant à la mort cellulaire est le mode d'action le plus souvent observé (Dridier *et al.*, 2006 ; Vassiliadis *et al.*, 2011).

Contrairement aux bactériocines, très peu de données sont connues sur le mécanisme d'action des halocines. L'halocine H6/H7 est la seule halocine dont la cible a été clairement identifiée. Une première étude a montré que l'halocine H6/H7 (HalH6/H7) entraînait une déformation des cellules cibles, conduisant à leur lyse cellulaire et laissant des « fantômes » vides dans lesquels les enveloppes cellulaires restent intactes (Torreblanca *et al.*, 1990). De plus, il a été observé que l'HalH6/H7 induisait la lyse de ces sphéroplastes, suggérant que la cible serait localisée au niveau de la membrane (Torreblanca *et al.*, 1990). Une deuxième étude a montré que la cible de l'HalH6/H7 était l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) (Meseguer *et al.*, 1995). NHE permet le transport unidirectionnel des ions Na^+ et H^+ , respectivement vers l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Cet échangeur est indispensable pour l'adaptation des cellules d'*Halobacteria* aux fortes concentrations salines des environnements qu'elles colonisent (Oren, 2006).

Pour les autres halocines, aucune cible n'a été clairement identifiée. Néanmoins, des changements morphologiques et dans certains cas une lyse cellulaire, ont été observés lorsque des cellules d'*Halobacterium salinarum* étaient traitées avec du surnageant de culture contenant l'halocine H4 (HalH4) (Meseguer et Rodriguez-Valera, 1986). Pour les cellules traitées, une diminution de l'import de protons vers le cytoplasme a été observée sans que les échangeurs NHE ou ATPase ne semblent impliqués dans le processus. Ces observations suggèrent que la cible de l'HalH4 pourrait être localisée au niveau de la membrane plasmique, entraînant des modifications de la perméabilité de la membrane et un déséquilibre ionique qui conduisent à la lyse cellulaire (Meseguer et Rodriguez-Valera, 1986 ; Torreblanca *et al.*, 1990).

Des changements morphologiques accompagnés d'un flux du contenu cellulaire vers l'extérieur ont été observés par microscopie électronique pour des cellules d'*Halorubrum saccharovorum* traitées avec du surnageant contenant l'halocine C8 (HalC8) (Li *et al.*, 2003). Après 24 heures, la plupart des cellules traitées étaient complètement lysées. Cette observation suggère que la cible du peptide serait localisée au niveau de la paroi cellulaire et que le mécanisme d'action d'HalC8 pourrait être différent d'une perméabilisation classique de la bicouche membranaire, souvent observée pour les bactériocines et supposée pour les halocines H4 et H6/H7.

Dans ce chapitre, la cible d'HalC8 a été investiguée. Dans un premier temps, le spectre d'action d'HalC8 a été étudié afin d'identifier les micro-organismes susceptibles de posséder la cible d'HalC8. Afin de disposer d'une quantité suffisante d'HalC8 pure et de réaliser des tests dans le but d'identifier la cible d'HalC8, des essais de surexpression d'HalC8 chez une souche hétérologue ont été réalisés. Enfin, la cible d'HalC8 a été recherchée *via* le criblage d'une banque de mutants de la souche *Haloferax volcanii* H295, sensible à HalC8, afin de trouver un mutant devenu résistant à l'action d'HalC8 chez qui le gène cible, ou impliqué dans le mécanisme cible d'HalC8 a été inactivé.

2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.1 Détermination du spectre d'activité d'HalC8

En 2003, Li *et al.* ont montré que le surnageant de la souche *Natrinema* sp. AS7092, souche originellement productrice d'HalC8, possédait une activité antimicrobienne contre un large spectre d'archées halophiles (Li *et al.*, 2003). Parmi les archées halophiles sensibles à HalC8, on recense des espèces halophiles appartenant aux genres *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Natrialba* et *Natrinema* ainsi que des espèces haloalkaliphiles appartenant aux genres *Natronobacterium* et *Natronomonas* (Tableau 20).

Dans ce contexte, le but de notre étude a été d'étudier si HalC8 était actif sur des souches d'archées halophiles appartenant à un autre genre ou sur des micro-organismes halophiles appartenant aux deux autres domaines du vivant : les bactéries et les eucaryotes. A l'heure actuelle, aucune étude ne fait l'objet de tests d'activités cross-domaine pour HalC8. Cependant, les micro-organismes halophiles bactériens et eucaryotes évoluent dans le même environnement et HalC8 pourrait avoir un rôle dans les interactions cross-domaine au sein de ces environnements hypersalins.

A défaut de disposer d'HalC8 pure et en quantité suffisante pour déterminer son spectre d'action, des surnageants de culture contenant HalC8 ont été utilisés. Les surnageants de culture des souches *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema altunense* JCM12890 ont été utilisés car la production d'HalC8 par ces deux souches a été confirmée par spectrométrie de masse (cf. chapitre 2). La recherche de souches sensibles à HalC8 a été réalisée grâce à des tests antimicrobiens en utilisant la technique de diffusion à partir de puits creusés dans une géloseensemencée avec la souche cible (cf. Matériel et Méthodes).

Dans un premier temps, l'activité du surnageant de cultures de *Natrinema* sp. SWI6 et *Nm. altunense* JCM12890, contenant HalC8, a été testée contre des souches d'archées halophiles (Tableau 20). Une activité antimicrobienne a été observée pour des souches appartenant aux genres *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halorubrum* et *Natrinema*, confirmant les résultats obtenus par Li *et al.* (Li *et al.*, 2003). Par ailleurs, une activité antimicrobienne a également été observée contre les souches *Halomicrobium mukohataei* DSM12286, *Haloterrigena hispanica* DSM18328 et *Haloterrigena turkmenica* DSM5511,

mettant en évidence pour la première fois des espèces appartenant aux genres *Halomicrobium* et *Haloterrigena* comme étant sensibles à un surnageant contenant l'HalC8 (Tableau 20).

Souche cible		Sensibilité SN brut	SN filtré et chauffé
Eucaryotes	<i>Penicillium corylophilum</i> LCP 5424 ³	ND	-
	<i>Eurotium rubrum</i> LCP 6453 ³	ND	-
Bactéries	<i>Salinivibrio costicola</i> SI3 ²	-	ND
	<i>Salinibacter ruber</i> DSM13855 ^{2,3}	+	ND
	<i>Lentibacillus halophilus</i> DSM19123 ³	-	ND
	<i>Nesterenkonia halophila</i> DSM16378 ³	-	ND
	<i>Halomonas sabkhae</i> DSM19122 ³	-	ND
	<i>Salinicoccus siamensis</i> DSM21576 ³	-	ND
	<i>Oceanobacillus kapialis</i> DSM23158 ³	-	ND
Archées	<i>Haloarcula</i> sp. SWI8 (A8) ²	+	ND
	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC33960 ¹	+	ND
	<i>Halobacterium salinarum</i> ATCC33170 ¹	+	ND
	<i>Halobacterium salinarum</i> DSMZ 3754 ²	+	ND
	<i>Halococcus morrhuae</i> DSM1309 ¹	+	ND
	<i>Halococcus turkmenicus</i> JCM9101 ¹	+	ND
	<i>Haloferax denitrificans</i> ATCC35960 ¹	-	ND
	<i>Haloferax gibbonsii</i> ATCC33959 ¹	+	ND
	<i>Haloferax mediterranei</i> DSMZ 1411 ²	+	+
	<i>Haloferax volcanii</i> DSM3757 ^{2,3}	+	+
	<i>Halomicrobium mukohataei</i> DSM12286 ²	+	+
	<i>Halorubrum chaoviator</i> ETD3 ^{2,3}	+	+
	<i>Halorubrum chaoviator</i> ETR14 ^{2,3}	+	+
	<i>Halorubrum saccharovororum</i> ATCC29252 ¹	+	ND
	<i>Halorubrum tebenquichense</i> SWO33 ²	+	ND
	<i>Halorubrum trapanicum</i> JCM9743 ¹	+	ND
	<i>Haloterrigena hispanica</i> DSM18328 ²	+	+
	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM5511 ^{2,3}	+	+
	<i>Natrialba magadii</i> NCMB2190 ¹	+	ND
	<i>Natrinema</i> sp. D20 ¹	+	ND
	<i>Natrinema ejinorensense</i> DSM18194 ²	+	ND
	<i>Natrinema pallidum</i> DSM15623 ²	+	-
	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624 ²	+	-
	<i>Natrinema versiforme</i> DSM16034 ²	-	ND
	<i>Natronobacterium gregoryi</i> NCMB2189 ¹	+	ND
	<i>Natronococcus occultus</i> JCM8859 ¹	-	ND
	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM2160 ¹	+	ND
	<i>Natronorubrum tibetense</i> GA33 ¹	-	ND

Tableau 20. Spectre d'activité d'HalC8 contre des eucaryotes, bactéries et archées halophiles. Ce tableau est basé sur les résultats de l'étude menée par Li *et al.* (Li *et al.*, 2003) avec du surnageant (SN) de *Natrinema* sp. AS7092 (indiqués par ¹) et les résultats obtenus dans cette étude avec du surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 (indiqués par ²) et *Nnm. altunense* JCM12890 (indiqués par ³), bruts ou filtrés sur des membranes de 0,22 µm puis chauffés 10 minutes à 100 °C. Les tests antimicrobiens ont été réalisés par la technique de diffusion à partir de puits creusés dans une gélose ensemencée avec la souche cible ensemencées à une DO₆₀₀ de 0,001 dans une gélose molle de M372, coulée sur une gélose dure de M372. Des puits ont été creusés où 80µL de surnageant brut ou filtré/chauffé de *Natrinema* sp. SWI6 ou *Nnm. altunense* JCM12890 ont été déposés. Les boîtes ont été incubées à 37 °C jusqu'à l'apparition de halos. Les signes + indiquent l'observation de halos d'inhibition et les signes – indiquent l'absence de halo.

Afin de savoir si la cible d'HalC8 est présente chez d'autres micro-organismes halophiles, colonisant les mêmes environnements hypersalins, des tests antimicrobiens ont été réalisés contre sept bactéries halophiles et deux champignons halophiles. La croissance d'une bactérie a été inhibée par le surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 (Tableau 20). Il s'agit de la bactérie *Salinibacter ruber*, démontrant pour la première fois une activité cross-domaine pour HalC8. Les eucaryotes testés, les champignons *Penicillium corylophilum* LCP 5424 et *Eurotium rubrum* LCP 6453, ne sont pas sensibles à l'action de surnageant contenant HalC8, même quand ce dernier a été concentré 40 fois (Figure 56 et Tableau 20), montrant une absence totale d'activité d'HalC8 sur ces deux genres de champignons.

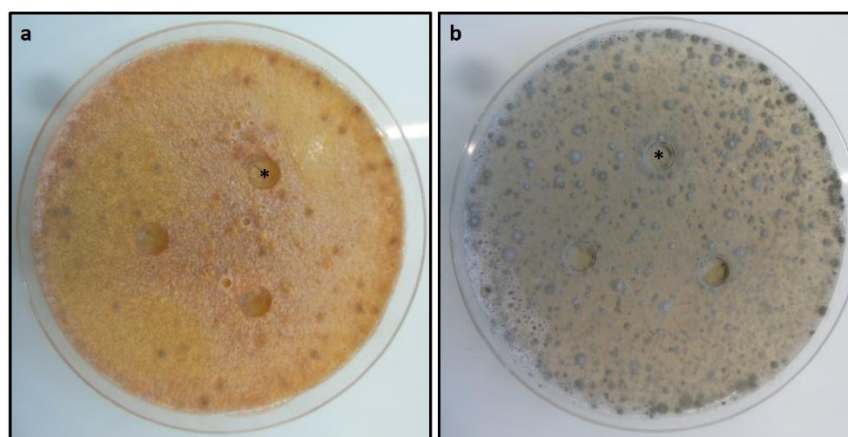


Figure 56. Test d'activité antimicrobienne du surnageant concentré 40 fois de *Nnm. altunense* JCM12890 contre les champignons halophiles *E. rubrum* LCP 6453 (a) et *P. corylophilum* LCP 5424 (b).

50 μ L de surnageant d'une culture de *Nnm. altunense* JCM 12890 filtré, chauffé à 100 °C puis concentré 40 fois sur des Vivaspins de 5 kDa ont été déposés dans le puits marqué par une étoile. Les autres puits correspondent au surnageant de *Haloferax mediterranei* et *Halobacterium salinarum* concentrés 40 fois et contenant les halocines H4 et S8.

Afin de déterminer le spectre d'action d'HalC8, les tests antimicrobiens ont été réalisés avec du surnageant de culture contenant HalC8. Cependant, comme le démontre le chapitre 3 de cette thèse, en plus d'HalC8, d'autres agents possédant une activité antimicrobienne sont susceptibles d'être présents dans le surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 et *Nnm. altunense* JCM12890, et notamment des virus. De ce fait, les activités antimicrobiennes observées avec du surnageant brut pourraient être dues à HalC8 mais aussi à d'autres composés

antimicrobiens : autres peptides, protéines et/ou virus présents dans le surnageant de cultures de *Natrinema* sp. SWI6 et *Nnm. altunense* JCM12890.

Des expériences décrites dans le chapitre 3 ont permis de démontrer que l'activité due à HalC8, peptide thermorésistant de 7,4 kDa, pouvait être dissociée d'une éventuelle activité virale par filtration et chauffage du surnageant. De ce fait, les tests antimicrobiens sont actuellement réalisés au laboratoire avec du surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 ou *Natrinema* sp. SWI6 filtré sur des membranes de 0,22 µm et chauffé, dans le but de déterminer le spectre d'action d'HalC8 en éliminant le maximum d'agents antimicrobiens, dont les virus, présents dans les surnageants testés. A l'heure actuelle, le surnageant filtré et chauffé de *Nnm. altunense* JCM12890 a été testé contre neuf souches d'archées halophiles. L'activité observée, contre des souches appartenant aux genres *Haloferax*, *Halomicrobium*, *Halorubrum* et *Haloterrigena*, pour les surnageant brut de *Natrinema* sp. SWI6 et *Nnm. altunense* JCM12890, a également été observée lorsque les surnageants avaient été préalablement filtrés et chauffés, démontrant que ces souches sont susceptibles d'être sensibles à HalC8. Cependant, l'activité observée contre les souches *Nnm. pallidum* DSM15623 et *Nnm. pellirubrum* DSM 15624 avec du surnageant brut de *Nnm. sp. SWI6* n'a pas été conservée lorsque que le surnageant avait été préalablement filtré et chauffé. Ce résultat indique que l'activité détectée avec le surnageant brut n'était pas due à HalC8, thermorésistant, mais à un autre agent antimicrobien thermolabile.

2.2 Surexpression d'HalC8 chez l'hôte hétérologue *Haloferax volcanii*

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur la cible d'HalC8, le peptide devra être purifié dans le but d'observer le comportement d'une cellule cible en présence d'HalC8 par MET ou encore de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) du peptide par exemple la CMI ou en observant le comportement d'une cellule cible en présence d'HalC8 purifié. La détermination de la CMI permet d'avoir des informations préliminaires sur la cible d'HalC8 : une CMI élevée présume d'une cible externe alors qu'une faible CMI présume une cible intracellulaire. La purification d'HalC8 à partir de culture de souches productrice d'HalC8 n'a pas permis d'obtenir une quantité suffisante de peptide afin de réaliser ce type d'expérimentation. En conséquence, une stratégie de surexpression d'HalC8 a été développée.

2.2.1 Constructions génétiques

La surexpression d'HalC8 a été envisagée chez un hôte hétérologue, l'archée halophile *Haloferax volcanii*. Cette souche est la seule archée halophile chez qui la technique de surexpression a été décrite (Allers, 2010). La souche utilisée est *Haloferax volcanii* H98, souche dérivée de la souche *Haloferax volcanii* DS70, et qui a été mutée pour le gène *pyrE2*, gène d'auxotrophie pour l'uracile qui code l'enzyme orotate phosphoribosyl transférase impliquée dans la biosynthèse de l'uracile, et pour le gène *hdrb*, gène d'auxotrophie pour la thymidine qui code la sous-unité de l'hétérodisulfide réductase, enzyme impliquée dans la biosynthèse du folate et de la thymine. La souche *Hfx. volcanii* H98 $\Delta pyrE2 \Delta hdrb$ n'est donc plus capable de synthétiser l'uracile et la thymidine. Ces mutations permettront de sélectionner les cellules transformées avec un plasmide portant les gènes *pyrE2* et *hdrb* sur un milieu non supplémenté en uracile et thymidine.

Deux plasmides ont été utilisés dans cette étude : pTA963 et pTA962. Le plasmide pTA963 est l'homologue du plasmide pTA962 mais permet de surexprimer des protéines avec une étiquette histidine. pTA962 et pTA963 sont des plasmides navettes, c'est à dire qu'ils possèdent deux origines de répllication : une origine de répllication bactérienne (*colE1*) et une origine de répllication chez les archées (*pHV2*), leur permettant d'être utilisés pour des transformations chez *Escherichia coli* ainsi que chez des archées. pTA962 et pTA963 possèdent un gène de résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des cellules bactériennes transformées avec pTA962 ou pTA963 sur du milieu supplémenté avec de l'ampicilline, ainsi que les gènes *hdrB* et *pyrE2*, permettant la sélection des cellules d'archées $\Delta pyrE2 \Delta hdrb$ transformées avec pTA962 ou pTA963 sur du milieu dépourvu de thymine et d'uracile. Enfin, le site de clonage de pTA962 et pTA963 est sous le contrôle d'un promoteur p. *tnaA*, inductible au tryptophane (Allers *et al.*, 2010).

