



**HAL**  
open science

# Biosynthèse et régulation de l'expression des altérines, peptides antibiotiques produits par des bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas*

Hélène Cuny

► **To cite this version:**

Hélène Cuny. Biosynthèse et régulation de l'expression des altérines, peptides antibiotiques produits par des bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas*. *Biotechnologies*. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0084 . tel-04416403

**HAL Id: tel-04416403**

**<https://theses.hal.science/tel-04416403>**

Submitted on 25 Jan 2024

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 598

*Sciences de la Mer et du littoral*

Spécialité : Biotechnologies

Par

**Héléna CUNY**

**Biosynthèse et régulation de l'expression des altérines,  
peptides antibiotiques produits par des bactéries  
marines du genre *Pseudoalteromonas***

Thèse présentée et soutenue à Quimper, le 23 Novembre 2021

Unité de recherche : LBCM EA3884, Université de Bretagne Occidentale

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Valérie LECLERE

Professeure des universités, Université de Lille

Annick MEJEAN

Professeure des universités, Université de Paris Diderot

## **Composition du Jury :**

### **Présidente de jury**

Claire HELLIO

Professeure des universités, Université de Bretagne Occidentale

### **Examineurs**

Valérie LECLERE

Professeure des universités, Université de Lille

Annick MEJEAN

Professeure des universités, Université de Paris Diderot

Romain CHEVROT

Maître de conférences, Université de La Rochelle

### **Directeur de thèse**

Yannick FLEURY

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

### **Co-directeur de thèse**

Alexis BAZIRE

Maître de conférences, Université de Bretagne Sud

---

# Remerciements

---

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines. Mes premiers remerciements vont aux Universités de Bretagne Occidentale et de Bretagne Sud pour le financement de ces trois ans de contrat doctoral. Je remercie également les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer ce travail de recherche : Annick Méjean et Valérie Leclere, rapporteurs de ce manuscrit ainsi que Claire Hellio, Romain Chevrot, Alexis Bazire et Yannick Fleury, membres de ce jury de thèse.

Merci à Lionel Cladière et Romain Chevrot, membres de mon comité de thèse, qui ont suivi mon travail au cours de ces 3 années. Merci pour votre attention, votre soutien et vos conseils précieux qui m'ont permis d'avancer dans la bonne direction au cours de ces trois ans.

Je tiens à remercier Isabelle Linossier, Yannick Fleury, Alexis Bazire et Nathalie Bourgognon de m'avoir accueillie et permis de réaliser ma thèse au sein du LBCM.

Un très grand merci à mon équipe de direction de thèse, Yannick Fleury, Alexis Bazire et Benjamin Brillet.

Yannick, merci pour ton accueil à mon arrivée dans cette équipe, qui a d'ailleurs bien évolué depuis ce jour ! J'ai beaucoup appris de toi, aussi bien dans le domaine professionnel qu'humain. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, ta détermination et ta patience au long de ces trois années où tu m'as accompagnée dans ce périple qu'est la thèse.

Alexis, tu me connais depuis mon arrivée en terre bretonne. Tout d'abord, merci de m'avoir donné ma chance en licence 3 à Lorient. Depuis, sept ans sont passés et me voilà à terminer une thèse. Merci pour ton accueil, ta disponibilité, ta confiance, ton humour et ta bonne humeur.

Benjamin, merci pour ton accompagnement au cours de ce projet BREx6 (d'ailleurs, c'est à toi que l'on doit cet acronyme...). J'ai beaucoup appris grâce à toi et j'ai pu évoluer scientifiquement et humainement. Merci pour tes conseils et le temps que tu as pu consacrer à m'aider et à me guider !

Je tiens à remercier chaleureusement Alain Dufour, qui a été présent depuis le début de cette thèse et même avant qu'elle ne débute. Merci pour ta gentillesse et tes conseils avisés.

Merci à l'équipe du LBCM de Quimper pour sa « gentillesse et bienveillance ». Quelle équipe singulière que nous formons.

Camille, merci pour ta sincérité et ton humour (à la ZeWar) accompagnée de références (que je n'ai jamais). Merci pour ton partage d'expériences, tes conseils aussi bien pour les manip que l'avancement de la thèse. Je n'oublierai pas les superbes plongées dans ton pays Bigouden.

Claire, quel parcours depuis ton entretien au premier jour de ma thèse : ton stage et tes passages en tant qu'ingénieure dans l'équipe... Maintenant, te voilà l'une des nôtres depuis quelques mois. Je te souhaite une belle réussite pour ta thèse et surtout de profiter au max de cette expérience ! Merci pour ta gentillesse, ton attention et ton humour.

Clément, cela a été un réel plaisir d'échanger et travailler avec toi. Merci pour tes conseils, ta patience, ta pédagogie, tes retours d'expériences et ton implication. J'apprécie beaucoup ton humour, ta ténacité et ton investissement. En revanche, ton caractère... on fait avec !

Fanny, merci d'avoir fortement contribué au bien-être de l'équipe par tes excellents cafés du matin, merci également pour ton humour, ta gentillesse et aussi de m'avoir supportée en face de toi tous les jours !

Hélène, ma coéquipière de thèse... Nous avons débuté nos thèses en même temps. Bien que nous soyons très différentes et que quelques années nous séparent, nous nous sommes entendu dès le début. Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée et d'avoir pu travailler avec toi. Tu n'imagines pas à quel point ton expérience, tes conseils, ton humour (bien que discutable, tout comme celui de Grape) ont pu être nécessaires et essentiels au cours de ces trois ans. Je te suis extrêmement reconnaissante pour tout ce que tu as pu m'apporter. J'espère que nos chemins se recroiseront et je te souhaite un beau parcours à suivre. Merci ZeWar !

Leila, la plus française d'Iranie. Je suis très heureuse d'avoir croisé ton chemin. Merci pour ta bonne humeur, ton rire (et tes cris !), tes petites marques d'attention, les cours de prononciation du farsi... Merci pour tous ces moments riches que nous avons passés ensemble. ممنون ليلا



Patrick, je n'ai jamais rencontré quelqu'un qui te ressemble, même de loin. Chaque échange avec toi a été un réel plaisir. Merci pour ta bonne humeur, ton humour à la Jazon, ton humilité, ton honnêteté, ton implication et le partage de tes expériences mais également de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de la plongée. Tu fais partie de « ces gens qui marquent les esprits » JBZ !

Merci aux stagiaires Camille, Cyrielle et Maëlle qui ont pris part à mon projet de thèse sans compter leurs heures. Un petit mot particulier pour Garance et Baptiste, le binôme si complémentaire : bonne chance pour la relève. Cela a été un réel plaisir de vous rencontrer !  
Merci à tous pour les moments si importants au sein d'une équipe : Les pauses caf', les tournois de fléchettes, les tournois de pétanques, sorties prélèvements ou plongées aux Glénan et à la pointe de Brézellec mais aussi tous les autres moments du quotidien qui ont fait de mon passage à Quimper une expérience inoubliable. Petit clin d'œil à Michel et Momo, concombre de mer et homard de compagnie, qui n'ont été que de passage mais avaient bel et bien leur place au sein de l'équipe.

Je tiens aussi à remercier Denis, Mehdi et Estelle pour leur accueil, leur sympathie et leurs conseils côté enseignement.

Merci à tous les membres du LBCM de Lorient et de Vannes que j'ai connus comme étudiante mais également collègues. Merci également à Alexandra, Tatiana, Mathieu et Florian pour votre accueil lors de mes passages au LBCM Lorient. Albane, merci pour ton partage d'expériences et tes bons conseils.

Bien sûr, je ne peux pas oublier l'équipe « du bout du couloir » qui a également été accueillante et présente tout au long de ma thèse.

Je remercie enfin mes proches de m'avoir soutenue et accompagnée pendant ce long parcours.

J'ai bien grandi grâce à vous tous et je garderai de très bons souvenirs inoubliables, c'en est une certitude ! Fais « Chmire » que ça s'arrête, c'est bien N.U.L. que tout ait une fin. J'espère que mon bout de chemin avec vous ne s'arrêtera pas ici !



---

# Sommaire

---

<b>Avant-propos.....</b>	<b>18</b>
<b>Etude bibliographique.....</b>	<b>26</b>
1. Structures des lipopeptides.....	31
2. Activités des lipopeptides et mécanismes d'action .....	37
2.1. Activités anti-fongiques .....	37
2.2. Activités anti-bactériennes .....	38
2.3. Activités anti-tumorales.....	41
2.4. Activités anti-inflammatoires.....	41
2.5. Activités anti-virales.....	41
3. Applications des lipopeptides .....	42
4. Relation structure-activité des polymyxines.....	44
4.1. Structure peptidique.....	44
4.1.1. Résidus Dab .....	44
4.1.2. Motifs peptidiques hydrophobes .....	44
4.1.3. Tripeptide de connexion.....	44
4.2. Autres éléments de structure .....	45
4.2.1. Chaîne hydrocarbonée .....	45
4.2.2. Structure cyclique .....	45
4.2.3. Multipeptides .....	45
5. Mécanismes de résistance .....	46
5.1. Antibiorésistances.....	46
5.2. Résistance aux lipopeptides.....	49
5.3. Résistance aux polymyxines.....	49

5.3.1.	Modifications des LPS .....	50
5.3.1.1.	La Phosphoéthanolamine (pEtN).....	50
5.3.1.2.	Le 4-amino-4-deoxy-L-Arabinose (L-Ara4N).....	52
5.3.1.3.	La galactosamine .....	53
5.3.2.	Perte des lipopolysaccharides .....	53
5.3.3.	Autres systèmes de résistance aux polymyxines .....	54
6.	Biosynthèse et régulation .....	54
6.1.	Non Ribosomal Peptide Synthetases .....	55
6.2.	Peptides issus des voies non ribosomales .....	60
7.	Prédiction des métabolites peptidiques .....	61
<b>Chapitre 1 – Diversité chimique des altérines .....</b>		<b>68</b>
1.	Introduction.....	70
2.	Altérines, une nouvelle famille de cyclolipopeptides marins antibactériens .....	72
3.	Conclusion .....	81
<b>Chapitre 2 – Bactéries d'intérêt du genre <i>Pseudoalteromonas</i> .....</b>		<b>82</b>
1.	Introduction.....	84
2.	Description et caractérisation de la nouvelle espèce <i>Pseudoalteromonas ostreae</i> ....	85
3.	Conclusion .....	98
<b>Chapitre 3 – Non ribosomal peptide synthetases chez le genre <i>Pseudoalteromonas</i> .....</b>		<b>100</b>
1.	Introduction.....	102
2.	Etude des systèmes Non Ribosomal Peptide Synthetases au sein du genre <i>Pseudoalteromonas</i> .....	103
3.	Conclusion .....	121
<b>Chapitre 4 – Biosynthèse des altérines .....</b>		<b>122</b>
1.	Introduction.....	124
2.	Biosynthèse des altérines chez <i>Pseudoalteromonas rhizosphaerae</i> hCg-6 .....	125

3. Conclusion .....	146
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>148</b>
<b>Références.....</b>	<b>156</b>
<b>Valorisation scientifique .....</b>	<b>192</b>
Publications scientifiques.....	194
Communications orales en congrès scientifiques.....	195
Communications par affiches en congrès scientifiques.....	196
<b>Annexes.....</b>	<b>198</b>



---

# Liste des figures

---

Figure 1. Structure chimique des altérines (Desriac <i>et al.</i> 2020).....	23
Figure 2. Exemple de structure de lipopeptide linéaire, Pubchem.....	32
Figure 3. Structure des ogipeptines (Hirota-Takahata <i>et al.</i> 2017).....	34
Figure 4. Structure peptidique de (A) la polymyxine B et de (B) la polymyxine E ou colistine, PubChem. ....	35
Figure 5. Structure chimique de la daptomycine, PubChem. ....	36
Figure 6. Mode d'action de la daptomycine sur une membrane de bactérie Gram positif (Heidary <i>et al.</i> 2018).....	38
Figure 7. Structure d'un LPS bactérien (Galdiero <i>et al.</i> 2012).....	39
Figure 8. Mode d'action des polymyxines sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Li et Velkov 2019).....	40
Figure 9. Résistances innées et acquises chez une bactérie à Gram négatif (Hobson <i>et al.</i> 2021). .....	47
Figure 10. Mécanismes de résistance aux polymyxines (Moffatt <i>et al.</i> 2019). ....	49
Figure 11. Fixation de pEtN au lipide A d'un LPS (Reynolds <i>et al.</i> 2005). ....	51
Figure 12. Mécanisme de résistance aux polymyxines chez la bactérie <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Jeannot <i>et al.</i> 2017).....	52
Figure 13. Structure d'un lipide A lié à un L-Ara4N (bleu) (Breazeale <i>et al.</i> 2003). ....	53
Figure 14. Principe d'assemblage des peptides non ribosomiaux par les synthétases NRPS. .	55
Figure 15. Différentes réactions catalysées par les domaines des NRPS (Sieber et Marahiel 2005).....	57

Figure 16. (A) Prise en charge d'une chaîne hydrocarbonée par un domaine Cstarter module NRPS. (B) Exemple chez la rhizomide A (Zhong <i>et al.</i> 2021).	58
Figure 17. Distribution de peptides non ribosomaux recensés sur la base de données NORINE en fonction de leur taille (nombre de monomères).	60
Figure 18. Approche de "genome-mining" pour l'identification de bactéries productrices de métabolites secondaires valorisables ainsi que leurs clusters de gènes de biosynthèse.	63
Figure 19. Données de structure et fonctions biologiques de lipopeptides de la base de données NORINE.	65
Figure 20. Diagramme de Venn des familles de gènes des souches <i>Pseudoalteromonas</i> sp. hOe-66, hOe-124 et hOe-125	84
Tableau 1. Classes de peptides antimicrobiens (Wang 2017).	28
Tableau 2. Liste de quelques peptides antimicrobiens isolés de microorganismes.	29
Tableau 3. Exemples de familles de lipopeptides linéaires non ribosomaux, NORINE database, <a href="https://bioinfo.lifl.fr/norine/">https://bioinfo.lifl.fr/norine/</a>	32
Tableau 4. Liste des familles de lipopeptides cycliques non ribosomaux, NORINE.	33
Tableau 5. Domaines spécifiques pour l'incorporation de résidus spécifiques ou la modification des monomères au cours de l'assemblage par les mega-enzymes NRPS.	59
Tableau 6. Exemples des méthodes de séquençage haut débit et leurs utilisations (Bertelli et Greub 2013).	62
Tableau 7. Numéros d'accèsion des séquences ARNr 16S et draft des génomes des souches de <i>Pseudoalteromonas ostreae</i> . ND, Non déposé.	98



---

## Liste des annexes

---

Annexe 1. Table S1.1: Genome statistics of <i>Pseudoalteromonas ostreae</i> hOe-66 <sup>T</sup> .....	200
Annexe 2. Table S1.2: Primer sequences ordered from Eurogentec. Primer for RT-qPCR designed for <i>Pseudoalteromonas rhizosphaerae</i> hCg-6. ....	201
Annexe 3. Figure S1: UPLC/MS chromatograms of <i>Pseudoalteromonas rhizosphaerae</i> hCg-6 and <i>Pseudoalteromonas</i> sp. HM-SA03 with the same alterin production profile for both strains in MB. ....	202



---

# Liste des abréviations

---

A	Adenylation domain
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Al <sup>3+</sup>	Aluminium
Ala	Alanine
ANI	Average Nucleotide Identity
APD	Antimicrobial Peptide Database
ARN	Acide RiboNucléique
Asn	Asparagine
Asp	Acide Aspartique
AMP	Adénosine MonoPhosphate
ATP	Adénosine TriPhosphate
BaAMPs	Biofilm-active AntiMicrobial Peptides
BGC	Biosynthetic Gene Cluster
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Condensation domain
CAMP	Collection of AntiMicrobial Peptides
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
CDS	Coding DNA Sequence
CECT	Coleccion Espanola de Cultivo Tipo
CIDRAP	Center for Infectious Disease Research and Policy
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CLP	CycloLipoPeptide
Cy	Cyclization domain
Dab	Acide diaminobutyrique
DBAASP	DataBase of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides
DgkA	Diacylglycerol kinase
DRAMP	Data Repository of AntiMicrobial Peptides
E/C	Epimerization/Condensation domain
EptA	Phosphoéthanolamine transférase
F	Formylation domain
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe <sup>3+</sup>	Fer

Glu	Acide Glutamique
Gly	Glycine
HPLC-HRMS	High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry
Kb	Kilo base
Kdo	Acide 3-deoxy-d-manno-octulosonique
Kyn	Acide kynurenic
LAMP	Database Linking AntiMicrobial Peptides
L-Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinose
Leu	Leucine
LPS	LipoPolysaccharide
MB	Marine Broth
MCR	Mobilizable Colistin Resistance
MDR	Multi-Drugs Resistant bacteria
Mg <sup>2+</sup>	Magnésium
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NM	Domaine N-méthylation
NRPS	Non Ribosomal Peptide Synthétase
OIE	World Organization for Animal Health
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies
Orn	Ornithine
Ox	Domaine d'oxydation
PAM	Peptide AntiMicrobien
PCP	Domaine Peptidyl Carrier Protein
pEtN	Phosphoéthanolamine
Phe	Phénylalanine
PLA2	PhosphoLipase A2
PlantPepDB	Plant Peptide Database
PKS	Polyketide Synthase
ppan	Phosphopantéthéine
PPi	Pyrophosphate
RiPP	Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rn	Domaine de réduction
RND	Résistance-Nodulation-Division
RT-qPCR	Reverse Transcription and quantitative Polymerase Chain Reaction
SAR	Structure-Activity Relation
Ser	Sérine
SMRT	Single Molecule Real Time
TCS	Two Component System
TE	Domaine Thioesterase
Thr	Thréonine
Trp	Tryptophane
TSB <sub>NaCl</sub>	Tryptone Soja Broth enrichie en Chlorure de sodium
UFC	Unités Formant Colonie
WGS	Whole Genome Sequencing
YADAMP	Yet Another Database of AntiMicrobial Peptides
Zn <sup>2+</sup>	Zinc



---

# **Avant-propos**

---





Selon les prévisions de l'Organisation des Nations Unies (ONU), la population mondiale devrait atteindre 9,7 Milliards de personnes d'ici 2050 et 11 Milliards d'ici 2100. Cette croissance démographique est liée à l'amélioration des niveaux de vie et aux progrès de la médecine réduisant ainsi la mortalité infantile et augmentant l'espérance de vie globale (ONU 2019). Afin de permettre à tous d'accéder à une alimentation adéquate à l'horizon 2030 (défi « Faim Zéro »), l'ONU a mis en place des objectifs de développement durable. Ils visent notamment à assurer la sécurité alimentaire et promouvoir des systèmes de production alimentaire durables en doublant la productivité tout en assurant la viabilité de ces derniers (FAO 2015). L'aquaculture est le secteur de la production alimentaire qui se développe le plus vite (Pandiyani *et al.* 2013). Selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), elle deviendra la source principale d'approvisionnement en poisson d'ici 2030.

Cependant, l'aquaculture connaît les mêmes difficultés que les élevages d'animaux terrestres. Depuis la fin du XIXe siècle, lors de la révolution agricole et industrielle, les exploitations se sont développées afin de répondre à la demande mondiale croissante avec des élevages intensifs d'animaux. Ce type de production intensive favorise la dissémination des infections bactériennes. Cela a entraîné l'utilisation massive d'antibiotiques de manière préventive et métaphylactique, c'est-à-dire le traitement d'un groupe d'individus lorsque seulement l'un d'entre eux est infecté (Serrano et Nations 2005 ; Cabello 2006 ; Shamsuzzaman 2012 ; Gao *et al.* 2012 ; Rico *et al.* 2013 ; Song *et al.* 2016). Les antibiotiques ont été utilisés non seulement pour inhiber la croissance de bactéries pathogènes (Sapkota *et al.* 2008) mais également pour favoriser la croissance des animaux (Li *et al.* 2020).

Ce recours aux antibiotiques est très controversé parce qu'il a largement participé à l'apparition d'antibiorésistances. En effet, la présence quasi permanente d'antibiotiques tels que l'oxytétracycline ou le florfenicol au sein des élevages aquacoles crée une pression de sélection sur les bactéries présentes (Lulijwa *et al.* 2020). Que ces bactéries soient pathogènes ou non, cette pression permet aux souches résistantes à l'antibiotique de survivre et de se développer.

Pour limiter les répercussions de l'antibiorésistance, des efforts de prévention et des interdictions d'utilisation sont imposés par la législation européenne depuis 2006 tels que le

règlement européen interdisant l'utilisation d'antibiotiques additifs, pour des effets facteurs de croissance, dans l'alimentation des animaux de production (CIDRAP 2021). Malheureusement, tous les pays ne portent pas le même niveau d'attention à ce problème environnemental et de santé publique. Beaucoup utilisent toujours les antibiotiques de manière abusive tels que les Etats Unis où 80% des antibiotiques sont destinés aux animaux (OMS 2017). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation (FAO) ont présenté une approche multisectorielle, « Un monde, une santé », afin de réunir les professionnels de compétences multiples dans la lutte contre les zoonoses et les résistances aux antibiotiques.

Afin de diminuer le risque d'apparition de nouvelles souches résistantes, multirésistantes, voire pan-résistantes qui sont de plus en plus difficiles à éradiquer, il est urgent de proposer des alternatives à l'utilisation d'antibiotiques (ONU 2021).

Parmi les alternatives possibles, la vaccination est un moyen de prévention permettant de diminuer l'utilisation d'antibiotiques. Elle permet de réduire le risque infectieux, comme dans le cas de la pneumonie ou de la méningite causées par *Streptococcus pneumoniae* chez l'Homme (Weiser *et al.* 2018 ; Feldman et Anderson 2020) ou encore de la septicémie hémorragique en pisciculture causée par la bactérie *Aeromonas salmonicida* (Vanden Bergh et Frey 2014 ; Vasquez *et al.* 2020). Toutefois, dans le cas de l'aquaculture, plusieurs freins à l'essor de la vaccination sont identifiés, notamment son coût financier dans un contexte de marché considéré comme limité et aux réglementations strictes (Conseil consultatif de l'aquaculture, 2018).

Il est également possible de sélectionner génétiquement des animaux afin d'exploiter les lignées plus résistantes aux défis environnementaux tels que le risque infectieux. Ce moyen, appelé « amélioration génétique », permet de développer des espèces résistantes aux maladies et ainsi limiter l'utilisation d'antibiotiques (FAO 2019). Cependant, l'homogénéité génétique d'un élevage fait courir un risque de mortalité importante en cas d'apparition d'une bactérie pathogène.

Une autre des alternatives est l'utilisation de probiotiques, aussi bien en agriculture qu'en aquaculture, afin de protéger et favoriser la croissance des élevages tout en limitant l'utilisation d'antibiotiques. Les probiotiques sont définis comme des compléments alimentaires composés d'organismes vivants ayant une action bénéfique pour l'hôte en

améliorant l'équilibre du microbiote intestinal (Fuller 1989 ; Verschuere *et al.* 2000). L'aquaculture piscicole et conchylicole peut être développée par l'utilisation de probiotiques dans une alimentation améliorée. Ils facilitent la digestion par action enzymatique, inhibent les pathogènes, améliorent la réponse immunitaire et peuvent également jouer le rôle d'agent(s) antimutagène(s) et anticarcinogène(s) (Pandiyan *et al.* 2013).

La recherche de nouveaux microorganismes probiotiques adaptés pour l'aquaculture, telles que les bactéries ouvre donc des voies de développement importantes. L'environnement est une source naturelle de souches et de composés d'intérêt, notamment le milieu marin qui reste un réservoir sous-exploré (Moran 2015). En effet, l'eau de mer est contient environ  $1.10^4$  UFC/mL (Zweifel et Hagstrom 1995). Des organismes filtreurs, tels que les bivalves, ont une capacité de filtration d'environ 10L/h ce qui en fait des agents biologiques naturels pouvant alors sélectionner des bactéries d'intérêt.

Dans ce contexte, le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) des Universités de Bretagne Occidentale (UBO) et de Bretagne Sud (UBS), s'attache à la sélection et la caractérisation de bactéries d'intérêt isolées d'organismes marins tels que les bivalves ou les échinodermes. En 2007 et 2013, l'équipe du LBCM a réalisé un criblage de bactéries actives isolées à partir d'hémolymphe d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et d'huîtres plates *Ostrea edulis* (Defer *et al.* 2013 ; Desriac *et al.* 2014). Cinq souches bactériennes du genre *Pseudoalteromonas* ont été sélectionnées pour leurs activités anti-bactériennes puissantes contre les bactéries pathogènes notamment du genre *Vibrio*. Les nouveaux composés bioactifs responsables de l'activité ont été purifiés, caractérisés et nommés altérines (Desriac *et al.* 2020). L'utilisation de la souche *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 et des altérines est protégée par le brevet US9956262B2 (Desriac *et al.* 2018).

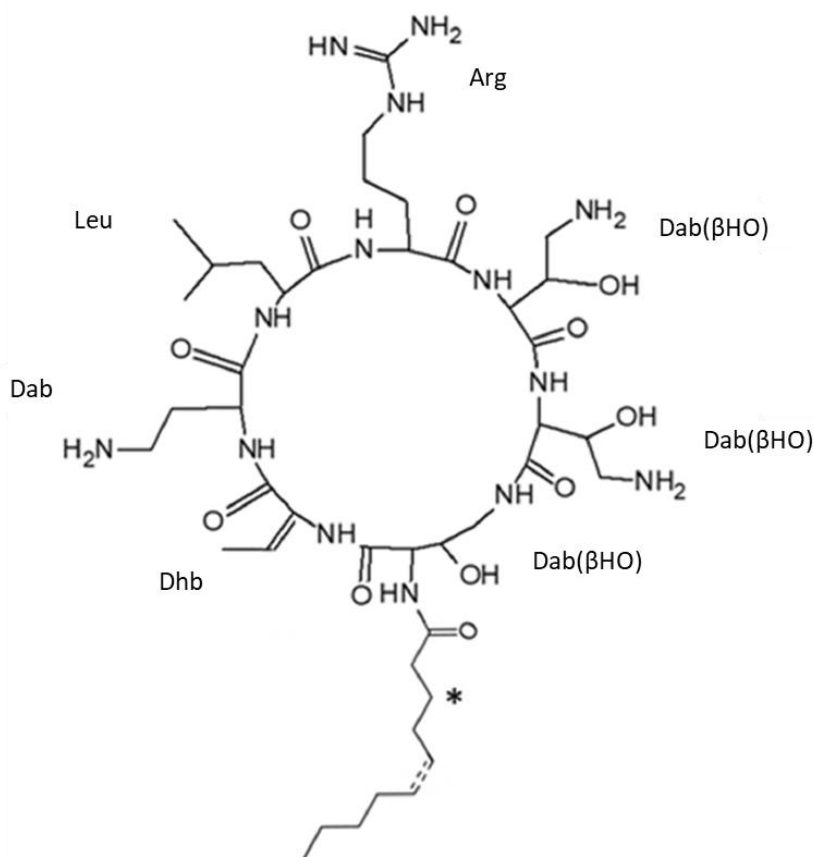


Figure 1. Structure chimique des altérines (Desriac *et al.* 2020).

Arg, arginine ;  $\beta$ -HO dab, acide  $\beta$ -hydroxydiaminobutyrique ; Dab, acide diaminobutyrique ; Dhb, déhydrobutyrine ; Leu, leucine.

Les altérines sont une famille de cyclolipopeptides amphiphiles (Figure 1). Ils sont composés d'un cycle heptapeptidique dont la séquence est Dab( $\beta$ HO)-Dhb-Dab-Leu-Arg-Dab( $\beta$ HO)-Dab( $\beta$ HO). Cette partie peptidique est hydrophile et cationique grâce aux charges positives des résidus d'acide diaminobutyrique (Dab), arginine (Arg) ou d'acide  $\beta$ -hydroxydiaminobutyrique (Dab( $\beta$ HO)). La partie lipophile est constituée par la chaîne hydrocarbonée portée par le premier résidu d'acide aminé du cycle, Dab( $\beta$ HO).

La composition en résidus d'acides aminés et la structure cyclique associées à la présence d'une chaîne hydrocarbonée semblent désigner une voie de biosynthèse non ribosomale. Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit fait suite aux travaux menés par Florie Desriac et Clément Offret. Il a pour objectif l'étude de la diversité chimique des altérines antibiotiques ainsi que l'identification de la voie de biosynthèse de ces peptides produits par des souches du genre *Pseudoalteromonas*.

Cette thèse a fait appel à plusieurs disciplines telles que la microbiologie, la génomique et la transcriptomique ainsi que des méthodes d'ingénierie génétique, de biochimie et de chimie analytique.

Ce manuscrit expose différents axes de ces recherches :

- L'étude bibliographique permettant de situer le contexte de l'étude sur les souches bactériennes actives, les altérines et leur voie de biosynthèse.
- La diversité chimique des altérines antibiotiques produites par les souches de *Pseudoalteromonas*.
- La caractérisation des souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines et l'analyse de leurs génomes.
- La description de la voie de biosynthèse des altérines chez les souches de *Pseudoalteromonas*.
- Les voies de biosynthèse de métabolites secondaires chez le genre *Pseudoalteromonas*.
- Une discussion générale et une conclusion.



---

## **Etude bibliographique**

---





Les peptides antimicrobiens (PAM) constituent un arsenal chimique de défense de l'hôte. Ubiquitaires dans la nature, ils ont en effet été décrits tout au long de l'évolution. Ils sont produits de manière constitutive ou en réponse à la présence d'un pathogène par un *stimulus* infectieux ou inflammatoire impliquant une réponse de l'immunité innée (Hancock 2001 ; Cunliffe et Mahida 2004 ; Bowdish *et al.* 2005 ; Brown et Hancock 2006). Les PAM permettent aux organismes de lutter contre des agents pathogènes tels que les virus (Skalickova *et al.* 2015), les champignons ou les bactéries mais ont également des activités antibiofilm (de la Fuente-Núñez *et al.* 2016), anticancer (Hoskin et Ramamoorthy 2008) ou des activités immunomodulatrices (Hilchie *et al.* 2013 ; Mansour *et al.* 2014). Ils peuvent être actifs contre des pathogènes résistants aux antibiotiques conventionnels ce qui en fait une piste d'alternative aux antibiotiques communément utilisés.

Les PAM sont regroupés en 4 grands groupes structuraux : hélices  $\alpha$ , brins  $\beta$ , boucles et structures plus complexes (Hancock 1997c ; Wang 2017). L'organisation en hélices  $\alpha$  est la forme la plus commune des PAM naturels représentant 58% des PAM de structure connue au sein de la base de données Antimicrobial Peptide Database (APD3) (Wang *et al.* 2016), regroupant notamment les cecropines et les magainines (Haney *et al.* 2017 ; Sun *et al.* 2018 ; Boparai et Sharma 2019). En 2017, Wang proposa une nouvelle classification des peptides basée sur leur structure (Tableau 1) :

Tableau 1. Classes de peptides antimicrobiens (Wang 2017).