A l'heure actuelle, le mécanisme de maturation de la protéine précurseur qui conduit à la libération d'HalC8 n'est pas connu. Il pourrait s'agir d'un clivage spontané de la protéine précurseur ou d'un clivage catalysé par une enzyme. Dans ce dernier cas, l'enzyme pourrait être codée par le génome de la souche productrice mais absente chez la souche hétérologue *Hfx. volcanii* H98. De ce fait, plusieurs stratégies de surexpression ont été menées. La première stratégie est le clonage du gène codant la protéine précurseur (ProC8) (Figure 57, construction 1). Dans ce cas, la protéine précurseur sera surexprimée et sa maturation devra être

réalisée chez la souche hétérologue, on fait donc l'hypothèse que la protéase responsable du clivage est présente, exprimée et active chez *Hfx. volcanii* H98. La seconde stratégie est le clonage de la région codant uniquement le peptide mature actif (HalC8) (Figure 57, construction 2). Cependant, *Hfx. volcanii* est sensible au surnageant des souches *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema altunense* JCM12890 contenant HalC8, donc probablement à HalC8 (Table 20). Un test antimicrobien a montré que, plus spécifiquement, la souche *Hfx. volcanii* H98 était sensible au surnageant filtré et chauffé de *Nnm. altunense* JCM12890 qui contient HalC8. Dans l'hypothèse où le peptide posséderait une cible intracellulaire, la surexpression d'HalC8 chez *Hfx. volcanii* H98 conduirait à la mort de la cellule productrice. Ce problème pourrait être pallié par la troisième stratégie de clonage, où seule la région de *halC8* codant la protéine d'immunité (HalI) a été clonée (Figure 57, construction 3). De ce fait, la souche productrice pourra être immunisée par l'ajout de protéine d'immunité dans la culture d'*Hfx. volcanii* H98 qui aura été préalablement surexprimée (construction 3) ou bien suite à la libération de la protéine d'immunité à partir du clivage de la protéine précurseur (construction 1).

Les constructions 1, 2 et 3 ont été réalisées avec le plasmide pTA962 et pTA963 afin d'obtenir chacune des constructions avec et sans étiquette histidine. La présence d'une étiquette histidine permettra la purification sur colonne de nickel. Cependant, l'expression d'HalC8 avec une étiquette histidine pourrait gêner le repliement du peptide dans la bonne conformation et ainsi, inhiber son activité. Un contrôle d'expression sans étiquette histidine est donc indispensable. Les cellules d'*E. coli* DH5 α , puis d'*E. coli* Dam- et enfin d'*Hfx. volcanii* H98 ont été successivement transformées avec les 3 constructions génétiques permettant l'expression avec ou sans étiquette histidine. La transformation dans *E. coli* Dam-, muté pour la déoxyadénosine méthylase, est une étape indispensable car l'ADN méthylé serait découpé en petits fragments chez *Hfx. volcanii*, souche finale utilisée pour l'expression hétérologue des gènes de biosynthèse de l'halocine C8.

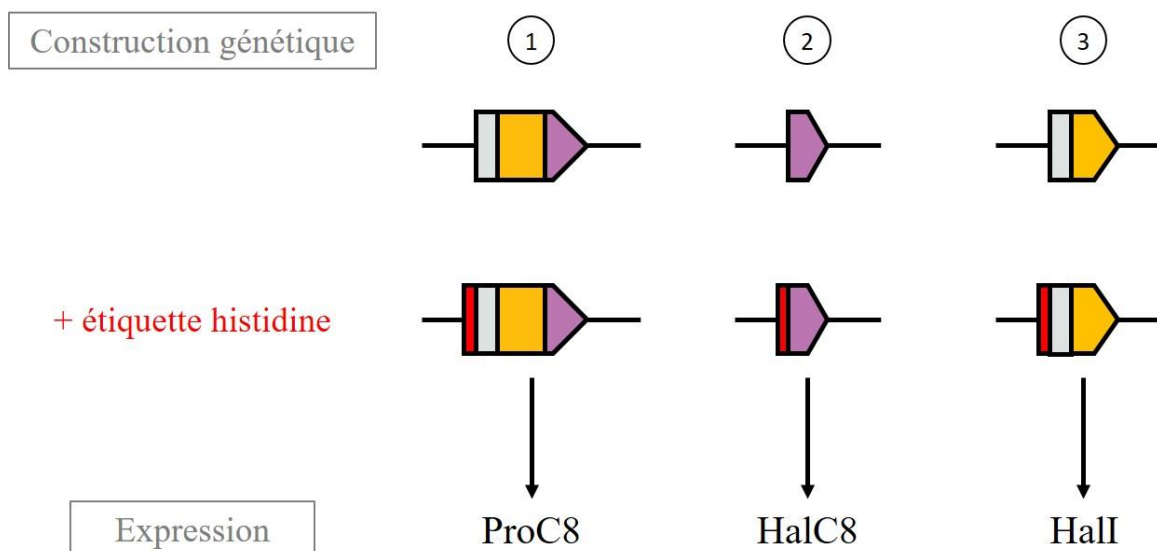


Figure 57. Constructions génétiques pour l'expression hétérologue de ProC8, HalC8 ou HalI chez *Haloferax volcanii* H98, avec ou sans étiquette histidine.

Les gènes, représentés par des flèches ont été clonés dans pTA9632 ou pTA963 lorsqu'une séquence codant une étiquette histidine est présente en amont du gène. La séquence codant les 6 acides-aminés histidine est représentée en rouge. La région du gène *halC8* codant le peptide signal est représentée en gris, celle codant la protéine d'immunité est représentée en jaune et la région codant HalC8 est représentée en violet. Les souches transformées avec la construction 1 expriment la protéine précurseur (ProC8), l'halocine C8 (HalC8) avec la construction 2 et la protéine d'immunité (HalI) avec la construction 3.

2.2.2 Induction de l'expression

Afin d'induire l'expression de ProC8, HalC8 et HalI, du tryptophane (Trp) doit être ajouté aux cultures en milieu de phase exponentielle. Pour les 6 cultures d'*Hfx. volcanii* H98 transformées avec chacune des 3 constructions génétiques, le milieu de la phase de croissance a été atteint après 10 heures (Figure 58).

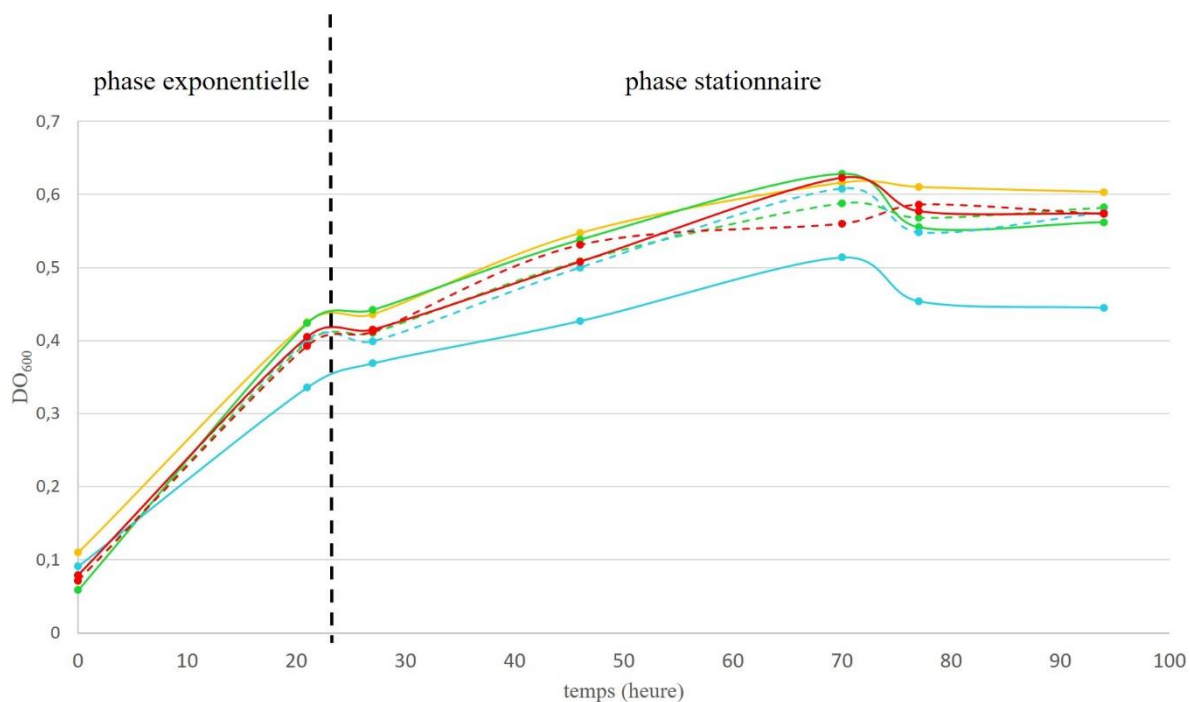


Figure 58. Croissance d'*Haloferax volcanii* H98 transformée avec les plasmides pTA962 et pTA963 pour l'expression de ProC8, HalC8 et HalI avec ou sans étiquette histidine.

La croissance de la souche *Hfx. volcanii* H98 cultivée dans 5 mL de milieu YPC a été suivie pendant 95 heures en mesurant la DO à 600 nm. La courbe jaune représente la croissance de la souche *Hfx. volcanii* H98 non transformée. Les lignes de couleur verte, turquoise et rouge représentent la croissance de *Hfx. volcanii* H98, respectivement transformée avec les constructions 1, 2 et 3. Les lignes pleines représentent la croissance *Hfx. volcanii* H98 transformée avec le plasmide pTA962 et les lignes pointillées représentent la croissance *Hfx. volcanii* H98 transformée avec le plasmide pTA963.

La souche *Hfx. volcanii* H98 transformée avec la construction 2 et qui doit exprimer HalI sans étiquette histidine a été choisie pour mettre au point la quantité de Trp qu'il faut ajouter à la culture pour induire l'expression. Cette construction a été choisie car la protéine d'immunité, exprimée seule n'est en théorie pas toxique pour la cellule hôte. Après 10 heures de culture, 0, 5, 10, 15 et 16 mM de Trp ont été ajoutés à la culture d'*Hfx. volcanii* H98 afin d'induire l'expression de HalI pendant 6h30. Sun *et al.*, ont suggéré que HalI était adressé à la membrane par le signal Tat (Sun *et al.*, 2005). La surexpression de HalI serait donc en théorie visible dans le cytoplasme ou la fraction membranaire mais aucune preuve expérimentale formelle ne confirme cette hypothèse. De ce fait, l'expression de HalI a été recherchée dans le surnageant, le cytoplasme et la fraction correspondant aux parois et membranes cellulaires après migration sur gel SDS-PAGE. Aucun signal n'a été détecté en SDS-PAGE pour le surnageant, probablement à cause d'une trop faible concentration des protéines présentes. Dans les fractions correspondant au cytoplasme et aux parois/membranes cellulaires, aucune bande correspondant

à la masse moléculaire de Hall n'a été observée pour les échantillons induits au tryptophane. La surexpression de Hall a ensuite été induite par l'ajout de quantités plus importantes de Trp (0, 2,5, 5, 10 et 25 mM) pendant 24 heures, soit presque 4 fois plus longtemps que pour l'expérience précédente. Encore une fois, aucune bande correspondant à la masse moléculaire de la protéine d'immunité n'a été observée, quelle que soit la concentration de Trp ajoutée, indiquant que Hall n'est pas exprimée dans nos conditions (Figure 59).

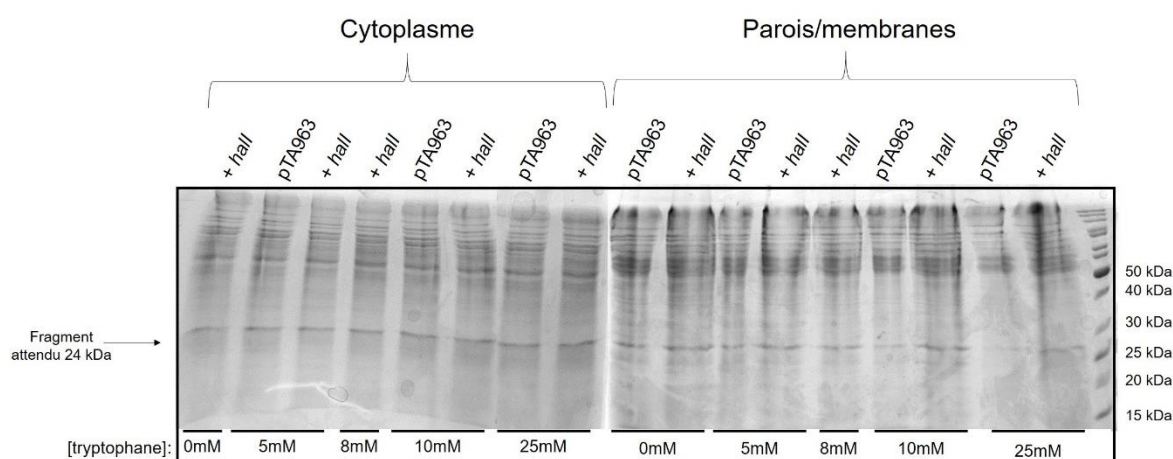


Figure 59. Surexpression de la protéine d'immunité après 24 heures d'induction par 0, 5, 8, 10 et 25 mM de Trp.

Gel Tris-glycine 12 % migré dans du tampon tris-glycine. Coloration au bleu de Coomassie. L'expression de Hall a été induite chez des cellules d'*Hfx. volcanii* H98 transformées avec pTA963 vide (échantillon contrôle), ainsi que chez des cellules d'*Hfx. volcanii* H98 transformées avec pTA963 contenant le gène codant Hall. La taille attendue pour Hall est indiquée à gauche. Le marqueur de masse a migré à droite du gel.

Afin de savoir si seulement Hall n'est pas exprimée dans nos conditions, des essais d'induction ont été réalisés avec toutes les constructions génétiques, permettant d'exprimer ProC8, Hall et HalC8 avec une étiquette histidine. L'induction de l'expression a été réalisée durant 68 heures avec 5 mM de Trp. Une fois encore, le surnageant, trop peu concentré ne permet pas d'observer des bandes protéiques nettes (Figure 60). Dans le culot, aucune surexpression n'a été détectée en présence de 5 mM de Trp, quelle que soit la construction surexprimée (Figure 60). Les gels SDS-PAGE ont également été révélés au nitrate d'argent qui permet d'augmenter la sensibilité de détection. Malheureusement, aucune bande correspondant aux protéines surexprimées n'a été observée avec cette méthode de révélation.

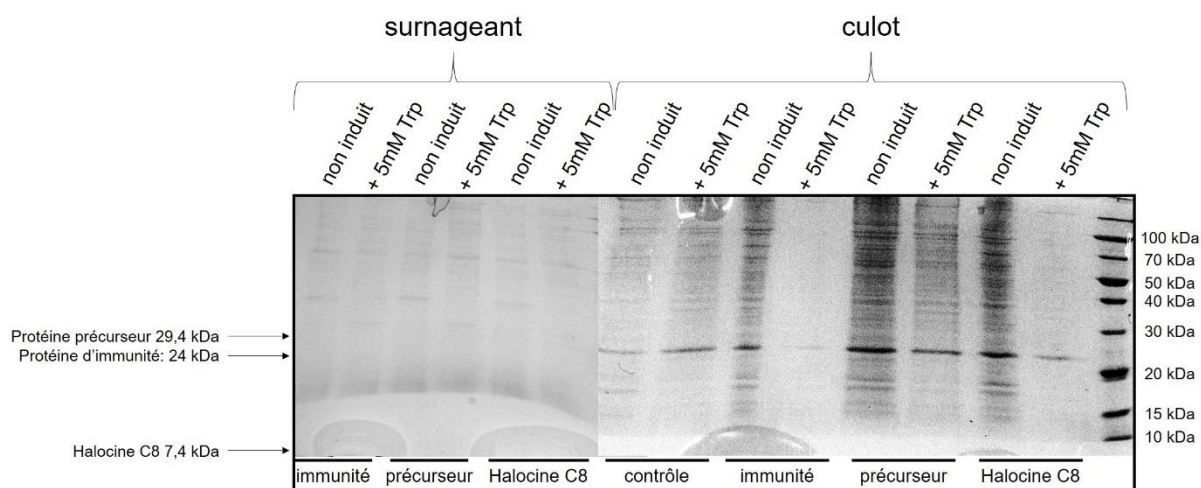


Figure 60. Surexpression de la protéine d'immunité après 68 heures d'induction par 0 ou 5 mM de tryptophane.