<b>Classes</b>	<b>Nombre de PAM</b>	<b>Taille moyenne en acides aminés</b>	<b>Charge nette</b>	<b>Exemples</b>
L (Linéaire)	1513	22	+2,25	Magainines
S (Connexions sur chaînes latérales)	985	38	+3,99	Lantibiotiques (ex. nisine)
P (Connexions chaîne principale et latérale)	23	15	+0,09	Daptomycine, colistine
O (Circulaire)	197	30	+1,02	Cyclotides

Les PAM sont recensés dans les différentes bases de données généralistes telles que Antimicrobial Peptide Database (APD) (Wang et Wang 2004 ; Wang *et al.* 2016), Database of

Antimicrobial Activity and Structure of Peptides (DBAASP) (Gogoladze *et al.* 2014 ; Pirtskhalava *et al.* 2021), Data repository of antimicrobial peptides (DRAMP) (Fan *et al.* 2016 ; Kang *et al.* 2019), Yet Another Database of Antimicrobial Peptides (YADAMP) (Piotto *et al.* 2012), Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP) (Thomas *et al.* 2010 ; Waghu *et al.* 2014) ou Linking Antimicrobial Peptides (LAMP) (Zhao *et al.* 2013). Certaines bases de données sont plus spécialisées et classent les peptides selon certaines caractéristiques telles que l'origine (PlantPepDB (Das *et al.* 2020)), l'activité (Biofilm-active antimicrobial peptides (BaAMPs) (Di Luca *et al.* 2015)) ou la structure (Defensins knowledgebase (Seebah *et al.* 2007) ou encore leur mode de biosynthèse (NORINE (Flissi *et al.* 2020)). En effet, les PAM peuvent également être scindés en 2 catégories en fonction de leur voie de biosynthèse : ribosomale ou non ribosomale. La majorité des peptides antimicrobiens naturels sont produits par voie ribosomale sous forme de pro-peptides immatures aboutissant à une forme active de peptide mature.

Les microorganismes sont, à l'heure actuelle, la plus grande source de PAM naturels (Martin *et al.* 1995 ; Hancock 1997c ; Wang et Wang 2004) (Tableau 2). Le premier PAM caractérisé, la nisine, a été isolé d'une bactérie lactococque lactique (Mattick et Hirsch 1947).

Tableau 2. Liste de quelques peptides antimicrobiens isolés de microorganismes.

+ = Gram positif, - = Gram négatif. (Boparai et Sharma 2019)

<b>Peptides</b>	<b>Sources</b>	<b>Nb AA</b>	<b>Bactéries sensibles</b>	<b>Références</b>
Alamethicine	<i>Trichoderma viride</i>	20	Gram +	(Su <i>et al.</i> 2018)
Altérine	<i>Pseudoalteromonas rhizosphaerae</i> hCg-6	7	Gram -	(Desriac <i>et al.</i> 2020)
Carnobacteriocine B2	<i>Carnobacterium piscicola</i>	48	Gram +/-	(Hammi <i>et al.</i> 2016)
Carnobacteriocine BM1	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	43	Gram +/-	(Tulini <i>et al.</i> 2014)
Circularine A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 25752	69	Gram +/-	(Perez <i>et al.</i> 2016)
Daptomycine	<i>Streptomyces roseosporus</i>	13	Gram +	(Heidary <i>et al.</i> 2018)
Divercine V41	<i>Carnobacterium divergens</i> V41	43	Gram +	(Brillet-Viel <i>et al.</i> 2016)

## Etude bibliographique

Enterocine	<i>Enterococcus</i>	70	Gram +/-	(Ben Braïek <i>et al.</i> 2018)
Enterocine P	<i>Enterococcus faecium</i> P13	44	Gram +	(Le <i>et al.</i> 2014)
Ericine S	<i>Bacillus subtilis</i>	32	Gram +	(Sharma <i>et al.</i> 2018)
Gassericine A	<i>LactoBacillus gasseri</i> LA39	58	Gram +/-	(Maldonado-Barragán <i>et al.</i> 2016)
Gramicidine A	<i>Bacillus brevis</i>	15	Gram +/-	(Muhammad <i>et al.</i> 2016)
Hominicine	<i>Staphylococcus hominis</i> MBBL 2-9	21	Gram +/-	(Ebrahimipour <i>et al.</i> 2014)
Leucocine A	<i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i>	37	Gram +/-	(Chen <i>et al.</i> 2018)
Lichenine	<i>Bacillus licheniformis</i>	12	Gram +/-	(Gupta <i>et al.</i> 2018)
Listeriocine 743A	<i>Listeria innocua</i> 743	43	Gram +	(Wan <i>et al.</i> 2013)
Mesentericine Y105	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	37	Gram +	(Arakawa <i>et al.</i> 2016)
Microcine J25	<i>Escherichia coli</i> AY25	21	Gram -	(Zhao <i>et al.</i> 2016)
Nisine	<i>Lactococcus lactis</i>	34	Gram +	(Mills <i>et al.</i> 2017)
Pediocine PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0	44	Gram +	(Araújo <i>et al.</i> 2016)
Planosporicine	<i>Planomonospora alba</i>	24	Gram +/-	(Raja et Gajalakshmi 2017)
Plantaricine A	<i>LactoBacillus plantarum</i>	26	Gram +/-	(Jiang <i>et al.</i> 2018)
Plantaricine ASM1	<i>LactoBacillus plantarum</i> A-1	43	Gram +	(Wang <i>et al.</i> 2018)
Plantaricine C19	<i>LactoBacillus plantarum</i> C19	37	Gram +	(Wang <i>et al.</i> 2018)
Polymyxine B	<i>Paenibacillus</i>	10	Gram -	(Li et Velkov 2019)
Pyricularia thionin	<i>Pyricularia pubera</i>	47	Gram +/-	(Guzmán-Rodríguez <i>et al.</i> 2015)
Streptine 1	<i>Bacillus subtilis</i> A1/3	23	Gram +	(Bosma <i>et al.</i> 2011)
Subtiline	<i>Bacillus subtilis</i>	32	Gram +	(Singh <i>et al.</i> 2017)
Subtilosine A	<i>Bacillus subtilis</i>	35	Gram +/-	(Venturina <i>et al.</i> 2016)

Les peptides non ribosomiaux sont moins nombreux que les autres types de PAM. Néanmoins, ils constituent les exemples les plus probants en terme d'applications thérapeutiques. En

effet, la colistine (Colimycine®) ou la daptomycine (Cubicine®) sont utilisées en médecine humaine pour lutter contre les infections par des bactéries à Gram positif et Gram négatif respectivement.

Ces deux antibiotiques peptidiques sont des lipopeptides constitués d'une partie peptidique associée à une chaîne hydrocarbonée. Ce type de lipopeptides est classiquement synthétisé par des bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* mais peut également être produit par d'autres bactéries, des champignons ou des levures.

Cette revue de la littérature est consacrée aux lipopeptides bactériens non ribosomiaux ; les cyclolipopeptides de la famille des polymyxines seront particulièrement détaillés du fait de leurs homologies structurales et fonctionnelles avec les altérines étudiées au cours de cette thèse.

## **1. Structures des lipopeptides**

De manière générale, les lipopeptides sont composés de 4 à 25 résidus d'acides aminés.

Selon la base de données NORINE qui regroupe les peptides non ribosomiques, 314 lipopeptides bactériens sont à ce jour, en Octobre 2021, recensés et regroupés en 37 familles. Parmi celles-ci, 5 familles regroupent 85 lipopeptides cycliques bactériens alors que les autres familles peuvent être de structure doublement cyclique, partiellement cyclique, ramifiée ou encore linéaire (Tableau 3 et Figure 2).

Tableau 3. Exemples de familles de lipopeptides linéaires non ribosomaux, NORINE database, <https://bioinfo.lifl.fr/norine/>.

Familles de peptides	Genre	Masse (Da)	Nb AA	Isoformes	Référence
Amphibactines	<i>Vibrio</i>	858	4	8	(Martinez <i>et al.</i> 2003)
Apramides	<i>Lyngbya</i>	978	7	7	(Luesch <i>et al.</i> 2000)
Aquachelines	<i>Halomonas</i>	1065	7	4	(Martinez <i>et al.</i> 2003)
Carmabines	<i>Lyngbya</i>	703	4	2	(Hooper <i>et al.</i> 1998)
Corrugatine	<i>Pseudomonas</i>	1033	8	1	(Risse <i>et al.</i> 1998)
Syringafactines	<i>Pseudomonas</i>	1082	8	10	(Berti <i>et al.</i> 2007)
Tolaasin	<i>Pseudomonas</i>	2004	18	1	(Bassarello <i>et al.</i> 2004)

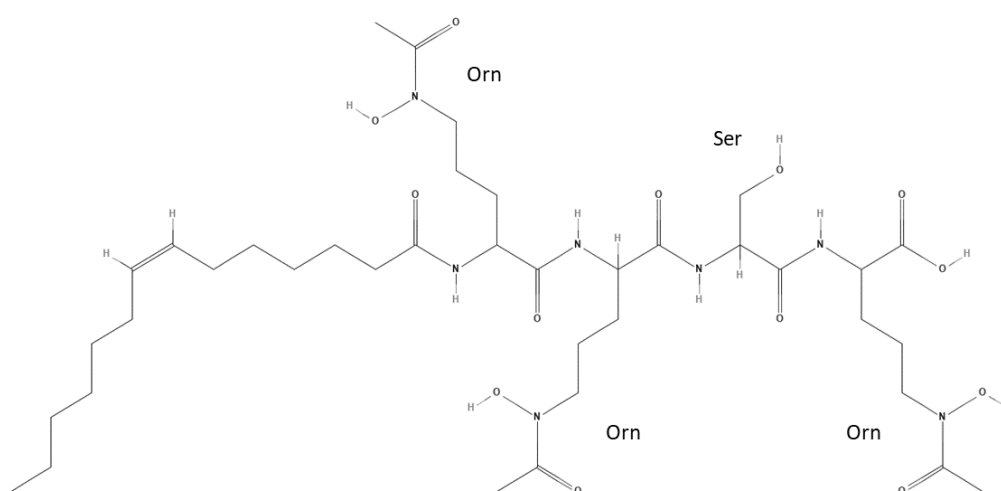


Figure 2. Exemple de structure de lipopeptide linéaire, Pubchem.

Amphibactine S. Orn, ornithine; Ser, serine.

Les cyclolipopeptides (CLP) sont des oligopeptides cycliques portant une chaîne hydrocarbonée. Les CLP ont des structures variées avec des chaînes hydrocarbonées de 6 à 18 carbones, saturées ou non, hydroxylées ou non, méthylées ou non. La partie peptidique est variable, allant de 2 à 25 résidus d'acides aminés, de configuration L ou D. Par ailleurs, des résidus d'acides aminés non protéinogéniques sont fréquemment retrouvés dans les CLP. Ces

structures originales leur permettent d'éviter une dégradation par les protéases de l'environnement (Moffatt *et al.* 2019).

La base NORINE recense 113 CLP qui peuvent être regroupés en 8 familles (Tableau 4).

Tableau 4. Liste des familles de lipopeptides cycliques non ribosomaux, NORINE.

<b>Famille de peptides</b>	<b>Genre</b>	<b>Masse (Da)</b>	<b>Nb AA</b>	<b>Référence</b>
Beauverolides	<i>Beauveria</i>	529	3	(Kuzma <i>et al.</i> 2001)
Iturines	<i>Bacillus</i>	1029	7	(Besson <i>et al.</i> 1990)
Jessenipeptine	<i>Pseudomonas</i>	1905	19	(Arp <i>et al.</i> 2018)
Kulomo opunalide	<i>Phillinopsis</i>	716	5	(Nakao <i>et al.</i> 1998)
Plusbacines	<i>Pseudomonas</i>	1130	8	(Shoji <i>et al.</i> 1992)
Serrawettines	<i>Serratia</i>	514	2	(Sunaga <i>et al.</i> 2004)
Surfactines	<i>Bacillus</i>	1008	7	(Arima <i>et al.</i> 1968)
Tripeptines	<i>Lysobacter</i>	1126	8	(Hashizume <i>et al.</i> 2004)

Les altérines sont des CLP de masse moléculaire entre 926 et 982 Da. Leur structure a été déterminée par des analyses RMN à spectre 2D homonucléaire et hétéronucléaire. Elles sont composées d'un cycle de 7 résidus d'acides aminés de séquence : Dab( $\beta$ HO)-Dhb-Dab-Leu-Arg-Dab( $\beta$ HO)-Dab( $\beta$ HO) portant une chaîne hydrocarbonée allant de 8 à 12 carbones avec ou sans insaturation ou hydroxylation (Figure 1) (Desriac *et al.* 2020).

Cette structure est très proche des ogipeptines produites par la souche *Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 (Hirota-Takahata *et al.* 2017 ; Kozuma *et al.* 2017). Cette famille de CLP regroupe 4 ogipeptines allant de 955 à 1009 Da dont les structures diffèrent par la longueur (10 à 14 carbones) et la présence d'insaturation ou non sur la chaîne hydrocarbonée (Figure 3). Les altérines ont la même séquence peptidique que les ogipeptines mais diffèrent par la stéréoisomérisation du résidu Dhb d'insaturation Z chez les ogipeptines et E chez les altérines (Desriac *et al.* 2020).

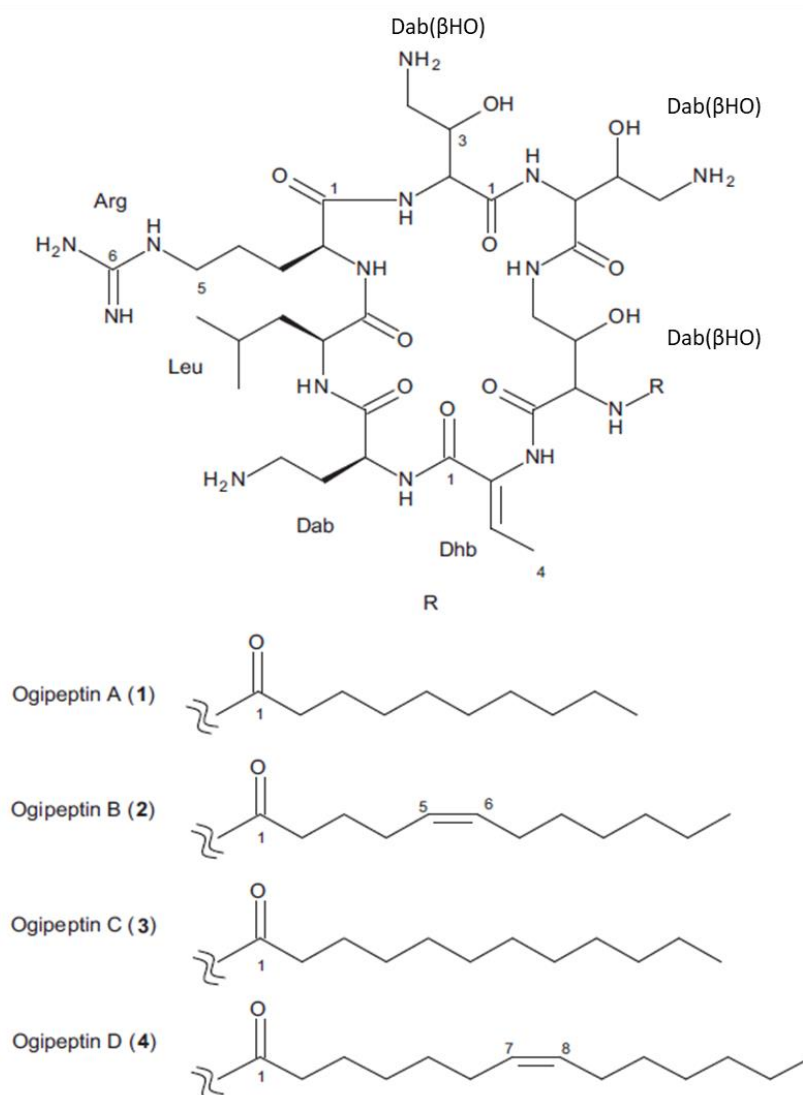


Figure 3. Structure des ogipeptines (Hirota-Takahata *et al.* 2017).

Arg, arginine ;  $\beta$ -HO dab, acide  $\beta$ -hydroxydiaminobutyrique ; Dab, acide diaminobutyrique ; Dhb, déhydrobutyrique ; Leu, leucine.

D'autres cyclolipopeptides sont dit partiellement cycliques lorsqu'une partie des résidus d'acides aminés sont externes au macrocycle peptidique tels que chez les polymyxines et la daptomycine.

La famille des polymyxines comprend 7 groupes, notés A, B, C, D, E, M et P (Stansly et Brownlee 1949 ; Martin *et al.* 2003 ; Niu *et al.* 2013). Les polymyxines A, C et D ne sont pas utilisées en médecine humaine à cause de leur néphrotoxicité et leur neurotoxicité (Loho et Dharmayanti 2015). La colistine, du groupe des polymyxines E, est un peptide utilisé pour le traitement des infections par des bactéries à Gram négatif. Elle a été découverte à la fin des

années 40 et elle est produite par *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus* (Ainsworth *et al.* 1947 ; Henriksen *et al.* 2007 ; Naghmouchi *et al.* 2011 ; Park *et al.* 2012).

Les polymyxines B et E (Colistine) ne sont utilisées qu'en dernier recours pour traiter les infections par des bactéries à Gram négatif multirésistantes telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii* (Falagas et Kasiakou 2005). Les polymyxines sont des lipopeptides cycliques d'environ 1,2 kDa, synthétisés par voie non ribosomale chez plusieurs bactéries du genre *Paenibacillus*. Elles sont constituées d'un cycle de 7 résidus d'acides aminés Dab-Dab-Leu-Leu-Dab-Dab-Thr ainsi que d'un tripeptide de connexion Dab-Thr-Dab et d'une chaîne hydrocarbonée au niveau N terminal du tripeptide (Figure 4) (Katz et Demain 1977).

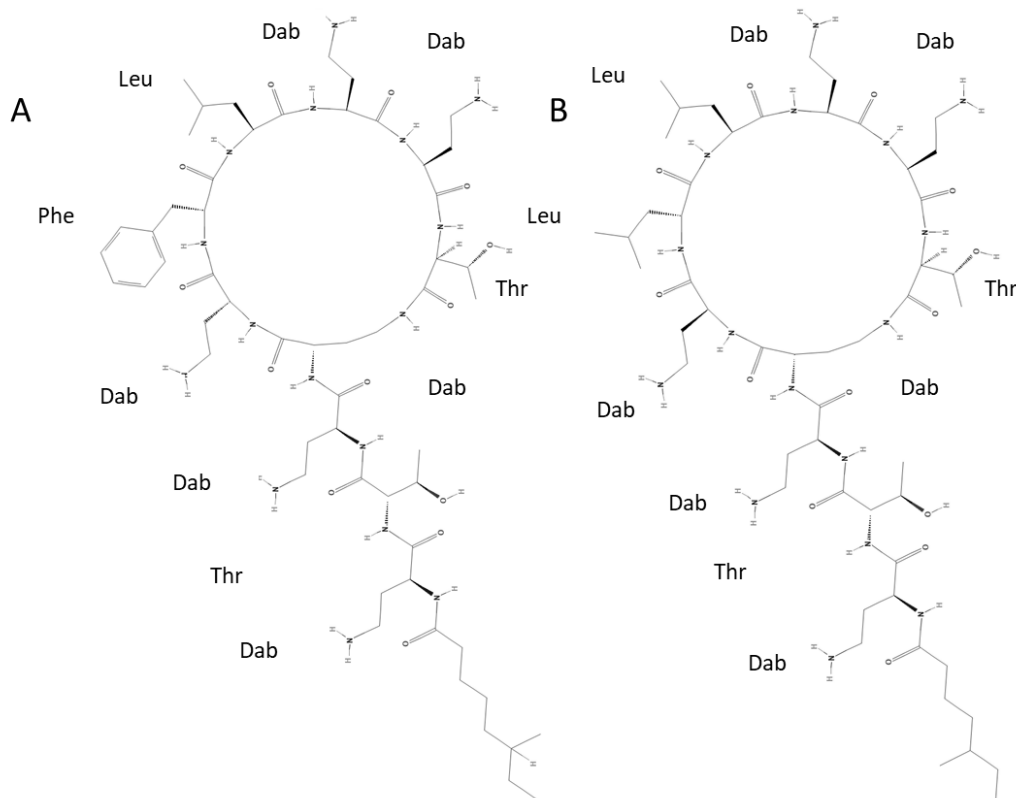


Figure 4. Structure peptidique de (A) la polymyxine B et de (B) la polymyxine E ou colistine, PubChem.

Dab, acide diaminobutyrique ; Thr, threonine ; Phe, phénylalanine ; Leu, leucine.

Le peptide est composé d'acides aminés D- et L-. Les résidus d'acides aminés du cycle peuvent varier d'une polymyxine à une autre, notamment le résidu en position 6 qui peut être une D-Phénylalanine (Polymyxine B) ou une D-Leucine (Colistine) (Figure 4). Cinq des résidus ont une fonction amine libre donnant le caractère cationique à la molécule. Cette partie peptidique



est hydrophile et la chaîne hydrocarbonée est hydrophobe, ce qui confère le caractère amphiphile nécessaire à l'activité biologique du peptide.

Par comparaison, la daptomycine est un CLP proche des polymyxines, de 1,6 kDa composé de 13 résidus d'acides aminés dont 10 forment le cycle peptidique selon l'enchaînement Thr-Kyn-Glu-Ser-Gly-Asp-Ala-Asp-Orn-Gly (Figure 5). Trois autres acides aminés sont liés au cycle sur le premier résidu du cycle (Thr) : Asp-Asn-Trp. Enfin, une chaîne hydrocarbonée C10:0 est reliée à la partie peptidique par le tripeptide de connexion. Cette structure et la composition en acides aminés confèrent à la daptomycine une charge globale négative participant à l'activité biologique de la molécule contre les bactéries à Gram positif (Tedesco et Rybak 2004).

Elle est naturellement produite par *Streptomyces roseosporus*. Elle est utilisée dans le traitement d'infections cutanées, d'endocardites et autres infections causées par des bactéries à Gram positif dont les pathogènes multirésistants tels que *Staphylococcus aureus* résistants à la méthiciline (MRSA) ou à la vancomycine (VRSA).

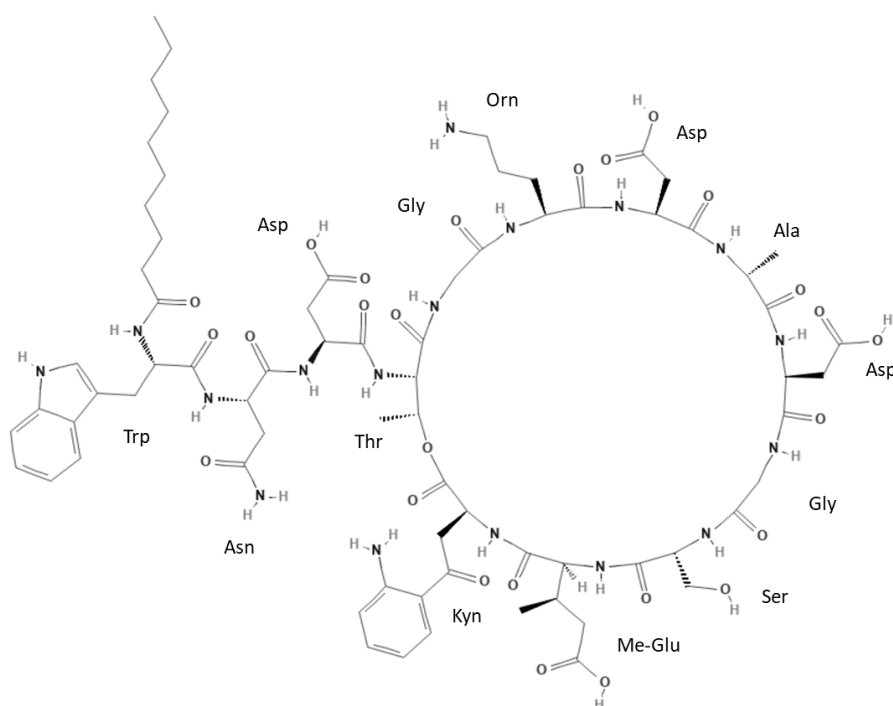


Figure 5. Structure chimique de la daptomycine, PubChem.

Trp, tryptophane ; Asn, asparagine ; Asp, acide aspartique ; Gly, glycine ; Orn, ornithine ; Ser, serine ; Me-Glu, acide glutamique-4-méthylène ; Kyn, acide kynurenique.

## 2. Activités des lipopeptides et mécanismes d'action

Les lipopeptides produits par genre *Bacillus* (les surfactines, les iturines et les fengycines) comptent parmi les plus étudiés (Zhao *et al.* 2017). C'est également le cas des lipopeptides du genre *Pseudomonas* qui sont comptés à plus de 100 lipopeptides réunis en 14 familles

### 2.1. Activités anti-fongiques

Les activités anti-fongiques et modes d'actions des lipopeptides contre les champignons et levures pathogènes sont nombreux et parmi les plus décrites (Ongena et Jacques 2008 ; Geudens et Martins 2018).

Les iturines dont les bacillomycines (*Bacillus vallismortis*) et les mycosubtilines (*Bacillus subtilis*), les fengycines mais également les plipastatines (*Bacillus subtilis*) ou les surfactines (*Bacillus subtilis*) dont les pumilacidines (*Bacillus pumilus*) présentent des activités anti-fongiques contre, par exemple, *Aspergillus flavus* qui produit des aflatoxines hépatotoxiques et *Colletotrichum gleosporioides* responsable de l'antracnose chez les fruits tropicaux (Venkateswerlu 1981 ; Robens et Richard 1992 ; Volpon *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 2008 ; Mohammadipour *et al.* 2009 ; Melo *et al.* 2009 ; Zhao *et al.* 2010, 2014 ; Béchet *et al.* 2012, 2013 ; Siddiqui et Ali 2014 ; Pathak et Keharia 2014). La micafungine et la caspofungine sont, quant à elles, utilisées chez l'Homme pour traiter les infections fongiques telles que celles causées par *Aspergillus* ou *Candida*. *Pseudomonas* est également un genre bactérien connu pour sa biosynthèse de lipopeptides ayant des activités antifongiques comme les sclerosines ou les lokisines (Berry *et al.* 2012 ; Gu *et al.* 2020).

L'iturine A, produite par *Bacillus subtilis*, cible en premier lieu les membranes en augmentant la perméabilité aux ions par formation de pores (Han *et al.* 2015). Elle peut créer des agrégats avec les surfactines ce qui augmenterait l'activité anti-fongique des iturines (Cazorla *et al.* 2007). Les iturines pourraient avoir une action fongicide par des interactions avec des composants intracellulaires tels que les cholestérols et les bicouches phospholipidiques (Zhang *et al.* 2013).

Les lipopeptides sont fongicides grâce à la formation de pores dans les membranes, l'induction d'apoptose ou encore la perturbation de mécanismes cellulaires (Cho *et al.* 2009 ; Qi *et al.* 2010 ; Ajesh *et al.* 2013 ; Tang *et al.* 2014 ; Mnif et Ghribi 2015 ; González-Jaramillo *et al.* 2017).

## 2.2. Activités anti-bactériennes

L'activité anti-bactérienne est l'activité biologique la plus fréquemment décrite pour les lipopeptides. Les lipopeptides interagissent avec les LPS des membranes des bactéries à Gram négatif en déplaçant des cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) (Powers et Hancock 2003) ou avec les acides lipoteichoïques des peptidoglycanes de membranes de bactéries à Gram positif (Canepari et Boaretti 1996). Ces interactions électrostatiques sont suivies d'interactions hydrophobes avec les parties lipidiques des membranes.

Les lipopeptides sont caractérisés par leur structure amphiphile (Jenssen *et al.* 2006 ; Bahar *et al.* 2015) et portent pour la grande majorité une charge globale positive (charge nette entre +2 et +9), leur permettant d'interagir à la fois avec les composants lipidiques et les groupements phosphates des membranes bactériennes. La combinaison de leur structure cationique et amphiphile leur permet de perturber la membrane cytoplasmique bactérienne, entraînant la mort cellulaire par choc osmotique. En effet, les PAM peuvent déstabiliser la membrane et/ou créer des pores et/ou traverser la membrane vers le compartiment intracellulaire (Brogden 2005).

Des lipopeptides anioniques telle que la daptomycine ont été également décrits. La daptomycine cible les bactéries à Gram positif par interaction avec le phosphatidylglycérol des membranes et crée une dépolarisation membranaire rapide lors de son insertion calcium-dépendante dans la membrane. Cette dépolarisation entraîne une fuite de potassium, de magnésium et d'ATP intracellulaires (Figure 6) (Ho *et al.* 2008 ; Hobbs *et al.* 2008 ; Muraih *et al.* 2012).

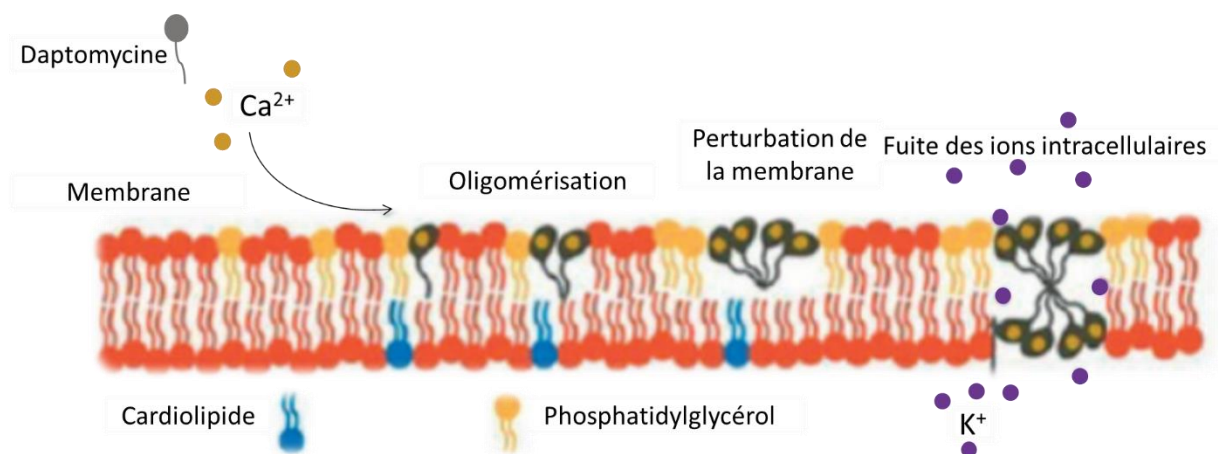


Figure 6. Mode d'action de la daptomycine sur une membrane de bactérie Gram positif (Heidary *et al.* 2018).

Les polymyxines sont actives contre les bactéries à Gram négatif. Etant des polypeptides cationiques, elles interagissent avec les LPS chargés négativement par des liaisons électrostatiques fortes. Les LPS sont constitués d'un antigène O, un lipide A et de polysaccharides chargés négativement. Les LPS sont stabilisés par les cations divalents tels que le calcium et le magnésium (Figure 7).

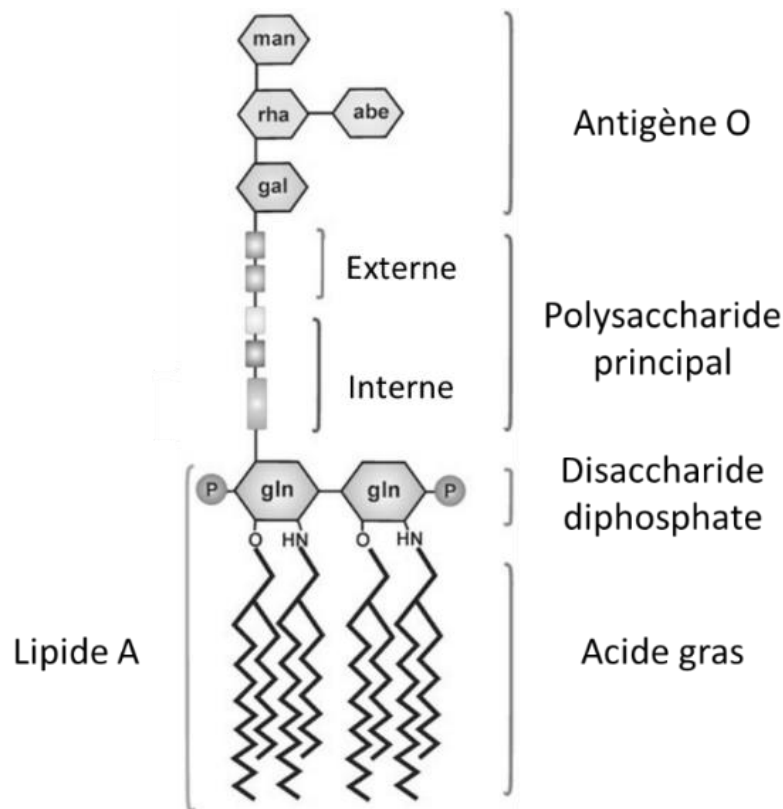


Figure 7. Structure d'un LPS bactérien (Galdiero *et al.* 2012)

Les charges positives, portées par les Dab des polymyxines, entrent en compétition avec les cations divalents de la membrane pour interagir avec les groupements phosphates des lipides A chargés négativement. Les cations divalents  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  stabilisent la membrane externe par leur action de pont entre les LPS. Par conséquent la polymyxine déplaçant ces derniers, elle diminue la stabilité membranaire (Figure 8).

Les chaînes hydrocarbonées de la polymyxine interagissent avec les chaînes hydrocarbonées des lipides A des LPS par des interactions hydrophobes, ce qui renforce l'attachement du peptide à la membrane bactérienne. Cette liaison perturbe la structure de la membrane entraînant une perte de stabilité (Clusell *et al.* 2007). Par la suite, la polymyxine s'insère dans

la bicouche lipidique de la membrane interne, entre les têtes hydrophiles et les chaînes hydrocarbonées, et perturbe la membrane (Hancock 1997a, 1997b, 2001 ; Hancock et Lehrer 1998 ; Hancock et Chapple 1999). La perméabilité cellulaire est augmentée ce qui aboutit à une fuite du contenu intracellulaire et la mort de la bactérie cible (Falagas et Kasiakou 2005).

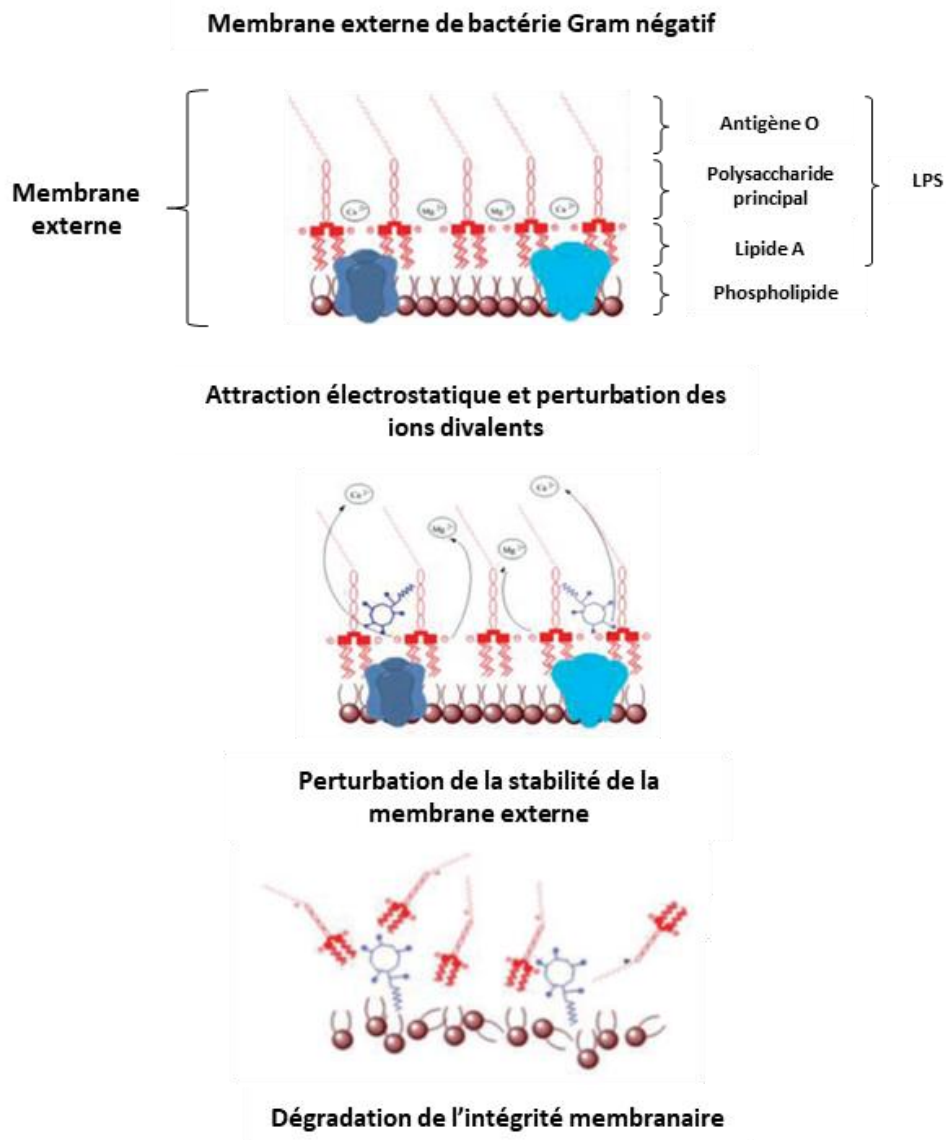


Figure 8. Mode d'action des polymyxines sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Li et Velkov 2019).

Les polymyxines peuvent avoir une activité anti-bactérienne par l'inhibition de la respiration bactérienne. Elles inhibent l'activité de l'oxydoréductase menaquinone-NADH<sub>2</sub> (NDH-2) au sein de la membrane interne chez *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* (Li et Velkov 2019).

Les altérines sont également des cyclolipoptides amphiphiles cationiques. Leur activité a été identifiée comme dépendant de leur capacité à interagir et à se lier aux LPS des membranes des bactéries à Gram négatif. Une perturbation de la membrane et une dépolarisation cellulaire sont observées lorsque les altérines sont mises en contact d'une bactérie telle que *Vibrio tasmaniensis*. Le mode d'action des altérines semble donc très proche de celui des polymyxines (Desriac *et al.* 2020).

### **2.3. Activités anti-tumorales**

Certains lipopeptides montrent des activités anti-tumorales en tuant ou limitant l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que les surfactines limitent la progression des lignées cellulaires d'un carcinome humain (Kim *et al.* 2007 ; Cao *et al.* 2010 ; Park *et al.* 2013). Les iturines ont montré une inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses telles que les cellules d'adénocarcinome pulmonaires (MDA-MB-231) et les cellules tumorales mammaires (MCF-7) ainsi qu'une induction de l'apoptose par inhibition de voies métaboliques et enzymatiques (Dey *et al.* 2015).

### **2.4. Activités anti-inflammatoires**

Des activités anti-inflammatoires sont retrouvées chez les surfactines. Ces cyclolipoptides inhibent un ensemble de protéines impliquées dans les mécanismes d'inflammation telle que la Phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique (PLA2). La PLA2 est impliquée dans la libération de facteurs d'inflammation de type prostaglandine et leukotriène (Kim *et al.* 1998). Les voies de signalisation Toll Like Receptor 4 (TLR4) et Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) impliquées dans le processus inflammatoire lors de l'activation des macrophages par les LPS, sont également atténuées (Mnif et Ghribi 2015 ; Zhang *et al.* 2015).

### **2.5. Activités anti-virales**

Les lipopeptides de *Bacillus subtilis* tels que les surfactines et les fengycines ont été décrits comme ayant un effet inactivateur des virus enveloppés tels la « pseudo-rage » de type Herpès qui est responsable de la maladie d'Aujeszky, semblable à la rage. Elles ont également un effet sur le parvovirus porcin qui engendre la Parvovirose au sein des élevages ou encore

le paramyxovirus de la maladie de Newcastle et le birnavirus de la bursite infectieuse. Ces virus touchent les oiseaux en général et les élevages aviaires (Huang *et al.* 2006). En revanche, le processus infectieux et la réplication des virus n'ont été affectés que dans le cas du paramyxovirus et du birnavirus. L'action de ces lipopeptides est supposée cibler les capsules virales et la morphogénèse.

Les lipopeptides ont des activités anti-virales en ciblant généralement l'enveloppe des virus ou en limitant l'interaction virus-hôte par intégration du lipopeptide à l'enveloppe virale (Robinson *et al.* 1998 ; Sitaram et Nagaraj 1999 ; Bastian et Schäfer 2001 ; Belaid *et al.* 2002 ; Horne *et al.* 2005). La surfactine est capable d'inactiver les enveloppes virales de l'Herpès virus, du virus Zika, du virus Chikungunya ou encore celle du virus Ebola (Raaijmakers *et al.* 2006). La surfactine a également un effet inhibiteur d'infection aux particules de coronavirus (CoV) par deux mécanismes déterminés *in vivo* : la destruction de la membrane virale ainsi que l'inhibition de la fusion entre la cellule hôte et la cellule virale (Johnson *et al.* 2019).

La longueur de la chaîne hydrocarbonée est déterminante pour l'activité anti-virale des surfactines contre les virus à enveloppe tels que le virus de l'immunodéficience humaine ou les coronavirus: plus l'hydrophobicité de la chaîne augmente, plus la capacité anti-virale augmente (Kracht *et al.* 1999). En effet, la chaîne hydrocarbonée permet au peptide de s'insérer dans la bicouche lipidique des enveloppes virales entraînant leur désintégration et empêchant l'adsorption et la pénétration des virus lors du processus infectieux.

### **3. Applications des lipopeptides**

Du fait de leurs activités biologiques et de leurs structures particulières (faible poids moléculaire), les lipopeptides trouvent de nombreuses applications dans différents secteurs industriels (Zhao *et al.* 2017) tels que :

- Le domaine pharmaceutique

Un usage des lipopeptides comme vecteurs naturels de composés médicamenteux est une alternative aux méthodes d'encapsulation synthétique (Gudiña *et al.* 2013).

Les lipopeptides ont des applications dans le domaine du biomédical pour le traitement d'infections fongiques et virales mais principalement bactériennes (Rodrigues *et al.* 2006). Des activités anti-bactériennes contre des bactéries multirésistantes ont été décrites pour la

surfactine active contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Das *et al.* 2008 ; Meena *et al.* 2020).

La daptomycine (Cubicin®), la teicoplanine (Targocid®) ou encore la dalbavancine (Xydalba®) et telavancine (Vibativ®) sont utilisées contre les bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus pneumoniae* dans le cas de pneumonie ou *Staphylococcus aureus*.

La colistine (Colimycine®) et la polymyxine B (Polydexa®) sont utilisées dans le traitement d'infections par des bactéries à Gram négatif comme dans le cas de septicémie, infection abdominale ou pulmonaires causées par *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii* (Ho *et al.* 2010). Dans le traitement contre des souches « Multi Drugs Resistant », les praticiens reviennent à l'utilisation d'antibiotiques tels que la colistine qui avaient peu à peu été remisés au profit de molécules moins toxiques (Li et Nation 2006 ; Antoniadou *et al.* 2007 ; Boucher *et al.* 2009 ; Michalopoulos et Karatza 2010). La colistine est alors de nouveau utilisée lorsqu'aucun autre antibiotique disponible n'est efficace contre une infection par une bactérie à Gram négatif MDR, malgré sa néphrotoxicité avérée (Biswas *et al.* 2012 ; Martis *et al.* 2014 ; Ordooei Javan *et al.* 2015).

- le domaine cosmétique

Les lipopeptides, d'origine microbienne, sont utilisés dans le domaine cosmétique. La surfactine possède des propriétés de surface permettant de diminuer la tension de surface conférant ses propriétés émulsifiantes et stabilisatrices ainsi qu'une faible toxicité (Kanlayavattanakul et Lourith 2010).

- le secteur agroalimentaire

Ils peuvent être utilisés dans le domaine agroalimentaire (Nitschke et Costa 2007). Les lipopeptides composés d'un cycle sont plus propices à la valorisation en tant que conservateurs alimentaires grâce à leur structure cyclique qui les rend moins sensibles aux protéases (Stein 2005 ; Mandal *et al.* 2013). Leurs propriétés antiadhésives et antimicrobiennes sont utilisées comme émulsifiants, agent de texture et de stabilité (Mandal *et al.* 2013).



## **4. Relation structure-activité des polymyxines**

Les différentes études des relations structure-activité (SAR) des polymyxines ont révélé des éléments de structure indispensables à l'activité contre les bactéries à Gram négatif (Velkov *et al.* 2010). Ces études de relation structure-activité ont été menées dans l'objectif d'améliorer ces antibiotiques aussi bien du point de vue de l'efficacité anti-bactérienne que du point de vue de leur toxicité.

### **4.1. Structure peptidique**

#### **4.1.1. Résidus Dab**

Les Dab présents dans le cycle des polymyxines jouent un rôle important dans les premières interactions polymyxine-LPS grâce à leurs charges positives. La suppression de ces charges par sulfomethylation entraîne la perte de l'activité de la polymyxine (Barnett *et al.* 1964). La distribution spatiale de ces charges positives importe également pour les interactions électrostatiques avec les lipides A des LPS (Velkov *et al.* 2010).

#### **4.1.2. Motifs peptidiques hydrophobes**

La polymyxine est un composé amphiphile qui possède des zones hydrophiles et hydrophobes. Le caractère hydrophobe est porté par la chaîne hydrocarbonée mais également par les résidus D-Phe et L-Leu du cycle peptidique. Ils permettent l'insertion dans la membrane externe ainsi que la stabilisation du complexe peptide-LPS par des interactions hydrophobes au même titre que la chaîne hydrocarbonée. Malgré une conservation importante de ces résidus dans les polymyxines naturelles, ils ne sont pas indispensables à l'activité antimicrobienne tant que le caractère hydrophobe est conservé (Velkov *et al.* 2010).

#### **4.1.3. Tripeptide de connexion**

Le cycle heptapeptidique de la polymyxine est relié à la chaîne hydrocarbonée par un tripeptide Dab-Thr-Dab dit de connexion. La perte de ce tripeptide de connexion entraîne la perte de l'activité antimicrobienne de la polymyxine. Les deux charges positives portées par les résidus Dab joueraient un rôle dans l'interaction avec le LPS. Seule la modification du résidu

Dab N-terminal n'entraîne pas la perte totale d'activité, bien qu'elle soit réduite d'un facteur 2 (Kanazawa *et al.* 2009).

## **4.2. Autres éléments de structure**

### **4.2.1. Chaîne hydrocarbonée**

La chaîne hydrocarbonée permet l'insertion du peptide dans la membrane externe et sa perturbation. La libération de la chaîne hydrocarbonée est réalisée par protéolyse à l'aide de protéases telles que la papaïne ou la ficine. La perte de l'acide gras entraîne la perte de l'activité antimicrobienne mais les interactions avec la membrane externe sont maintenues. De plus, la toxicité chez la souris est réduite. La chaîne hydrocarbonée est donc un élément important pour permettre l'activité antimicrobienne de la polymyxine mais elle est également à considérer pour envisager de réduire la toxicité de l'antibiotique (Vaara et Vaara 1983 ; Velkov *et al.* 2010).

### **4.2.2. Structure cyclique**

Le rôle de la structure cyclique des polymyxines a été évalué par la synthèse de polymyxine linéaire. Le cycle peptidique est décrit comme participant à la perméabilisation de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. L'analyse de l'activité anti-Gram négatif de polymyxines linéarisées a confirmé le rôle crucial de la structure cyclique des polymyxines. Des analogues linéaires de polymyxines ont montré que la perte de la structure cyclique entraîne la perte totale d'activité antimicrobienne. Ces résultats soulignent le caractère crucial de cette configuration cyclique dans l'activité de perméabilisation de la membrane (Vaara 1991).

### **4.2.3. Múltipeptides**

Le brevet, déposé par Griffin et Judice, décrit l'invention de múltipeptides composés de 2 à 10 peptides liés par des liaisons covalentes (Griffin et Judice 2002). Ces múltipeptides sont constitués de polymyxines, circuline (Murray et Tetrault 1949) ou octapeptines (Abou Fayad

*et al.* 2018). Ces multimères peptidiques permettent une fixation sur plusieurs lipides A des LPS, renforçant les interactions et l'activité antibiotique.

## **5. Mécanismes de résistance**

### **5.1. Antibiorésistances**

L'utilisation d'un antibiotique se traduit par l'élimination des bactéries sensibles et par voie de conséquence permet le développement de bactéries résistantes. Cette pression de sélection, résultant généralement d'un mauvais usage des antibiotiques, a favorisé l'apparition et le développement de l'antibiorésistance.

Les résistances aux antibiotiques peuvent être innées, lorsqu'elles sont dues à des gènes faisant partie du core-génome de l'organisme ou elles peuvent être acquises, lorsque les gènes conférant la résistance sont introduits dans un organisme sensible.

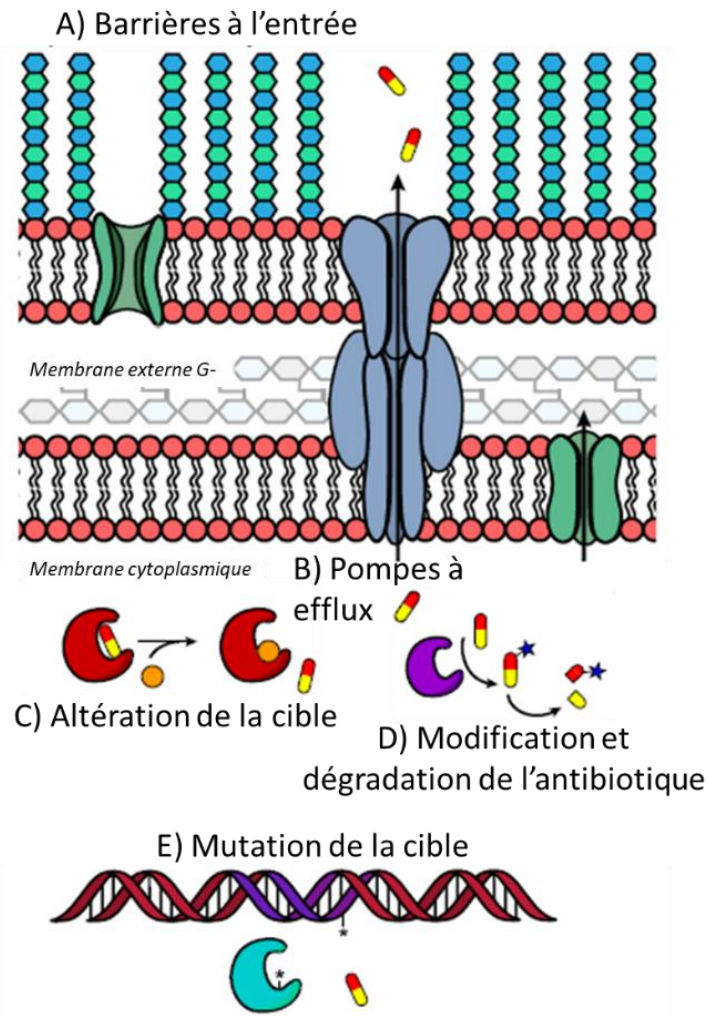


Figure 9. Résistances innées et acquises chez une bactérie à Gram négatif (Hobson *et al.* 2021).

Les résistances résultent de :

- l'acquisition d'un gène codant une enzyme inhibant l'action de l'antibiotique,
- l'imperméabilisation de sa membrane par une modification de la composition chimique ou de l'épaisseur de cette dernière, comme par exemple, avec la protéine OmpF d'*E.coli* (Figure 9A),
- l'utilisation de pompes à efflux comme les fluoroquinolones chez *S.aureus* (Figure 9B),
- la modification ou dégradation chimique de l'antibiotique lui-même pour en limiter l'accumulation par l'activation d'une voie métabolique alternative ou la surexpression d'enzymes dédiées, telle que la méthylase pour l'erythromycine chez les staphylocoques (Figure 9D).

- la modification ou la réduction de l'expression des cibles de l'antibiotique, telle que la protéine Penicillin-binding protein 2B des pneumocoques pour l'interaction avec la pénicilline (Figure 9C) (Tenover 2006 ; Yelin et Kishony 2018 ; Hobson *et al.* 2021).

D'un point de vue génomique, les résistances peuvent apparaître grâce à des mutations de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en amont ou au sein du gène, entraînant une modification de l'expression ou une altération de la cible de l'antibiotique ou de la protéine conférant la résistance (Figure 9E). Il est aussi possible de modifier l'expression d'un gène participant à la résistance par l'acquisition d'un promoteur ou en générant plusieurs copies du gène d'intérêt (Hiramatsu *et al.* 2001 ; Ameyama *et al.* 2002 ; Weigel *et al.* 2003 ; Toprak *et al.* 2011 ; Palmer et Kishony 2014 ; Chevereau *et al.* 2015 ; Liu *et al.* 2016 ; Zampieri *et al.* 2017).

Les transferts de gènes de résistance peuvent être verticaux, c'est-à-dire transmis avec le patrimoine génétique à la descendance ou bien horizontaux, par transformation, conjugaison ou transduction et l'acquisition d'un plasmide de résistance ou recombinaison génétique. De plus, contrairement aux mutations, il est de plus en plus fréquent que les résistances portées par les plasmides soient multiples (MDR). Les praticiens peuvent également faire face à des impasses thérapeutiques causées par des bactéries PanDrug Resistant (PDR) pour lesquelles aucun antibiotique n'est efficace.

Malgré l'observation de ce phénomène, l'utilisation d'antibiotiques s'est développée, parfois de manière abusive, entraînant l'augmentation des résistances et l'apparition de nouvelles souches MDR. Les résistances se sont donc propagées dans l'environnement (Rhodes *et al.* 2000 ; Miranda et Zemelman 2002a, 2002b ; Petersen *et al.* 2002). En effet, les souches multiresistantes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ou *Klebsiella pneumoniae* ont développé des résistances aux céphalosporines, quinolones et carbapénèmes (Loho et Dharmayanti 2015).

## 5.2. Résistance aux lipopeptides

Des résistances acquises aux lipopeptides sont décrites chez les bactéries.

Des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et des *Enterococcus* ont acquis des gènes de résistance à la daptomycine. Ces gènes codent des cardiolipides synthases qui participent à la diminution de la sensibilité à la daptomycine (Tran *et al.* 2015).

Des résistances aux surfactines ont été décrites chez *Bacillus subtilis* impliquant le gène *yerP*. La séquence protéique de YerP est similaire aux protéines de la famille des RND (Resistance-Nodulation-Division) telle que les systèmes AcrA/B chez *Escherichia coli*. Ces protéines de type RND sont des pompes à efflux impliquées dans les résistances, voire multi-résistances, à un grand nombre de composés par l'export des composés antibiotiques (Tsuge *et al.* 2001 ; Coyne *et al.* 2010).

## 5.3. Résistance aux polymyxines

A l'heure actuelle, les résistances aux polymyxines rapportées restent faibles du fait de leur utilisation limitée. Cependant, des bactéries à Gram négatif ont pu développer des résistances par plusieurs types de mécanismes liés à des modifications post-traductionnelles (Figure 10).

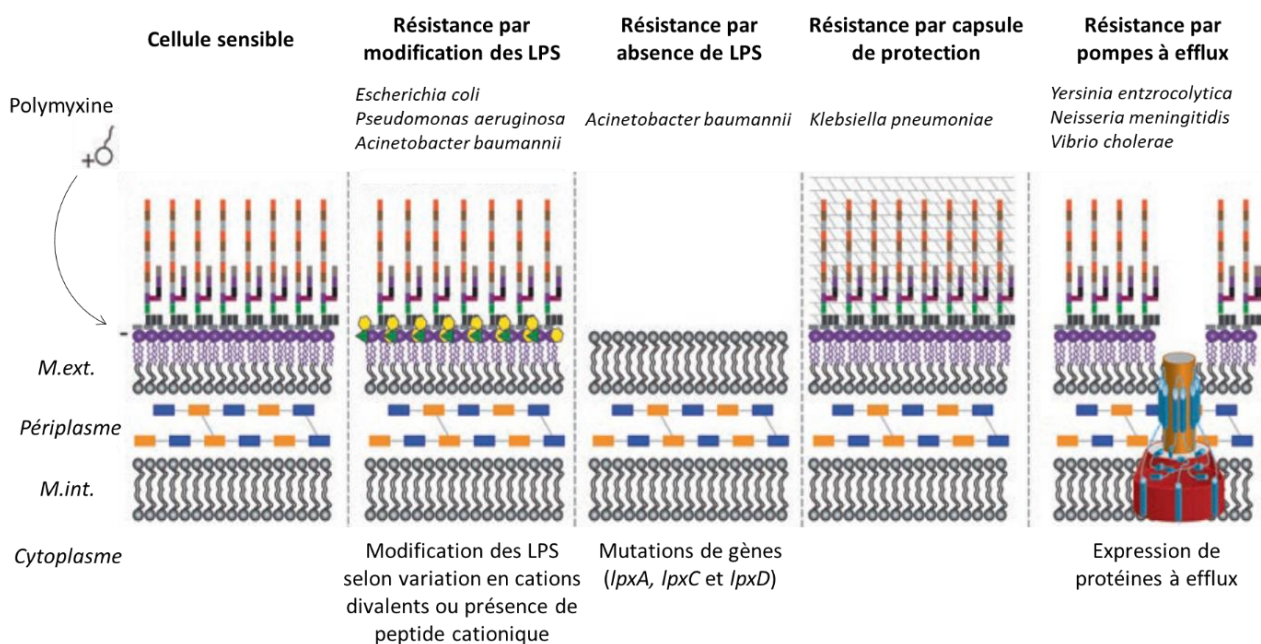


Figure 10. Mécanismes de résistance aux polymyxines (Moffatt *et al.* 2019).

Tous ces mécanismes ont pour but de diminuer les interactions Polymyxine-LPS et donc l'action bactéricide des polymyxines.

### **5.3.1. Modifications des LPS**

Le mécanisme principal de résistance est basé sur l'altération de la structure des LPS, cibles des polymyxines. Cette altération est déclenchée par plusieurs facteurs de l'environnement cellulaire tels que de faibles concentrations en  $Mg^{2+}$  et de fortes concentrations en  $Fe^{3+}$ . Le LPS est modifié par la substitution des groupements phosphates des lipides A. Lorsque ces derniers sont substitués, les LPS perdent leur charge négative ce qui diminue l'interaction avec les polymyxines (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*...). Plusieurs composés sont capables de substituer le groupement phosphate des LPS : la phosphoéthanolamine, le 4-amino-4-deoxy-L-arabinose ou la galactosamine.

#### **5.3.1.1. La Phosphoéthanolamine (pEtN)**

L'addition de pEtN au LPS est catalysé par l'intermédiaire d'une enzyme, la phosphoéthanolamine transférase (EptA). Cette enzyme permet la fixation de pEtN à l'acide 3-deoxy-d-manno-octulosonique (Kdo) du lipide A. Cette réaction libère également du diacylglycérol (Figure 11). Ce dernier est recyclé par la diacylglycérol kinase (DgkA) synthétisée par le gène *dgkA* co-régulé avec *eptA*.

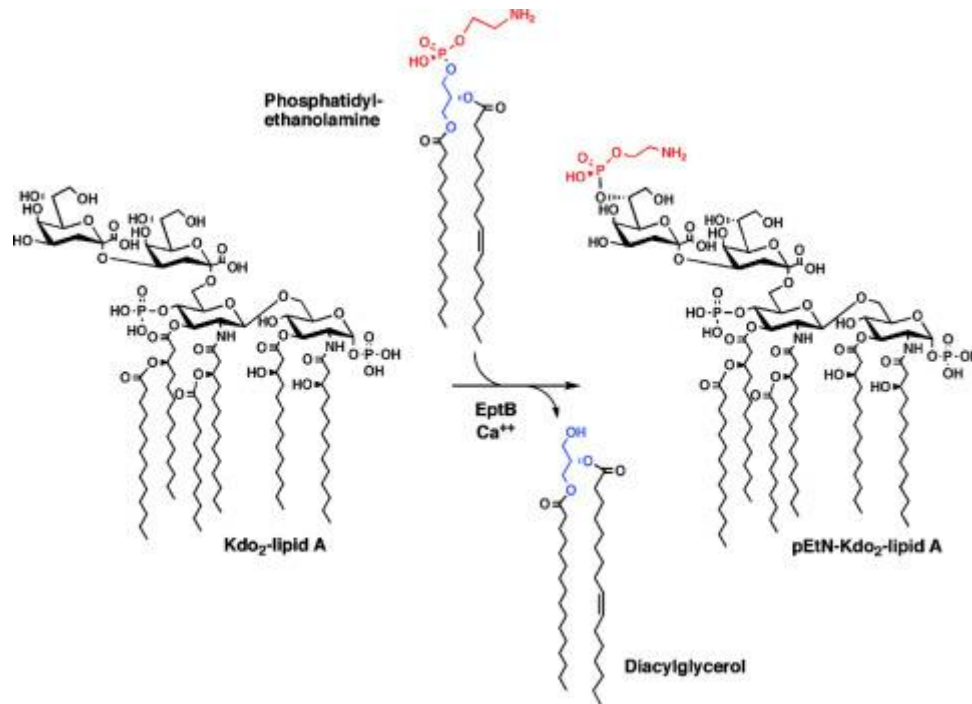


Figure 11. Fixation de pEtN au lipide A d'un LPS (Reynolds *et al.* 2005).

L'expression du gène *eptA* dépend du système à deux composants (TCS) PmrA/PmrB. PmrB est la protéine « senseur » (ou histidine kinase) qui perçoit des signaux tels que la présence de lipopeptides cycliques, un pH acide, la présence d'Al<sup>3+</sup> et Zn<sup>2+</sup> ou encore une forte concentration en Fe<sup>3+</sup>. Elle permet la phosphorylation du « response regulator », PmrA, qui, à son tour, induit la transcription du gène *eptA* pour finalement aboutir à l'addition de pEtN sur le lipide A.

Le TCS PhoP/PhoQ inhibe la transcription du gène *eptB* lorsque la concentration en Mg<sup>2+</sup> est faible ou même en présence de cyclolipopeptides et ne permet donc pas la production de protéine EptB pour l'addition de pEtN au lipide A. En revanche, l'activation de PhoQ permet la phosphorylation de PhoP qui active la transcription du gène *pmrD*, servant de signal pour la phosphorylation de *pmrA* précédemment présenté (Jeannot *et al.* 2017) (Figure 12).