Gel Tris-glycine 12 % migré dans du tampon tris-glycine. Coloration au bleu de Coomassie. Un contrôle d'induction a été réalisé avec des échantillons non induits afin d'observer l'apparition d'une bande plus intense correspondant à la masse de ProC8, HalC8 ou HalI dans l'échantillon induit au Trp. Les tailles attendues sont indiquées à gauche. Le marqueur de masse a migré à droite du gel.

2.3 Identification de la cible moléculaire par criblage d'une banque de mutants d'*Hfx. volcanii*

La surexpression d'HalC8 chez l'hôte hétérologue *Hfx. volcanii* H98 n'a pas permis d'obtenir le peptide en quantité suffisante pour réaliser des tests dans le but d'obtenir des informations sur le cible d'HalC8. Cependant, les expériences, présentées dans ce paragraphe, ont été mises au point afin d'identifier la cible sans disposer de peptide pur.

Lors des essais de surexpression d'HalC8 chez l'hôte hétérologue *Hfx. volcanii*, nous avons observé que cette souche était sensible au surnageant filtré et chauffé contenant HalC8. Cette sensibilité, probablement limitante pour la surexpression de l'halocine, est une caractéristique qui peut être utilisée dans la recherche de la cible moléculaire d'HalC8. En effet, une banque de mutants de la souche *Hfx. volcanii* H295 a été générée par une équipe finlandaise (Kiljunen *et al.*, 2014). Les mutants de cette banque ont été générés par l'inactivation des gènes via l'insertion d'un transposon qui possède un gène de résistance au chloramphénicol (voir Matériels et méthodes). Cette banque contient 10^9 cellules par mL et statistiquement sept copies pour chacun des gènes inactivés. La génération de cette banque s'inscrit dans une démarche d'identification du rôle des gènes chez les archées, dont une grande majorité n'a pas de fonction

connue. Dans le présent contexte, nous avons utilisé cette banque dans le but d'identifier la ou les cibles cellulaires d'HalC8 mises en jeu *via* la caractérisation des gènes inactivés. Le criblage de cette banque a donc été réalisé afin d'identifier d'éventuels mutants résistants à l'activité de surnageants de culture contenant HalC8, chez lesquels le gène inactivé est susceptible d'intervenir dans le mode d'action d'HalC8.

Le criblage de la banque de mutants d'*Hfx. volcanii* H295, dans le but d'identifier des mutants résistants à HalC8, le surnageant de culture de la souche *Nnm. altunense* JCM12890 a été utilisé. La production d'HalC8 par *Nnm. altunense* JCM12890 a été confirmée par la détection du peptide par spectrométrie de masse à partir d'une culture de *Nnm. altunense* JCM12890 (cf. chapitre 2). Le surnageant utilisé a été préalablement filtré et chauffé afin de s'affranchir de l'activité virale (cf. chapitre 3). Pour toutes les expériences décrites ci-après, le même lot de surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890, préparé en une même fois, a été utilisé afin de normaliser la quantité d'HalC8 présent dans le surnageant pour tous les tests réalisés.

La première étape a consisté à mettre au point les conditions dans lesquelles la souche mère sauvage *Hfx. volcanii* H295 était sensible au surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 contenant HalC8. Pour cela, la sensibilité d'*Hfx. volcanii* H295 au surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 a été testée grâce à des tests antimicrobiens solides et liquides. Les tests antimicrobiens réalisés en milieu solide ont permis de montrer que la croissance de la souche mère était inhibée par le surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 non dilué (Figure 61, b). Lors des tests antimicrobiens liquides, la croissance de la souche mère a été suivie au cours du temps en présence du surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 non dilué ou dilué au 1/5, 1/10, 1/20 et 1/50 (Figure 61, c). Une croissance de la souche mère a été observée en présence de surnageant dilué au 1/50 et au 1/20 (Figure 61, c). Lorsque le surnageant n'avait pas été dilué ou dilué seulement au 1/5 ou au 1/10, aucune croissance d'*Hfx. volcanii* H295 n'a été observée (Figure 61, c). La dilution au 1/10 du surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 est donc la plus grande dilution pour laquelle une sensibilité à HalC8 de la souche mère a été observée. Cette dilution a été utilisée lors du criblage de la banque de mutants afin de détecter la présence de mutants résistants parmi la banque.

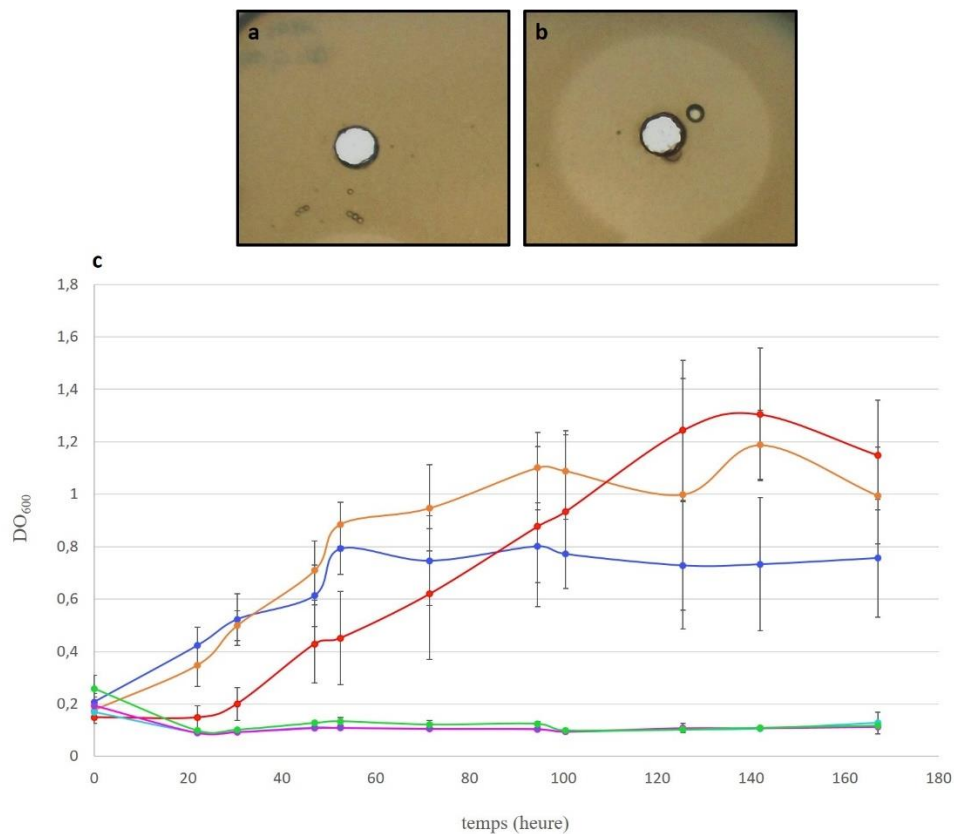


Figure 61. Inhibition de la croissance d'*Hfx. volcanii* H295 sur milieu solide (a, b) et liquide (c) par le surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890.

Le surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 a été filtré sur une membrane de 0,22 μ m, puis chauffé 10 minutes à 100 °C. En milieu solide, 80 μ L de milieu M372 (a) ou de surnageant non dilué (b) ont été déposés dans des puits creusés dans une géloseensemencée avec *Hfx. volcanii* H295. En milieu liquide, le surnageant non dilué ou dilué au 1/5, 1/10, 1/20 et 1/50 dans M372 a été ajouté dans les puits d'une plaque 96 puits contenant la souche mère *Hfx. volcanii* H295 à DO₆₀₀=0,2. La croissance de la souche mère a été suivie en mesurant la DO₆₀₀ pendant 170 heures. La croissance d'*Hfx. volcanii* H295 en absence de surnageant est représentée par la courbe bleu. La croissance d'*Hfx. volcanii* H295 en présence de surnageant non dilué, dilué au 1/5, 1/10, 1/20 et 1/50 est respectivement représenté par les courbes de couleur verte, rose, turquoise, rouge et orange. Les barres verticales indiquent les écarts-types calculés à partir de triplicats biologiques.

Les mutants de la banque résistants à HalC8 ont été recherchés avec des tests antimicrobiens réalisés en milieu liquide et solide. Pour les tests liquides, la croissance des mutants d'*Hfx. volcanii* H295 cultivés en présence du surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 dilué au 1/10 a été très irrégulière et n'a pas dépassé la DO₆₀₀ de 0,2 (Figure 62). On peut faire l'hypothèse qu'HalC8, contenu dans le surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890, a une activité contre la majorité des mutants de la banque, les mutants résistants n'étant de ce fait pas en nombre suffisant pour croître.

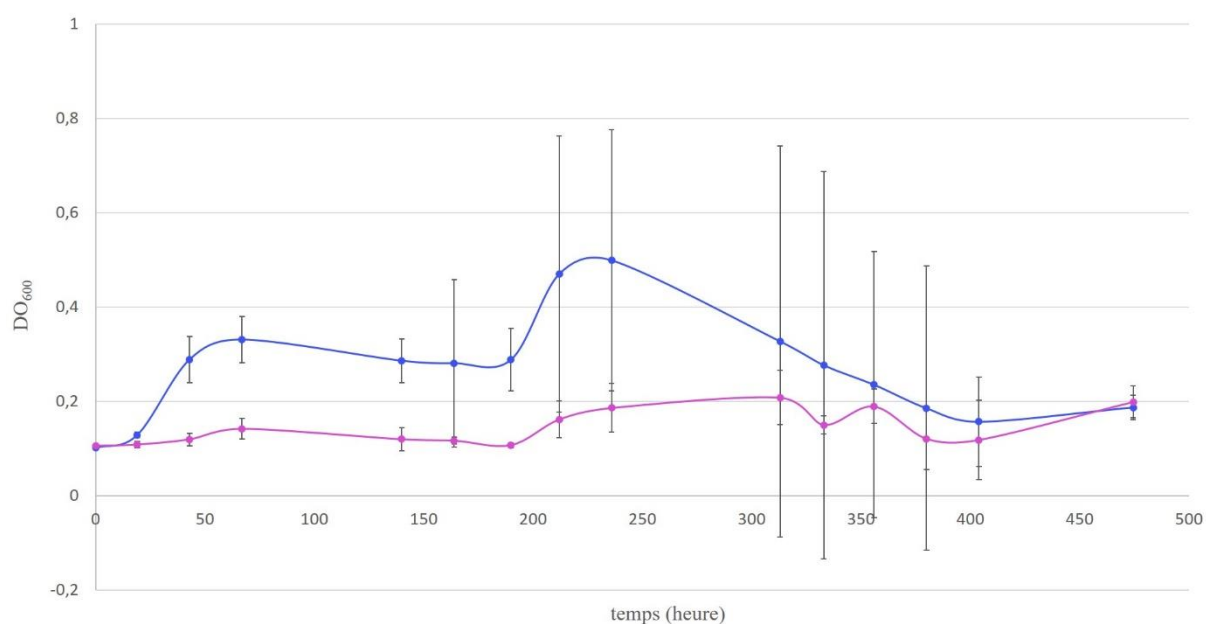


Figure 62. Croissance de la banque de mutants d'*Hfx. volcanii* H295 en absence et en présence de surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890.

La banque de mutants d'*Hfx. volcanii* H295 a étéensemencée à une DO₆₀₀ de 0.2 dans une plaque 96 puits en absence ou en présence de surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 dilué au 1/10. La croissance de la souche mère a été suivie en mesurant la DO₆₀₀ pendant 475 heures. La croissance de la banque de mutants d'*Hfx. volcanii* H295 est représentée par la courbe bleue. La croissance de la banque de mutants d'*Hfx. volcanii* H295 en présence du surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 dilué au 1/10 est représentée par la courbe rose. Les barres verticales indiquent les écarts-types calculés à partir de triplicats biologiques.

La recherche de mutants résistants à HalC8 a également été réalisée par des tests antimicrobiens solides. Pour cela, le surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890, qui contient HalC8, a été ajouté à une gélose sur laquelle la banque de mutants a été étalée afin d'isoler les mutants résistants à HalC8, c'est à dire capable de croître en présence du surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 qui contient HalC8. L'utilisation de cette technique implique de déterminer le volume minimum de surnageant qu'il faut ajouter à la gélose et qui inhibe la croissance de la souche mère *Hfx. volcanii* H295, ainsi que le nombre de boîtes à utiliser pour l'étalement de la banque afin d'être sûr de cribler tous les mutants générés. Ces mises au point techniques ont été réalisées.

Dans un premier temps, afin de déterminer le volume minimum de surnageant qui inhibe la croissance de la souche mère, 0, 0,5, 1 ou 2 mL de surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 ont été ajoutés à 50 mL de gélose sur laquelle 100 µL d'une culture la souche mère *Hfx. volcanii*

H295 à une DO_{600} de 1,9, 0,01, 0,001 ou 0,0004 ont été étalés. Lorsque 100 μ L de la souche mère avec une DO_{600} de 1,9 ont été étalés, sa croissance a été observée, quel que soit le volume de surnageant dans la gélose. Cependant, pour les DO_{600} de 0,01, 0,001 et 0,0004, aucune croissance de la souche mère n'a été observée en présence de 0, 0,5, 1 ou 2 mL de surnageant de *Nm. altunense* JCM12890, alors qu'une croissance de la souche mère au mêmes DO_{600} avait été observée en absence de surnageant de *Nm. altunense* JCM12890. Ce résultat montre que le volume minimum de surnageant de *Nm. altunense* JCM12890 à ajouter dans 50 mL de gélose pour observer une inhibition de la souche mère est de 0,5 mL. Cette quantité a été choisie pour le criblage de la banque de mutants.

Afin de cribler tous les mutants de la banque, 200 μ L de la banque diluée à 10^7 cellules.mL⁻¹ ont été étalés sur 15 boîtes de 50 mL de géloses contenant 0,5 mL de surnageant de *Nm. altunense* JCM12890. Après avoir vérifié que la banque de mutants diluée à 10^7 cellules.mL⁻¹ était capable de pousser en absence de surnageant, 6 mutants résistants, dont 3 étaient localisés sur la périphérie des boîtes, ont été obtenus sur les géloses contenant 0,5 mL de surnageant (Figure 63). Après repiquage en milieux solide et liquide, la croissance des 6 mutants a été observée en présence de surnageant, confirmant qu'il ne s'agissait pas de faux positifs.

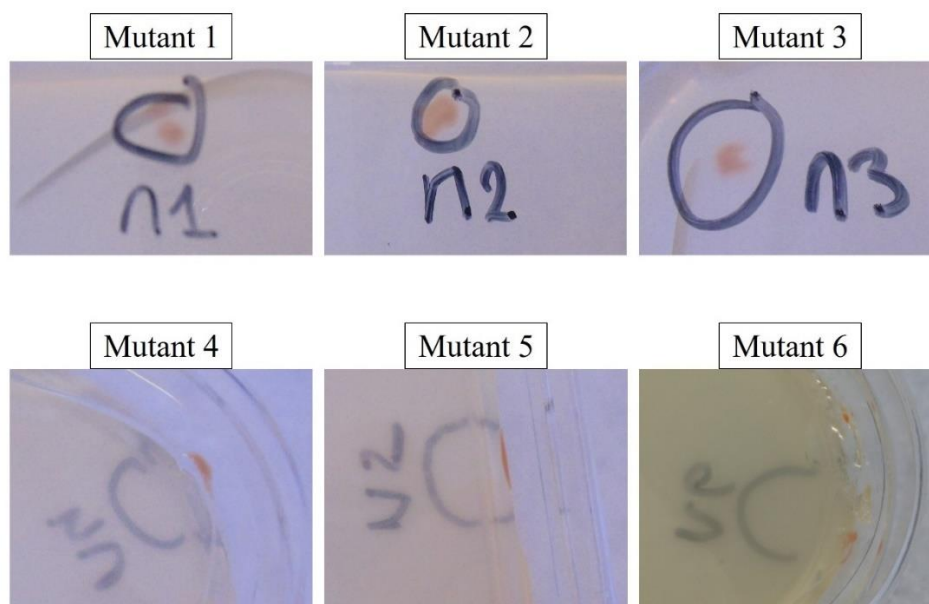


Figure 63. Obtention de 6 colonies résistantes à l'activité du surnageant de *Nm. altunense* JCM12890.

Les colonies ont poussé sur une gélose de 50 mL de milieu M372 où 0,5 mL de surnageant filtré puis chauffé de *Nm. altunense* JCM12890 ont été ajoutés. Les 6 colonies résistantes ont été repiquées sur milieux solide et liquide en présence de surnageant filtré puis chauffé de *Nm. altunense* JCM12890.