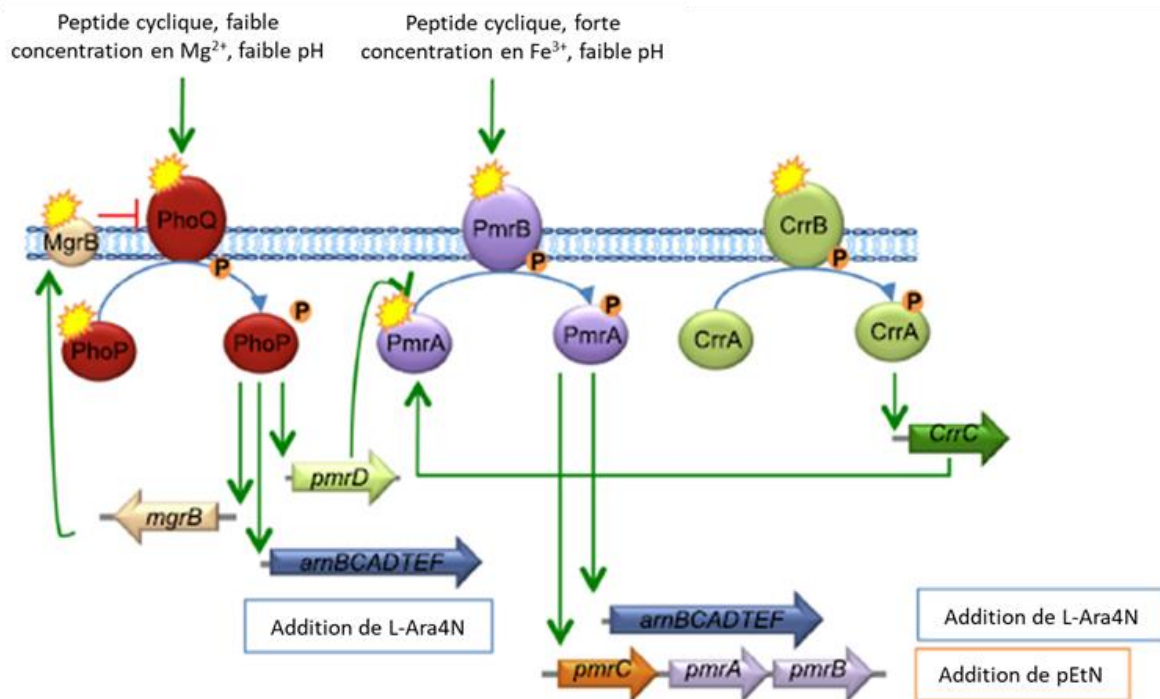


Figure 12. Mécanisme de résistance aux polymyxines chez la bactérie *Klebsiella pneumoniae* (Jeannot *et al.* 2017)

### 5.3.1.2. Le 4-amino-4-deoxy-L-Arabinose (L-Ara4N)

Les systèmes présentés précédemment sont également responsables de la biosynthèse de L-Ara4N via l'activation de l'expression de l'opéron *arnBCADTEF*. Lorsque le L-Ara4N est produit, il se fixe sur les lipides A des LPS et augmente les charges positives, ce qui empêche les interactions avec les polymyxines et rend la souche résistante à ces dernières (Figure 13). La transcription de l'opéron *arnBCADTEF* est initiée par le TCS PmrA/PmrB en présence de  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , d'un pH acide ou présence de peptides cycliques. Chez *Klebsiella pneumoniae*, cet opéron peut être activé par les TCS PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ.

Des mécanismes moléculaires plus complexes ont été décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* avec plusieurs TCS impliqués. Le système ColR/ColS, en présence de  $Zn^{2+}$ , active la transcription d'*eptA* mais inhibe celle de l'opéron *arnBCADTEF*. Le système PmrA/PmrB est activé à la fois par les signaux environnementaux tels que de faibles taux de  $MgCl_2$  ou de  $CaCl_2$  ( $\leq 0,02mM$  (McPhee *et al.* 2006)) et par le TCS PhoP/PhoQ. La présence de polymyxine induit l'expression du TCS ParR/ParS et l'expression de l'opéron *arnBCADTEF* pour l'addition de L-Ara4N aux LPS (Jeannot *et al.* 2017).

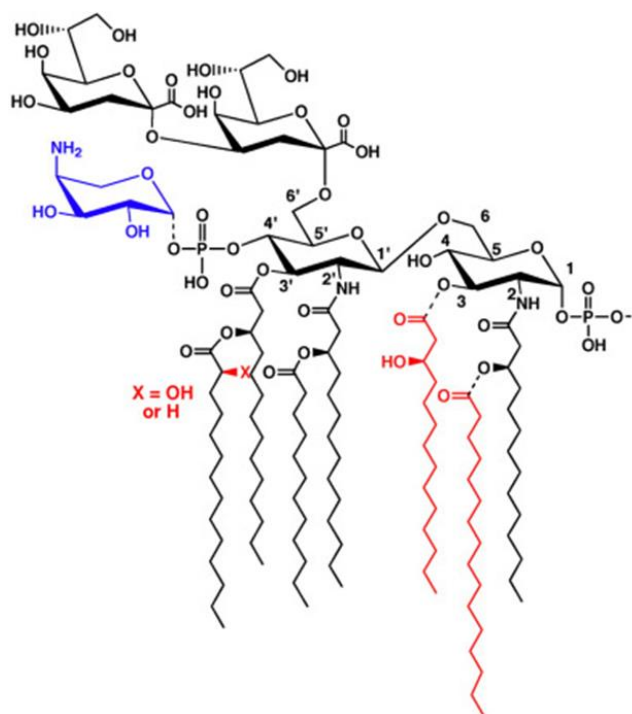


Figure 13. Structure d'un lipide A lié à un L-Ara4N (bleu) (Breazeale *et al.* 2003).

### 5.3.1.3. La galactosamine

Chez *Acinetobacter baumannii*, l'addition de pEtN aux LPS a été observée par l'expression des gènes *pmrCAB* suite à l'activation du TCS PmrA/PmrB. Ce dernier est également responsable de l'expression du gène *naxD* qui code une déacétylase convertissant le *N*-acetylgalactosamine en galactosamine (Chin *et al.* 2015). Ce dernier se fixe ensuite sur le lipide A rendant les LPS chargés positivement.

### 5.3.2. Perte des lipopolysaccharides

La perte des LPS est également un moyen de limiter l'action des polymyxines sur les membranes des bactéries à Gram négatif. Cette absence de LPS est due à une mutation des gènes *lpxA*, *lpxC* et *lpxD* impliqués dans la biosynthèse des lipides A (Raetz *et al.* 2009 ; Moffatt *et al.* 2010). Ces mutations entraînent l'inhibition de la synthèse de lipides A et donc de LPS, ce qui diminue les interactions avec la polymyxine et rend la bactérie moins sensible à l'antibiotique. En revanche, une perte des LPS entraîne une perméabilité membranaire qui

rend les bactéries plus sensibles aux antibiotiques autres que les polymyxines (Moffatt *et al.* 2010).

### **5.3.3. Autres systèmes de résistance aux polymyxines**

D'autres mécanismes plus rares sont décrits, comme la biosynthèse d'une capsule polysaccharidique en présence de polymyxine B chez *Klebsiella pneumoniae*, des systèmes de pompes à efflux tels que MtrCDE chez *Neisseria meningitidis*, *Vibrio cholerae* et *Yersinia enterocolitica*. De plus, bien qu'elles soient naturellement insensibles aux polymyxines du fait de l'absence de LPS, les souches de *Paenibacillus polymyxa* peuvent inactiver les polymyxines par une sérine protéase (colistinase) (Moffatt *et al.* 2019).

La résistance à la polymyxine peut être médiée par la présence d'un plasmide. Ce type de résistance est appelé MCR (Mobilizable Colistin Resistance) qui permet l'expression du système de biosynthèse de la protéine MCR-1 de la famille des phosphoéthanolamine transférases pour la modification des lipides A par addition de pEtN (Liu *et al.* 2016).

La résistance des bactéries à Gram négatif est donc médiée par différents facteurs selon le mécanisme employé. La composition en ions du milieu de culture déclenche des voies de transcription permettant la résistance, notamment un faible taux de  $Mg^{2+}$ , la présence d' $Al^{3+}$ , de  $Zn^{2+}$  ou encore une forte concentration en  $Fe^{3+}$ . La présence de lipopeptides antimicrobiens tels que la polymyxine ou encore de faibles pH permettent l'expression de voies de résistance aux peptides cationiques antimicrobiens.

## **6. Biosynthèse et régulation**

Au sein du monde microbien, les métabolites sont produits selon des voies spécifiques faisant intervenir des groupes de gènes appelés Biosynthetic Gene Cluster (BGC).

Les lipopeptides sont synthétisés par voie non ribosomale faisant intervenir un mécanisme enzymatique de biosynthèse qui n'est pas directement lié au ribosome (Huang *et al.* 2014). Une large variété de métabolites est issue de voies de biosynthèse ne dépendant pas des ribosomes. Les premières voies décrites furent les voies de biosynthèse de la gramycidine S et

de la tyrocidine en 1971. Des antibiotiques tels que la pénicilline, la cyclosporine, les polymyxines ou encore la daptomycine sont synthétisés par voie non ribosomale.

Les enzymes généralement impliquées dans cette biosynthèse sont des Non Ribosomal Peptide Synthétases (NRPS) de grande taille (>100kDa) (Lipmann *et al.* 1971). Les BGC sont constitués de gènes codant la ou les NRPS et sont généralement accompagnés de gènes accessoires qui participent à la biosynthèse et parfois de gènes régulateurs.

L'assemblage par voie non ribosomale est un mécanisme coûteux en terme d'énergie pour l'organisme producteur. Il semblerait que ce coût soit contre-balançé par les bénéfices apportés par les métabolites secondaires produits aussi bien pour la croissance que pour la survie de l'hôte.

### 6.1. Non Ribosomal Peptide Synthetases

Beaucoup de systèmes non ribosomaux font intervenir des Non Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS), formant des systèmes multienzymatiques complexes.

Les protéines NRPS ont une organisation modulaire. Chaque module permet la prise en charge d'un résidu d'acide aminé spécifique. Le premier module de la chaîne d'assemblage est appelé module d'initiation, le module final est appelé module de terminaison et sont séparés par « n » modules d'élongation (Figure 14).

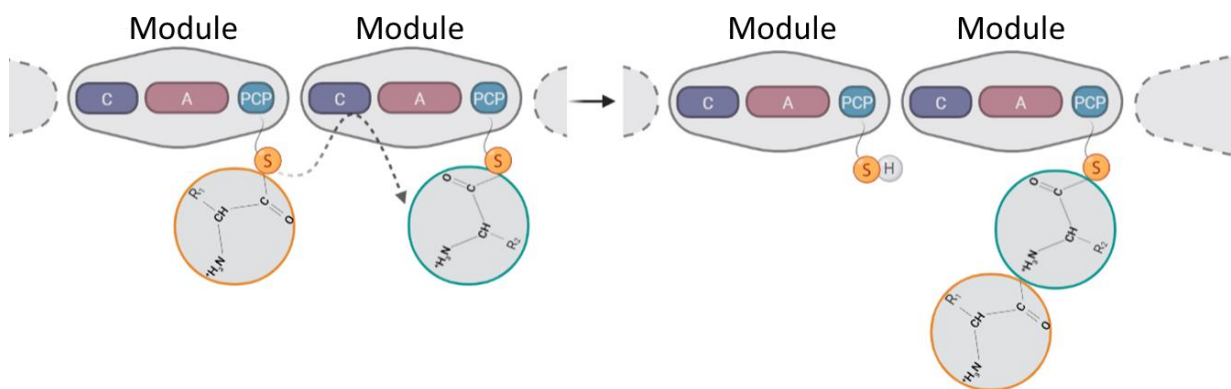


Figure 14. Principe d'assemblage des peptides non ribosomaux par les synthétases NRPS.

Chacun des modules est divisé en 3 domaines qui catalysent une réaction définie dans la sélection et l'assemblage des monomères.

Le domaine d'adénylation (A) est présent au sein de tous les modules. Ce domaine est constitué d'environ 550 résidus d'acides aminés dont un site actif de 8 à 10 résidus appelé «binding pocket» ou «code de Stachelhaus», signature d'un résidu spécifique à sélectionner (Conti 1997 ; Stachelhaus *et al.* 1999). Les séquences peptidiques des domaines A des NRPS ont entre 30 et 60% d'identité ce qui permet généralement d'identifier le site actif qui varie d'un domaine à l'autre (Turgay *et al.* 1992).

La séquence putative identifiée d'un site actif permet alors de suspecter voire de prédire l'acide aminé qui sera sélectionné et intégré à la chaîne peptidique. Le domaine d'adénylation réalise une réaction en deux étapes permettant (i) la sélection et (ii) l'activation du résidu spécifique. Premièrement, l'enzyme catalyse la formation d'aminoacyl-adénylate (acide aminé – O – AMP) par l'intermédiaire de  $Mg^{2+}$  et d'ATP libérant du pyrophosphate (PPi). L'acide aminé est alors activé. Deuxièmement, l'aminoacyl-adénylate est lié par une fonction thioester résultant d'une attaque nucléophile du complexe libre thiol du domaine PCP (domaine Peptidyl Carrier Protein). Le résidu est alors lié à l'enzyme multimérique (Figure 15A) (Weber et Marahiel 2001 ; Sieber et Marahiel 2005 ; Marahiel 2009).

Le domaine Peptidyl Carrier Protein (PCP), d'environ 100 résidus d'acides aminés, est présent dans tous les modules. Il est également appelé domaine de thiolation (T) et n'est pas doté d'activité catalytique autonome.

Il agit comme fixateur et transporteur du résidu sélectionné au module de condensation suivant. Le domaine PCP inactif (Apo-PCP) est activé (Holo-PCP ou ppan-PCP) par une phosphopantéthéine transférase qui transfère le cofacteur phosphopantéthéine (ppan) sur l'apo-PCP. Sous sa forme active, il joue le rôle d'articulation du mécanisme d'assemblage de la chaîne peptidique par le transfert de l'acide aminé activé sur le groupement thiol du cofacteur ppan lié au PCP grâce au domaine A, comme présenté précédemment. Le domaine PCP lié à un domaine A forment le module d'initiation de synthèse non ribosomale (Figure 15B).

Le domaine de condensation (C) est présent au sein de tous les modules (C-A-PCP) sauf dans le module d'initiation (A-PCP) à l'exception des modules d'initiation des synthétase de lipopeptides qui possèdent un domaine C pour la prise en charge de l'acide gras. Il est constitué d'environ 450 résidus d'acides aminés et réalise la liaison de deux résidus, entraînant l'assemblage de la chaîne peptidique. La condensation est réalisée par attaque

nucléophile qui permet la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés. Cette formation se fait grâce à un site donneur et un site accepteur au sein du domaine C entraînant le transfert de l'acide aminé sur le peptide en cours de formation (Figure 15C) (Weber et Marahiel 2001 ; Marahiel 2009). Il intègre principalement des résidus de conformation L (Bloudoff et Schmeing 2017). Le domaine de condensation peut être de type  ${}^L C_L$  (forme la plus répandue des domaines C). Il condense deux monomères de configuration L par formation d'une liaison peptidique entre ces derniers. Il peut également former une liaison peptidique entre le résidu du module précédent de forme D et un autre monomère de forme L, celui étant noté domaine  ${}^D C_L$  (Rausch *et al.* 2007).

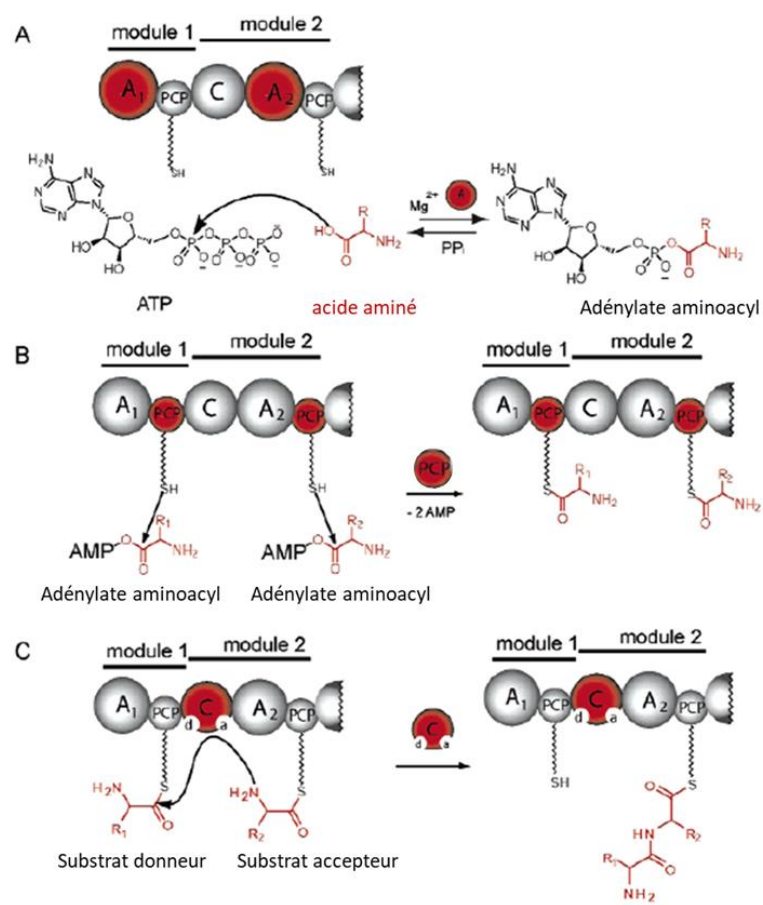


Figure 15. Différentes réactions catalysées par les domaines des NRPS (Sieber et Marahiel 2005).  
 (A) Sélection et activation d'un résidu par le domaine d'adénylation. (B) Formation d'une liaison covalente entre le résidu active précédemment le groupement thiol du domaine PCP. (C) Elongation de la chaîne peptidique par le domaine de condensation.

Les domaines de condensation peuvent avoir des fonctions plus élargies. C'est notamment le cas des domaines « C starter » pour la liaison d'une chaîne hydrocarbonée sur le premier

résidu d'acide aminé (Clugston *et al.* 2003 ; Sieber et Marahiel 2005 ; Balibar *et al.* 2005 ; Rausch *et al.* 2007). Ce mécanisme d'addition d'un acide gras a été décrit chez *Paraburkholderia rhizoxinica*, producteur des cyclolipopeptides rhizomides (Figure 16) (Zhong *et al.* 2021).

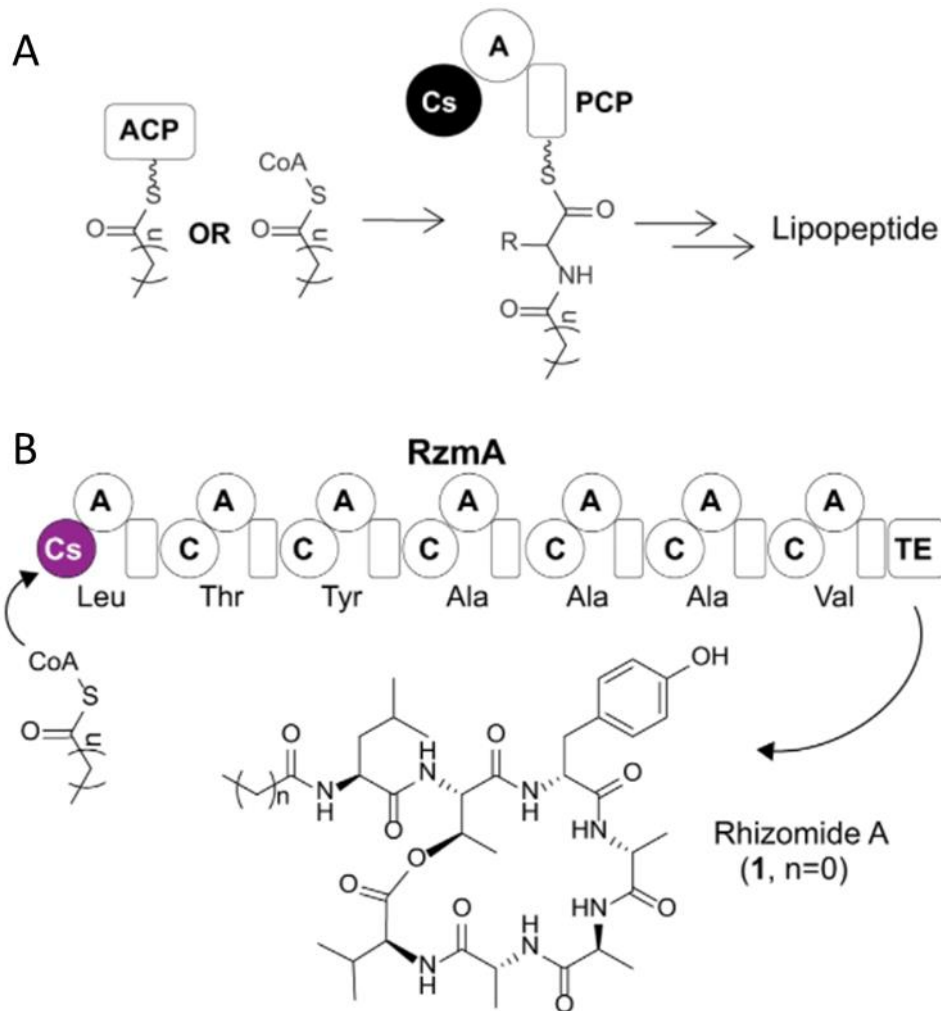


Figure 16. (A) Prise en charge d'une chaîne hydrocarbonée par un domaine Cstart module NRPS. (B) Exemple chez la rhizomide A (Zhong *et al.* 2021).

Un domaine d'hétérocyclisation (Cy) permet la cyclisation d'un monomère au sein de la chaîne peptidique. Pour la première étape de la réaction de cyclisation, le domaine Cy initie une attaque nucléophile d'un acide aminé lié au PCP accepteur sur un thioester d'un acide aminé donneur. La seconde étape est une attaque nucléophile du groupement thiol sur le carbone  $\alpha$ -carbonyl de l'acide aminé donneur.

Le domaine d'épimérisation/condensation (E/C) d'environ 450 résidus d'acides aminés permet l'épimérisation du carbone  $\alpha$  d'un acide aminé de configuration L lié au domaine PCP en configuration D. Il existe également des domaines d'épimérisation (E) qui n'ont pas la

fonction de condensation des monomères à la suite de l'épimérisation. Les domaines E sont plus fréquents que les domaines E/C.

D'autres types de modifications peuvent être apportées telles que la méthylation, l'halogénéation ou encore la multimérisation du composé final (Tableau 5) (Bloudoff et Schmeing 2017).

Tableau 5. Domaines spécifiques pour l'incorporation de résidus spécifiques ou la modification des monomères au cours de l'assemblage par les mega-enzymes NRPS.

<b>Domaine</b>	<b>Fonction</b>	<b>Composé</b>	<b>Référence</b>
N-Méthylation (NM)	Ajout d'un groupement méthyle sur l'azote de l'acide aminé précédant.	Cyclosporine	(Lawen et Zocher 1990)
Formylation (F)	Ajout d'un groupement aldéhyde sur la groupement amine d'un résidu d'acide aminé, généralement sur le module d'initiation.	Gramycidine	(Schoenafinger <i>et al.</i> 2006)
Oxydation (Ox)	Oxydation d'oxazoline en oxazole ou de thiazoline en thiazole suite à une cyclisation.	Epothilone et bleomycine	(Schneider <i>et al.</i> 2003)
Réduction (Rn)	Réaction inverse à l'oxydation suite à une cyclisation.	Pyocheline	(Reimann <i>et al.</i> 2001)

La libération du peptide final se fait par l'intermédiaire d'un domaine thioesterase (TE) présent dans le dernier module dit de terminaison et est constitué d'environ 280 résidus d'acides aminés. La catalyse de la libération est réalisée, dans un premier temps, par transfert du couple peptide-S-PCP du module de terminaison sur le site actif du domaine TE. Dans un deuxième temps, une hydrolyse ou une cyclisation permet la libération du peptide.

L'assemblage d'acides aminés par ces mega-enzymes peut être de 3 types : linéaire, itératif ou non linéaire. Dans le cas d'une NRPS linéaire, les modules sont utilisés une fois et dans l'ordre d'assemblage comme dans le cas de la polymyxine E (Tambadou *et al.* 2015).



Dans le cas d'une NRPS itérative, les modules peuvent être réutilisés au cours de l'assemblage. C'est le cas de l'enterobactine où 2 modules sont utilisés 3 fois pour former ce peptide composé de 6 résidus d'acides aminés (Mootz *et al.* 2002).

## 6.2. Peptides issus des voies non ribosomales

Les systèmes NRPS sont capables de produire des composés de nature peptidique très variés. Ils peuvent incorporer des acides aminés usuels, des acides aminés non-protéogéniques, des acides gras ou encore des sucres. Les peptides peuvent être composés de 2 à 26 monomères comme les dysamides (2 résidus) (Fu *et al.* 1998) mais la plupart possèdent 7 ou 8 monomères (19% des peptides non ribosomaux recensés au sein de la base NORINE en septembre 2021) (Figure 17).

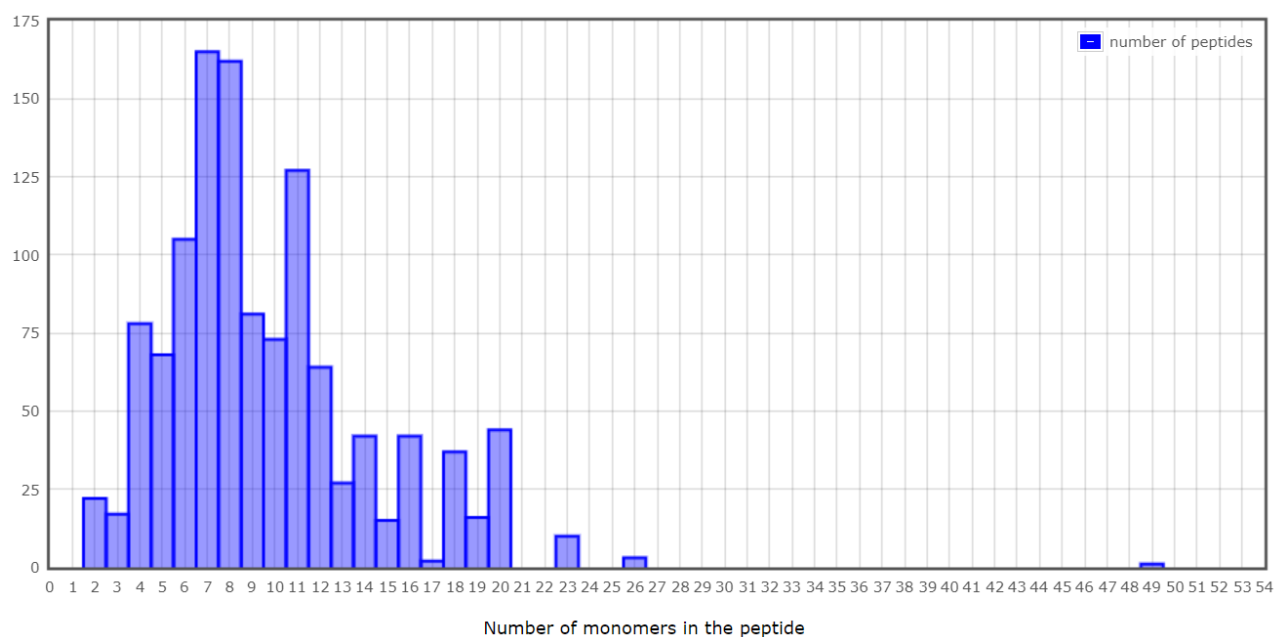


Figure 17. Distribution de peptides non ribosomaux recensés sur la base de données NORINE en fonction de leur taille (nombre de monomères).

Sur la base NORINE, environ 26% des peptides non ribosomaux sont des lipopeptides, dont la majorité possède des activités antibiotiques (44%).

Grâce aux outils de prédiction et à la détermination des structures des mega-enzymes NRPS, il est possible de donner une première hypothèse de structure du peptide non ribosomique synthétisé.

## **7. Prédiction des métabolites peptidiques**

La découverte de nouveaux composés bioactifs naturels résulte, historiquement, d'une approche dite fonctionnelle ou bio-guidée. Des stratégies alternatives combinant des approches génomique et métabolomique se développent.

L'approche bio-guidée consiste à purifier, en recherchant l'activité biologique ciblée dans les différentes fractions chromatographiques, puis à caractériser structuralement les composés bioactifs par spectrométrie de masse ou résonance magnétique nucléaire (RMN) (Wang 2017). Une telle approche a été utilisée avec succès pour les altérines (Desriac *et al.* 2020). Néanmoins, les risques d'échec sont nombreux (perte d'activité biologique, pureté ou quantité insuffisante pour la caractérisation structurale par RMN).

Ces méthodes étant risquées et chronophages, la recherche de nouveaux PAM s'oriente maintenant vers la prédiction par bioinformatique ainsi que par la génomique et la protéomique (Li *et al.* 2007 ; Yang *et al.* 2012 ; Coquet *et al.* 2016). Pour réaliser une étude génomique de la biosynthèse de métabolites secondaires, les génomes bactériens sont d'abord séquencés et assemblés. Les méthodes de séquençage des génomes sont de plus en plus perfectionnées, rapides et de moins en moins coûteuses. Depuis 2005, l'ère du séquençage haut débit permet à beaucoup de laboratoires d'accéder aux génomes complets des organismes étudiés et, par conséquent, aux BGC. Il existe, à l'heure actuelle, un grand nombre de méthodes de WGS adaptées à la taille du génome et à la profondeur de séquençage souhaitée (Tableau 6).

Tableau 6. Exemples des méthodes de séquençage haut débit et leurs utilisations (Bertelli et Greub 2013).

<b>Technologie</b>	<b>Méthode</b>	<b>Plateforme</b>	<b>Longueur (pb)</b>	<b>Débit (Gb/h)</b>	<b>Utilisation</b>
Sanger	Termineurs marqués	ABI 3730XL	850	ND	<i>De novo</i> et métagénomique
454 (Roche)	Pyroséquençage	GS FLX	400-700	0,04	<i>De novo</i> et métagénomique
Solexa (Illumina)	Termineurs réversibles	HiSeq/MiSeq	36-250	2,9/0,2	Re-séquençage
SOLiD (ABI)	Ligature	5500XL	75	1	Re-séquençage
Heliscope (Helicos)	Termineurs virtuels	tSMS	25-55	1	Re-séquençage
Ion Torrent (Life tech.)	Semi- conducteur	PGM	100-200	0,2	Re-séquençage
PacBio (Pacific Bioscience)	Single molécule, Real-time (SMRT)	PacBioRS	250-10000	0,1	Structure génomique et metagénomique
Nanopore	Courant ionique	Minlon	10000-50000	ND	Structure génomique et <i>de novo</i>

En revanche, la rapidité d'exécution entraîne des erreurs dans les séquences génomiques qui peuvent perturber l'assemblage des fragments séquencés en un génome complet.

Ces erreurs de séquençage peuvent aussi influencer les annotations des gènes et l'attribution de fonctions. En effet, si la séquence du gène contient des erreurs, l'analyse des similarités de séquences avec les bases de données peut alors être faussée et donner un résultat approximatif ou erroné.

Une fois les génomes assemblés, ils sont annotés de façon automatique puis manuelle afin d'attribuer des fonctions précises à chacun des gènes d'intérêt (Figure 18).