Afin d'identifier le(s) gène(s) inactivé(s) qui confère(nt) la résistance aux 6 mutants obtenus, l'ADNg des 6 mutants résistants a été extrait et digéré, générant ainsi des fragments, qui ont été clonés puis, pour ceux qui possèdent le transposon, séquencés avec des amorces s'hybridant sur le transposon et dirigées vers l'extérieur (Figure 64). La réaction de séquençage n'a pas abouti. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ce problème : une quantité insuffisante de matériel pour la réaction de séquençage, une absence de transposons dans les échantillons, ou encore une spécificité trop faible des amorces pour le transposon, empêchant leur hybridation. Afin de vérifier la présence de transposon dans les échantillons, des amorces s'hybridant de part et d'autre du site de clonage du plasmide pUC19 utilisé (Figure 64) et sur le gène de résistance au chloramphénicol du transposon (Figure 64) ont été dessinées. Aucune amplification n'a été observée pour les deux couples d'amorces. Ce résultat indique que le transposon est absent dans nos échantillons et que les clones obtenus après le séquençage seraient des faux-positifs, malgré une sélection sur des milieux supplémentés avec deux antibiotiques, ampicilline et chloramphénicol, permettant en théorie, exclusivement la croissance de colonies possédant le transposon. De nouveaux clonages sont en cours afin d'obtenir des colonies qui possèdent le transposon. Le séquençage du gène inactivé par le transposon chez les mutants résistants à HalC8 nous permettra de rechercher des identités de séquence avec le génome d'*Hfx. volcanii* et ainsi identifier le gène qui a été inactivé et qui est responsable de la résistance au surnageant de *Nm. altunense* JCM12890 contenant HalC8 observée.

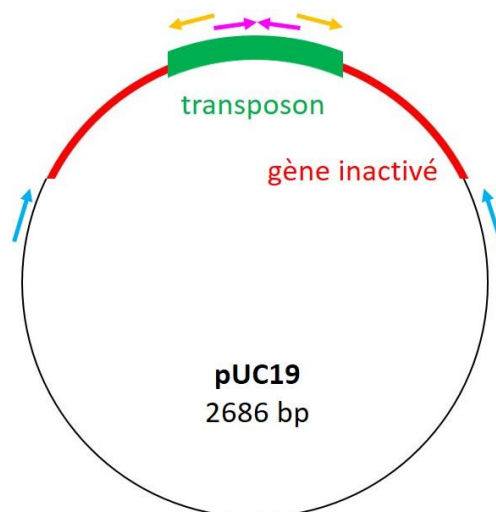


Figure 64. Localisation des amorces utilisées pour la vérification de la présence d'un insert et son séquençage.

L'ADNg des colonies résistantes a été digéré individuellement par *EcoRI*, *KpnI* et *SphI*. Les fragments obtenus (contenant ou non le transposon) ont été clonés dans pUC19 avant que les plasmides ne soient transformés dans des cellules compétentes d'*E. coli* DH5 α . Les colonies obtenues ont été sélectionnées sur milieu supplémenté avec de l'ampicilline (sélection des colonies transformées avec pUC19) et du chloramphénicol (sélection des colonies transformées avec pUC19 qui contient un insert avec le transposon (représenté en vert). Les flèches représentent les amorces dessinées. Les amorces pour vérifier la présence d'un insert comportant le transposon s'hybrident sur le plasmide pUC19 (en bleu) ou sur le gène de résistance au chloramphénicol porté par le transposon (en rose). Les amorces représentées en jaune sont les amorces utilisées pour le séquençage du gène inactivé. Le sens des flèches indiquent l'orientation des amorces.

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

HalC8 est un peptide antimicrobien thermorésistant de 7,4 kDa produits par des archées halophiles appartenant à la classe des *Halobacteria*, dont la cible est inconnue. Le spectre d'action d'HalC8 a été déterminé dans le but d'identifier les organismes susceptibles de posséder la cible d'HalC8.

Le spectre d'action d'HalC8 avait été étudié en 2003 par Li *et al.*, qui avaient montré qu'HalC8 possédait un large spectre d'action parmi les archées halophiles, inhibant des organismes halophiles appartenant aux genres *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Natrialba* et *Natrinema*, ainsi que des espèces haloalkaliphiles appartenant aux genres *Natronobacterium* et *Natronomonas* (Li *et al.*, 2003). Notre étude a permis de confirmer la sensibilité à HalC8 pour les souches appartenant aux genres *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halorubrum* et *Natrinema*. Cette étude a également permis d'identifier de nouvelles souches d'archées halophiles sensibles à HalC8 appartenant aux genres *Halomicrobium* et *Haloterrigena*.

La sensibilité des souches *Hfx. gibbonsi*, *Hfx. gibbonsi* et *Hbt. salinarum* à HalC8 est un résultat particulièrement intéressant car le gène *halC8*, codant HalC8, avait été retrouvé dans le génome de ces trois souches (Besse *et al.*, soon to be published, cf. chapitre 2). Le gène *halC8* retrouvé dans le génome d'*Hfx. gibbonsii*, *Hfx. volcanii* et *Hbt. salinarum* possède une région codant HalC8 très bien conservée alors que la région codant la protéine d'immunité HalI ne possède qu'un faible pourcentage d'identités avec la même région du gène *halC8* retrouvé dans le génome des souches *Natrinema*. De ce fait, les souches *Haloferax* et *Halobacterium* sont susceptibles de posséder un mécanisme d'immunité différent de celui des souches *Natrinema*, impliquant des protéines d'immunité différente. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'une activité antimicrobienne d'HalC8 produite par les souches *Natrinema* contre *Hfx. gibbonsii*, *Hfx. volcanii* et *Hbt. salinarum*, incapables de se protéger de la toxine avec leur protéine d'immunité.

A défaut de posséder HalC8 pure et en quantité suffisante, la détermination du spectre d'action d'HalC8 a été réalisée avec du surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema alunense* JCM12890, contenant HalC8. Cependant, l'utilisation de surnageants bruts ne permet pas de dissocier l'activité d'HalC8 d'une éventuelle autre activité antimicrobienne due à un autre agent antimicrobien peptidique, protéique ou viral. Le chapitre 3 de cette thèse démontre

qu'en plus d'HalC8, d'autres agents antimicrobiens sont présents dans le surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema alunense* JCM12890, et notamment un virus. Afin de dissocier l'activité virale de celle d'HalC8 et d'éliminer un maximum d'agents antimicrobiens autre qu'HalC8, les surnageants ont été filtrés sur des membranes de 0,22 µm puis chauffés à 100 °C pendant 10 minutes. A l'heure actuelle, les activités observées contre des souches appartenant aux genres *Haloferax*, *Halomicrobium*, *Halorubrum*, *Haloterrigena* et *Natrinema* ont été confirmées avec du surnageant filtré et chauffé. Les activités observées contre les souches appartenant aux genres *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Natrialba*, *Natronobacterium* et *Natronomonas* devront également être confirmées en utilisant du surnageant filtré et chauffé. Le surnageant filtré et chauffé contient HalC8 mais pourrait aussi contenir d'autres agents antimicrobiens thermostables. Ainsi, l'utilisation d'HalC8 purifiée représente l'unique solution pour corrélérer avec certitude une activité observée à l'action antimicrobienne d'HalC8.

Afin de savoir si la cible d'HalC8 est exclusivement retrouvée chez les archées ou si elle serait plutôt spécifique des organismes halophiles, l'activité du peptide a été testée contre des organismes halophiles appartenant aux deux autres domaines du vivant : les bactéries et les eucaryotes. Ces organismes colonisent les environnements hypersalins et sont donc, au même titre que les archées, susceptibles d'être sensibles à l'action d'HalC8. L'activité d'HalC8 a été testée contre 7 bactéries halophiles et 2 champignons halophiles. La croissance d'une seule bactérie de notre sélection, *Salinibacter ruber*, a été inhibée par le surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 et *Nnm. alunense* JCM12890 contenant HalC8. Ce dernier résultat est surprenant puisqu'il s'agit d'une inhibition cross-domaine, jamais observée pour HalC8, et suggère des interactions cross-domaines dans les environnements hypersalins. Néanmoins, des inhibitions cross-domaine ont régulièrement été observées pour les archées appartenant aux genres *Halorubrum*, *Haloferax* ou *Halogranum*, actives contre des bactéries isolées de milieux hypersalins appartenant aux genres *Halomonas*, *Rhodovibrio*, *Salisaeta* ou *Pontibacillus* (Atanasova *et al.*, 2013).

Les bactéries halophiles appartenant au genre *Salinibacter*, et notamment *Salinibacter ruber*, sont les seules bactéries présentes dans les environnements hypersalins où la concentration saline est très élevée, environnements où les archées halophiles de la classe des *Halobacteria* sont les organismes dominants (Ghai *et al.*, 2011). Puisqu'ils colonisent les

mêmes environnements, il est probable que les archées halophiles de la classe des *Halobacteria* et la bactérie *Salinibacter ruber* interagissent. L'interaction *via* HalC8 suppose que la cible du peptide soit commune aux cellules d'archées et à la bactérie sensible.

L'activité antimicrobienne des surnageants de *Natrinema* sp. SWI6 et *Nm. alunense* JCM12890, contre *Salinibacter ruber* ont été réalisés avec du surnageant brut, contenant HalC8 mais également d'autres agents antimicrobiens dont notamment un virus. L'inhibition n'a pas pu être confirmée avec du surnageant filtré et chauffé, traitements permettant d'éliminer le virus et un maximum d'agents antimicrobiens autres qu'HalC8, car le tapis formé par *Salinibacter ruber* ne pousse pas toujours de façon homogène. Cependant, l'activité observée contre *Salinibacter ruber* n'est vraisemblablement pas due à un virus, même s'il est présent dans le surnageant brut de *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema alunense* JCM12890, car cela impliquerait que le virus possède la capacité d'infecter à la fois une archée et une bactérie. A l'heure actuelle, aucun virus halophile connu n'est capable d'infecter une archée et une bactérie halophile (Atanasova *et al.*, 2015a). De surcroît, l'inhibition de croissance de *Salinibacter ruber* a été observée en utilisant des surnageants de culture de deux souches différentes, *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema alunense* JCM12890, toutes deux produisant HalC8, et confirmée à plusieurs reprises par des duplicatas d'expérience. De ce fait, l'inhibition de la croissance de *Salinibacter ruber* est très probablement due à HalC8.

Afin d'obtenir des informations sur la cible d'HalC8, plusieurs expériences pourront être réalisées. Parmi elles, l'observation par microscopie électronique du comportement d'une cellule cible traitée avec HalC8 pourrait nous permettre d'avoir des informations sur le mécanisme d'action d'HalC8 (formation de pores, augmentation du volume cellulaire...) et ainsi de formuler des hypothèses sur la localisation membranaire ou intracellulaire de la cible. De telles hypothèses pourraient également être formulées grâce à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'HalC8. En effet, une CMI élevée est souvent associée à une cible extracellulaire alors qu'une faible CMI est plutôt associée à une cible intracellulaire. La réalisation de ces expériences nécessite d'avoir HalC8 pure et en quantité suffisante. La purification d'HalC8 à partir des cultures de *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema alunense* JCM12890 n'a pas permis d'obtenir des quantités de peptide suffisantes. Afin de pallier ce problème, des essais de surexpression d'HalC8 ont été réalisés chez l'hôte hétérologue

Hfx. volcanii H295 sous le contrôle d'un promoteur inductible au tryptophane. Après avoir réalisé les constructions génétiques, aucune expression de ProC8, HalI ou HalC8 n'a été observée.

La croissance d'*Hfx. volcanii* H295 est inhibée par le surnageant de *Natrinema alunense* JCM12890 contenant HalC8. Lors des essais de surexpression d'HalC8, la souche *Hfx. volcanii* H295 est donc susceptible d'être tuée par sa propre production, expliquant l'absence d'une surexpression significative d'HalC8. Cependant, la surexpression de ProC8 ou HalI n'est en théorie pas toxique pour *Hfx. volcanii* H295. Grâce à l'utilisation d'antibiotiques, Sun *et al.* ont montré que les protéines ProC8 et HalI étaient associées aux fractions membranaires (Sun *et al.*, 2005). La surexpression de ces protéines aurait donc dû être observée dans la fraction correspondant aux membranes cellulaires. Des expériences de mise au point de la quantité de tryptophane à ajouter, du temps d'induction et de la méthode de détection sont actuellement en cours.

La sensibilité de la souche *Hfx. volcanii* H295 à HalC8 a été utilisée dans l'élaboration d'un protocole expérimental visant à identifier la cible d'HalC8 à partir du surnageant de culture de *Nm. altunense* JCM12890 contenant le peptide. En effet, le criblage d'une banque de mutants de la souche *Hfx. volcanii* H295 a été réalisé avec le surnageant de *Nm. altunense* JCM12890 qui contient HalC8, afin d'identifier des mutants de cette banque qui ont acquis une résistance à HalC8. Le criblage a permis d'isoler 6 mutants résistants à l'activité antimicrobienne du surnageant de *Nm. altunense* JCM12890 contenant HalC8. Les expériences sont actuellement en cours afin d'identifier le gène inactivé qui confère la résistance aux 6 mutants. Les gènes inactivés seront identifiés grâce à une recherche d'identité avec le génome d'*Hfx. volcanii* via l'algorithme BLAST.

Les recherches génétiques sur les archées ne sont pas très avancées et le développement de méthodes génétiques chez les archées halophiles, notamment *Hfx. volcanii*, ne date que d'une dizaine d'années (Makarova et Koonin, 2003 ; Soppa, 2006). De ce fait, un grand nombre de gènes chez les archées ont des fonctions inconnues. L'identification d'un gène conférant une résistance à HalC8 pourrait donc être une nouvelle donnée d'identification d'un gène dont la fonction pourrait être inconnue.

Les tests d'activité ont montré que la cible d'HalC8 était susceptible d'être retrouvée chez des archées halophiles de la classe des *Halobacteria* ainsi que chez la bactérie *Salinibacter*

ruber, dont la croissance a été inhibée par le surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 (Tableau 20). Aucune activité d'HalC8 a été observée contre les champignons halophiles *E. rubrum* LCP 6453 et *P. corylophilum* LCP 5424. Cependant, d'autres cibles eucaryotes halophiles devront être testées afin de savoir si la cible HalC8 pourrait être retrouvée chez les trois domaines du vivant.

Cette étude est la première à suggérer que la cible d'HalC8 serait présente chez une bactérie. Néanmoins, la cible d'HalH6/H7 a également été retrouvée chez des organismes appartenant à des domaines différents : NHE est inhibé chez des cellules d'*Halobacteria* et des cellules mammifères. A l'heure actuelle, HalH6/H7 est le seul inhibiteur biologique du NHE connu chez les mammifères, en faisant un candidat pour le traitement des pathologies associées à une hyperactivité ou une surexpression du NHE chez les mammifères. L'ischémie du myocarde entraîne une forte acidification intracellulaire qui résulte en une hyperactivité du NHE des cardiomyocytes. Cependant, l'accumulation intracellulaire d'ions Na^+ et Ca^{2+} , liée à la réduction du pH intracellulaire, entraîne des dommages du myocarde. *In vivo*, l'administration intraveineuse d'HalH6/H7 a permis de diminuer la taille de l'infarctus et réduire l'arythmie chez un chien qui avait subi une ischémie et une reperfusion (Lequerica *et al.*, 2006). Le NHE des cellules humaines a également été inhibé *in vitro* par HalH6/H7, suggérant que les effets observés chez le chien pourraient être retrouvés chez l'Homme (Lequerica *et al.*, 2006). Le fait que la cible d'HalC8 ait été retrouvée chez des organismes appartenant à deux domaines distincts est un résultat prometteur qui pourrait déboucher sur des applications biotechnologiques, à l'instar de ce qu'il a été observé pour HalH6/H7.

Ce travail s'inscrit dans une démarche d'étude des peptides antimicrobiens, afin de connaître leur fonctionnement, car nous ne disposons que de très peu d'informations sur ces peptides par rapport aux informations disponibles pour les peptides antimicrobiens produits par les bactéries et les eucaryotes dont les recherches ont débutées bien avant celles sur les peptides antimicrobiens d'archées.

Conclusion et perspectives générales

Conclusion et perspectives générales

Depuis la fin des années 1970, les archées sont reconnues comme constituant l'un des trois règnes du vivant avec les eucaryotes et les bactéries (Fox *et al.*, 1977, 1980). Ces micro-organismes sont les colonisateurs majoritaires, et dans certains cas exclusifs, des environnements où les conditions sont extrêmes en termes de température, pH, pression ou encore salinité (Pikuta *et al.*, 2007). Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés aux archées halophiles qui colonisent les milieux hypersalins et plus particulièrement aux peptides antimicrobiens qu'elles produisent, les halocines. Avec les sulfolobicines, ces peptides antimicrobiens sont les seuls à avoir été identifiés à partir d'environnements extrêmes naturels. Les connaissances sur les halocines sont, à l'heure actuelle, quasiment inexistantes par rapport à ce qui est connu chez leurs homologues bactériens, les bactériocines. Ce travail de thèse constitue donc un travail pionnier visant à mieux comprendre les interactions entre les micro-organismes qui colonisent les environnements hypersalins et à étudier les halocines, dans le but, à long terme, de développer leurs éventuelles applications biotechnologiques. Lors de ces trois années de thèse, notre travail s'est porté plus particulièrement sur l'halocine C8 (HalC8) initialement purifiée de la souche *Natrinema* sp. AS7092. Les objectifs de cette thèse ont consisté à étudier la répartition de la production de cette halocine, les mécanismes de sa biosynthèse, son spectre d'activité et son mécanisme d'action.

Le **chapitre 1** de cette thèse regroupe les données de la littérature relatives aux peptides antimicrobiens produits par les archées, et notamment les halocines. Cette étude bibliographique a permis de corréler tous les travaux réalisés indépendamment et de synthétiser l'ensemble des connaissances actuelles sur les peptides antimicrobiens d'archées.

Les résultats obtenus dans le **chapitre 2** ont permis de montrer que les gènes impliqués dans la biosynthèse d'HalC8 étaient retrouvés dans le génome de plusieurs archées halophiles. En effet, par des analyses *in silico*, nous avons démontré que gène *halC8*, codant le précurseur du peptide mature actif, est conservé sur toute sa longueur exclusivement chez les souches appartenant aux genres *Natrinema* et *Haloterrigena*. Des études par PCR ont permis de montrer

que le gène *halC8* était, en plus d'être restreint, systématiquement retrouvé chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* testées, même si elles provenaient d'endroits géographiquement très éloignés. Ces genres ont été proposés il y a seulement 20 ans en se basant uniquement sur la séquence du gène codant l'ARNr 16S (McGenity *et al.*, 1998). Aujourd'hui, la distinction de ces deux genres est controversée car ils sont très proches phylogénétiquement, même en utilisant d'autres marqueurs que le gène codant l'ARNr 16S, comme le gène *rpoB* (Enache *et al.*, 2007 ; Minegishi *et al.*, 2010b ; Tindall, 2003 ; Wright, 2006). La question de la réunification de ces deux groupes est actuellement débattue au sein de la communauté scientifique, et plus particulièrement au sein du comité de taxonomie des *Halobacteriaceae*. Le professeur Aharon Oren, membre de ce comité, a réagi à la présentation de ces résultats lors du congrès "Halophiles 2016" en indiquant qu'il s'agissait d'un argument de poids plaidant en la faveur de la réunification de ces deux genres en un genre unique.

Des expériences de transcription inverse ont permis de montrer que le gène *halC8*, était transcrit chez toutes les souches *Natrinema* et *Haloterrigena* testées. Cette transcription a été corrélée à la détection d'une activité antimicrobienne pour les surnageants de *Natrinema* et *Haloterrigena*, suggérant que l'activité observée serait due à HalC8. Chez deux souches de *Natrinema*, *Natrinema* sp. SW16 et *Natrinema altunense* JCM12890, HalC8 a été purifié. La purification d'HalC8 à partir d'une culture de *Natrinema altunense* JCM12890 a montré que le peptide avait une masse moléculaire de 7431,5 Da. La purification du peptide a également confirmé la présence de 5 ponts disulfure. Ce nombre est extrêmement élevé au regard de la taille du peptide (10 cystéines sur 76 acides aminés). La présence des cinq ponts disulfure conduit vraisemblablement à une structure très compacte, qui pourrait expliquer la grande stabilité d'HalC8 en présence de solvants organiques ou lorsque la concentration saline diminue. Il serait intéressant d'évaluer le rôle des cystéines et des ponts disulfures dans la structure compacte d'HalC8. Pour cela, les résidus cystéines devront être mutés les uns après les autres et l'activité antimicrobienne pourra être analysée pour chacun des mutants générés. Ces expériences nous permettront de savoir quels résidus cystéines sont indispensables à l'activité d'HalC8 et pourraient contribuer au repliement d'HalC8 dans la bonne conformation. Des expériences, actuellement en cours, permettront de purifier HalC8 à partir de 50 boîtes ensemencées et d'obtenir une plus grande quantité de peptide purifié dans le but d'étudier cette structure tridimensionnelle par RMN et modélisation moléculaire. Il sera intéressant d'élucider la structure tridimensionnelle de ce peptide qui devrait être originale compte tenu de ces 5 ponts

disulfure au sein d'une séquence de moins de 80 acides aminés. L'élucidation structurale pourrait permettre de comprendre les mécanismes de repliement des protéines en milieu salin fortement ionisé.

Les gènes localisés à proximité de *halC8*, et qui sont putativement impliqués dans la régulation de la biosynthèse et le transport du peptide ont également été retrouvés chez la plupart des souches *Natrinema* et *Haloterrigena* possédant le gène *halC8*. Pour les génomes séquencés, le groupe de gènes a été retrouvé avec une organisation similaire, suggérant que ces gènes et leur organisation sont indispensables à la production d'HalC8. Ce groupe de gènes, ou au moins l'un des gènes nécessaires à la production d'HalC8, pourrait être localisé sur un plasmide comme le suggère les expériences réalisées avec de l'acridine orange, utilisée pour curer les plasmides.

halC8 a également été retrouvé chez des souches halophiles appartenant aux genres *Haloferax* et *Halobacterium*. Cependant, chez ces souches, la région du gène codant HalI possède un faible pourcentage d'identités avec la même région codant HalI chez les souches *Natrinema* et *Haloterrigena*. Ce résultat suggère que les souches *Haloferax* et *Halobacterium* produisent des protéines d'immunité avec une séquence en acides aminés, donc une structure tridimensionnelle et une activité différentes de la protéine d'immunité produite par les souches *Natrinema* et *Haloterrigena*. De ce fait, les souches *Haloferax* et *Halobacterium* ne posséderont pas de mécanisme d'immunité leur permettant de se protéger contre HalC8 produites par les souches *Natrinema* et *Haloterrigena*. Cela a été observée lorsque la souche *Hfx. volcanii* était inhibée par le surnageant de *Natrinema* sp. SWI6 contenant HalC8 (Chapitre 3).

La production d'halocines pourrait conférer un avantage sélectif pour les souches productrices et jouer un rôle essentiel dans la compétition entre micro-organismes pour la colonisation d'un même environnement. Cependant, si la production d'halocine C8 a été mise en évidence chez les genres *Natrinema* et *Haloterrigena*, comment pourrait-on expliquer que ces deux genres ne soient pas dominants dans les environnements hypersalins ? De plus, aucune production de peptides antimicrobiens n'a été mise en évidence pour l'archée *Haloquadratum walsbyi*, espèce pourtant dominante d'une immense majorité d'environnements hypersalins (Ghai *et al.*, 2011). Des études sur le rôle des bactériocines dans les compétitions microbiennes ont permis de démontrer que l'avantage écologique ne revenait pas à la souche productrice mais

plutôt à la souche qui possédait seulement le mécanisme de résistance à la toxine, entraînant un coût énergétique moindre (Gillor, 2007 ; Riley et Gordon, 1999). Cependant, si ces halocines, dont la production est énergétiquement couteuse, ne permettent pas aux souches productrices d'éliminer leurs compétiteurs pour la colonisation d'un environnement ou la recherche de nutriments, un autre rôle avantageux pour la souche productrice devrait leur être associé.

Chez 9 souches *Natrinema* et *Haloterigena*, la séquence protéique d'HalC8 est très conservée, et même identique dans la plupart des cas. La production de peptides identiques par des espèces différentes n'est pas d'un grand intérêt écologique. Au vu de sa grande conservation, HalC8 pourrait avoir un rôle de peptide signal important dans la communication intercellulaire. La production d'HalC8 est maximale en début de phase stationnaire (Li *et al.*, 2003), on peut donc faire l'hypothèse que l'activité d'HalC8 est liée à la densité cellulaire et pourrait donc jouer un rôle dans le quorum sensing (QS) au sein des milieux hypersalins. Le QS est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes en réponse à une fluctuation de la densité cellulaire (Miller et Bassler, 2001). Le QS a été largement étudié chez les bactéries, qui produisent et libèrent des molécules signal appelées molécules auto-inductrices dont la concentration augmente en fonction de la densité cellulaire. Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif utilisent le QS afin de réguler de nombreuses activités physiologiques comme la symbiose, la virulence, la production d'antibiotique... (Miller et Bassler, 2001). En général, les bactéries à Gram négatif utilisent des homosérine lactones N-acétylées (AHL) comme molécules auto-inductrices alors que les bactéries à Gram positif utilisent des peptides pour communiquer (Miller et Bassler, 2001). La production d'AHLs par des bactéries halophiles du genre *Halomonas* a été montrée, mais le rôle de ces AHLs n'a pas été identifié (Llamas *et al.*, 2005). Les auteurs ont suggéré qu'elles pourraient jouer un rôle dans la formation de biofilms et d'exopolysaccharides (Llamas *et al.*, 2005 ; Montgomery *et al.*, 2013). Le QS a été beaucoup moins étudié chez les archées. Néanmoins, de potentielles molécules auto-inductrices ont été détectées chez l'archée haloalkaliphile *Natronococcus occultus*, qui pourraient être responsables de la production et/ou l'activation d'une protéase extracellulaire (Paggi *et al.*, 2003). Toutes ces données suggèrent la présence de communications *via* un système de QS dans les milieux hypersalins, potentiellement utilisé par des bactéries mais aussi des archées. En conséquence, nous pouvons formuler l'hypothèse de l'implication de peptides, et notamment d'HalC8, en tant que molécules auto-inductrices du QS dans les milieux hypersalins, comme cela est observé pour les bactéries à Gram positif (Miller et Bassler, 2001). Des expériences de

q-RT-PCR sont actuellement en cours et pourront nous permettre de voir si HalC8 est une molécule auto-inductrice, potentiellement impliquée dans le QS en milieu hypersalin. Pour cela, HalC8 pure devra être ajoutée à une culture et les transcrits devront être mesurés par q-RT-PCR afin de savoir si c'est une molécule auto-inductrice qui pourrait jouer un rôle dans la signalisation.

Via des mécanismes de QS, HalC8 pourrait avoir un rôle dans la communication cellulaire intra- et inter- espèces. En effet, halC8 est présent chez des espèces appartenant à des genres différents : chez *Haloferax* et *Halobacterium*, la protéine d'immunité est différente et pourrait permettre une communication avec des signaux différents, une régulation différente qui permettraient aux cellules d'identifier les cellules qui sont à leur proximité et d'adapter leur comportement en fonction de l'affiliation des souches environnantes, selon qu'elles appartiennent au même genre ou à des genres différents.

Les résultats du **chapitre 3** de cette thèse démontrent la présence d'une combinaison de plusieurs agents antimicrobiens dans les surnageants de culture de la souche *Natrinema* sp. SWI6 et *Natrinema altunense* JCM12890. En plus d'HalC8, au moins deux autres agents antimicrobiens ont été identifiés, dont la taille est supérieure à 100 kDa. Par des observations au MET et des analyses physiques, deux populations distinctes de nanoparticules ont été identifiées. La première population est composée de virus, infectant les archées et qui sont très nombreux dans les environnements hypersalins, 100 fois plus nombreux que les cellules d'archées (Atanasova *et al.*, 2016). La plupart des virus d'archées halophiles ont un cycle infectieux chronique, c'est-à-dire qu'ils se multiplient chez l'hôte sans induire sa lyse cellulaire (Atanasova *et al.*, 2016). Cependant, à fortes salinités, un passage du cycle infectieux chronique vers un cycle infectieux lytique se produit (Luk *et al.*, 2014). De ce fait, les virus pourraient être les seuls prédateurs dans les milieux hypersalins et dominer les compétitions microbiennes dans de tels environnements, minimisant le rôle des halocines dans les compétitions.

Une autre population de nanoparticules dont le diamètre est de 50 à 100 nm a été détectée. Ces particules pourraient être des vésicules. Une activité antimicrobienne a été associée à ces nanoparticules et l'hypothèse de la production d'HalC8 dans des vésicules a été avancée, à l'instar de ce qu'il a été observé pour les sulfolobocines (Prangishvili *et al.*, 2000 ; Ellen *et al.*, 2011). La production d'HalC8 dans des vésicules représente un avantage significatif

qui pourrait permettre à HalC8 d'atteindre sa cible. En effet, HalC8 est un peptide hydrophobe dont la sécrétion à l'état libre dans un milieu aqueux hypersalin est difficile à concevoir.

L'objectif du **chapitre 4** était d'identifier la cible d'HalC8. Afin d'obtenir des indications préliminaires sur la cible d'HalC8, le comportement de cellules cibles en présence d'HalC8 pourra être observé par MET. Ces expériences pourraient notamment être réalisées avec les souches appartenant aux genres *Haloferax* et *Halobacterium* afin d'observer si ces souches, qui possèdent *halC8* dans leur génome mais produisent une protéine d'immunité différente de celle produite par les souches *Natrinema* et *Haloterrigena*, réagissent de la même manière que des souches cibles comme *Hrr. chaoviator* qui ne possède pas le gène *halC8*. Aussi, la CMI d'HalC8 pourra être déterminée afin d'obtenir des informations préliminaires sur la localisation de la cible, extracellulaire ou intracellulaire, en fonction de la valeur de CMI. Ces expériences nécessitent de disposer d'HalC8 pure et en quantité suffisante. La purification d'HalC8 à partir de culture des différentes souches productrices (*Natrinema* sp. SWI6 ; *Natrinema altunense* JCM12890) n'a pas permis d'obtenir le peptide en quantité suffisante. La purification d'HalC8 est en cours à partir de volumes de culture plus importants afin de progresser dans l'identification de la cible du peptide. En conséquence, une stratégie de surexpression d'HalC8 a été développée chez l'hôte hétérologue *Haloferax volcanii*. Malheureusement, les essais d'induction de l'expression d'HalC8 n'ont pas été fructueux.

Malgré l'absence d'HalC8 pure, des expériences dans le but d'identifier la cible d'HalC8 ont été réalisées. Pour cela, le criblage d'une banque de mutants d'*Haloferax volcanii*, sensible à HalC8, a été réalisé avec du surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 contenant HalC8. Six mutants résistants au surnageant de *Nnm. altunense* JCM12890 ont été isolés. Des expériences sont actuellement en cours afin d'identifier le gène qui a été inactivé chez le mutant et qui lui confère une résistance à HalC8. Ces expériences nous permettront d'identifier le gène cible ou impliqué dans le mode d'action d'HalC8.

L'étude du spectre d'action d'HalC8 a permis de montrer qu'il était large, inhibant la plupart des archées halophiles, des archées haloalkaliphiles ainsi qu'une bactérie halophile. En effet, la croissance de la bactérie *Salinibacter ruber*, colonisatrice principale des milieux hypersalins, est inhibée par HalC8. De ce fait, la cible d'HalC8 est susceptible d'être présente chez des archées et des bactéries halophiles. En plus d'être impliqué dans les interactions inter

et intra espèces, HalC8 pourrait également être impliquée dans les interactions inter-domaines dans les milieux hypersalins.

Le fait que la cible d'HalC8 soit potentiellement présente chez des bactéries et des archées est un résultat intéressant au niveau évolutif. On peut se demander si la possession d'une même cible est un caractère spécifique des halophiles, le cas échéant quel pourrait être le rôle d'HalC8 dans les milieux hypersalins ? Ce caractère pourrait être partagé plus légèrement par les organismes extrêmophiles. Des tests d'activité contre des organismes extrêmophiles devront être réalisés.

Enfin, nous pouvons nous demander si la sensibilité à HalC8 partagée par les souches d'archées et des bactéries est effectivement due à une cible commune ou serait plutôt la conséquence d'un mode de reconnaissance du peptide par la cellule cible commun pour les bactéries et les archées. Par ailleurs, la sensibilité à HalC8 pourrait simplement être due à l'absence de production d'une protéine d'immunité, ou à la production d'une protéine d'immunité différente ne conférant de résistance à HalC8.

En plus de la compréhension du rôle écologique d'HalC8 et des halocines en général, l'identification de la cible d'HalC8, notamment si elle est retrouvée chez un large spectre de souches, pourrait déboucher, à long terme, sur des applications biotechnologiques ou pharmaceutiques. On peut par exemple citer l'exemple des bactériocines, les homologues bactériens des halocines pour lesquelles de nombreuses applications ont été développées, notamment dans les industries agro-alimentaires, en tant que conservateurs, et médicales, en tant que probiotiques (Yang *et al.*, 2014).

Ce travail de thèse réalisé pendant trois années s'inscrit dans une volonté d'étude du domaine des archées, secteur de recherche fascinant par son originalité et intrigant par sa singularité. Les études sur les archées, et notamment halophiles, n'en étant qu'à leurs prémices, peuvent parfois apparaître comme longues et ardues du fait de leur difficulté de mise en culture dans les conditions de laboratoire, mais nul doute que ces découvertes prometteuses préfigurent de avancées scientifiques conséquentes et enthousiasmantes.

Références

Références

- Acedo, J.Z., van Belkum, M.J., Lohans, C.T., McKay, R.T., Miskolzie, M., and Vederas, J.C. (2015). Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2910–2918.
- Alain, K., Marteinsson, V.T., Miroshnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Prieur, D., and Birrien, J.-L. (2002). *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1331–1339.
- Alam, M., and Oesterhelt, D. (1984). Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.* 176, 459–475.
- Albers, S.-V., and Jarrell, K.F. (2015). The archaeellum: how *Archaea* swim. *Front. Microbiol.* 6, 23.
- Albers, S.-V., and Meyer, B.H. (2011). The archaeal cell envelope. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 414–426.
- Albers, S.-V., Szabó, Z., and Driessen, A.J.M. (2006). Protein secretion in the *Archaea*: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 537–547.
- Albuquerque, L., Taborda, M., La Cono, V., Yakimov, M., and da Costa, M.S. (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.
- Allen, E., and Barlett, H. (2004). Piezophiles: microbial adaptation to the deep-sea environment. In *Encyclopedia of Life Support Systems*, (UNESCO-EOLSS), p.
- Allers, T. (2010). Overexpression and purification of halophilic proteins in *Haloferax volcanii*. *Bioeng. Bugs* 1, 288–290.
- Allers, T., and Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nat. Rev. Genet.* 6, 58–73.
- Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K., and Mevarech, M. (2010). Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1759–1769.
- Allison, G.E., Fremaux, C., and Klaenhammer, T.R. (1994). Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176, 2235–2241.
- Alonso Y Adell, M., and Teis, D. (2011). Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex. *Febs Lett.* 585, 3191–3196.