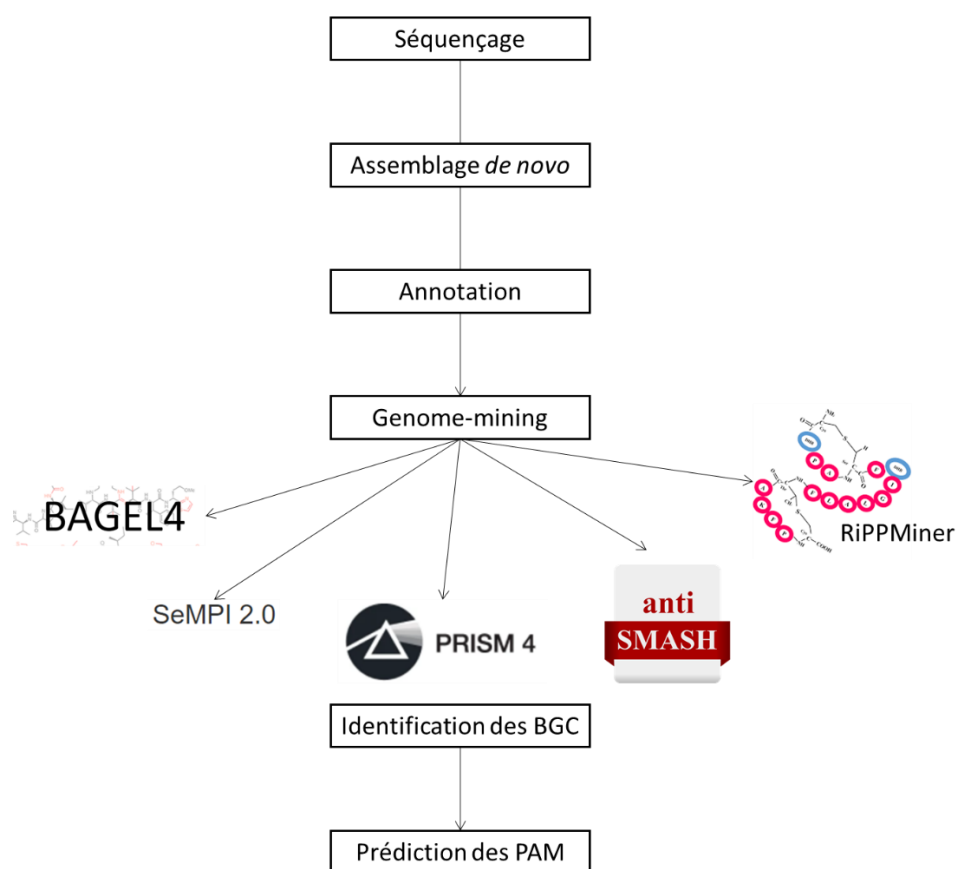


Figure 18. Approche de "genome-mining" pour l'identification de bactéries productrices de métabolites secondaires valorisables ainsi que leurs clusters de gènes de biosynthèse.

Des outils spécifiques ont été développés afin de détecter des gènes ou groupes de gènes impliqués dans la biosynthèse de ces composés. Les prédictions sont basées sur les génomes séquencés ainsi que sur les protéines référencées dans les bases de données. L'analyse de séquences de gènes facilite l'identification de synthétases et leurs gènes environnants en les comparant avec l'outil BLAST (Altschul *et al.* 1990). Cette analyse est réalisée grâce à plusieurs outils tels que Bagel4 (de Jong *et al.* 2010), PRISM4 (Skinnider *et al.* 2015), AntiSMASH (Blin *et al.* 2021), RiPPMiner et RiPPMiner-genome (Agrawal *et al.* 2017, 2021), SeMPI2.0 (Zierrep *et al.* 2020), NRPS predictor (Rausch *et al.* 2005 ; Röttig *et al.* 2011), PKS/NRPS analysis (Bachmann et Ravel 2009), NRPSp (Prieto *et al.* 2012)... Ils identifient des BGC de métabolites au sein de génomes analysés tels que les systèmes PKS, NRPS, RiPP...

Dans le cas des NRPS, des logiciels tels que PKS/NRPS analysis ou NRPS predictor permettent ensuite d'identifier l'organisation des domaines et de détecter les sites actifs des domaines d'adénylation. Ces outils identifient les 8 à 10 résidus d'acides aminés qui forment la « binding pocket », signature spécifique du monomère sélectionné et pris en charge par la ou les mégazyme(s) NRPS.

D'un système NRPS à l'autre, les structures protéiques sont très similaires et des modules identiques sont retrouvés chez différentes NRPS. La répartition et l'enchaînement de ces modules donnent lieu à des séquences peptidiques variées (Baltz 2021).

Malheureusement la méthode de « genome-mining » est limitée par l'implémentation des bases de données puisque les algorithmes de prédiction sont fondés sur les données disponibles dans les bases. Les outils de prédiction sont fondés sur des méthodes d'analyse de bases de données différentes. Ainsi, pour obtenir une prédiction la plus significative possible, plusieurs de ces outils sont généralement utilisés en parallèle.

Sur la base des prédictions liées à l'analyse des synthétases, les PAM peuvent ensuite être prédits d'un point de vue structural.

La plateforme NORINE est spécialisée dans l'analyse des peptides non ribosomiques (Flissi *et al.* 2020). A ce jour, elle inclut une base de données de 1740 peptides non ribosomiques dont 314 lipopeptides regroupant leurs structures mais également les annotations associées telles que l'organisme producteur, les références bibliographiques et l'activité biologique du peptide (Figure 19).

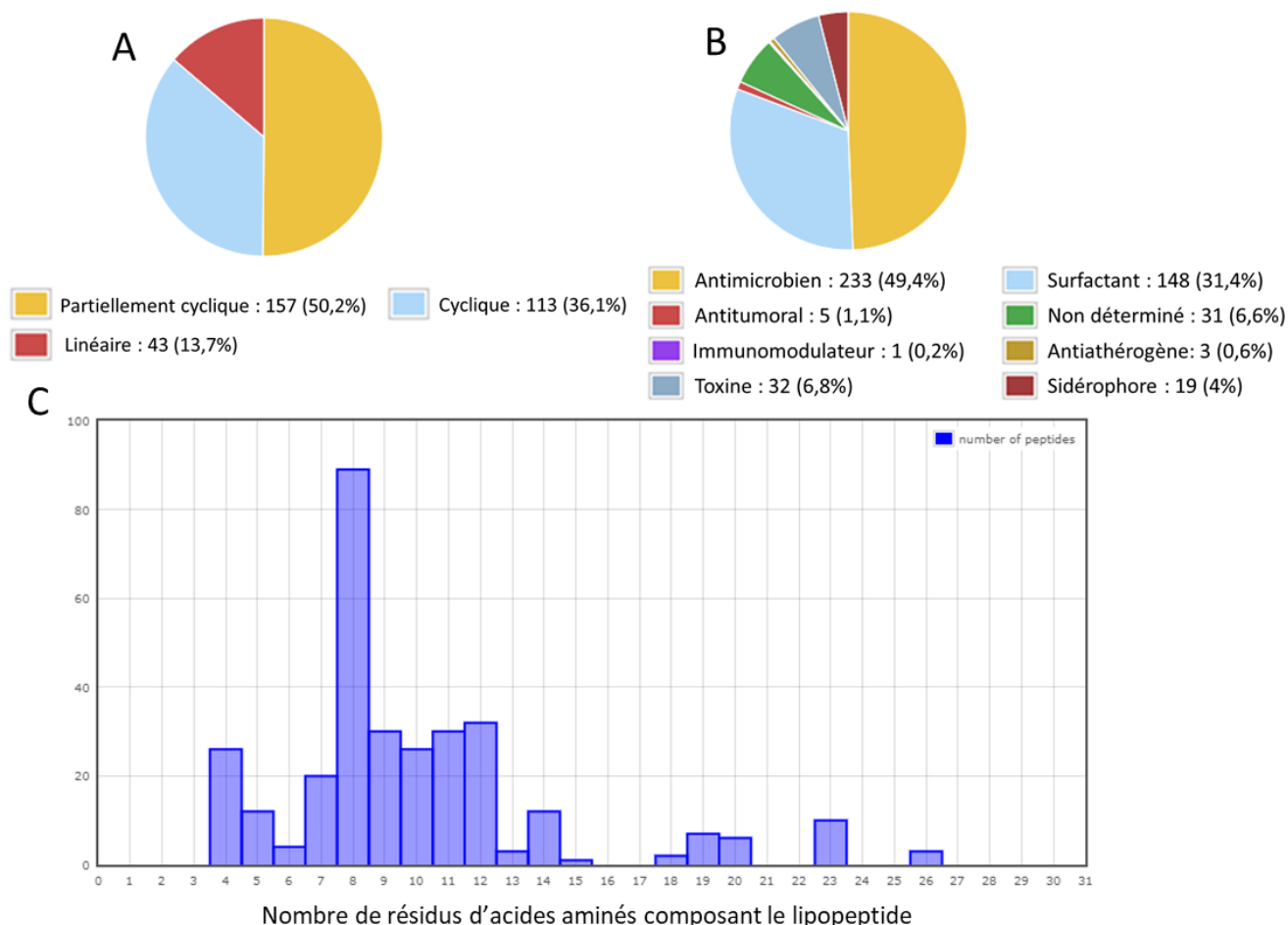


Figure 19. Données de structure et fonctions biologiques de lipopeptides de la base de données NORINE.

A) Structures des lipopeptides ; B) Activités biologiques des lipopeptides ; C) Répartition du nombre de résidus d'acides aminés des lipopeptides.

Cette plateforme permet donc d'associer la séquence peptidique à une famille de peptides connue. Il est également possible d'envisager la fonction biologique du peptide par similarité de séquence avec les autres peptides de la base de données référencés, comme par exemple, des activités antimicrobiennes, anti-tumorales ou encore biosurfactants.

Tous ces outils sont des éléments de prédiction de plus en plus fiables qui servent à prédire le panel de métabolites secondaires produits par un organisme. Il est donc possible de découvrir de nouveaux composés par cette méthode de recherche, complétée par de l'analyse expérimentale telle que la chromatographie et la spectrométrie pour l'isolement et l'identification de composés bioactifs tels que les PAM.

De plus, les prédictions pour les découvertes de nouveaux composés ainsi que l'identification du cluster de biosynthèse doivent être complétées par de l'analyse phénotypique. Par

exemple, le système de biosynthèse des empedopeptines a été identifié et confirmé chez une bactérie du genre *Massilia* (Ho *et al.* 2021). Cette identification est le fruit d'une approche multi-omique intégrée avec une étude génomique, métabolomique et phénotypique.

Les prédictions bioinformatiques sont une première étape dans l'identification des métabolites secondaires produits par les organismes mais doivent être complétées par des approches bioguidées et omiques.





---

# **Chapitre 1 – Diversité chimique des altérines**

---



## 1. Introduction

De manière générale, les familles de lipopeptides sont composées de plusieurs isoformes dont la structure varie au niveau d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés ou encore au niveau de la chaîne hydrocarbonée (longueur et/ou insaturation). Ainsi, la famille des kurstakines, produite par des bactéries du genre *Bacillus*, est composée de 7 isoformes dont la chaîne hydrocarbonée varie en longueur (de 11 à 14 carbones avec la présence éventuelle d'une hydroxylation en C3' (Béchet *et al.* 2012)). La famille des iturines est composée d'une douzaine de membres dont les bacillomycines et les mycosubtilines. Les iturines peuvent avoir des enchainements d'acides aminés variables ainsi qu'une chaîne hydrocarbonée allant de C13:0-NH<sub>2</sub>(C3') à C17:0-NH<sub>2</sub>(C3'). La famille des polymyxines, produites par des bactéries du genre *Paenibacillus*, est constituée de plus de 15 isoformes dont la structure varie au niveau des résidus d'acides aminés. Plusieurs variations sont possibles telles qu'un résidu D-Ser au lieu d'un résidu L-Dab sur le 3<sup>e</sup> acide aminé du tripeptide, le résidu D-Phe peut être remplacé par un résidu D-Leu en 6<sup>e</sup> position dans le cycle, le résidu L-Leu peut être remplacée par un résidu L-Thr ou encore le dernier résidu L-Thr remplacé par un résidu L-Leu (Kadar *et al.* 2013). La famille des altérines a été précédemment caractérisée après purification des principaux cyclolipopeptides produits par les souches *Pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42. Leur structure a été élucidée par RMN révélant un cycle heptapeptidique portant une chaîne hydrocarbonée (Desriac *et al.* 2020). Cette étude a permis d'identifier, en premier lieu, 7 isoformes allant de 926 Da à 982 Da. A la différence des souches *Pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42 isolées de l'hémolymphe d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, les souches de *Pseudoalteromonas* hOe-66, hOe-124 et hOe-125 ont été isolées de l'hémolymphe d'huître plate, *Ostrea edulis*. La production des principales altérines a été détectée dans leur surnageant de culture. Nous avons analysé les profils de production des 5 souches de *Pseudoalteromonas* par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) (collaboration avec le Laboratoire Littoral environnement et sociétés (LIENSs)). Cette technique permet la caractérisation des produits minoritaires et ainsi d'accéder à l'ensemble de la chimiodiversité des alterines.

## *Chapitre 1 – Diversité chimique des altérines*

Les résultats de cette étude ont été décrits dans l'article « Alterins, a new family of marine antibacterial cyclolipopeptides », soumis le 28.07.2021 et actuellement en révision dans le journal « International Journal of Antimicrobial Agents ».

## 2. Altérines, une nouvelle famille de cyclolipopeptides marins antibactériens

### Alterins, a new family of marine antibacterial cyclolipopeptides.

Clément Offret<sup>1</sup>, Hélène Cuny<sup>1</sup>, Pierre-Edouard Bodet<sup>2</sup>, Camille Jegou<sup>1</sup>, Alexis Bazire<sup>1</sup>, Romain Chevrot<sup>2</sup>, Valérie Thiery<sup>2</sup>, Benjamin Brillet<sup>1</sup> and Yannick Fleury<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ Brest, Univ. Bretagne Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine, EA3884, F-29334 Quimper, France

<sup>2</sup>La Rochelle University, Littoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs), UMRi 7266, Université de La Rochelle, La Rochelle, France

Corresponding author: Yannick Fleury, [yannick.fleury@univ-brest.fr](mailto:yannick.fleury@univ-brest.fr)

**Keywords:** Antimicrobial; chemodiversity; cyclolipopeptides; *Pseudoalteromonas*

#### Highlights

- New family of antimicrobial cyclolipopeptides
- The marine genus *Pseudoalteromonas* as producer of high chemodiversity of alterins
- Investigation of alterin structure using UPLC-HRMS

#### Abstract

Five strains of *Pseudoalteromonas*, isolated from oyster hemolymph, exhibited antibacterial activity against several Gram-negative bacteria. Bioactive compounds were identified in their cell-free supernatant and characterized as alterins, which are cyclolipopeptides composed of an heptapeptidic ring connected to a fatty acid chain. Using UPLC-HRMS, we describe here 37

structural analogs differing from each other by one or more amino acid residue(s), the length of the fatty acid chain, its hydroxylation and the presence of unsaturation.

## 1. Introduction

The genus *Pseudoalteromonas* is one of the main marine bacterial groups gathering many bioactive metabolite-producing species (1). This genus is well-known to be associated with marine organisms (2). One of its ecological significance is its capability to produce antimicrobial compounds and so it may contribute to host defense (3, 4). As filter feeders, marine bivalves are particularly exposed to microorganisms and exhibit high concentrations of cultivable microbiota in hemolymph (5, 6). In this way, marine bivalves can be considered as natural agents of selection. From hemolymph of two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, five *Pseudoalteromonas* strains were isolated exhibiting potent antimicrobial activity. All strains were shown to produce cyclolipopeptides named alterins (7). Alterins contained an heptapeptidic cycle linked to a hydrocarbon tail via an amido bond. This cycle is composed of 2 proteinogenic amino acid residues (Leu<sup>4</sup> and Arg<sup>5</sup>) and 5 exotic ones (Dhb<sup>2</sup>, Dab<sup>3</sup> and 3 Dab( $\beta$ -OH)<sup>1,6,7</sup>). The latter is quite uncommon since it has only been described so far in 2 antibiotic peptide families, alterins (7) and odilorhabdins (8), which are linear peptides produced by a Non-Ribosomal Peptide Synthetase of the nematode-symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* (8). The alterin members differ from each other by the hydrocarbon tail length, the number of unsaturation(s) on the C5 and the hydroxylation or not on the C3. To date, the alterin family is made of 8 members, characterized from the strains hCg using purification and NMR analysis. In this paper, in order to have a complete overview of the alterin chemodiversity within *Pseudoalteromonas* strains, we used a much more sensitive methodology consisting in a UPLC – HRMS approach.

## 2. Material and methods

### 2.1. Crude extract production

The *Pseudoalteromonas* alterin production was investigated from the 5 strains called hCg-6 (JX912482), hCg-42 (JX912481) and hOe-66T (MT271987), hOe-124 (MT271988) and hOe-125 (MT271989), according to the procedure developed by Desriac *et al.* (2020). Briefly, the

five producing strains were grown for 40 hours at 18°C under shaking (150 rpm) in a specific medium (7). The cell-free culture supernatants (100 ml) were subjected to C18 solid-phase extraction column (SPE, C18 2G UPTI-clean cartridges, Interchim, France). Elutions were performed using acetonitrile:water (60:40; v/v). After freeze-drying, extracts were resuspended in acetonitrile:water (80:20; v/v; 2ml). Alterin concentrations were measured using the BCA method (BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific, USA) (Table 1).

## 2.2. Liquid chromatography and Mass spectrometry analysis

The chemical diversity of alterins resulting from hCg and hOe strains crude extracts was explored using an Acquity UPLC H-Class coupled to a Xevo G2 S Q-TOF mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source (Waters, Manchester, United Kingdom). Alterin abundances were normalized using a synthetic cyclolipopeptide as internal standard (Heptanoyl-Dab-Leu-Pro-cyclo-(Lys-Ser-Tyr-Lys-Leu) trifluoroacetate salt, Bachem, Switzerland).

## 3. Results

### 3.1. Antibacterial activity from crude extracts

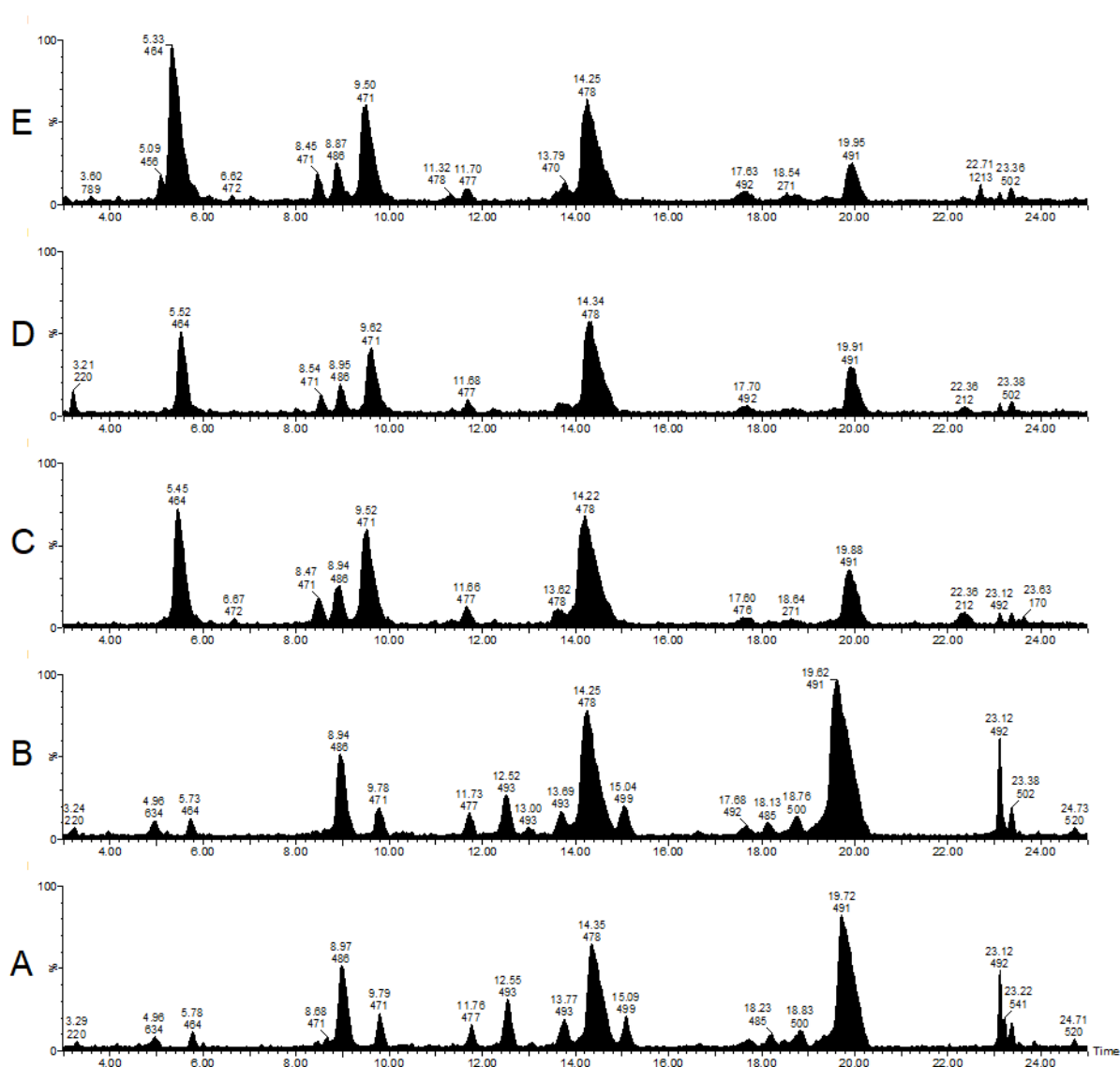
At equal bacterial density (*i.e.* 10<sup>9</sup> CFU/mL), the alterin concentration was higher in the hOe extracts than in the hCg ones (Table 1). The antibiotic activity against Gram-negative bacteria was higher using alterin extracts produced by hCg strains than hOe ones (Table 1). *Vibrio tapetis* CECT 4600 displayed a higher resistance to alterins than the other tested strains (Table 1).

**Table 1.** MIC (μg/mL) of crude extracts obtained from the five *Pseudoalteromonas* supernatants, hCg-6, hCg-42, hOe-66, hOe-124 and hOe-125. Concentrations of crude extracts were obtained using BCA method, and were normalized as concentration produced by 10<sup>9</sup> CFU/mL of each strains. ND: Not Determined.

Producing strains	Crude extracts (μg/mL for 10 <sup>9</sup> CFU/mL)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. harveyi</i> ORM4	<i>V. pectinica</i> CIP 105190	<i>V. splendidus</i> LGP32	<i>V. tapetis</i> CECT 4600
hCg-6	112.4	6.25	1.58	1.58	1.58	>50
hCg-42	276.3	6.25	1.58	1.58	1.58	>50
hOe-66	365.6	25	3.13	3.13	3.13	>50
hOe-124	557.2	25	3.13	6.25	6.25	>50
hOe-125	492.7	25	3.13	6.25	3.13	>50
Polymyxin B	/	1.5	50	100	ND	ND

### 3.2. *Pseudoalteromonas* hOe strains as alterins producers

RP-UPLC-MS analysis allowed us to compare crude extracts from the five *Pseudoalteromonas* strains (Figure 1). Similarities were observed between crude extracts from hOe and hCg strains, in terms of retention time and m/z. Indeed, m/z were the same for peaks with the highest intensity (*i.e.* 464, 486, 471, 478 and 491), between the five chromatograms, as well as for the retention times, revealing that hOe crude extracts have also contained alterins. Based on LC analysis, the resulting extracts were composed of at least 96% of alterins. Nevertheless, differences in both intensity and diversity appeared between the all five crude extracts, suggesting that the five strains produced a high diversity of alterin analogs.



**Figure 1.** Base peak intensity chromatogram obtained from crude extracts of the five strains *Pseudoalteromonas* hCg-6 (A), hCg-42 (B), hOe-66 (C), hOe-124 (D) and hOe-125 (E). Time retention and m/z were indicated for most intense peaks (> 5% of intensity).



### **3.3. Structural diversity of alterins**

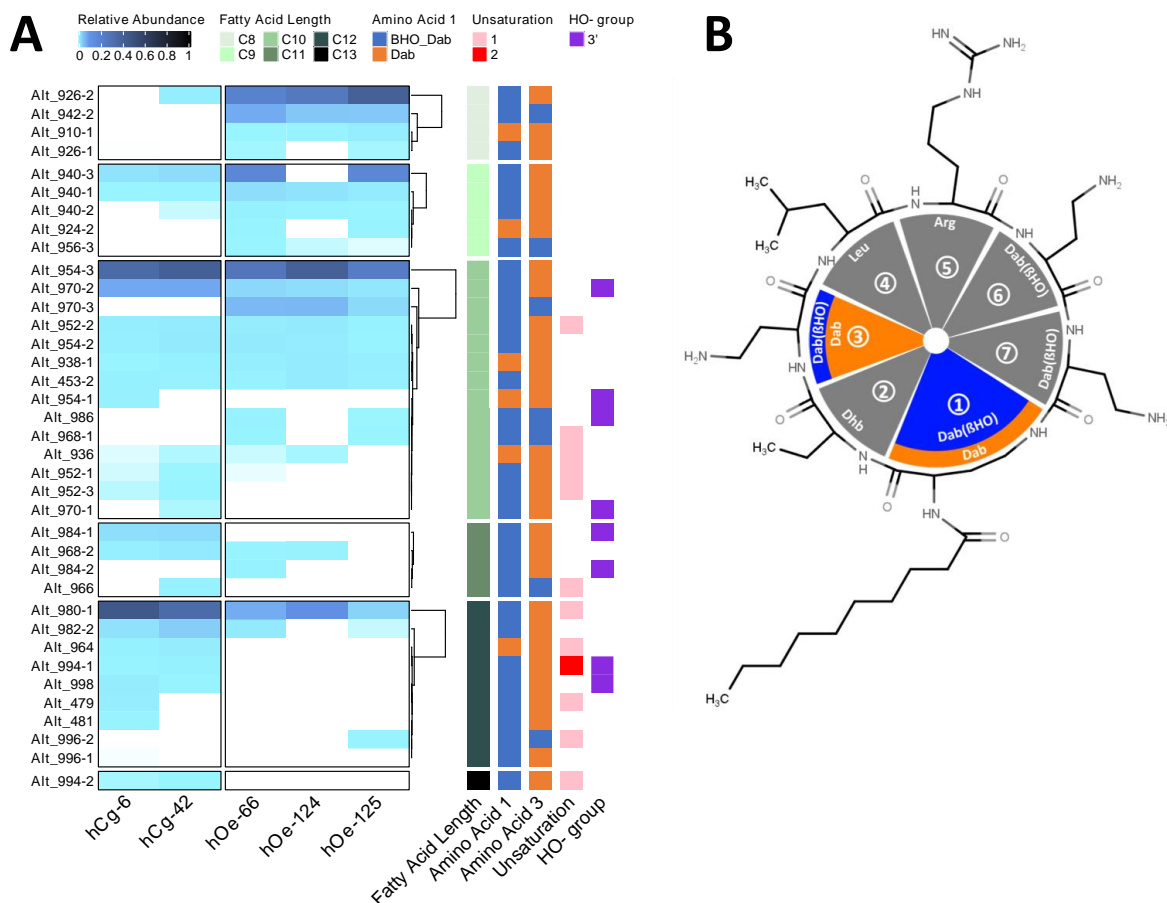
From the five crude extracts, more than 55 alterins or alterin-like structures were identified and among them 37 structures have been elucidated by LC-MS/MS (Figure 2A). The alterin members ranged from 453 Da to 998 Da with structural differences detected both on the peptidic cycle and the fatty acid chain. As an example, “Alt\_998-1” means Alterin of 998 Da, first isoform.

The amino acid residues within the cycle are the same in all alterins, except residues 1 and 3. Most structures carry a Dab( $\beta$ -OH)<sup>1</sup> and Dab<sup>3</sup> (68%) but a few alterins were found, mainly from hOe strains, with the combinations Dab( $\beta$ -OH)<sup>1</sup>-Dab( $\beta$ -OH)<sup>3</sup> or Dab<sup>1</sup>-Dab<sup>3</sup> (Figure 2B).

Regarding the fatty acid chain, the length varied from a C8 to a C13. The most abundant alterin (around 40%) found in hCg strains crude extract was the Alt\_980-1 with a C12:1 fatty acid chain while the most abundant alterin member (around 30%) for hOe exhibits a shorter chained-alterin, the C8:0 Alt\_926-2. The Alt\_954-3, a C10:0 alterin was also produced in high proportions by the both hCg and hOe crude extracts (37% and 28%, respectively).

The C13 chain was observed only on the Alt\_994-2 isoform, exclusively produced by hCg strains. Overall, hCg strains produced mainly alterins with long fatty acid chains (>C10) while hOe strains produced alterins with shorter fatty acid chains (<C10).

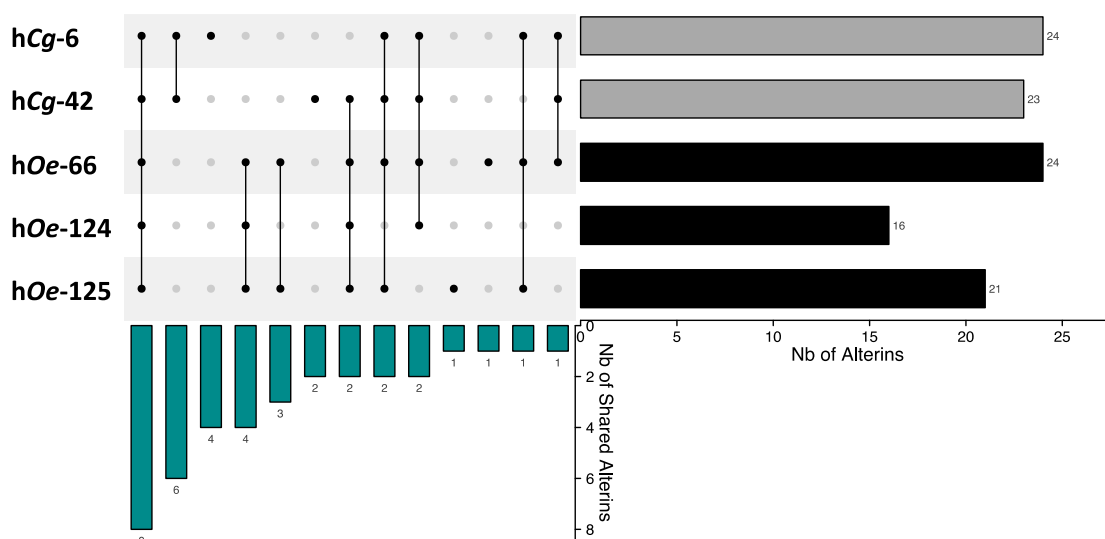
Interestingly, 3 tripeptides were also detected in the crude extracts, the Alt\_453, Alt\_471 and Alt\_481. They all carried the Dab( $\beta$ -OH)<sup>1</sup>-Dhb<sup>2</sup>-Dab<sup>3</sup> combination with a fatty acid (C10 or C12).



**Figure 2.** Representation of the chemodiversity of alterins produced by the five strains *Pseudoalteromonas* hCg-6, hCg-42, hOe-66, hOe-124 and hOe-125. **A.** Heatmap illustrating the relative abundances of alterins identified in the crude extract from each strain, ordered by the fatty acid length (C8, C9, C10, C11, C12 and C13, in green shade), the amino acid 1 and 3 (Dab( $\beta$ HO), blue; Dab, orange) and the unsaturation (red, with; transparent, without). **B.** General structure of alterins with amino acid residues identifications.