- Anderson, I., Djao, O.D.N., Misra, M., Chertkov, O., Nolan, M., Lucas, S., Lapidus, A., Del Rio, T.G., Tice, H., Cheng, J.-F., et al. (2010). Complete genome sequence of *Methanothermus fervidus* type strain (V24S). *Stand. Genomic Sci.* 3, 315–324.
- Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., and Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2269–2272.
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., et al. (2012). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 30, 108–160.
- Asensio, C., and Pérez-Díaz, J.C. (1976). A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 7–14.
- Atanasova, N.S., Roine, E., Oren, A., Bamford, D.H., and Oksanen, H.M. (2012). Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environ. Microbiol.* 14, 426–440.
- Atanasova, N.S., Pietilä, M.K., and Oksanen, H.M. (2013). Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier. *MicrobiologyOpen* 2, 811–825.
- Atanasova, N.S., Oksanen, H.M., and Bamford, D.H. (2015a). Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 40–48.
- Atanasova, N.S., Bamford, D.H., and Oksanen, H.M. (2015b). Haloarchaeal virus morphotypes. *Biochimie* 118, 333–343.
- Atanasova, N.S., Bamford, D.H., and Oksanen, H.M. (2016). Virus-host interplay in high salt environments. *Environ. Microbiol. Rep.*
- Bae, J.-W., Rhee, S.-K., Park, J.R., Kim, B.-C., and Park, Y.-H. (2005). Isolation of uncultivated anaerobic thermophiles from compost by supplementing cell extract of *Geobacillus toebii* in enrichment culture medium. *Extrem. Life Extreme Cond.* 9, 477–485.
- Bagos, P.G., Nikolaou, E.P., Liakopoulos, T.D., and Tsirigos, K.D. (2010). Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2811–2817.
- Baker-Austin, C., and Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* 15, 165–171.
- Barrett, J. (2001). Thermal hysteresis proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 105–117.
- Bastos, M. do C. de F., Coelho, M.L.V., and Santos, O.C. da S. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiol. Read. Engl.* 161, 683–700.

- Bayer, A., Freund, S., and Jung, G. (1995). Post-translational heterocyclic backbone modifications in the 43-peptide antibiotic microcin B17. Structure elucidation and NMR study of a ^{13}C , ^{15}N -labelled gyrase inhibitor. *Eur. J. Biochem. FEBS* 234, 414–426.
- Bell, S.D., and Jackson, S.P. (2000). Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 275, 31624–31629.
- Bell, S.D., and Jackson, S.P. (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 208–213.
- Bell, S.D., Cairns, S.S., Robson, R.L., and Jackson, S.P. (1999). Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 971–982.
- Benelli, D., and Londei, P. (2011). Translation initiation in *Archaea*: conserved and domain-specific features. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 89–93.
- Benson, C.A., Bizzoco, R.W., Lipson, D.A., and Kelley, S.T. (2011). Microbial diversity in nonsulfur, sulfur and iron geothermal steam vents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 74–88.
- Besse, A., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A. (2015). Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie*.
- Bischof, J.C., and He, X. (2005). Thermal stability of proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066, 12–33.
- Boughalmi, M., Saadi, H., Pagnier, I., Colson, P., Fournous, G., Raoult, D., and La Scola, B. (2013). High-throughput isolation of giant viruses of the *Mimiviridae* and *Marseilleviridae* families in the Tunisian environment. *Environ. Microbiol.* 15, 2000–2007.
- Bowmaker, J.K., Govardovskii, V.I., Shukolyukov, S.A., Zueva, L.V., Hunt, D.M., Sideleva, V.G., and Smirnova, O.G. (1994). Visual pigments and the photic environment: the cottoid fish of Lake Baikal. *Vision Res.* 34, 591–605.
- Braun, V., Patzer, S.I., and Hantke, K. (2002). Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* 84, 365–380.
- Breukink, E., and de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 321–332.
- Breukink, E., van Heusden, H.E., Vollmerhaus, P.J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A.J.R., and de Kruijff, B. (2003). Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J. Biol. Chem.* 278, 19898–19903.
- Brochier, C., Gribaldo, S., Zivanovic, Y., Confalonieri, F., and Forterre, P. (2005). Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biol.* 6, R42.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 245–252.

- Brock, T.D., and Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98, 289–297.
- Brocks, J.J., Logan, G.A., Buick, R., and Summons, R.E. (1999). Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285, 1033–1036.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 620–630.
- Burghardt, T., Näther, D.J., Junglas, B., Huber, H., and Rachel, R. (2007). The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex. *Mol. Microbiol.* 63, 166–176.
- Burns, D.G., Camakaris, H.M., Janssen, P.H., and Dyll-Smith, M.L. (2004). Cultivation of Walsby's square haloarchaeon. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 469–473.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M., and Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 217–241.
- Callac, N., Oger, P., Lesongeur, F., Rattray, J., Vannier, P., Michoud, G., Beauverger, M., Gayet, N., Rouxel, O., Jebbar, M., et al. (2016). *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov., a novel hyperthermophilic piezophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Guaymas Basin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 158–229.
- Castelle, C.J., Wrighton, K.C., Thomas, B.C., Hug, L.A., Brown, C.T., Wilkins, M.J., Frischkorn, K.R., Tringe, S.G., Singh, A., Markillie, L.M., et al. (2015). Genomic expansion of domain *Archaea* highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr. Biol.* 25, 690–701.
- Castillo, A.M., Gutiérrez, M.C., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D.A., Jones, B.E., Grant, W.D., and Ventosa, A. (2006). *Natrinema ejinorensis* sp. nov., isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2683–2687.
- del Castillo, F.J., del Castillo, I., and Moreno, F. (2001). Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. *J. Bacteriol.* 183, 2137–2140.

- Cavera, V.L., Arthur, T.D., Kashtanov, D., and Chikindas, M.L. (2015). Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 494–501.
- Cavicchioli, R. (2011). Archaea--timeline of the third domain. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 51–61.
- Cavicchioli, R., Amils, R., Wagner, D., and McGenity, T. (2011). Life and applications of extremophiles. *Environ. Microbiol.* 13, 1903–1907.
- Cayol, J.L., Ollivier, B., Patel, B.K., Prensier, G., Guezennec, J., and Garcia, J.L. (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.
- Cha, I.-T., Lee, M.-H., Kim, B.-Y., Cho, Y.-J., Kim, D.-W., Yim, K.J., Song, H.S., Seo, M.-J., Rhee, J.-K., Choi, J.-S., et al. (2015). Genome sequence of the haloarchaeon *Haloterrigena jeotgali* type strain A29T isolated from salt-fermented food. *Stand. Genomic Sci.* 10.
- Chaban, B., Ng, S.Y.M., and Jarrell, K.F. (2006). Archaeal habitats--from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* 52, 73–116.
- Chen, L., Brügger, K., Skovgaard, M., Redder, P., She, Q., Torarinsson, E., Greve, B., Awayez, M., Zibat, A., Klenk, H.-P., et al. (2005). The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota. *J. Bacteriol.* 187, 4992–4999.
- Cheung, J., Danna, K.J., O'Connor, E.M., Price, L.B., and Shand, R.F. (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.
- Chevance, F.F.V., and Hughes, K.T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 455–465.
- Chhibber, S., and Vadehra, D.V. (1986). Purification and Characterization of a Bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae* 158. *Microbiology* 132, 1051–1054.
- Choi, H.J., Cheigh, C.I., Kim, S.B., and Pyun, Y.R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 88, 563–571.
- Chumchalová, J., and Smarda, J. (2003). Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiol. (Praha)* 48, 111–115.
- Ciaramella, M., Napoli, A., and Rossi, M. (2005). Another extreme genome: how to live at pH 0. *Trends Microbiol.* 13, 49–51.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881–10890.
- Cotter, P.D. (2014). An “Upp”-turn in bacteriocin receptor identification. *Mol. Microbiol.* 92, 1159–1163.

- Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 95–105.
- Cox, M.M., Keck, J.L., and Battista, J.R. (2010). Rising from the ashes: DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet.* 6.
- Čuboňová, L., Richardson, T., Burkhart, B.W., Kelman, Z., Connolly, B.A., Reeve, J.N., and Santangelo, T.J. (2013). Archaeal DNA polymerase D but not DNA polymerase B is required for genome replication in *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* 195, 2322–2328.
- Cui, H.-L., Tohty, D., Zhou, P.-J., and Liu, S.-J. (2006). *Haloterrigena longa* sp. nov. and *Haloterrigena limicola* sp. nov., extremely halophilic archaea isolated from a salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1837–1840.
- Cutler, S.A., Lonergan, S.M., Cornick, N., Johnson, A.K., and Stahl, C.H. (2007). Dietary inclusion of colicin E1 is effective in preventing postweaning diarrhea caused by F18-Positive *Escherichia coli* in pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3830–3835.
- D’Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.-A., Feller, G., and Gerday, C. (2002). Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357, 917–925.
- D’Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., and Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep.* 7, 385–389.
- DasSarma, S., and DasSarma, P. (2012). Halophiles. In *eLS*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- DasSarma, S., and DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 120–126.
- DasSarma, S., Capes, M., and DasSarma, P. (2009). Haloarchaeal megaplasms. In *Microbial Megaplasms*, E. Schwartz, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 3–30.
- De, J., Ramaiah, N., and Vardanyan, L. (2008). Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Mar. Biotechnol.* 10, 471–477.
- Deatherage, B.L., and Cookson, B.T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* 80, 1948–1957.
- Delgado, M.A., Rintoul, M.R., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (2001). *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* 183, 4543–4550.
- DeLong, E. (1998a). Archaeal Means and Extremes. *Science* 280, 542–543.

- DeLong, E.F. (1998b). Everything in moderation: archaea as “non-extremophiles.” *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 649–654.
- Deming, J.W. (2002). Psychrophiles and polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 301–309.
- Denner, E.B.M., McGenity, T.J., Busse, H.-J., Grant, W.D., Wanner, G., and Stan-Lotter, H. (1994). *Halococcus salifodinae* sp. nov., an archaeal isolate from an Austrian salt mine.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., and Fleury, Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar. Drugs* 8, 1153–1177.
- Diep, D.B., and Nes, I.F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3, 107–122.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2384–2389.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., and Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 70, 564–582.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., and Barton, G.J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* gkv332.
- Dufour, A., Hindré, T., Haras, D., and Le Pennec, J.-P. (2007). The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 134–167.
- Duman, J.G., and Olsen, T.M. (1993). Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology* 30, 322–328.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* 24, 708–734.
- Duschl, A., and Wagner, G. (1986). Primary and secondary chloride transport in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 168, 548–552.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (Springer Science & Business Media).
- Dym, O., Mevarech, M., and Sussman, J.L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium. *Science* 267, 1344–1346.
- Eichler, J. (2003). Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco)proteins. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 3347–3351.

- Eisenberg, H., and Wachtel, E.J. (1987). Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16, 69–92.
- Elgat, M., and Ben-Gurion, R. (1969). Mode of Action of Pesticin. *J. Bacteriol.* 98, 359–367.
- Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., et al. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the *Archaea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 8102–8107.
- Ellen, A.F., Albers, S.-V., Huibers, W., Pitcher, A., Hobel, C.F.V., Schwarz, H., Folea, M., Schouten, S., Boekema, E.J., Poolman, B., et al. (2009). Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extrem. Life Extreme Cond.* 13, 67–79.
- Ellen, A.F., Zolghadr, B., Driessen, A.M.J., Albers, S.-V. (2010). Shaping the archaeal cell envelope. *Archaea*.
- Ellen, A.F., Rohulya, O.V., Fusetti, F., Wagner, M., Albers, S.-V., and Driessen, A.J.M. (2011). The sulfolobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J. Bacteriol.* 193, 4380–4387.
- Elshahed, M.S., Savage, K.N., Oren, A., Gutierrez, M.C., Ventosa, A., and Krumholz, L.R. (2004). *Haloferax sulfurifontis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2275–2279.
- Enache, M., Itoh, T., Fukushima, T., Usami, R., Dumitru, L., and Kamekura, M. (2007). Phylogenetic relationships within the family *Halobacteriaceae* inferred from *rpoB*’ gene and protein sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2289–2295.
- Engle, M., Li, Y., Woese, C., and Wiegel, J. (1995). Isolation and characterization of a novel alkali-tolerant thermophile, *Anaerobranca horikoshii* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 454–461.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85–106.
- Espeset, D., Duché, D., Baty, D., and Géli, V. (1996). The channel domain of colicin A is inhibited by its immunity protein through direct interaction in the *Escherichia coli* inner membrane. *EMBO J.* 15, 2356–2364.
- Evans, P.N., Parks, D.H., Chadwick, G.L., Robbins, S.J., Orphan, V.J., Golding, S.D., and Tyson, G.W. (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics. *Science* 350, 434–438.
- Feller, G. (2013). Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica* 2013, 512840.

- Feng, J., Liu, B., Zhang, Z., Ren, Y., Li, Y., Gan, F., Huang, Y., Chen, X., Shen, P., Wang, L., et al. (2012). The complete genome sequence of *Natrinema* sp. J7-2, a haloarchaeon capable of growth on synthetic media without amino acid supplements. *PloS One* 7, e41621.
- Field, D., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2015). Bioengineering lantibiotics for therapeutic success. *Front. Microbiol.* 6, 1363.
- Filker, S., Kaiser, M., Rosselló-Móra, R., Dunthorn, M., Lax, G., and Stoeck, T. (2014). “*Candidatus Haloectosymbiotes riaformosensis*” (*Halobacteriaceae*), an archaeal ectosymbiont of the hypersaline ciliate *Platynematum salinarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 244–251.
- Forterre, P. (2015). The universal tree of life: an update. *Front. Microbiol.* 6, 717.
- Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S., and Woese, C.R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 4537–4541.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., et al. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209, 457–463.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M., and Shoham, M. (1996). Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat. Struct. Biol.* 3, 452–458.
- Fröls, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Boekema, E.J., Driessen, A.J.M., Schleper, C., and Albers, S.-V. (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol. Microbiol.* 70, 938–952.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Hernández, P.E., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2012). The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2908–2915.
- Galinski, E.A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 272–328.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., and Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* 32, 765–771.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Omar, N.B., and Lucas, R. (2011). Food applications and regulation. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (Springer New York), pp. 353–390.
- Garcia-Bustos, J.F., Pezzi, N., and Mendez, E. (1985). Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 791–797.

- García-Moyano, A., González-Toril, E., Aguilera, Á., and Amils, R. (2012). Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* *81*, 303–314.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L., and Muyzer, G. (1996). Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 3284–3291.
- Garrido, M.C., Herrero, M., Kolter, R., and Moreno, F. (1988). The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* *7*, 1853–1862.
- Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A.B., Martin-Cuadrado, A.-B., Mizuno, C.M., McMahon, K.D., Papke, R.T., Stepanauskas, R., Rodriguez-Brito, B., Rohwer, F., et al. (2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci. Rep.* *1*, 135.
- Gilbert, J.A., Hill, P.J., Dodd, C.E.R., and Laybourn-Parry, J. (2004). Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiol. Read. Engl.* *150*, 171–180.
- Gillor, O. (2007). Bacteriocins' role in bacterial communication. In *Bacteriocins*, P.D.M.A. Riley, and D.M.A. Chavan, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 135–145.
- González-Pastor, J.E., San Millán, J.L., Castilla, M.A., and Moreno, F. (1995). Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J. Bacteriol.* *177*, 7131–7140.
- Gordon, D.M., and O'Brien, C.L. (2006). Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiol. Read. Engl.* *152*, 3239–3244.
- Gorlenko, V., Tsapin, A., Namsaraev, Z., Teal, T., Tourova, T., Engler, D., Mielke, R., and Nealson, K. (2004). *Anaerobranca californiensis* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic, fermentative bacterium isolated from a hot spring on Mono Lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *54*, 739–743.
- Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., and Gálvez, A. (2006). Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS-48. *J. Appl. Microbiol.* *101*, 422–428.
- Gribaldo, S., and Brochier-Armanet, C. (2006). The origin and evolution of *Archaea*: a state of the art. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *361*, 1007–1022.
- Gribaldo, S., Poole, A.M., Daubin, V., Forterre, P., and Brochier-Armanet, C. (2010). The origin of eukaryotes and their relationship with the *Archaea*: are we at a phylogenomic impasse? *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 743–752.
- Grinter, R., Milner, J., and Walker, D. (2012). Bacteriocins active against plant pathogenic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1498–1502.

Guijarro, J.I., González-Pastor, J.E., Baleux, F., San Millán, J.L., Castilla, M.A., Rico, M., Moreno, F., and Delepierre, M. (1995). Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. *J. Biol. Chem.* 270, 23520–23532.

Gupta, R.S., Naushad, S., and Baker, S. (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., Naushad, S., Fabros, R., and Adeolu, M. (2016). 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. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109, 565–587.

Gutiérrez, M.C., Castillo, A.M., Kamekura, M., and Ventosa, A. (2008). *Haloterrigena salina* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2880–2884.

Guy, L., and Ettema, T.J.G. (2011). The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol.* 19, 580–587.

Hahn, F.E., and Ciak, J. (1976). Elimination of resistance determinants from R-Factor R1 by intercalative compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9, 77–80.

Hallam, S.J., Konstantinidis, K.T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y., Sugahara, J., Preston, C., de la Torre, J., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18296–18301.

Hallberg, K.B., and Lindstrom, E.B. (1996). Multiple serotypes of the moderate thermophile *Thiobacillus caldus*, a limitation of immunological assays for biomining microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4243–4246.

Haseltine, C., Hill, T., Montalvo-Rodriguez, R., Kemper, S.K., Shand, R.F., and Blum, P. (2001). Secreted euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic crenarchaea. *J. Bacteriol.* 183, 287–291.

Hedderich, R., and Whitman, W.B. (2006). Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. In *The Prokaryotes*, M.D.P. Dr, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (Springer New York), pp. 1050–1079.

Hegemann, J.D., Zimmermann, M., Xie, X., and Marahiel, M.A. (2015). Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. *Acc. Chem. Res.* 48, 1909–1919.

Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., and Tagg, J.R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-Positive bacteria. In *Bacteriocins*, P.D.M.A. Riley, and D.M.A. Chavan, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 45–92.

- Herrero, M., and Moreno, F. (1986). Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 393–402.
- Hook, S.E., Wright, A.-D.G., McBride, B.W. (2010). Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*.
- Horikoshi, K., and Grant, W.D. (1998). *Extremophiles: microbial life in extreme environments* (New York).
- Horn, C., Paulmann, B., Kerlen, G., Junker, N., and Huber, H. (1999). *In vivo* observation of cell division of anaerobic hyperthermophiles by using a high-intensity dark-field microscope. *J. Bacteriol.* 181, 5114–5118.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H., and Gasson, M. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* MGG 228, 129–135.
- Huber, G., Spinnler, C., Gambacorta, A., and Stetter, K.O. (1989). *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 12, 38–47.
- Imadalou-Idres, N., Carre-Mlouka, A., Vandervennet, M., Yahiaoui, H., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2013). Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. *J. Life Sci.* 1057–1069.
- Irwin, J.A., and Baird, A.W. (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Ir. Vet. J.* 57, 348–354.
- Jaakkola, S.T., Pfeiffer, F., Ravantti, J.J., Guo, Q., Liu, Y., Chen, X., Ma, H., Yang, C., Oksanen, H.M., and Bamford, D.H. (2016). The complete genome of a viable archaeum isolated from 123-million-year-old rock salt. *Environ. Microbiol.* 18, 565–579.
- Jebbar, M., Franzetti, B., Girard, E., and Oger, P. (2015). Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles* 19, 721–740.
- Johnson, D.B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 307–317.
- Johnson, D.B., and Hallberg, K.B. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* 154, 466–473.
- Józefiak, D., Kierończyk, B., Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Rawski, M., Długosz, J., Sip, A., and Højberg, O. (2013). Dietary nisin modulates the gastrointestinal microbial ecology and enhances growth performance of the broiler chickens. *PloS One* 8, e85347.
- Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Wirth, R., Huber, H., and Rachel, R. (2008). *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Arch. Microbiol.* 190, 395–408.

- Kalmokoff, M.L., and Jarrell, K.F. (1991). Cloning and sequencing of a multigene family encoding the flagellins of *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.* 173, 7113–7125.
- Kalmokoff, M.L., Karnauchow, T.M., and Jarrell, K.F. (1990). Conserved N-terminal sequences in the flagellins of archaeobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 154–160.
- Kaluzhnaya, M., Khmelenina, V., Eshinimaev, B., Suzina, N., Nikitin, D., Solonin, A., Lin, J.L., McDonald, I., Murrell, C., and Trotsenko, Y. (2001). Taxonomic characterization of new alkaliphilic and alkalitolerant methanotrophs from soda lakes of the Southeastern Transbaikalian region and description of *Methylomicrobium buryatense* sp.nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 166–176.
- Kashefi, K., and Lovley, D.R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science* 301, 934.
- Kaur, S., and Kaur, S. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front. Pharmacol.* 6.
- Kawulka, K.E., Sprules, T., Diaper, C.M., Whittall, R.M., McKay, R.T., Mercier, P., Zuber, P., and Vederas, J.C. (2004). Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 3385–3395.
- Kempf, B., and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170, 319–330.
- Kets, E.P., Galinski, E.A., de Wit, M., de Bont, J.A., and Heipieper, H.J. (1996). Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* 178, 6665–6670.
- Kevbrin, V., Boltyanskaya, Y., Garnova, E., and Wiegel, J. (2008). *Anaerobranca zavarzinii* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic bacterium isolated from Kamchatka thermal fields. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1486–1491.
- Kiljunen, S., Pajunen, M.I., Dilks, K., Storf, S., Pohlschroder, M., and Savilahti, H. (2014). Generation of comprehensive transposon insertion mutant library for the model archaeon, *Haloferax volcanii*, and its use for gene discovery. *BMC Biol.* 12, 103.
- Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2010). The abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J. Bacteriol.* 192, 2068–2076.
- Kjos, M., Oppegård, C., Diep, D.B., Nes, I.F., Veening, J.-W., Nissen-Meyer, J., and Kristensen, T. (2014). Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol. Microbiol.* 92, 1177–1187.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337–349.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39–85.

- Kozera, B., and Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 54, 391–406.
- de Kruijff, B., van Dam, V., and Breukink, E. (2008). Lipid II: a central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 79, 117–121.
- Kuipers, A., Rink, R., and Moll, G.N. (2011). Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (Springer New York), pp. 147–169.
- Lake, J.A., Henderson, E., Oakes, M., and Clark, M.W. (1984). Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3786–3790.
- Lancaster, L.E., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2007). Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells. Mol. Dis.* 38, 15–18.
- Laviña, M., Pugsley, A.P., and Moreno, F. (1986). Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1685–1693.
- Lee, D.-W., Koh, Y.-S., Kim, K.-J., Kim, B.-C., Choi, H.-J., Kim, D.-S., Suhartono, M.T., and Pyun, Y.-R. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, 393–400.
- Lefebvre, O., and Moletta, R. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water Res.* 40, 3671–3682.
- Lefort, V., Desper, R., and Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol. Biol. Evol.* msv150.
- Lequerica, J.L., O'Connor, J.E., Such, L., Alberola, A., Meseguer, I., Dolz, M., Torreblanca, M., Moya, A., Colom, F., and Soria, B. (2006). A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of *Haloarchaea* as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *J. Physiol. Biochem.* 62, 253–262.
- Li, Y., Xiang, H., Liu, J., Zhou, M., and Tan, H. (2003). Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* 7, 401–407.
- Li, Y., Zirah, S., and Rebuffat, S. (2015). *Lasso peptides: bacterial strategies to make and maintain bioactive entangled scaffolds* (New York, NY: Springer New York).
- Liu, Y., and Whitman, W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 171–189.
- Llamas, I., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M.J., Gronquist, M., Eberhard, A., and González, J.E. (2005). Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones

in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extrem. Life Extreme Cond.* 9, 333–341.

Löhr, A.J., Bogaard, T.A., Heikens, A., Hendriks, M.R., Sumarti, S., Van Bergen, M.J., Van Gestel, C.A.M., Van Straalen, N.M., Vroon, P.Z., and Widianarko, B. (2005). Natural pollution caused by the extremely acidic crater lake Kawah Ijen, East Java, Indonesia. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 12, 89–95.

Luk, A.W.S., Williams, T.J., Erdmann, S., Papke, R.T., and Cavicchioli, R. (2014). Viruses of haloarchaea. *Life Basel Switz.* 4, 681–715.

Macalady, J.L., Vestling, M.M., Baumler, D., Boekelheide, N., Kaspar, C.W., and Banfield, J.F. (2004). Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid. *Extrem. Life Extreme Cond.* 8, 411–419.

Maisnier-Patin, S., Malandrin, L., Birkeland, N.-K., and Bernander, R. (2002). Chromosome replication patterns in the hyperthermophilic euryarchaea *Archaeoglobus fulgidus* and *Methanocaldococcus* (*Methanococcus*) *jannaschii*. *Mol. Microbiol.* 45, 1443–1450.

Makarova, K.S., and Koonin, E.V. (2003). Comparative genomics of archaea: how much have we learned in six years, and what's next? *Genome Biol.* 4, 115.

Makarova, K.S., Yutin, N., Bell, S.D., and Koonin, E.V. (2010). Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in *Archaea*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 731–741.

Makhloufi, K.M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat.

Makhloufi, K.M., Carré-Mlouka, A., Peduzzi, J., Lombard, C., Reenen, C.A. van, Dicks, L.M.T., and Rebuffat, S. (2013). Characterization of leucocin B-KM432Bz from *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from Boza, and comparison of its efficiency to pediocin PA-1. *PLOS ONE* 8, e70484.

Maksimov, M.O., Pan, S.J., and James Link, A. (2012). Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat. Prod. Rep.* 29, 996–1006.

Maksimov, M.O., Pelczar, I., and Link, A.J. Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery.

Mandelli, F., Oliveira Ramires, B., Couger, M.B., Paixão, D.A.A., Camilo, C.M., Polikarpov, I., Prade, R., Riaño-Pachón, D.M., and Squina, F.M. (2015). Draft genome sequence of the thermophile *Thermus filiformis* ATCC 43280, producer of carotenoid-(Di)glucoside-branched Fatty Acid (Di)esters and source of hyperthermostable enzymes of Biotechnological Interest. *Genome Announc.* 3.

Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 2–22.

Margesin, R., Feller, G., Gerday, C., and Russell, N.J. (2003). Cold-adapted microorganisms: adaptation strategies and biotechnological potential. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.

Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M., and Vederas, J.C. (2008). Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4756–4763.

Mathur, H., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2015). The sactibiotic subclass of bacteriocins: an update. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 549–558.

Matsunaga, F., Norais, C., Forterre, P., and Myllykallio, H. (2003). Identification of short “eukaryotic” Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. *EMBO Rep.* 4, 154–158.

McAuliffe, O., Ross, R.P., and Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 285–308.

McGenity, T.J., Gemmell, R.T., and Grant, W.D. (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 Pt 4, 1187–1196.

McHugh, G.L., and Swartz, M.N. (1977). Elimination of plasmids from several bacterial species by novobiocin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12, 423–426.

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

Mei, Y., He, C., Huang, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Chen, X., and Shen, P. (2015). Salinity regulation of the interaction of halovirus SNJ1 with its host and alteration of the halovirus replication strategy to adapt to the variable ecosystem. *PLOS ONE* 10, e0123874.

Meknaci, R., Lopes, P., Servy, C., Le Caer, J.-P., Andrieu, J.-P., Hacène, H., and Ouazzani, J. (2014). Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. *Extrem. Life Extreme Cond.* 18, 1049–1055.

Merget, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., and Gijsegem, F.V. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162, 328–334.

Mesbah, N.M., and 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.

Mesbah, N.M., Hedrick, D.B., Peacock, A.D., Rohde, M., and Wiegel, J. (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.

- Meseguer, I., and Rodriguez-Valera (1986). Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*. J. Gen. Microbiol. 3061–3068.
- Meseguer, I., and Rodriguez-Valera, F. (1985). Production and purification of halocin H4. FEMS Microbiol. Lett. 28, 177–182.
- Meseguer, I., Torreblanca, M., and Konishi, T. (1995). Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6. J. Biol. Chem. 270, 6450–6455.
- Michels, M., and Bakker, E.P. (1985). Generation of a large, protonophore-sensitive proton motive force and pH difference in the acidophilic bacteria *Thermoplasma acidophilum* and *Bacillus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 161, 231–237.
- Michoud, G., and Jebbar, M. (2016). High hydrostatic pressure adaptive strategies in an obligate piezophile *Pyrococcus yayanosii*. Sci. Rep. 6, 27289.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55, 165–199.
- Minegishi, H., Echigo, A., Nagaoka, S., Kamekura, M., and Usami, R. (2010a). *Halarchaeum acidiphilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 2513–2516.
- Minegishi, H., Kamekura, M., Itoh, T., Echigo, A., Usami, R., and Hashimoto, T. (2010b). Further refinement of the phylogeny of the *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (*rpoB*') gene. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 2398–2408.
- Moissl, C., Rudolph, C., and Huber, R. (2002). Natural communities of novel archaea and bacteria with a string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. Appl. Environ. Microbiol. 68, 933–937.
- Moissl, C., Rachel, R., Briegel, A., Engelhardt, H., and Huber, R. (2005). The unique structure of archaeal “hami”, highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. Mol. Microbiol. 56, 361–370.
- Monchy, S., Benotmane, M.A., Janssen, P., Vallaey, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., and Mergeay, M. (2007). Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. J. Bacteriol. 189, 7417–7425.
- Montalvo-Rodríguez, R., López-Garriga, J., Vreeland, R.H., Oren, A., Ventosa, A., and Kamekura, M. (2000). *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 Pt 3, 1065–1071.
- Montgomery, K., Charlesworth, J.C., LeBard, R., Visscher, P.T., and Burns, B.P. (2013). Quorum Sensing in Extreme Environments. Life 3, 131–148.
- Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R.M., and Ebright, R.H. (2004). Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. Mol. Cell 14, 739–751.

- Müller, V., and Oren, A. (2003). Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extrem. Life Extreme Cond.* 7, 261–266.
- Müller, D.W., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R., and Bellack, A. (2009). The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *J. Bacteriol.* 191, 6465–6468.
- Myllykallio, H., Lopez, P., López-García, P., Heilig, R., Saurin, W., Zivanovic, Y., Philippe, H., and Forterre, P. (2000). Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science* 288, 2212–2215.
- Narasingarao, P., Podell, S., Ugalde, J.A., Brochier-Armanet, C., Emerson, J.B., Brocks, J.J., Heidelberg, K.B., Banfield, J.F., and Allen, E.E. (2012). De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of *Archaea* in hypersaline microbial communities. *ISME J.* 6, 81–93.
- Nasir, A., Kim, K.M., and Caetano-Anollés, G. (2015). *Lokiarchaeota*: eukaryote-like missing links from microbial dark matter? *Trends Microbiol.* 23, 448–450.
- Näther, D.J., Rachel, R., Wanner, G., and Wirth, R. (2006). Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts. *J. Bacteriol.* 188, 6915–6923.
- Nes, I.F. (2011). History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (Springer New York), pp. 3–12.
- Nickell, S., Hegerl, R., Baumeister, W., and Rachel, R. (2003). *Pyrodictium cannulae* enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography. *J. Struct. Biol.* 141, 34–42.
- Nishie, M., Nagao, J.-I., and Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 17, 1–16.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H.S., and Kristiansen, P.E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 19–37.
- Novick, R.P. (1969). Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 33, 210–263.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G. (2000). The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina Turpin*) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 3, 1265–1277.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G.-J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., et al. (2010). Insights into the evolution of *Archaea* and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* gkq1228.

- O'Connor, E.M., and Shand, R.F. (2002). Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 23–31.
- Oger, P.M., and Jebbar, M. (2010). The many ways of coping with pressure. *Res. Microbiol.* 161, 799–809.
- Oren, A., and Heldal, M. (1997). X-ray microanalysis of intracellular ions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*. *Can J Microbiol. Can. J. Microbiol.* 43, 588–592.
- Oren, A., and Ventosa, A. (1999). Benjamin Elazari Volcani (1915-1999): sixty-three years of studies of the microbiology of the Dead Sea. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 2, 195–198.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56–63.
- Oren, A. (2006). Life at high salt concentrations. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 421–440.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst.* 4, 2.
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* 31, 825–834.
- Oren, A. (2011). Diversity of halophiles. In *Extremophiles Handbook*, K. Horikoshi, ed. (Springer Japan), pp. 309–325.
- Oren, A. (2012). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae*: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 263–271.
- Oren, A. (2013a). *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 342, 1–9.
- Oren, A. (2013b). Life at high salt concentrations. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 421–440.
- Oren, A. (2014a). The Family *Halobacteriaceae*. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 41–121.
- Oren, A. (2014b). Taxonomy of halophilic *Archaea*: current status and future challenges. *Extrem. Life Extreme Cond.* 18, 825–834.
- Ortega, M.A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M.C., van der Donk, W.A., and Nair, S.K. (2015). Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB. *Nature* 517, 509–512.