### 3.4. Alterins richness from *Pseudoalteromonas* strains

Based on alterin diversity from the crude extracts of the 5 strains, strains hCg-6 and hOe-66 exhibited the highest diversity, with 24 different alterins (Figure 3), while hOe-124 strain produced only 16 different alterins. A total of eight alterins were common to the five strains, representing from 32% to 89% of the total crude extracts. All 6 hCg-specific alterins carried unsaturation and/or hydroxylations on the fatty acid chain (Alt\_994-2, Alt\_998, Alt\_994-1, Alt\_964, Alt\_984 and Alt\_952-3) while alterins specific to hOe strains had peptidic cycles with either Dab<sup>1</sup>-Dab<sup>3</sup> or Dab( $\beta$ HO)<sup>1</sup>-Dab( $\beta$ HO)<sup>3</sup> combinations (Alt\_942-2, Alt\_910-1, Alt\_956-3 and Alt\_970-3).



**Figure 3.** Venn representation brought information on the number of alterins produced by each strain and those shared between them.

## 4. Discussion

In summary, a total of at least 37 alterin peptides were produced and identified from 5 different *Pseudoalteromonas* strains. Few other major genera are studied for their ability to produce antimicrobial cyclolipopeptides, such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* or *Paenibacillus*, respectively producing Surfactin, Pseudofactin, Daptomycin and Polymyxin (9). To date, *Pseudoalteromonas* genus is still poorly investigated, with only 2 studies reported the production of cyclolipopeptides (7, 9). As genus *Pseudoalteromonas* is exclusively found in the marine environment (10), alterins are considered as the first marine family of cyclolipopeptides.

Combining the structure diversity and bioactivity differences of alterin extracts, it seems that the fatty acid chains length is involved in the activity of alterins against Gram-negative bacteria, as described for polymyxins (11). Additionally, to the best of our knowledge, none has reported the biosynthesis of the partial cyclolipopeptide so far, *i.e.* the 3 tripeptides, suggesting that the alterin biosynthesis may result from a sequential biosynthesis mechanism. Overall, structure-activity investigations need to be conducted to identify the key structural features governing antibacterial activity and consider their application to treat, for instance, infectious diseases.

**Funding:** This work was supported by Région Bretagne, Quimper Bretagne Occidentale, Université de Bretagne Occidentale and the Université de Bretagne Sud. V.T. and R.C. are grateful to Région Nouvelle Aquitaine who supported the project ECONAT funded by the Contrat de Plan Etat-Région and the CNRS and the European Regional Development Fund. The work has also been supported by the project “Développement de Probiotiques innovants pour l’AQaculture MARiNe” (PAQMAN) financed by the program of European Fund for Maritime Affairs and Fisheries (FEAMP).

**Competing Interests:** None declared.

**Ethical Approval:** Not required.

## References

1. Bowman JP. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs* 5:220–241.
2. Offret C, Desriac F, Le Chevalier P, Mounier J, Jégou C, Fleury Y. 2016. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Marine Drugs* 14:129.
3. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology* 5:355–362.
4. Offret C, Rochard V, Laguerre H, Mounier J, Huchette S, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y. 2018. Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*, Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics Antimicrob Proteins* <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9389-8>.
5. Desriac F, Le Chevalier P, Brillet B, Leguerinel I, Thuillier B, Paillard C, Fleury Y. 2014. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiology Letters* 350:107–116.
6. Offret C, Jégou C, Mounier J, Fleury Y, Le Chevalier P. 2019. New insights into the haemo- and cOelo-microbiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *Journal of Applied Microbiology* <https://doi.org/10.1111/jam.14184>.

7. Desriac F, Harras AE, Simon M, Bondon A, Brillet B, Chevalier PL, Pugnière M, Got P, Destoumieux-Garzón D, Fleury Y. 2020. Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas* are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Mar Drugs* 17.
8. Pantel L, Florin T, Dobosz-Bartoszek M, Racine E, Sarciaux M, Serri M, Houard J, Campagne J-M, de Figueiredo RM, Midrier C, Gaudriault S, Givaudan A, Lanois A, Forst S, Aumelas A, Cotteaux-Lautard C, Bolla J-M, Vingsbo Lundberg C, Huseby DL, Hughes D, Villain-Guillot P, Mankin AS, Polikanov YS, Gualtieri M. 2018. Odilorhabdins, Antibacterial Agents that Cause Miscoding by Binding at a New Ribosomal Site. *Molecular Cell* 70:83-94.e7.
9. Patel S, Ahmed S, Eswari JS. 2015. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. *World J Microbiol Biotechnol* 31:1177–1193.
10. Paulsen SS, Strube ML, Bech PK, Gram L, Sonnenschein EC. Marine Chitinolytic *Pseudoalteromonas* Represents an Untapped Reservoir of Bioactive Potential. *mSystems* 4:e00060-19.
11. Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. 2010. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J Med Chem* 53:1898–1916.

### 3. Conclusion

Les souches de *Pseudoalteromonas* hCg-6, hCg-42, hOe-66, hOe-124 et hOe-125 produisent un grand nombre d'isoformes d'altérines à environ 20 mg/L d'altérines totales dans les surnageants. Il apparaît que la famille des altérines regroupe plus d'une cinquantaine d'isoformes dont 37 ont été structuralement caractérisés. Les différences structurales sont identifiées au niveau de l'hydroxylation ou non des résidus Dab<sup>1</sup> et Dab<sup>3</sup> du cycle en Dab( $\beta$ HO). La chaîne hydrocarbonée est également variable. Des altérines ont été identifiées avec une chaîne hydrocarbonée allant de C8:0 à C13:0. De plus, certaines altérines présentent une hydroxylation en C3' et/ou une insaturation en C5'. Il apparaît que les souches hCg produisent plus d'altérines à chaînes longues, notamment la forme C12 alors que les souches hOe produisent plus de chaînes courtes C8. La forme Dab( $\beta$ HO)<sup>1</sup> et Dab<sup>3</sup> est la plus fréquente et les insaturations sur la chaîne hydrocarbonée sont plus présentes chez les altérines à chaîne longue.

Néanmoins cette étude n'a pas permis de d'élucider l'impact de ces modifications structurales sur l'activité biologique. Seule l'activité anti-bactérienne des 5 extraits a été définie. Il apparaît que l'activité anti-bactérienne la plus importante est détectée avec les extraits des souches hCg-6 et hCg-42. L'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée semble par conséquent améliorer l'activité anti-bactérienne. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Desriac *et al.* En revanche, les effets de l'hydroxylation des chaînes latérales des résidus Dab en position 1 et 3 sur l'activité restent à définir.

La synthèse peptidique en phase solide a été envisagée pour établir les relations structure/activité des altérines. Néanmoins, le résidu Dab( $\beta$ HO) n'étant pas disponible dans le commerce, elle n'a pas été réalisée à ce jour. Ce dernier a pourtant été utilisé pour la synthèse d'analogues des odilorhabdines, des peptides linéaires de 10 résidus d'acides aminés dont 2 résidus Dab( $\beta$ HO) (Pantel *et al.* 2018 ; Sarciaux *et al.* 2018).

Les odilorhabdines sont des peptides non ribosomiaux antibactériens contenant 2 résidus Dab( $\beta$ HO) (Pantel *et al.* 2018). L'étude de la relation structure-activité a révélé que la substitution de ces résidus par différents monomères se traduisent par une réduction importante de l'activité. En revanche, la substitution du résidu Dab( $\beta$ HO) en position 3 par un résidu Ala aboutit à un peptide 4 fois plus actif.

---

**Chapitre 2 – Bactéries d'intérêt du genre**  
***Pseudoalteromonas***

---





## 1. Introduction

Les bactéries associées aux organismes marins ont un fort potentiel de biosynthèse de composés actifs (Amiri Moghaddam *et al.* 2021). Le criblage de bactéries actives isolées d'huîtres creuses et plates a permis d'identifier, entre-autre, 5 souches du genre *Pseudoalteromonas*. Ces dernières présentent une activité contre les bactéries à Gram négatif. Les composés actifs ont alors été caractérisés et dénommés altérines (Desriac *et al.* 2020). Les profils de production des 5 souches étant différents, nous avons entrepris le séquençage des génomes des souches productrices pour identifier la voie de biosynthèse des alterines. Les trois souches *Pseudoalteromonas* sp. hOe-66, hOe-124 et hOe-125 sont génétiquement proches avec des génomes de 4.64 Mb, contenant environ 2300 CDS et 4203 familles de gènes en commun soit 98% (Figure 20).

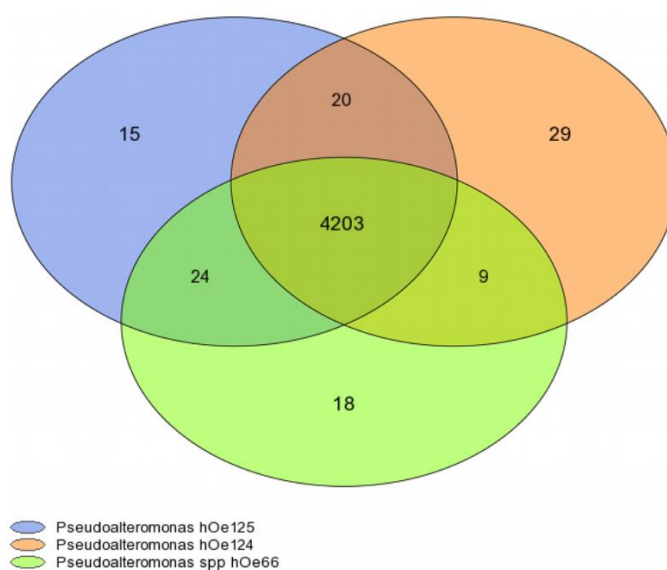


Figure 20. Diagramme de Venn des familles de gènes des souches *Pseudoalteromonas* sp. hOe-66, hOe-124 et hOe-125

Lors de l'étude des génomes des souches de *Pseudoalteromonas*, nous avons observé que les trois souches *Pseudoalteromonas* hOe-66, hOe-124, hOe-125 ne présentaient pas de correspondance avec une espèce de *Pseudoalteromonas* décrite, ANI <97% (Average Nucleotide Identity) indiquant que les souches hOe-66, hOe-124 et hOe-125 constituaient les représentants d'une nouvelle espèce du genre *Pseudoalteromonas*. Nous avons donc

entrepris la caractérisation des souches. Compte tenu de leur origine, nous avons proposé de nommer cette nouvelle espèce *Pseudoalteromonas ostreae*.

L'article intitulé « *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harboured by the flat oyster *Ostrea edulis* » a été accepté le 13.09.2021 dans le journal « International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology », DOI 10.1099/ijsem.0.005070.

## **2. Description et caractérisation de la nouvelle espèce *Pseudoalteromonas ostreae***

## *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harboured by the flat oyster *Ostrea edulis*

Hélène Cuny<sup>1†</sup>, Clément Offret<sup>1†</sup>, Amine M. Boukerb<sup>2,3</sup>, Leila Parizadeh<sup>1</sup>, Olivier Lesouhaitier<sup>2</sup>, Patrick Le Chevalier<sup>1</sup>, Camille Jégou<sup>1</sup>, Alexis Bazire<sup>1</sup>, Benjamin Brillet<sup>1</sup> and Yannick Fleury<sup>1,\*</sup>

### Abstract

Three bacterial strains, named hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125, were isolated from the haemolymph of different specimens of the flat oyster *Ostrea edulis* collected in Concarneau bay (Finistère, France). These strains were characterized by a polyphasic approach, including (i) whole genome analyses with 16S rRNA gene sequence alignment and pangenome analysis, determination of the G+C content, average nucleotide identity (ANI), and *in silico* DNA–DNA hybridization (*is*DDH), and (ii) fatty acid methyl ester and other phenotypic analyses. Strains hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125 were closely related to both type strains *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15<sup>T</sup> and *Pseudoalteromonas neustonica* PAMC 28425<sup>T</sup> with less than 93.3% ANI and 52.3% *is*DDH values. Regarding their phenotypic traits, the three strains were Gram-negative, 1–2 µm rod-shaped, aerobic, motile and non-spore-forming bacteria. Cells grew optimally at 25 °C in 2.5% NaCl and at 7–8 pH. The most abundant fatty acids were summed feature 3 (C<sub>16:1</sub> ω7c/C<sub>16:1</sub> ω6c), C<sub>16:0</sub> and C<sub>17:1</sub> ω8c. The strains carried a genome average size of 4.64 Mb and a G+C content of 40.28 mol%. The genetic and phenotypic results suggested that strains hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125 belong to a new species of the genus *Pseudoalteromonas*. In this context, we propose the name *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov. The type strain is hOe-66<sup>T</sup> (=CECT 30303<sup>T</sup>=CIP 111911<sup>T</sup>).

The bacterial genus *Pseudoalteromonas* was first described in 1995 by Gauthier *et al.* leading to most of the bacteria from the genus *Alteromonas* being reattributed to the genus *Pseudoalteromonas* after a phylogenetic study based on 16S rRNA analysis [1]. This genus is part of the family *Pseudoalteromonadaceae* within the order *Alteromonadales* and the class *Gamma-proteobacteria*. In July 2021, it was composed of 53 species separated in pigmented and non-pigmented clades (LPSN; [www.bacterio.net/pseudoalteromonas.html](http://www.bacterio.net/pseudoalteromonas.html)). More precisely, these bacteria are Gram-stain-negative rods, mainly aerobic and motile and all isolated from marine environment [2–11].

The aim of the present work was to assign the taxonomic position of the bacterial strains hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125, isolated from the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* collected in Brittany, France by using phylogenomic and phenotypic analyses.

### ISOLATION AND ECOLOGY

Flat oysters were sampled during winter 2013 (12 February) in the bay of Concarneau, Brittany, France (47° 53' N, 3° 58' W), located in the Natura 2000 zone (FR5300023). Wild oysters (*n*=50) were collected from the sediment. Haemolymph samples were aseptically collected from the adductor muscle using a 25-gauge needle attached to a 2 ml syringe.

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Univ Brest, Univ Bretagne Sud, LBCM, EA 3884, F-29000 Quimper, F-56100 Lorient, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, LMSM EA4312, Université de Rouen Normandie, Normandie Université, Evreux, France; <sup>3</sup>Genomics Platform, LMSM EA4312, University of Rouen-Normandy, Normandie University, Evreux, France.

**\*Correspondence:** Yannick Fleury, [yannick.fleury@univ-brest.fr](mailto:yannick.fleury@univ-brest.fr)

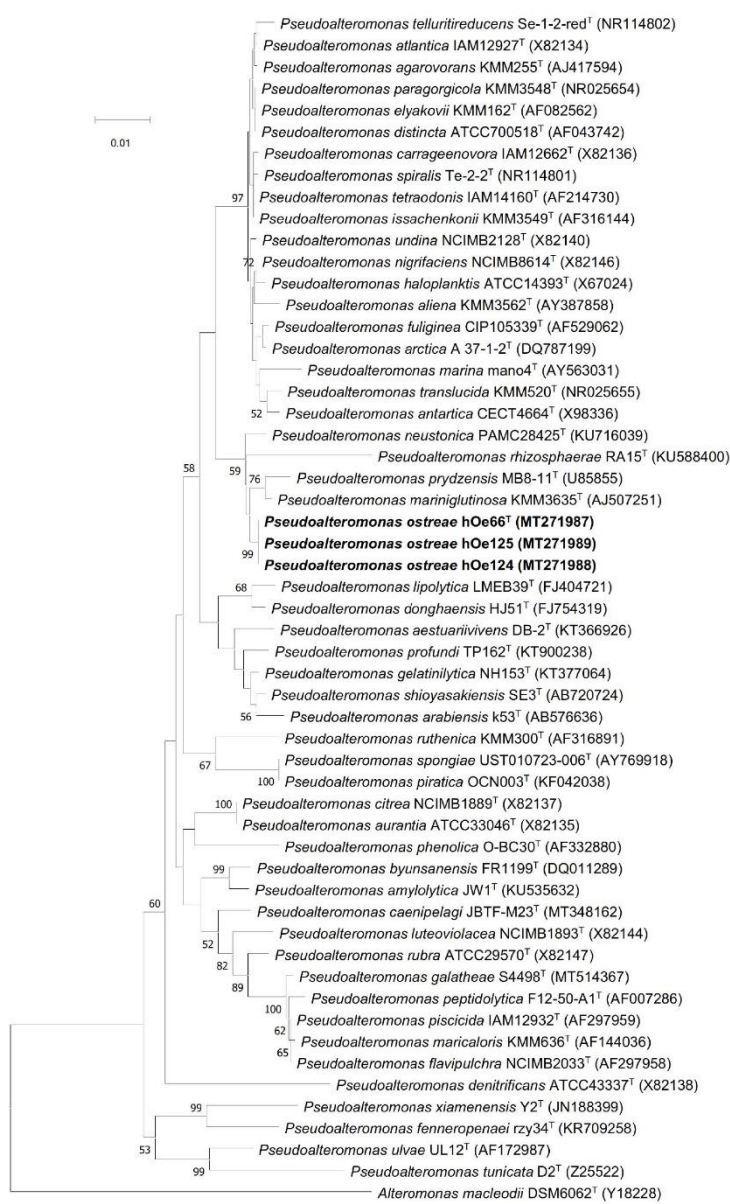
**Keywords:** flat oyster; haemolymph; *Pseudoalteromonas*.

**Abbreviations:** AFNOR, Association Française de Normalisation; ANIb, average nucleotide identity based on BLAST; CDS, coding sequences; dDDH, digital DNA–DNA hybridization; GGDC, Genome-to-Genome Distance Calculator; *is*DDH, *in silico* DNA–DNA hybridization; *is*DDH, *in silico* DNA–DNA hybridization; MA, marine agar; MB, marine broth; TSA, tryptone soy agar.

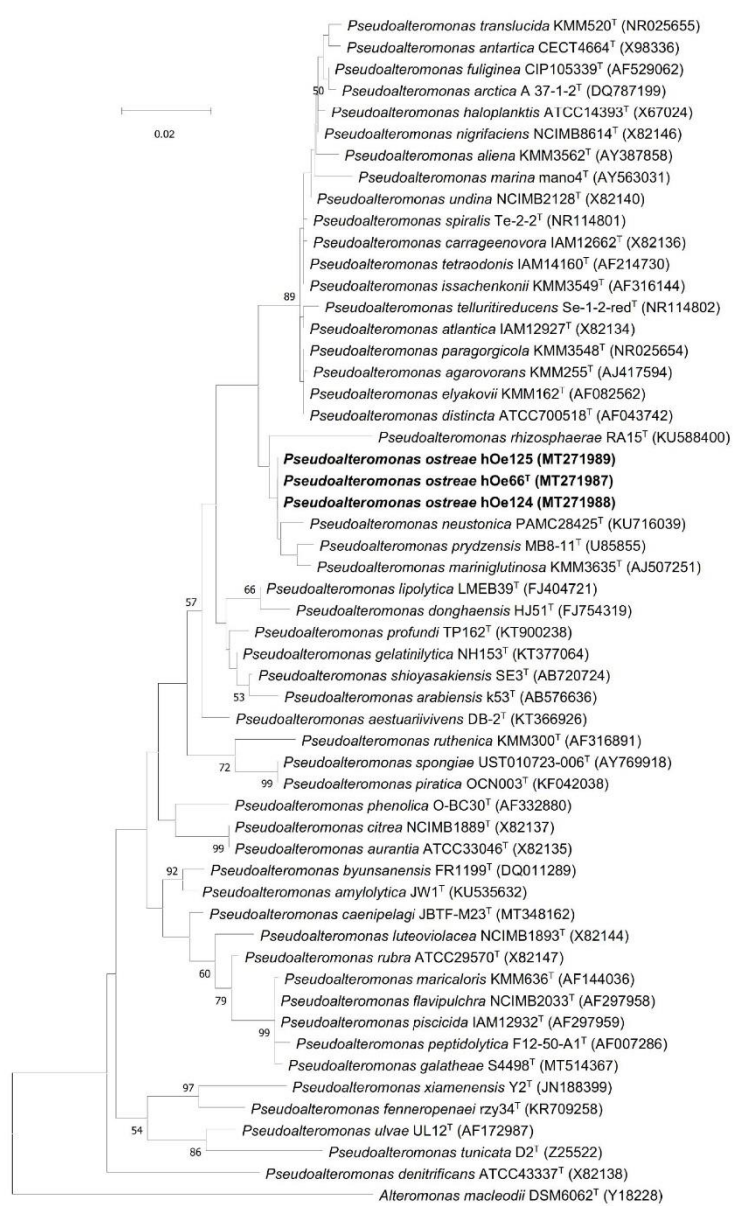
The 16S rRNA sequence of strain hOe-66<sup>T</sup> was deposited at GenBank under the accession number MT271987. The WGS data is available under the accession numbers JAGPYN01, biosample SAMN18537376 and bioproject PRJNA718511. The raw sequencing reads have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the accession number SRR15130277. The 16S rRNA sequences of hOe-124 and hOe-125 were deposited in GenBank under the accession numbers MT271988 and MT271989, respectively.

†These authors contributed equally to this work

One supplementary table is available with the online version of this article.

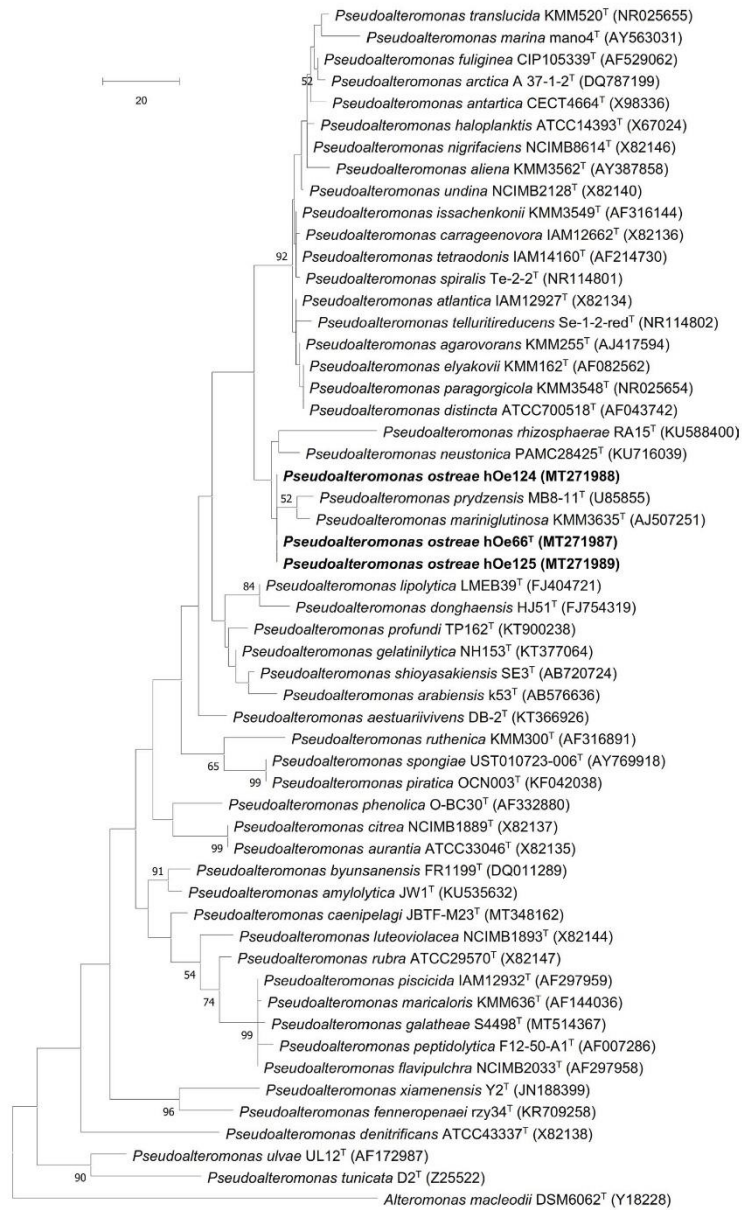


**Fig. 1.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of the three strains hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125 belonging to *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov. and the type strains of the genus *Pseudoalteromonas*. Bootstrap values are shown above branches if >50%. *Alteromonas macleodii* DSM 6062<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. Sequence accession numbers are given in parentheses.



**Fig. 2.** Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of the three strains hOe-661<sup>T</sup>, hOe-124<sup>T</sup> and hOe-125<sup>T</sup> belonging to *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov. and the type strains of the genus *Pseudoalteromonas*. Bootstrap values are shown above branches if >50%. *Alteromonas macleodii* DSM 6062<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. Sequence accession numbers are given in parentheses.





**Fig. 3.** Maximum parsimony phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of the three strains hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125 belonging to *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov. and the type strains of the genus *Pseudoalteromonas*. Bootstrap values are shown above branches if >50%. *Alteromonas macleodii* DSM 6062<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bar, 20 substitutions per nucleotide position. Sequence accession numbers are given in parentheses.

**Table 1.** Average nucleotide identity based on BLAST (ANIb) and pairwise *in silico* DNA–DNA hybridization (*is*DDH; using GGDC formula 2 and *is*DDH estimates based on identities/high-scoring segment pairs length) values for the three *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov. strains and the most closely related members of the genus *Pseudoalteromonas*

Strains: 1, hOe-66<sup>T</sup>; 2, hOe-124; 3, hOe-125; 4, *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393<sup>T</sup>; 5, *Pseudoalteromonas neustonica* PAMC 28425<sup>T</sup>; 6, *Pseudoalteromonas prydzensis* ACAM 620<sup>T</sup>; 7, *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15<sup>T</sup>. The numbers below the diagonal are ANI values predicted between pairs of genomes. The numbers above the diagonal are dDDH values between genomes.

Strain	1	2	3	4	5	6	7
1	–	100	100	26.4	24.0	28.9	52.3
2	100	–	100	26.4	24.0	28.9	52.3
3	100	100	–	26.4	24.0	28.9	52.3
4	83.1	83.1	83.1	–	23.1	30.7	25.7
5	80.9	80.9	80.9	80.1	–	23.3	24.5
6	85.0	85.0	85	85.9	80.4	–	28.3
7	93.3	93.3	93.3	82.7	81.2	84.5	–

Each sample was microscopically examined to check for the presence of haemocytes.

To isolate cultivable bacteria, 100 µl of a tenfold dilution of haemolymph was spread onto marine agar [MA: marine broth 2216 (MB; Difco) +1.5% agar (Fisher Scientific)] using sterilized solid-glass beads (Fisher Scientific). After 72 h of incubation at 18 °C, one to ten macroscopically distinguishable colonies were picked and subcultured in MB for 48 h at 18 °C with shaking (100 r.p.m.). Each bacterial isolate was purified by three subsequent streakings on MA. For long-term storage, sterile glycerol was added to 1 ml pure culture (25%, v/v) in cryogenic vials before storage at –80 °C.

## DNA EXTRACTION AND WHOLE GENOME SEQUENCING

Total DNA was extracted from 48 h cultures at 18 °C using the Monarch Genomic DNA purification kit (New England Biolabs) according to the manufacturer instructions. DNA (1 ng) was quantified by a double-stranded high-sensitivity kit on a Qubit fluorometer (ThermoFisher Scientific) and used to prepare genomic libraries for Illumina sequencing using the Nextera XT DNA sample kit as per the manufacturer's recommendations (Illumina). Libraries were sequenced on the Illumina MiSeq platform (LMSM Evreux, Rouen Normandy University, France) using a paired-end protocol (2×300 pb) and the V3 MiSeq reagent kit.

## GENOMES ASSEMBLY AND ANNOTATION

For bioinformatics analyses, default parameters were used unless otherwise stated. Paired-end reads were trimmed using Trimmomatic version 0.3.9 [12]. Sequence data quality was checked using FastQC version 0.11.9 [13], and assembly

achieved using Unicycler version 0.4.8 [14]. QUAST version 5.0.0 [15] was used to check assembly consistency (i.e. number of contigs, G+C content and total size). Mean coverages of contigs in each draft genome were determined by mapping trimmed reads onto the contigs using BBMap version 38.18 [16]. 16S rRNA prediction was done using barrnap version 0.9 [17]. The DNA G+C content was 40.28 mol% and the draft genome sizes were about 4.64 Mb. Details of assembly metrics and GenBank accession numbers are provided in Table S1 (available in the online version of this article).

The genome annotation of strain hOe66<sup>T</sup> was performed on the MicroScope web-based platform [18–20]. A total of 4293 coding sequences (CDS) were annotated, with an average length of 983 bp and an average of intergenic length of 143 bp. The protein-coding density was 88.61%. Also, thanks to the primary annotation, 74% of the CDS are classified in a cluster of orthologous groups [21], mainly for amino acid transport and metabolism (7.7%) and signal transduction mechanisms (7.2%).

## 16S rRNA GENE PHYLOGENY

The high-quality genome sequences were used to determine the taxonomic position of the three strains. First, 16S rRNA gene sequences were compared with those from representatives of 53 type strains of the genus *Pseudoalteromonas*, using *Alteromonas macleodii* DSM 6062<sup>T</sup> 16S rRNA gene as an outgroup. Sequence alignment (with MUSCLE [22]) and tree reconstructions (using the neighbour-joining, maximum-likelihood and maximum-parsimony methods with the Kimura two-parameter model) were performed using MEGA version 10.2.2 [23]. The bootstrap analysis was performed based on 500 replicates. The obtained phylogenetic trees (Figs 1–3) show the phylogenetic relationships of strains hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125 with the type strains of all validly named species within the genus *Pseudoalteromonas* based on the alignment of 1239 bp 16S rRNA gene sequences. The three strains form a separate clade with *Pseudoalteromonas neustonica* as the most closely related species.

## GENOME INDEXES

Genome-related indexes were calculated using the Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) web server (ggdc.dsmz.de; [24]) for *in silico* DNA–DNA hybridization (*is*DDH) [25], and PyANI version 0.2.11 [26] for the average nucleotide identity based on BLAST (ANIb) values (Table 1, Fig. 4).

All *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov. strains shared less than 93.3% ANI values with the most closely related species *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15<sup>T</sup> [27]. The 'gold standard' for species description using ANI is often accepted as 95–96% [28]. This relationship was confirmed by the DDH value of 52.3% (using recommended formula 2), which is below the 70% recommended for the classification within the same species. Altogether, these results confirm that the three *P. ostreae* strains belong to the same novel genomospecies

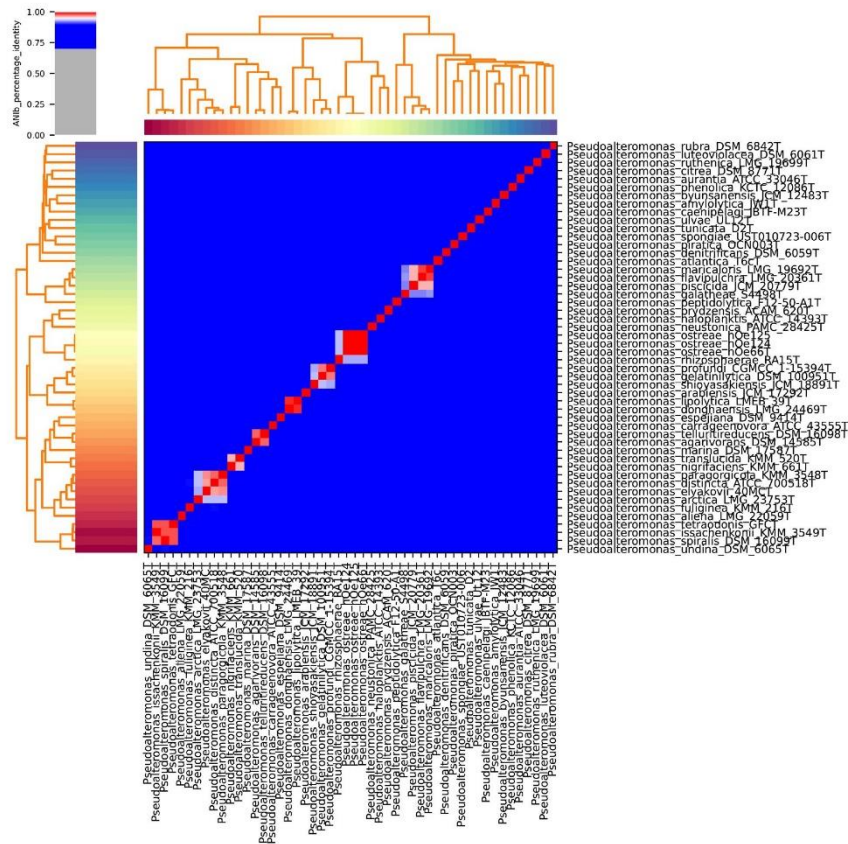


Fig. 4. Heatmap displaying the average nucleotide identity based on BLAST (ANIb) values (%) between the 50 *Pseudoalteromonas* species type strains. The colour key represents the percentage identity of strains with lower (grey/blue) and higher (red) ANI values. Strains clustered via dendrograms based on row means with gplots heatmap.2.

while they do not belong to any existing species in the genus *Pseudoalteromonas*.