- Ortiz-Alvarez, R., and Casamayor, E.O. (2016). High occurrence of *Pacearchaeota* and *Woesearchaeota* (Archaea superphylum DPANN) in the surface waters of oligotrophic high-altitude lakes. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 210–217.
- Osman, M.A.M. (1965). Pyocine typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.* 18, 200–202.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., and Krulwich, T.A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim. Biophys. Acta* 1717, 67–88.
- Paggi, R.A., Martone, C.B., Fuqua, C., and De Castro, R.E. (2003). Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 49–52.
- Pathom-Aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., and Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extrem. Life Extreme Cond.* 10, 181–189.
- Paul, S., Bag, S.K., Das, S., Harvill, E.T., and Dutta, C. (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biol.* 9, R70.
- Pelve, E.A., Lindås, A.-C., Knöppel, A., Mira, A., and Bernander, R. (2012). Four chromosome replication origins in the archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *Mol. Microbiol.* 85, 986–995.
- Perez, R.H., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Factories* 13, S3.
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M., and Herzberg, O. (1998). Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Struct. Lond. Engl.* 1993 6, 75–88.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B., and Tang, J. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.* 33, 183–209.
- Pivovarova, T.A., Kondrat'eva, T.F., Batrakov, S.G., Esipov, S.E., Sheichenko, V.I., Bykova, S.A., Lysenko, A.M., and Karavaiko, G.I. (2002). Phenotypic features of *Ferroplasma acidiphilum* strains Yt and Y-2. *Mikrobiologiya* 71, 809–818.
- Porter, K., Russ, B.E., and Dyll-Smith, M.L. (2007). Virus–host interactions in salt lakes. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 418–424.
- Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J.K., and Zillig, W. (2000). Sulfolobins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* 182, 2985–2988.
- Price, L.B., and Shand, R.F. (2000). Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J. Bacteriol.* 182, 4951–4958.

- Proctor, L.M., Lai, R., and Gunsalus, R.P. (1997). The methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila* TM-1 possesses a high-affinity glycine betaine transporter involved in osmotic adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2252–2257.
- Prowe, S.G., and Antranikian, G. (2001). *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 457–465.
- Quadri, I., Hassani, I.I., l’Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H., and 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.
- Rachel, R., Wyszchony, I., Riehl, S., and Huber, H. (2002). The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea Vanc. BC* 1, 9–18.
- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D., and Hill, C. (2011). Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (Springer New York), pp. 29–53.
- Rebuffat, S. (2011). Bacteriocins from Gram-negative bacteria: A classification? In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (Springer New York), pp. 55–72.
- Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., and Evilia, C. (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea Vanc. BC* 2013, 373275.
- Reeve, J.N. (2003). Archaeal chromatin and transcription. *Mol. Microbiol.* 48, 587–598.
- Riley, M.A., and Gordon, D.M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 7, 129–133.
- Riley, M.A., and Wertz, J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84, 357–364.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B.K., Gies, E.A., 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 Syst.* 1, 5.
- Rodríguez-Valera, F., Juez, G., and Kushner, D.J. (1982). Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.* 28, 151–154.
- Roh, S.W., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Kim, K.-H., Sung, Y., Kim, M.-S., Oh, H.-M., and Bae, J.-W. (2009). *Haloterrigena jeotgali* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from salt-fermented food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2359–2363.

- Romano, I., Poli, A., Finore, I., Huertas, F.J., Gambacorta, A., Pelliccione, S., Nicolaus, G., Lama, L., and 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.
- Rooney, E.A., Rowe, K.T., Guseva, A., Huntemann, M., Han, J.K., Chen, A., Kyrpides, N.C., Mavromatis, K., Markowitz, V.M., Palaniappan, K., et al. (2015). Draft genome sequence of the cellulolytic and xylanolytic thermophile *Clostridium clariflavum* strain 4-2a. *Genome Announc.* 3.
- Rosengren, K.J., Clark, R.J., Daly, N.L., Göransson, U., Jones, A., and Craik, D.J. (2003). Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12464–12474.
- Rudolph, C., Wanner, G., and Huber, R. (2001). Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2336–2344.
- Sandman, K., Krzycki, J.A., Dobrinski, B., Lurz, R., and Reeve, J.N. (1990). HMf, a DNA-binding protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*, is most closely related to histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5788–5791.
- Sarmiento, F., Mrázek, J., and Whitman, W.B. (2013). Genome-scale analysis of gene function in the hydrogenotrophic methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4726–4731.
- Sato, H., and Feix, J.B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1245–1256.
- Savage, K.N., Krumholz, L.R., Oren, A., and Elshahed, M.S. (2007). *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 19–24.
- Savage, K.N., Krumholz, L.R., Oren, A., and Elshahed, M.S. (2008). *Halosarcina pallida* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon from a low-salt, sulfide-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 856–860.
- Scharnagl, C., Reif, M., and Friedrich, J. (2005). Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochim. Biophys. Acta* 1749, 187–213.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H.P., and Zillig, W. (1995). *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* 177, 7050–7059.
- Schobert, B., and Lanyi, J.K. (1982). Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* 257, 10306–10313.

- Seckbach, J. (2007). *Algae and cyanobacteria in extreme environments* (Springer Science & Business Media).
- Seegerer, A., Langworthy, T.A., and Stetter, K.O. (1988). *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfatara Fields. *Syst. Appl. Microbiol.* *10*, 161–171.
- Settanni, L., and Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* *121*, 123–138.
- Severinov, K., Semenova, E., Kazakov, A., Kazakov, T., and Gelfand, M.S. (2007). Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Mol. Microbiol.* *65*, 1380–1394.
- Shand, R.F., and Leyva, K.J. (2007). Peptide and protein antibiotics from the domain *Archaea*: halocins and sulfobiocins. In *Bacteriocins*, P.D.M.A. Riley, and D.M.A. Chavan, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 93–109.
- Shao, H., Xu, L., and Yan, Y. (2014). Biochemical characterization of a carboxylesterase from the archaeon *Pyrobaculum* sp. 1860 and a Rational Explanation of Its Substrate Specificity and Thermostability. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 16885–16910.
- Sharma, S., Waterfield, N., Bowen, D., Rocheleau, T., Holland, L., James, R., and ffrench-Constant, R. (2002). The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* *214*, 241–249.
- Shinozawa, S., Araki, Y., Utsumi, K., and Oda, T. (1979). Stabilizing effects of cholesterol on changes in membrane permeability and potential induced in red blood cells by lysolecithin. *Physiol. Chem. Phys.* *11*, 161–167.
- Siddiqui, K.S., and Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 403–433.
- Silver, S., and Phung, L.T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 753–789.
- Sime-Ngando, T., Lucas, S., Robin, A., Tucker, K.P., Colombet, J., Bettarel, Y., Desmond, E., Gribaldo, S., Forterre, P., Breitbart, M., et al. (2011). Diversity of virus-host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal. *Environ. Microbiol.* *13*, 1956–1972.
- Singh, S.P., Raval, V.H., Purohit, M.K., Thumar, J.T., Gohel, S.D., Pandey, S., Akbari, V.G., and Rawal, C.M. (2012). Haloalkaliphilic bacteria and actinobacteria from the saline habitats: new opportunities for biocatalysis and bioremediation. In *Microorganisms in Environmental Management*, T. Satyanarayana, B.N. Johri, and A. Prakash, eds. (Springer Netherlands), pp. 415–429.
- Solbiati, J.O., Ciaccio, M., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (1996). Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J. Bacteriol.* *178*, 3661–3663.

- Soppa, J. (2006). From genomes to function: haloarchaea as model organisms. *Microbiol. Read. Engl.* 152, 585–590.
- Stanier, R., Doudoroff, M., and Adelberg, E. (1963). *The microbial world*, 2nd edn.
- Stan-Lotter, H., Pfaffenhuemer, M., Legat, A., Busse, H.-J., Radax, C., and Gruber, C. (2002). *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1807–1814.
- Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I., and Entian, K.-D. (2003). Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 278, 89–94.
- Stetter, K. (2001). *Methanothermus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (New York: Springer New York), pp. 233–235.
- Stetter, K.O., König, H., and Stackebrandt, E. (1983). *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 535–551.
- Stetter, K.O., Huber, R., Blöchl, E., Kurr, M., Eden, R.D., Fielder, M., Cash, H., and Vance, I. (1993). Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature* 365, 743–745.
- Summons, R. (1999). Microbial ecology: Molecular probing of deep secrets. *Nature* 398, 752–753.
- Sun, C., Li, Y., Mei, S., Lu, Q., Zhou, L., and Xiang, H. (2005). A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. *Mol. Microbiol.* 57, 537–549.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., and Stenström, T.A. (1994). Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1810–1813.
- Cowan, D.A. (2004). The upper temperature for life – where do we draw the line? *Trends Microbiol.* 12, 58–60.
- Tansey, M.R., and Brock, T.D. (1972). The upper temperature limit for eukaryotic organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2426–2428.
- Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Itoh, T., Parkin, K.L., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Valyasevi, R. (2008). *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2378–2383.
- Thomas, N.A., Bardy, S.L., and Jarrell, K.F. (2001). The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 147–174.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (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.
- Tindall, B.J. (2003). Taxonomic problems arising in the genera *Haloterrigena* and *Natrinema*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1697–1698.
- Torreblanca, M., Meseguer, I., and F. Rodriguez-Valera (1990). Effects of halocin H6 on the morphology of sensitive cells. *Biochem Cell Biol* 396–399.
- Torsvik, T., and Dundas, I.D. (1974). Bacteriophage of *Halobacterium salinarium*. *Nature* 248, 680–681.
- Ugalde, J.A., Narasingarao, P., Kuo, S., Podell, S., and Allen, E.E. (2013). Draft genome sequence of “*Candidatus Halobonum tyrrellensis*” strain G22, isolated from the hypersaline waters of lake Tyrrell, Australia. *Genome Announc.* 1.
- Uratani, J.M., Kumaraswamy, R., and Rodríguez, J. (2014). A systematic strain selection approach for halotolerant and halophilic bioprocess development: a review. *Extrem. Life Extreme Cond.* 18, 629–639.
- Uzelac, G., Kojic, M., Lozo, J., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Gabrielsen, C., Kristensen, T., Nes, I.F., Diep, D.B., and Topisirovic, L. (2013). A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a Class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *J. Bacteriol.* 195, 5614–5621.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., Lombard, C., Rebuffat, S., and Peduzzi, J. (2010). Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 288–297.
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzon, D., and Peduzzi, J. (2011). Class II Microcins - Springer. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. pp. 309–332.
- Veith, A., Klingl, A., Zolghadr, B., Lauber, K., Mentele, R., Lottspeich, F., Rachel, R., Albers, S.-V., and Kletzin, A. (2009). *Acidianus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* surface layers: structure, composition and gene expression. *Mol. Microbiol.* 73, 58–72.
- Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Kamekura, M., and Dyll-Smith, M.L. (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 Pt 1, 131–136.
- Vizán, J.L., Hernández-Chico, C., del Castillo, I., and Moreno, F. (1991). The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO J.* 10, 467–476.

- Wagner, G., Hartmann, R., and Oesterhelt, D. (1978). Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem. FEBS* 89, 169–179.
- Wang, H., and van der Donk, W.A. (2012). Biosynthesis of the class III lantipeptide catenulipeptin. *ACS Chem. Biol.* 7, 1529–1535.
- Wang, S., Yang, Q., Liu, Z.-H., Sun, L., Wei, D., Zhang, J.-Z., Song, J.-Z., and Yuan, H.-F. (2010). *Haloterrigena daqingensis* sp. nov., an extremely haloalkaliphilic archaeon isolated from a saline-alkaline soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2267–2271.
- White, M.F., and Bell, S.D. (2002). Holding it together: chromatin in the *Archaea*. *Trends Genet. TIG* 18, 621–626.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452–1456.
- Wiegel, J., Braun, M., and Gottschalk, G. (1981). *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr. Microbiol.* 5, 255–260.
- Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. F1000Prime Rep. 7.
- Willey, J.M., and van der Donk, W.A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 477–501.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- Woese, C.R., Fox, G.E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B.J., and Stahl, D. (1975). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254, 83–86.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4576–4579.
- Woods, W.G., and Dyall-Smith, M.L. (1997). Construction and analysis of a recombination-deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii*. *Mol. Microbiol.* 23, 791–797.
- Wright, A.-D.G. (2006). Phylogenetic relationships 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., and Nakase, T. (2000). *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 3, 1297–1303.
- Xu, X.-W., Ren, P.-G., Liu, S.-J., Wu, M., and Zhou, P.-J. (2005a). *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.

- Xu, X.-W., Liu, S.-J., Tohty, D., Oren, A., Wu, M., and Zhou, P.-J. (2005b). *Haloterrigena saccharevitans* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Xin-Jiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2539–2542.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C.T., and Fang, J.-Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* 5.
- Yip, K., Stillman, T., Britton, K., Artymiuk, P., Baker, P., Sedelnikova, S., Engel, P., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Consalvi, V., et al. (1995). The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3, 1147–1158.
- Yorgey, P., Davagnino, J., and Kolter, R. (1993). The maturation pathway of microcin B17, a peptide inhibitor of DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* 9, 897–905.
- Zamaroczy, M. de, and Chauleau, M. (2011). Colicin killing: foiled cell defense and hijacked cell functions. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (Springer New York), pp. 255–287.
- Zgurskaya, H.I., Krishnamoorthy, G., Ntrel, A., and Lu, S. (2011). Mechanism and function of the outer membrane channel TolC in multidrug resistance and physiology of enterobacteria. *Antimicrob. Resist. Chemother.* 2, 189.
- Zhang, X.-Y., Fan, X., Qiu, Y.-J., Li, C.-Y., Xing, S., Zheng, Y.-T., and Xu, J.-H. (2014). Newly identified thermostable esterase from *Sulfobacillus acidophilus*: properties and performance in phthalate ester degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6870–6878.
- Zhilina, T.N., and Zavarzin, G.A. (1987). *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp. The extremely halophilic methanogenic archaeobacterium. *Dokl Akad Nauk SSSR* 293, 464–468.
- Zobell, C.E., and Johnson, F.H. (1949). The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J. Bacteriol.* 57, 179–189.
- Zolghadr, B., Weber, S., Szabó, Z., Driessen, A.J.M., and Albers, S.-V. (2007). Identification of a system required for the functional surface localization of sugar binding proteins with class III signal peptides in *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.* 64, 795–806.
- Zolghadr, B., Klingl, A., Rachel, R., Driessen, A.J.M., and Albers, S.-V. (2011). The bindosome is a structural component of the *Sulfolobus solfataricus* cell envelope. *Extrem. Life Extreme Cond.* 15, 235–244.

Annexe

Publications

Article publié:

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

Articles en préparation :

Besse, A., Vandervennet, M., Peduzzi, J., Isaac, S., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A. Halocin C8, an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* and *Halobacterium*.

➔ Publication envisagée dans FEMS microbial ecology

Besse, A., Vandervennet, M., Peduzzi, J., Boccara, M., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A. Antimicrobial interplays in hypersaline environments: delineating the contributions of antimicrobial peptides and viruses.

➔ Publication envisagée dans Extremophiles

Colloques

Besse, A., Vandervennet, M., Peduzzi, J., Isaac, S., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A.
Communication orale: Microbial interactions in hypersaline environments
YNHM, Février 2014, Paris MNHN

Besse, A., Vandervennet, M., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A.
Poster: Halocin C8, an antimicrobial peptide produced by halophilic archaea belonging to the genera *Natrinema* and *Haloterrigena*.

GDR archées, Mai 2015, Toulouse

Besse, A., Vandervennet, M., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A.

Poster: Halocin C8, an antimicrobial peptide produced by halophilic archaea belonging to the

genera *Natrinema* and *Haloterrigena*

La microbiologie dans tous ses états, Janvier 2016, Paris Jussieu

Besse, A., Vandervennet, M., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and Carré-Mlouka, A.

Communication orale: . Halocin C8, an antimicrobial peptide widely distributed among the genera *Natrinema* and *Haloterrigena*.

Halophiles international meeting, Mai 2016, San Juan, Puerto rico

Autres activités scientifiques

Mission de terrain dans la saline Cabo Rojo à Puerto Rico. Echantillonnage de 4 bassins de salinité différente afin de détecter la présence du gène *halC8* dans le génome des organismes colonisateurs. **Puerto Rico - Mai 2016**

Représentante des étudiants et post-doctorants au conseil d'unité de l'UMR 7245. **Paris - 2013-2016**

Membre du comité scientifique lors du congrès international YNHM. **Paris – Février 2014**

Résumé

Les archées halophiles sont des procaryotes vivant dans des conditions d'extrême salinité. Ces micro-organismes colonisent les environnements hypersalins et synthétisent des peptides antimicrobiens appelés halocines, qui pourraient leur conférer un avantage sélectif sur leurs compétiteurs. Parmi les peptides antimicrobiens d'archées halophiles décrits, on distingue l'halocine C8, initialement purifiée à partir de la souche halophile *Natrinema* sp. AS7092. Ce travail de thèse a permis de montrer que la production d'halocine C8 était conservée chez des plusieurs archées halophiles appartenant aux genres : *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* et *Halobacterium*. Une activité antimicrobienne associée des particules supérieures à 100 kDa non infectieuses, suggèrent que l'halocine C8 est synthétisée dans des vésicules. Ce travail présente des résultats qui déboucheront sur une meilleure compréhension des compétitions microbiennes dans les environnements hypersalins et du rôle écologique des halocines.