**PHYLOGENOMIC ANALYSIS**

Prokka version 1.14.6 was used for the annotation of the 50 *Pseudoalteromonas* strains and *Alteromonas macleodii* DSM6062<sup>T</sup> (used as an outgroup to root the tree) genome sequences, with default parameters [29]. The obtained .gff files were used for the pangenome analysis determined at BLASTp identity of 35% using Roary software (version 3.13.0) [30] with the following flags: -e (create a multiFASTA alignment of core genes using PRANK), -n (fast core gene alignment with MAFFT), and -i 35 (minimum percentage identity for blastp;

35%). The Roary output was visualized using the roary\_plots.py script (Fig. 5).

Sequences of 1033 core genes were concatenated (composite length of 1057432 bp) and aligned. Then, a core genome phylogeny free of correction for recombination was reconstructed with IQ-TREE version 2.1.4 [31] using ModelFinder [32], and ultrafast bootstrapping [33]. MEGA version 10.2.2 [23] was used to reconstruct a maximum-likelihood phylogenetic tree (Fig. 6).

The topology of this phylogenomic tree and the pangenome analysis confirm the separation of the *P. ostreae* species into a distinct clade, with three closely related hOe strains.



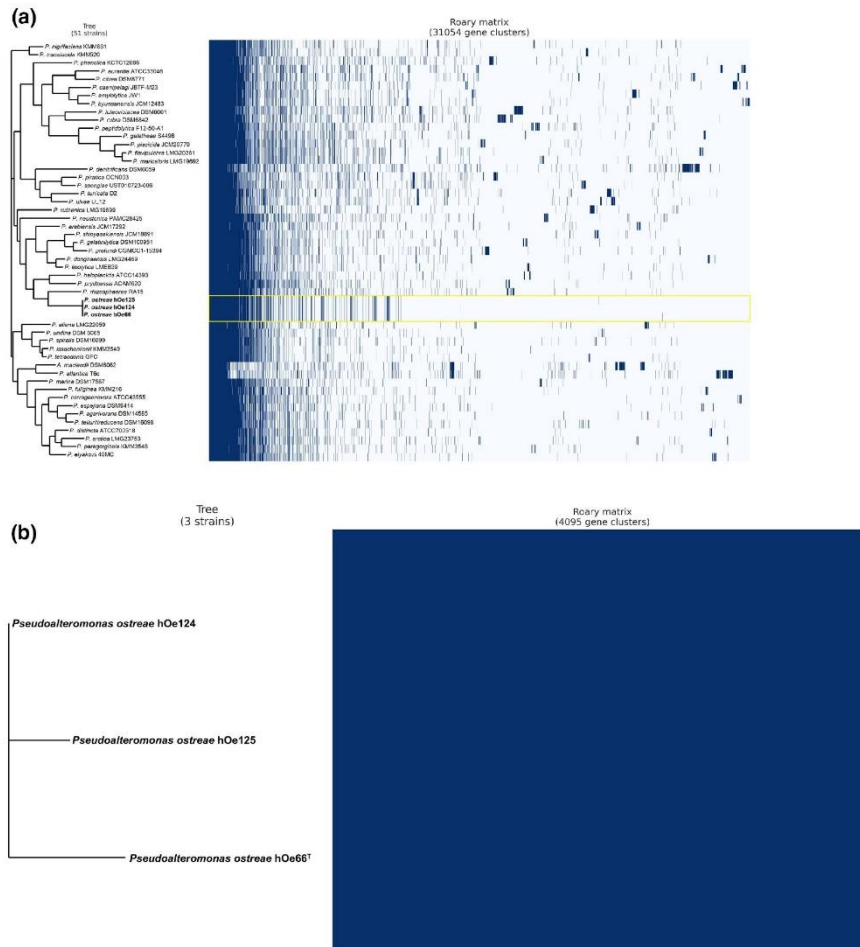


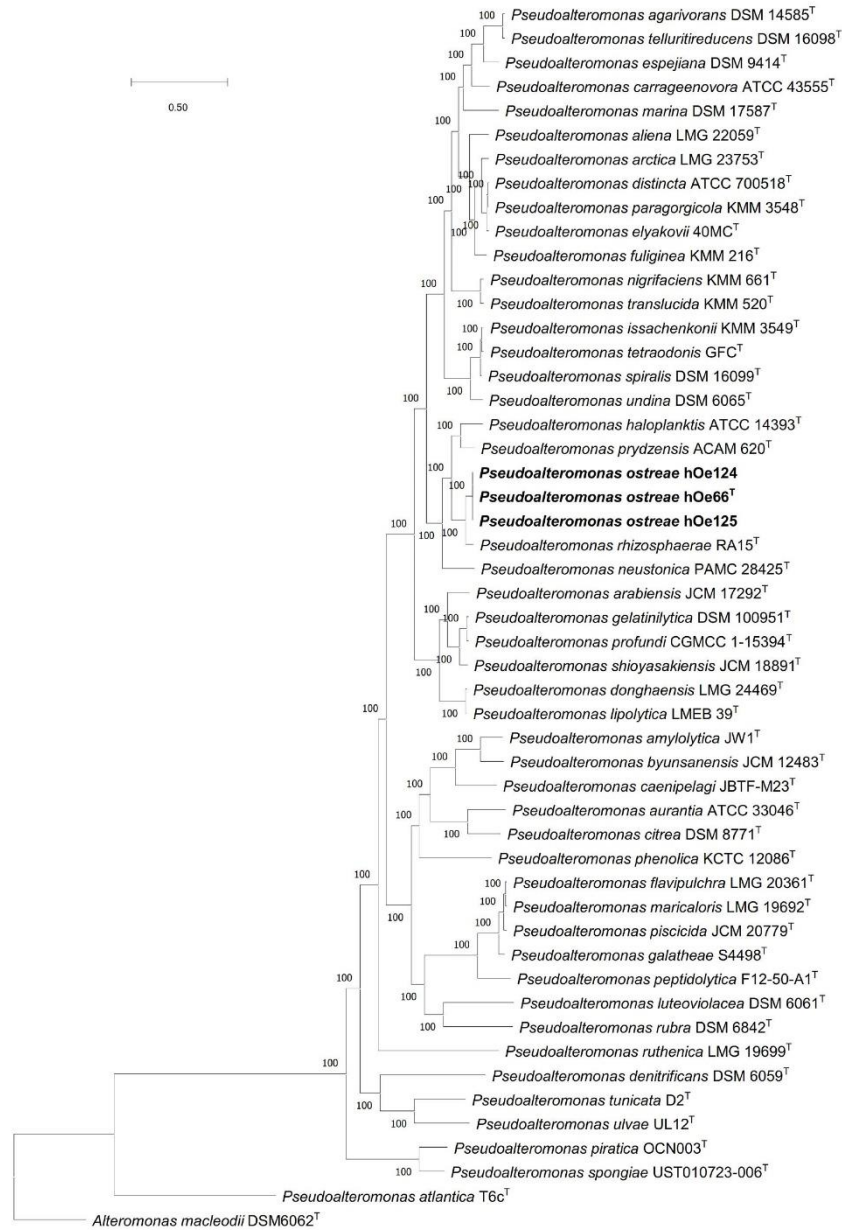
Fig. 5. Clustered gene presence/absence and accessory genome distribution calculated by pangenome analysis among (a) the 50 *Pseudoalteromonas* and *Alteromonas macleodii* strains, and (b) the three *Pseudoalteromonas ostreae* strains.

**PHYSIOLOGY AND CHEMOTAXONOMY**

The phenotypic characteristics of strains hOe-66<sup>T</sup>, hOe-124 and hOe-125 were determined in triplicate using three 48 h cultures at 18 °C in MB as growth medium. The type strains *P. rhizosphaerae* CECT 9079<sup>T</sup> from the Spanish Type Culture Collection (CECT, University of Valencia, Valencia, Spain) [27] and *P. neustonica* JMC 31286<sup>T</sup> from the Japan Collection of Microorganisms (RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan) [34] were used as reference controls.

The shape and colour of colonies were observed on MA plates. The cell size and morphology were examined using scanning

electron microscopy (JSM-IT500HR, JEOL). Gram staining was achieved according to Halebian *et al.* [35] and motility assessed by the hanging-drop method [36]. The temperature growth range was tested at 4, 10, 18, 20, 25, 30, 37 and 45 °C on MA for up to 10 days. The pH range was tested at pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 in buffered MB at 18 °C for up to 10 days by measuring the culture turbidity at 600 nm. The salinity tolerance range was determined in a tryptone–glucose extract agar media (mTGE with 1.5% agar) within a range from 0 to 30% (w/v) over 10 days at 18 °C. Anaerobic growth tolerance was estimated during 10 days at 18 °C using semi-solid tryptone



**Fig. 6.** Phylogenetic dendrogram based on the core genome conserved between the 50 *Pseudoalteromonas* strains using the concatenated sequences of 1033 core single-copy genes (1057432 bp). *Alteromonas macleodii* DSM6062<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bootstrap values are indicated at the nodes. The scale bar represents a 0.5% nucleotide sequence divergence.

soy agar (TSA) with 1.5% NaCl [tryptone soy broth (TSB), Biokar Diagnostics, +1.5% NaCl with 1.5% or 0.6% agar) inclusion with 0.6% agar and a paraffin top layer. Growth in other media was also tested such as TSA, TSA with 2.5% NaCl, media cetrimide agar (Dutscher) with 2.5% NaCl and McConkey agar (BD Difco, Fisher Scientific) with 2.5% NaCl, Mueller–Hinton (Difco) and Mueller–Hinton with 1.5% NaCl at 18 °C for up to 10 days.

Biochemical characteristics were determined with the API 20NE and API ZYM galleries (bioMérieux) according to the manufacturer's recommendations. The API 20NE assay was performed using the manufacturer's inoculation fluid with marine cations supplement in a 1:10 ratio [37] and incubated at 20 °C during 48 h. The API ZYM test was done at 20 °C for 4.5 h. Prior to the cellular fatty acid composition analysis, strains were cultured on MA and incubated at 20 °C for 48 h. The cellular fatty acid compositions were determined according to the standard protocols of the MIDI Microbial Identification System [38]. Content was analysed by gas chromatography (Agilent 6850), using the MIDI TSBA6 method (2008) and the Sherlock Microbial identification package.

The antibiotic resistance was tested using the solid agar diffusion approach according to the AFNOR U47-107 method.

Since the strains were isolated from oyster haemolymph, we controlled their sensitivity to the main antibiotics used in aquaculture [amoxicillin (25 µg), colistin (50 µg), enrofloxacin (5 µg), flumequine (30 µg), tetracycline (30 IU), trimetoprim/sulfametoxazol (25 µg) and kanamycin (30 IU)].

Strain hOe-66<sup>T</sup> cells were Gram-stain-negative, 1–2 µm straight rods, aerobic, motile and non-spore-forming bacteria (Fig. 7). Colonies were cream-orange coloured, convex, opaque, regular and 2–3 mm.

The type strain was able to grow on TSA, TSA with 2.5% NaCl, Mueller–Hinton, Mueller–Hinton with 1.5% NaCl but not in McConkey and cetrimide 2.5% NaCl media. Optimal growth was obtained at 25 °C, at pH 7–8 and with 2.5% NaCl. Also, strain hOe-66<sup>T</sup> was able to grow at 4–30 °C, pH 6–9 and with 0.5–6.0% NaCl (Table 2).

According to the API ZYM results, the type strain tested positive for alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), leucine arylamidase, trypsin, α-chymotrypsin, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, but negative for α-fucosidase, α-mannosidase, β-glucosidase, α-glucosidase, β-glucuronidase, β-galactosidase, α-galactosidase, cystine arylamidase, valine arylamidase, lipase (C14) and esterase

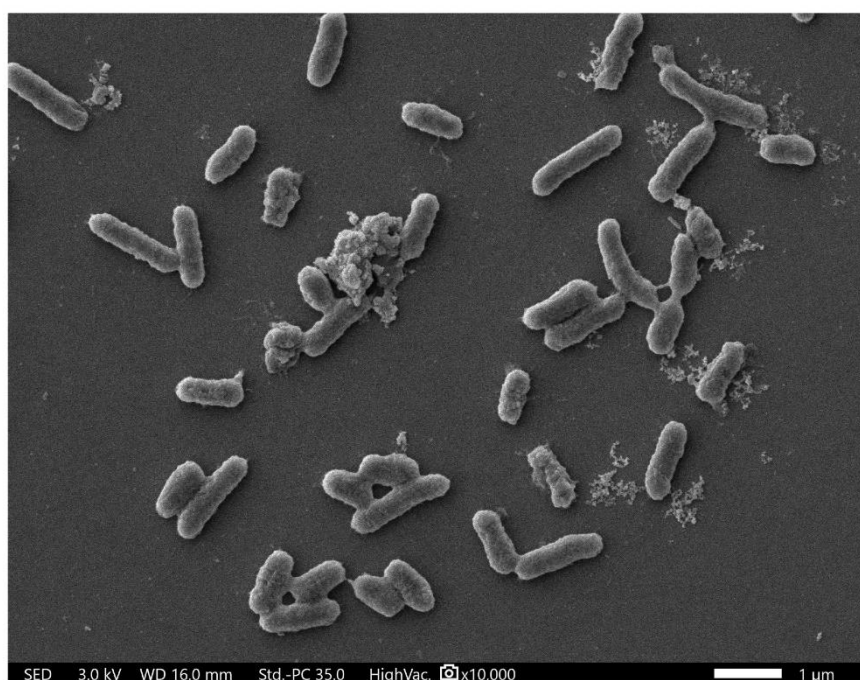


Fig. 7. Scanning electron microscope image of strain hOe-66<sup>T</sup>.

## Chapitre 2 – Bactéries d'intérêt du genre *Pseudoalteromonas*

Cuny et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021

**Table 2.** Differential phenotypic characteristics of h0e-66<sup>T</sup> and related strains

Strain: 1, h0e-66<sup>T</sup>; 2 h0e-124; 3, h0e-125; 4, *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15<sup>T</sup>; 5 *Pseudoalteromonas neustonica* PAMC 28425<sup>T</sup>. Data for strains 4 and 5 were from previous studies [22, 23].

Characteristics	1	2	3	4	5
Isolation site	Oyster haemolymph	Oyster haemolymph	Oyster haemolymph	Rhizosphere	Sea surface microlayer
Location	Concarneau Bay, France	Concarneau Bay, France	Concarneau Bay, France	Odiel marshes, Spain	Ross sea, Antarctica
Genome size (bp)	4643805	4642547	4642738	5267131	4979084
DNA G+C content (mol%)	40.3	40.3	40.3	40.4	39.7
Oxygen tolerance	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Facultative anaerobic
Salinity range (optimum) for growth (% w/v)	0.5–6 (2.5)	0.5–6 (2.5)	0.5–6 (2.5)	0.5–6 (2.5)	1–6 (1–3)
pH range (optimum) for growth	6–9 (7–8)	6–9 (7–8)	6–9 (7–8)	5–9 (7–8)	6–9 (7.5–8.5)
Reduction of nitrates to nitrites	–	–	–	+	–
Enzymatic activity:					
Hydrolysis of aesculin	–	–	–	+	–
Glucose fermentation	–	–	–	–	+
Arginine dihydrolase	–	–	–	+	–
Esterase C4	–	–	–	w	–
Esterase lipase C8	+	+	–	+	–
Valine arylamidase	–	+	+	+	–
Cystine arylamidase	–	–	–	w	–
Trypsin	+	+	+	+	–
α-Chymotrypsin	+	+	+	w	–
α-Galactosidase	–	–	–	w	–
α-Glucosidase	–	–	+	+	–
β-Glucosidase	–	–	–	+	–
Assimilation of:					
D-Glucose	+	+	+	+	–
L-Arabinose	–	–	–	+	–
D-Mannose	–	–	–	+	–
D-Mannitol	–	–	–	+	–
Maltose	+	+	+	+	–
Potassium gluconate	w	+	w	+	ND
Adipic acid	–	–	–	+	ND
Trisodium citrate	+	+	+	–	ND

(C4). The results obtained using the API 20NE revealed that the strain was positive for gelatinase, D-glucose, N-acetylglucosamine, maltose, malic acid and trisodium citrate. However, a weak assimilation of potassium gluconate was observed. In contrast, the strain did not assimilate L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, capric acid, adipic acid or phenylacetic acid. There was no nitrate reduction to N<sub>2</sub>,

indole production, glucose fermentation, aesculin hydrolysis, arginine dihydrolase or urease activity (Table 2).

Major fatty acids were summed feature 3 (C<sub>16:1</sub> ω7c/C<sub>16:1</sub> ω6c, 40%), C<sub>16:0</sub> (16.6%) and C<sub>17:1</sub> ω8c (11%), which are commonly found within *Pseudoalteromonas* bacteria [2] (Table 3).



**Table 3.** Whole cellular fatty acid compositions of hOe-66<sup>T</sup> and related *Pseudoalteromonas* strains

Strains: 1, hOe-66<sup>T</sup>; 2, hOe-124; 3, hOe-125; 4, *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15<sup>T</sup>; 5 *Pseudoalteromonas neustonica* PAMC 28425<sup>T</sup>. TR, Trace (below 1%); –, not detected, w, weak.

Fatty acid	1	2	3	4	5
C <sub>10:0</sub> 3-OH	–	–	TR	–	–
C <sub>12:0</sub>	5.1	4.8	5.1	2.7	2.2
C <sub>15:0</sub> 3-OH	1.3	1.5	1.4	2.4	–
C <sub>13:0</sub>	TR	TR	1.1	–	–
C <sub>12:0</sub> iso 3-OH	1.5	1.9	2.1	1.7	–
C <sub>12:0</sub> 2-OH	–	TR	TR	–	–
C <sub>12:0</sub> 3-OH	6.6	6.7	6.6	5.2	8.6
C <sub>14:0</sub>	TR	TR	TR	1.0	1.1
Summed feature 1*	–	TR	TR	–	–
C <sub>15:1</sub> ω8c	1.8	1.6	1.4	4.7	–
C <sub>16:0</sub> iso	2.1	2.2	2.2	TR	–
C <sub>16:1</sub> ω9c	–	–	TR	–	–
Summed feature 3*	40.0	39.9	36.1	35.3	31.3
C <sub>16:0</sub>	16.6	15.3	14.4	12.2	26.4
C <sub>17:1</sub> ω8c	11.0	11.8	12.9	16.7	3.1
C <sub>17:0</sub>	2.3	2.3	2.6	4.5	2.1
C <sub>18:1</sub> ω9c	1.0	TR	TR	TR	1.1
Summed feature 8*	9.0	8.0	9.4	6.4	15.2
C <sub>18:0</sub>	–	–	TR	TR	5.4

\*Summed features are fatty acids that cannot be resolved reliably from another fatty acid using the chromatographic conditions chosen. The MIDI system groups these fatty acids together as one feature with a single percentage of the total. Summed feature 1 contains C<sub>13:0</sub> 3-OH/C<sub>15:1</sub> i H, summed feature 3 contains C<sub>16:1</sub> ω7c/C<sub>16:1</sub> ω6c and summed feature 8 contains C<sub>18:1</sub> ω7c/C<sub>18:1</sub> ω6c.

According to the AFNOR U47-107 assay, the strain was resistant to colistin but sensitive to the other antibiotics: amoxicillin, flumequine, enrofloxacin, kanamycin, oxytetracycline and trimetoprim/sulfametoxazol.

The three *P. ostreae* strains presented the same physiological characteristics; however, strain hOe-124 differs from the type strain as it was valine arylamidase-positive, while strain hOe-125 differs from the type strain as it was esterase lipase (C8)-negative, valine arylamidase-positive and α-glucosidase-positive.

## DESCRIPTION OF *PSEUDOALTEROMONAS OSTREAE* SP. NOV.

*Pseudoalteromonas ostreae* (os'tre.ae. L. gen. n. *ostreae* of an oyster, of the genus *Ostrea*).

Cells are Gram-stain-negative, non-spore-forming, aerobic and motile rods. Cells form cream/orange-coloured, convex, opaque and regular colonies, between 2–3 mm after 48 h on MA plates at 18 °C. It grows at 4–30 °C, pH 6–9 and tolerates 0.5–6% NaCl (w/v). It grows well on MA, TSA, TSA with 2.5% NaCl, Mueller–Hinton agar and Mueller–Hinton agar with 1.5% NaCl but not on McConkey and cetrimide agar with 2.5% NaCl.

According to the API ZYM results, enzymatic activity is observed for alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), leucine arylamidase, trypsin, α-chymotrypsin, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; negative for α-fucosidase, α-mannosidase, β-glucosidase, α-glucosidase, β-glucuronidase, β-galactosidase, α-galactosidase, cystine arylamidase, valine arylamidase, lipase (C14) and esterase (C4). According to API 20NE assay, there is hydrolysis activity (gelatin) and assimilation of D-glucose, N-acetylglucosamine, maltose, malic acid and trisodium citrate, weak assimilation of potassium gluconate, but no assimilation of L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, capric acid, adipic acid and phenylacetic acid. Also no nitrate reduction, indole production, glucose fermentation, aesculin hydrolysis, arginine dihydrolase or urease activity is observed. Resistance is observed to colistin but not to amoxicillin, flumequine, enrofloxacin, kanamycin, oxytetracycline and trimetoprim/sulfametoxazol. The major fatty acids are summed feature 3 (C<sub>16:1</sub> ω7c/C<sub>16:1</sub> ω6c), C<sub>16:0</sub> and C<sub>17:1</sub> ω8c. The whole genome has a total length of 4643805 pb and is formed of 101 contigs. The N50 value is 181492 and the coverage is 123.9×. The genomic G+C content is 40.28 mol% and it contains at least 4293 CDS.

The type strain, hOe-66<sup>T</sup> (=CECT30303<sup>T</sup>=CIP111911<sup>T</sup>), was isolated from the haemolymph of the oyster *Ostrea edulis*.

### Funding Information

This work has been supported by Région Bretagne (AAP IMA Haliobiote II 2014/D1215) and the European Maritime and Fisheries Fund (Project Marine bacteria from marine animals: new natural probiotics for sustainable aquaculture). H.C., C.O. and L.P. were respectively funded by grants from the universities of western and south Brittany (UBO and UBS), from the region Bretagne and Quimper Bretagne Occidentale, and from the European Maritime and Fisheries Fund (Project Marine bacteria from marine animals: new natural probiotics for sustainable aquaculture). We acknowledge the contribution of the Normandy Network of Microbial Metagenomics (RNAMB), supported by Région Normandie and European Union (FEDER).

### Acknowledgements

Anthony Magueresse from the Institut de Recherche Dupuy de Lôme is acknowledged for the analysis of samples by SEM.

### Author contributions

Conceptualization, Y.F. and P.L.C. Data curation, A.M.B., H.C. and C.O. Formal analysis, A.M.B. and H.C. Funding acquisition, Y.F., O.L.S. and A.B. Investigation, H.C., C.O., L.P. and A.M.B. Methodology, H.C., C.O., A.M.B., B.B. and A.B. Project administration, Y.F., O.L.S., A.B., L.P., B.B. and C.J. Resources, P.L.C., C.O., A.B., A.M.B., C.J. and Y.F. Supervision, Y.F., O.L.S.,

A.B., B.B., C.J. and P.L.C. Validation, H.C., C.O., B.B., A.B., L.P., A.M.B., Y.F. and C.J.; Visualization, H.C., C.O., A.M.B., B.B. and Y.F. Writing – original draft, H.C., C.O. and A.M.B. Writing – review and editing, B.B., Y.F., A.B., A.M.B., L.P., O.L.S. and P.L.C.

### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### References

- Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Evol Microbiol* 1995;45:755.
- Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J. (eds). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1st edn. Wiley, 2015.
- Lau SCK, Tsoi MMY, Li X, Dobretsov S, Plakhotnikova Y, et al. *Pseudoalteromonas spongiae* sp. nov., a novel member of the gamma-Proteobacteria isolated from the sponge *Mycale adhaerens* in Hong Kong waters. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1593–1596.
- Park S, Lee SY, Kim W, Yoon J-H. *Pseudoalteromonas caenipelagi* sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:6301–6306.
- Al Khudary R, Stösser NI, Qoura F, Antranikian G. *Pseudoalteromonas arctica* sp. nov., an aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2018–2024.
- Zhang D-C, Liu Y-X, Huang H-J, Wu J. *Pseudoalteromonas profundii* sp. nov., isolated from a deep-sea seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:4416–4421.
- Yan Y, Liu S, Wang D, Xue J, Guo D, et al. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* b15 isolated from grape skin, a strain of strong inhibitory activity against fungi. *J Biotechnol* 2016;228:28–29.
- Beurmann S, Ushijima B, Svoboda CM, Videau P, Smith AM, et al. *Pseudoalteromonas piratica* sp. nov., a budding, prosthocatae bacterium from diseased *Montipora capitata*, and emended description of the genus *Pseudoalteromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:2683–2688.
- Bozal N, Tudela E, Rossello-Mora R. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an Antarctic coastal environment. 1997:7.
- Egan S, Holmström C, Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1499–1504.
- Ivanova EP, Sawabe T, Lysenko AM, Gorshkova NM, Hayashi K, et al. *Pseudoalteromonas translucida* sp. nov. and *Pseudoalteromonas paragorgicola* sp. nov., and emended description of the genus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1759–1766.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–2120.
- Andrews S. FastQC a quality control tool for high throughput sequence data: Babraham Bioinformatics. 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [accessed 25 February 2021].
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 2017;13:e1005595.
- Mikheenko A, Prijbelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* 2018;34:i142–i150.
- Bushnell B. *BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner*. Lawrence Berkeley National Lab, Berkeley, CA (United States): LBNL; 2014.
- Seemann T. *tseemann/barrnap*. 2021.
- Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, et al. MicroScope: A platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database* 2009;2009:bap021.
- Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, et al. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D636–47.
- Vallenet D, Calteau A, Dubois M, Amours P, Bazin A, et al. MicroScope: An integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Res* 2019.
- Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. *Science* 1997;278:631–637.
- Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792–1797.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547–1549.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013;14:60.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:81–91.
- Pritchard L, Glover R, Humphris S, Elphinstone J, Toth I. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal Methods* 2015;8.
- Navarro-Torre S, Carro L, Rodríguez-Llorente ID, Pajuelo E, Caviedes M, et al. *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel plant growth-promoting bacterium with potential use in phytoremediation. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:3287–3294.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461–466.
- Seemann T. PROKKA: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–2069.
- Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 2015;31:3691–3693.
- Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 2015;32:268–274.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 2017;14:587–589.
- Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol* 2013;30:1188–1195.
- Hwang CY, Lee I, Hwang YJ, Yoon SJ, Lee WS, et al. *Pseudoalteromonas neustonica* sp. nov., isolated from the sea surface microlayer of the Ross Sea (Antarctica), and emended description of the genus *Pseudoalteromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:3377–3382.
- Haleblian S, Harris B, Finegold SM, Rolfe RD. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1981;13:444–448.
- McClung LS. Suggestions on bacteriological techniques for the beginner. *Am Biol Teach* 1960;22:343–351.
- Farmer JJ, Hickman-Brenner FW. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H and Stackebrandt E (eds). In: *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York; 2006. pp. 508–563.
- Sasser M. *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*. MIDI, 1990.

### 3. Conclusion

L'étude des génomes des 5 souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines a révélé, sur la base des données de séquençage que les souches *Pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42 appartiennent à l'espèce *Pseudoalteromonas rhizosphaerae*. Les souches hOe-66, hOe-124 et hOe-125 sont proches des espèces *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* et *Pseudoalteromonas neustonica*. Les analyses ANI (<93% de l'espèce la plus proche) ont permis de conclure que les 3 souches appartenaient à une nouvelle espèce du genre *Pseudoalteromonas*.

La nouvelle espèce a été décrite sous le nom de *Pseudoalteromonas ostreae*. La souche type de cette espèce est *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66<sup>T</sup>. Cette dernière été déposée en collections : CECT30303<sup>T</sup> et CIP111911<sup>T</sup>. De plus, le génome de la souche type hOe-66<sup>T</sup> et les séquences 16S des 3 souches sont disponibles sur NCBI GenBank (Tableau 7).

Tableau 7. Numéros d'accèsion des séquences ARNr 16S et draft des génomes des souches de *Pseudoalteromonas ostreae*. ND, Non déposé.

Souche	ARNr 16S	Génome
<i>Pseudoalteromonas ostreae</i> hOe-66 <sup>T</sup>	MT271987	JAGPYN01
<i>Pseudoalteromonas ostreae</i> hOe-124	MT271988	ND
<i>Pseudoalteromonas ostreae</i> hOe-125	MT271989	ND

L'espèce *ostreae* s'ajoute aux 53 espèces de *Pseudoalteromonas*. De plus, cette nouvelle description enrichit les données disponibles sur le genre *Pseudoalteromonas* aussi bien pour les analyses génomiques que pour les données phénotypiques du genre.





---

**Chapitre 3 – Non ribosomal peptide  
synthetases chez le genre  
*Pseudoalteromonas***

---



## 1. Introduction

Le genre *Pseudoalteromonas* est moins décrit que d'autres genres bactériens tel que le genre *Bacillus* pour son potentiel biotechnologique (Offret *et al.* 2016 ; Chau *et al.* 2021). Les souches de *Pseudoalteromonas* hCg et hOe produisent la famille des altérines. La structure cyclique et amphiphile ainsi que la présence de monomères non protéogéniques dans les altérines laisse suspecter un mode de biosynthèse non ribosomal.

Nous avons dressé un inventaire du potentiel de biosynthèse de métabolites d'intérêt chez le genre bactérien *Pseudoalteromonas*. Cette analyse a été réalisée sur la base des données de génomes disponibles dans les bases de données publiques. La plateforme AntiSMASH a été majoritairement utilisée ainsi que d'autres outils d'analyse tels que l'outil PKS/NRPS de l'université de Maryland et la base de données ClusterMine 360.

La recherche s'est particulièrement concentrée sur la détection de clusters de biosynthèse de peptides antibactériens a été particulièrement focalisée sur les systèmes de biosynthèse non ribosomiaux et plus spécifiquement les gènes codant des protéines NRPS. Ces systèmes permettent la biosynthèse de peptides dont la composition en résidus d'acides aminés ne se limite pas à l'intégration d'acides aminés protéinogénique.

Grâce aux outils bioinformatiques disponibles, les séquences spécifiques des sites actifs des domaines A des NRPS ont été analysées. Il apparaît que plus de 50 % des monomères ne peuvent être prédits ce qui suggère une grande chimiodiversité des peptides produits et souligne le potentiel de production de composés originaux par les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*.

Ces travaux ont fait l'objet d'un manuscrit qui a été soumis au journal *Marine drugs* le 1<sup>er</sup> octobre 2021.

## 2. Etude des systèmes Non Ribosomal Peptide Synthetases au sein du genre *Pseudoalteromonas*

### Genomic exploration of NRPS systems among the *Pseudoalteromonas* genus.

Helena Cuny<sup>1</sup>, Benjamin Brillet<sup>1</sup>, Romain Chevrot<sup>2</sup>, Alain Dufour<sup>1</sup>, Alexis Bazire<sup>1</sup> and Yannick Fleury<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne Occidentale, Université de Bretagne Sud, 29334 Quimper, France ; yannick.fleury@univ-brest.fr

<sup>2</sup> Littoral, Environnement et Sociétés, UMR CNRS 7266, Université de La Rochelle, La Rochelle, France ; romain.chevrot01@univ-lr.fr

\* Correspondence: yannick.fleury@univ-brest.fr

#### Abstract

*Pseudoalteromonas* are known as strong metabolite producers and their ecological significance is therefore suspected. However, bioactive compounds produced by this bacterial genus are rarely linked to their biosynthesis pathways. Here we analyzed the available *Pseudoalteromonas* genomes for Biosynthetic Gene Cluster (BGCs) diversity especially the Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) clusters using various bioinformatics tools such as gene annotation (MaGe), BGCs analysis tools (AntiSMASH) and binding pockets prediction tools (NRPS prediction tool from Maryland University). A comparison with the *Bacillus* genus was also performed. This exploration was conducted with 105 *Pseudoalteromonas* strains and more than 502 BGCs of which ¼ were NRPS clusters. An average of 5 NRPS systems per strain was detected. These BGCs have a variable modules distribution and binding pockets diversity. About 50% of the adenylation active sites were not predicted assuming a wide diversity of unusual monomers incorporated into the final product. These results highlight the underexplored metabolite biosynthesis in the *Pseudoalteromonas* genus for the biotechnological mining of original compounds.

**Keywords:** *Pseudoalteromonas*; NRPS; metabolites; peptides; biosynthetic potential.

### 1. Introduction

The bacterial genus *Pseudoalteromonas* is part of the *Pseudoalteromonadaceae* family within the *Alteromonadal* order and the *Gammaproterobacteria* class [1]. These bacteria are Gram negative rods, more or less curved, measuring around 2µm and non-spore-forming bacteria. Most of the strains carry a lateral flagellum, polar or bipolar [2]. They are strictly aerobic or facultative anaerobic [3] and have a chemoheterotrophic metabolism.

The genus *Pseudoalteromonas* is described for its interactions with marine eukaryotic organisms [4]. It is known to produce bioactive compounds exhibiting a large spectrum of activity and is therefore suspected to play an important ecological role [4–6]. Numerous bioactivities are often described as antibacterial [6–15], algicidal [16–19], anti-viral [12] et antibiofilm [5,20–23] activities, especially by the pigmented strains of *Pseudoalteromonas* [4,24]. Many bioactive compounds are isolated and characterized within the *Pseudoalteromonas* genus such as koromycin [25], thiomarinol [26], L-amino acid oxidase [6], ogipeptins [27] or alterins [15]. This bacterial genus is a source of highly interesting bioactive compounds whose biosynthetic systems are still little-known. To date only five studies suspects the biosynthetic pathway linked to a specific bioactive compound, from *Pseudoalteromonas* strains [28–32]. Moreover, only two studies on one *Pseudoalteromonas* strain experimentally linked a bioactive compound to a biosynthesis pathway. Indeed, the genome of the thiomarinol producer *Pseudoalteromonas* sp. SANK 73390, had been sequenced. Several genes similar to NRPS close to *Streptomyces* were identified; involved in the production of holomycin or even *Photobacterium* and *Yersinia* producing related metabolites [33]. The same year, the specific cluster of *Pseudoalteromonas* sp. SANK73390 was studied. It revealed a 97 kb plasmid carrying the NRPS et PKS genes involved in the thiomarinol biosynthesis [26].

Several kinds of biosynthesis pathways of bioactive compounds metabolites are described within the genus *Pseudoalteromonas*. They are gathered into different categories such as bacteriocins which are defence peptides [34,35], siderophores which are iron chelator peptides [36–38], arylpolyenes, a yellow pigment protecting bacteria from oxidative stress [39], ladderans playing a role in membrane diffusion in the anammox catabolism [40], phospho-

nates or phosphonic acids act as enzyme inhibitors [41], resorcinols, lantipeptides which are part of the Ribosomally synthesized and post-transcriptionally modified peptides (RiPPs) as well as lantibiotics [42,43] and thiopeptides which are macrocyclic peptides mainly known for their antibacterial properties [44,45].

Other clusters encode enzymes for the biosynthesis of « non-ribosomal » compounds such as acyl amino acids, homoserine lactones, polyketide synthases (PKS, Biosynthesis of antibacterial polyketides) [46], indoles, non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) and hybrid systems associating at least 2 types of biosynthesis clusters.

Here, based on the public genomic data, we investigate the *Pseudoalteromonas* genomes for BGC. Thereafter, we focus on the NRPS. They were analysed using various bioinformatics tools. Our results show that most of the adenylation active sites were not predicted assuming a wide diversity of unusual monomers incorporated into the final peptide. Therefore, these data highlight the biotechnological potential of non ribosomal biosynthetic clusters within the genus *Pseudoalteromonas*.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Biosynthetic Gene Clusters annotation

By now, as a general overview, 4093 *Pseudoalteromonas* strains are registered in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (Taxonomy ID: 53246). The genus exhibit 53 species described and 488 genome assemblies available on NCBI. The Taxa tool of AntiSMASH was first used to select genomes from the 25,236 available bacterial genomes belonging to *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alteromonadales*, *Pseudoalteromonadaceae* and finally to the *Pseudoalteromonas* genus. It resulted in 105 *Pseudoalteromonas* genomes of which 48 were attributed to 33 different *Pseudoalteromonas* species. A total of 502 BGCs were extracted from the 105 genomes and analyzed. The *Pseudoalteromonas* genomes carried from 1 to 75 BGCs, for an average of 5BGCs. A wide diversity of BGCs types were identified such as arylpolyene (APE), bacteriocin, siderophore, homo-serine lactone, indole, lanthipeptide, phosphonate, non ribosomal peptide synthetase (NRPS), NRPS fragments, betalactone, polybrominated diphenyl ethers (PBDE), polyketide synthase (PKS), resorcinol, thiopeptide, long-chain alkylphenol (LAP) and ectoine. Also, several hybrid BGCs were identified such as NRPS-PKS, bacteriocin-NRPS, betalactone-NRPS-PKS,

### Chapitre 3 – NRPS chez le genre *Pseudoalteromonas*

ladderane-NRPS, lanthipeptide-NRPS... Within the 502 identified BGCs, bacteriocin and NRPS are the main found BGC as each one represents 32% of the total predicted BGCs, followed by arylpolyene BGCs (Figure 1).

In order to investigate diversity of the putative NRPs produced by *Pseudoalteromonas* NRPS, we investigate the “binding pocket” in the adenylation domain of NRPS identified in *Pseudoalteromonas* genomes. These binding pockets are made of a 8 to 10 amino acid residue sequence in the adenylation domain and responsible of the monomer selection. In some cases, it is possible to predict this selection by the known Stachelhaus code [47,48].

To compare with a well-known genus for NRP production, the same analyses were conducted with the *Bacillus* genus which is much more represented since 31,435 *Bacillus* strains and 5,857 genome assemblies are registered in the NCBI database (Taxonomy ID : 1386). On the AntiSMASH Db, 1210 genomes of *Bacillus* within 108 species were available and over 12,561 BGCs were analyzed. A few were found within the *Bacillus* genus but not in the *Pseudoalteromonas* genus such as linaridin, lanthidin, cyclodipeptide synthase (CDPS). The BGCs analysis reveal a larger diversity of cluster types mainly due to the much larger number of sequenced *Bacillus* genomes. In september 2021, 5,857 *Bacillus* genome assemblies were available versus 488 genome assemblies available for *Pseudoalteromonas* on NCBI. The BGC diversity related to the number of analyzed species reveal that *Pseudoalteromonas* genus already show a high diversity despite the lower number of studied strains compared to *Bacillus* genus (Figure 1A).

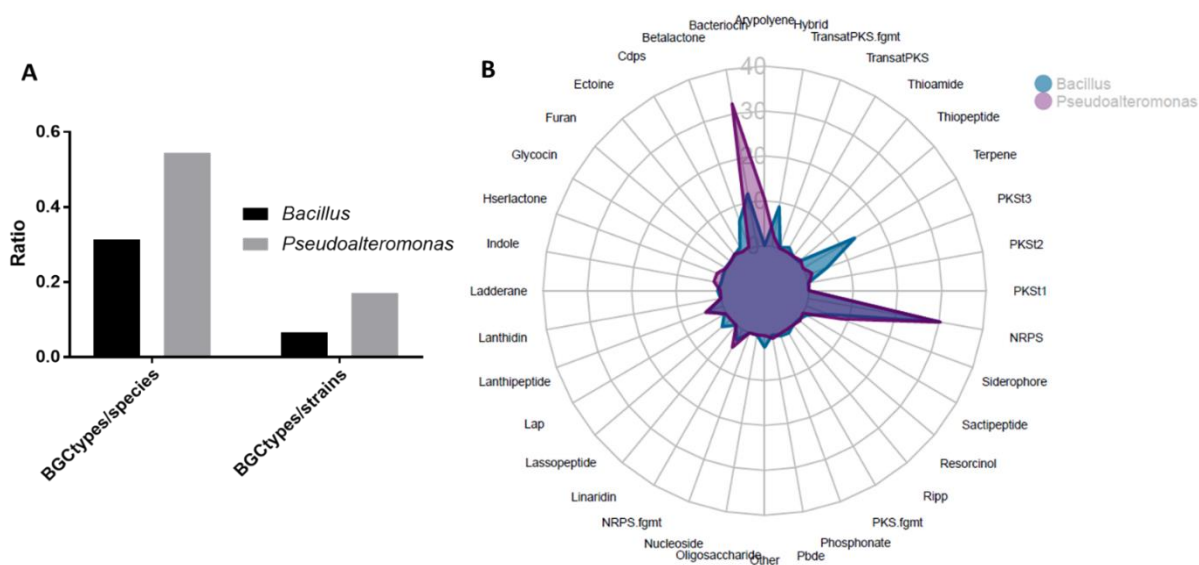


Figure 1. A : Ratio of BGC types diversity related to studied species and strains of *Bacillus* and *Pseudoalteromonas*. Ratio were calculated by divided the number of BGCs types with the number of genus corresponding species or strains studied. B : Radar plot of absolut BGCs reprartition (%) within the two genus *Bacillus* and *Pseudoalteromonas*. Legend : PKS, Polyketide Synthase; NRPS, Non Ribosomal Peptide Synthetase; Ripp, Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides; Lap, Linear azol(in)e-co ntaining peptides; Pbde, Polybrominated diphenyl ethers; Hserlactone, Homoserine lactone; fgmt, fragment.

The major BGC types within the *Pseudoalteromonas* genus were NRPS and bacteriocins, representing two-thirds of the analyzed clusters, followed by hybrid systems and terpene BGCs (Figure 1B).

While considering all the predicted NRPS, the *Pseudoalteromonas* and *Bacillus* genera would respectively carry 36% and 33% of NRPS clusters, which tend to show that *Pseudoalteromonas* strains could be a prolific source of original compounds, at least, as much as *Bacillus*.

Thanks to the BGCs analysis, 51% of *Bacillus* BGCs predicted were associated to known BGCs registered on MiBIG database out of only 35% for the *Pseudoalteromonas* genus.

*Pseudoalteromonas* BGCs registered show a mean size of 32,351 bp, a few are on contig edges due to genome quality and chosen sequencing methods. Only 117 BGCs out of 502 (23%) showed from 40% to 100% similarities with described BGCs. Nine BGCs from *Pseudoalteromonas luteoviolacea* HI1, *Pseudoalteromonas phenolica* KCTC12086, *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1, *Pseudoalteromonas piscicida* DE2-B,



## Chapitre 3 – NRPS chez le genre *Pseudoalteromonas*

*Pseudoalteromonas rubra* T7, *Pseudoalteromonas* sp. JW3 and *Pseudoalteromonas* sp. Bsw20308, exhibited a 100% identity with 6 known BGC (Table 1).

Table 1. List of described BGCs with 100% similarities with *Pseudoalteromonas* BGCs

Compound	BGC nb	Organisms	References
rhizomide	BGC0001758	<i>Paraburkholderia rhizoxinica</i>	[49]
pentabromopseudilin	BGC0000891	<i>Pseudoalteromonas luteovioalcea</i>	[50 – 52]
1-heptadecene	BGC0001164	<i>Cyanothece</i> sp.	[53]
xenematide	BGC0001825	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	[54]
nostamid	BGC0001479	<i>Nostoc punctiforme</i>	[55,56]
alterochromids	BGC0000299	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	[57]

The identified MiBIG BGCs were described from *Pseudoalteromonas* strains but also other genera such as *Duganella* or *Teredinibacter*. The most frequently associated are desferrioxamin, a ferri chelator from *Pantoea agglomerans* (BGC0001572) [58,59] with 75% similarities and violacein, an antimicrobial pigment, for most of the *Pseudoalteromonas luteoviolacea* with 80% similarities, described as BGC0000831 from *Duganella* sp. B2 [60,61]. Also, the thiomarinol metabolite, produced by the strain *Pseudoalteromonas* sp. SANK73390, was the only bioactive compound from *Pseudoalteromonas* genus described in the ClusterMine360 Db (Genbank : FN689524.1).

### 2.2. *Pseudoalteromonas* NRPS dissection

The predicted biosynthetic potential of *Pseudoalteromonas* strains was then analyzed based on their NRPS regions [6]. NRPS are the major secondary metabolite cluster among whole *bacteria*, *archaea* and *fungi* organisms as it represents ¼ of BGCs on AntiSMASH database.

As described in the material and methods, data were sorted out, half of the predicted NRPS BGCs were considered as full NRPS systems (39 out of 71 BGCs), it concerned 14 *Pseudoalteromonas* strains (Figure 2). Region size ranged from 6,388 bp to 15,9374 bp, the average was around 58 kb and the whole NRPS genes size within a BGC around 23 kb, which

means that the NRPS genes represent 40% of an whole NRPS BGC size. NRPS BGCs could carry from 1 to 7 NRPS genes carrying 2 to 17 adenylation domains per NRPS system.

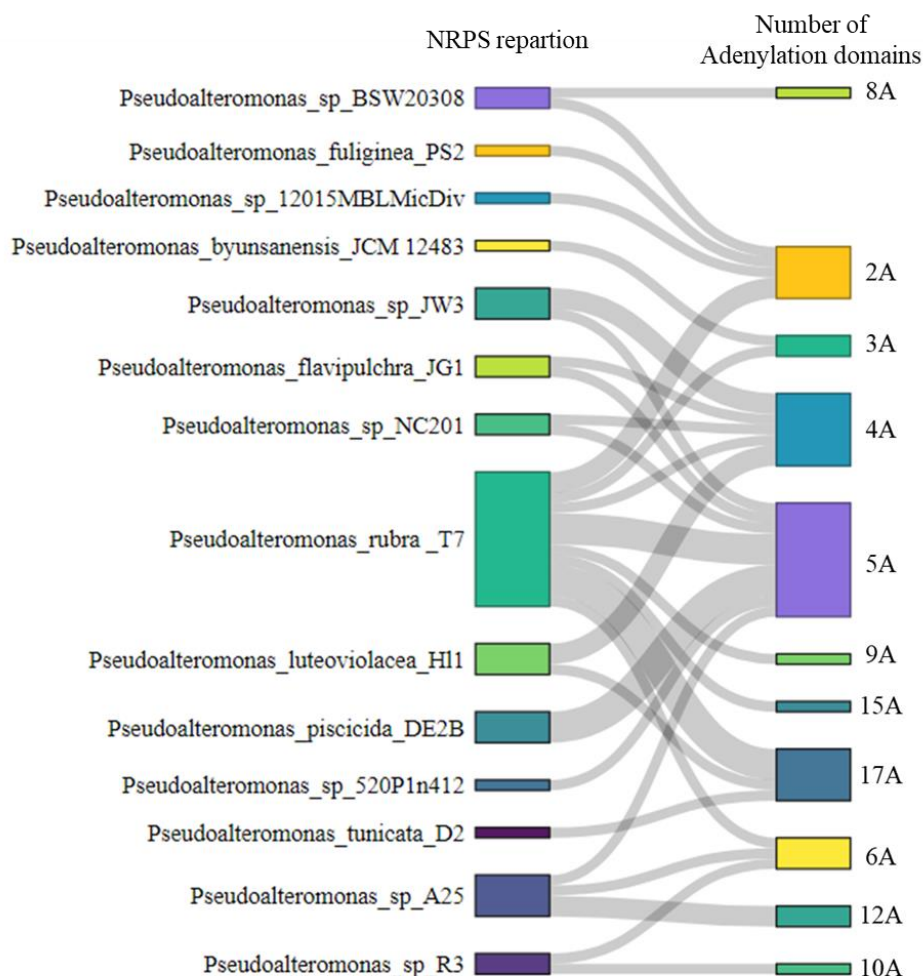


Figure 2. Sankey plot of studied *Pseudoalteromonas* strains NRPS systems and the corresponding number of adenylation domains.

Each adenylation domain was then analyzed using the Prediction tool of the Maryland University. Interestingly, the first amino acid residue (D) of the active site is highly conserved within the Stachelhaus sequences (Figure 3A) as well as the 6th (G) and last ones (V), to a lesser extent.

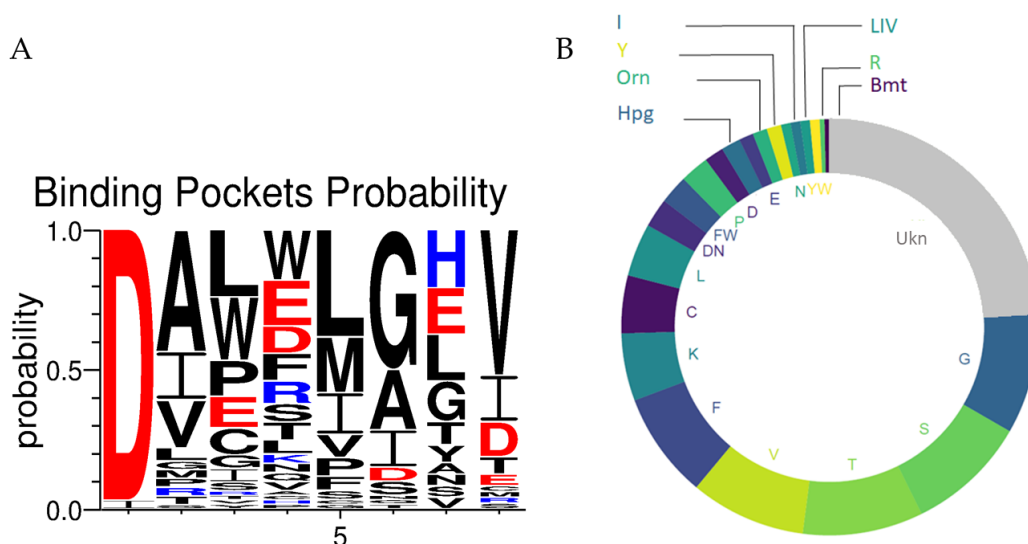


Figure 3. A, Graphical representation of *Pseudoalteromonas* NRPS binding pockets multiple sequence alignment. Sequence alignment realized with 267 active site sequences; negatively charged amino acids are identified in red and positively charged amino acids identified in blue. B, Graphical representation of the predicted monomers selected by *Pseudoalteromonas* binding pockets. Ukn, Unknown; G, Glycine; S, Serine; T, Threonine; V, Valine; F, Phenylalanine; K, Lysine; C, Cysteine; L, Leucine; D, Aspartic acid; N, Asparagine; W, Tryptophane; P, Proline; HPG, 4-Hydroxyphenylglycine; E, Glutamic acid; Orn, Ornithine; Y, Tyrosine; I, Isoleucine; R, Arginine; Bmt, (E)-2-Butenyl-4-methyl-threonine.

From the Stachelhaus code, selected residues were predicted (Figure 3B). Most of the binding pockets could not get any known attributed monomer. It represents  $\frac{1}{4}$  of the adenylation domains analyzed and this means that the  $\frac{1}{4}$  of selected residues are unusual amino acids. The main monomers predicted were Glycine, Serine, Threonine and Valine which represent, each, 9% of the predicted selected monomers. From these analyses, the peptidic metabolite sequence could be reconstituted and none of them was recurrent.

### 3. Conclusion

Bioactive secondary metabolites from the *Pseudoalteromonas* genus are mainly described regarding their bioactivity and structural feature. In order to get new insight into their biosynthesis pathways, we conducted a bioinformatic investigation of available *Pseudoalteromonas* genomes. It revealed that, despite a low number of available sequenced genomes, *Pseudoalteromonas* strains carry a high number of NRPS clusters compared to the genus

*Bacillus*. The genus of interest also exhibits a wide diversity of binding pocket sequences, which illustrate a high potential genus for the biosynthesis of original bioactive compounds.

The bioinformatics tools are supposed to predict and determine the putative structure of the natural metabolite from an NRPS systems for instance, by analyzing modules and active sites sequences. However, when systems like NRPS are identified, genomic data and structure prediction do not allow the reliable attribution of the cluster to the final product without experimental proof despite the strong bioinformatics analysis tools available.

Results are based on available public data, which represent a little part of currently isolated and studied *Pseudoalteromonas* strains. Also, it is important to remind that the data gathered and analyzed in this study were treated with filters applied to minimize automatic prediction errors. Considering this part of the genus, results shown in this study, as the BGC types diversity and the uncommon binding sites. It would finally be interesting to emphasize the genus by harnessing its biosynthesis pathways and bioactive metabolites. The *Pseudoalteromonas* genus potential remains to be explored.

To conclude, the chemodiversity of bioactive products from the genus *Pseudoalteromonas* could only be the tip of the natural product iceberg.

## 4. Material and methods

The analysis of BGCs within the *Pseudoalteromonas* genus was possible thanks to the Antibiotics & Secondary Metabolites Analysis Shell (AntiSMASH) v6.0 (updated on PythonV3 in 2019) [62]. This web-based tool is a database of Secondary metabolites clusters which gives the overview of BGCs predictions and annotations for strains of interest, not limited to NRPS/PKS structures [63]. The platform gathers the genomic data of archae, bacteria and eukaryota from genomes in NCBI RefSeq annotated as “complete genome”, “Chromosome” and some “Draft genome” based on their FastANI scores [64]. BGCs are identified by seeking the conserved core-enzymes in genomic data from their Hidden Markov Models (HMM) profiles in Pfam [65], SMART [66], BAGEL [67,68] and also the HMM profiles in AntiSMASH. The clusters delimitation to include genes involved in the metabolite biosynthesis is not well defined for bacteria genomes compared to fungi genomes for whom the CASSIS algorithm allows co-regulated genes detection. Then, the “region” term is sometimes used instead of the cluster/BGC terms because of this detection limitation.

The ClusterMine360 database [69] gathered microbial clusters, NRPS/PKS biosynthetic pathways and compounds and was used to identify described clusters and their structures.

*Pseudoalteromonas* genome sequences were analyzed through the AntiSMASH database. NRPS regions identified were then manually curated and sorted out to exclude non representative regions such as NRPS fragments, hybrids and NRPS with missing domains or only one complete module.

Detected NRPS regions similarities were determined by sequence alignments of the whole biosynthetic region with BGCs manually curated and deposited in the MiBIG Database [70]. Genes of the region of interest are, then, analyzed against core-enzymes HMM profiles.

Active sites sequences of the adenylation domains were analysed using the PKS/NRPS Analysis tool (v1.1) from Maryland University [71]. This tool allowed the detection of the binding pockets of the adenylation domain within the NRPS sequences and to highlight the amino acids playing a role in this active site. Thanks to the Stachelhaus code [48], the PKS/NRPS Analysis tool could also predict the monomer specificity of a binding pocket.

All the recorded binding pocket sequences were aligned and represented on a sequence logo to highlight conservation sites by multiple sequence alignment on WebLogo v3.7.4 [72,73].

**Author Contributions:** Conceptualization, Y.F., B.B. and H.C.; methodology, Y.F., R.C., B.B. and H.C.; validation, Y.F., A.B., R.C., B.B. and H.C.; formal analysis, H.C.; investigation, H.C.; data curation, H.C.; writing—original draft preparation, H.C.; writing—review and editing, Y.F., A.B., R.C., B.B. and H.C.; visualization, A.B., R.C., B.B. and H.C.; supervision, Y.F., A.B. and B.B.; project administration, Y.F., A.B. and B.B.; funding acquisition, Y.F. and B.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Universities of Western Brittany and South Brittany and by the European Maritime and Fisheries Fund (Project Marine bacteria from marine animals: new natural probiotics for sustainable aquaculture).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

[1] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division

of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995;45:755–61. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-755>.

[2] Ivanova EP. *Pseudoalteromonas translucida* sp. nov. and *Pseudoalteromonas paragorgicola* sp. nov., and emended description of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002;52:1759–66. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02097-0>.

[3] Hwang CY, Lee I, Hwang YJ, Yoon SJ, Lee WS, Cho BC. *Pseudoalteromonas neustonica* sp. nov., isolated from the sea surface microlayer of the Ross Sea (Antarctica), and emended description of the genus *Pseudoalteromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2016;66:3377–82. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001202>.

[4] Bowman JP. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs* 2007:22.

[5] Holmström C, Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol Ecol* 1999;30:285–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x>.

[6] Offret C, Desriac F, Le Chevalier P, Mounier J, Jégou C, Fleury Y. Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: chemodiversity and ecological significance. *Mar Drugs* 2016;14. <https://doi.org/10.3390/md14070129>.

[7] Gauthier MJ. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of some violet-pigmented bacteria isolated from seawater. *Canadian Journal of Microbiology* 1976;22:138–49. <https://doi.org/10.1139/m76-019>.

[8] Gauthier MJ, Breittmayer VA. A new antibiotic-producing bacterium from seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1979;29:366–72. <https://doi.org/10.1099/00207713-29-4-366>.

[9] Gauthier MJ, Flatau GN. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Canadian Journal of Microbiology* 1976;22:1612–9. <https://doi.org/10.1139/m76-237>.

[10] Ivanova EP, Kiprianova EA, Mikhailov VV, Levanova GF, Garagulya AD, Gorshkova NM, *et al.* Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and

emendation of the description. International Journal of Systematic Bacteriology 1998;48:247–56. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-247>.

[11] Yoshikawa K, Takadera T, Adachi K, Nishijima M, Sanc H. Korormicin, a novel antibiotic specifically active against marine Gram-negative bacteria, produced by a marine bacterium. The Journal of Antibiotics 1997;50:949–53. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.50.949>.

[12] Maeda M, Nogami K, Kanematsu M, Hirayama K. The concept of biological control methods in aquaculture. In: Hagiwara A, Snell TW, Lubzens E, Tamaru CS, editors. Live Food in Aquaculture, Dordrecht: Springer Netherlands; 1997, p. 285–90. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2097-7\\_45](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2097-7_45).

[13] Kalinovskaya NI, Ivanova EP, Alexeeva YV, Gorshkova NM, Kuznetsova TA, Dmitrenok AS, *et al.* Low-molecular weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species. Current Microbiology 2004;48. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4240-0>.

[14] Yu M, Wang J, Tang K, Shi X, Wang S, Zhu W-M, *et al.* Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. Microbiology 2012;158:835–42. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055970-0>.

[15] Desriac F, El Harras A, Simon M, Bondon A, Brillet B, Le Chevalier P, *et al.* Alterins produced by oyster-associated *Pseudoalteromonas* are antibacterial cyclolipopeptides with LPS-binding activity. Marine Drugs 2020;18:630. <https://doi.org/10.3390/md18120630>.

[16] Akagawa-Matsushita M, Matsuo M, Koga Y, Yamasat K. *Alteromonas atlantica* SQ. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides 1992:7.

[17] Vera J, Alvarez R, Murano E, Slebe JC, Leon O. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. Applied and Environmental Microbiology 1998;64:4378–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.11.4378-4383.1998>.

[18] Lovejoy C, Bowman JP, Hallegraef GM. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class Proteobacteria, Gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. Appl Environ Microbiol 1998;64:2806–13.

- [19] Su JQ, Yang XR, Zheng TL, Tian Y, Jiao NZ, Cai LZ, *et al.* Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 2007;6:799–810. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.04.004>.
- [20] Holmström C, Egan S, Franks A, McCloy S, Kjelleberg S. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* 2002;41:47–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00965.x>.
- [21] Dheilly A, Soum-Soutéra E, Klein GL, Bazire A, Compère C, Haras D, *et al.* Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6. *Applied and Environmental Microbiology* 2010;76:3452–61. <https://doi.org/10.1128/AEM.02632-09>.
- [22] Jouault A, Gobet A, Simon M, Portier E, Perennou M, Corre E, *et al.* Alterocin, an antibiofilm protein secreted by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. *Applied and Environmental Microbiology* 2020. <https://doi.org/10.1128/AEM.00893-20>.
- [23] Klein GL, Soum-Soutéra E, Guede Z, Bazire A, Compère C, Dufour A. The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling* 2011;27:931–40. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.611878>.
- [24] Holmström C, James S, Egan S, Kjelleberg S. Inhibition of common fouling organisms by marine bacterial isolates with special reference to the role of pigmented bacteria. *Biofouling* 1996;10:251–9. <https://doi.org/10.1080/08927019609386284>.
- [25] Yoshikawa K, Nakayama Y, Hayashi M, Unemoto T, Mochida K. Korormicin, an antibiotic specific for Gram-negative marine bacteria, strongly inhibits the respiratory chain-linked Na<sup>+</sup>-translocating NADH: Quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *The Journal of Antibiotics* 1999;4.
- [26] Murphy AC, Fukuda D, Song Z, Hothersall J, Cox RJ, Willis CL, *et al.* Engineered thiomarinol antibiotics active against MRSA are generated by mutagenesis and mutasynthesis of *Pseudoalteromonas* SANK73390. *Angewandte Chemie International Edition* 2011;50:3271–4. <https://doi.org/10.1002/anie.201007029>.
- [27] Hirota-Takahata Y, Kozuma S, Kuraya N, Fukuda D, Nakajima M, Takatsu T, *et al.* Ogipeptins, novel inhibitors of LPS: physicochemical properties and structural elucidation. *J Antibiot* 2017;70:84–9. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.61>.



- [28] Stelzer S. Unravelling the role of the ToxR-like transcriptional regulator WmpR in the marine antifouling bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Microbiology* 2006;152:1385–94. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28740-0>.
- [29] Shao J, Zhu P, Zheng Y, You Y, Yan X. Molecular phylogeny and modular structure of hybrid NRPS/PKS gene fragment of *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-2 isolated from marine sponge *Hymeniacidon Perleve*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009. <https://doi.org/10.4014/jmb.0804.282>.
- [30] Zhu P, Zheng Y, You Y, Yan X, Shao J. Sequencing and modular analysis of the hybrid non-ribosomal peptide synthase – polyketide synthase gene cluster from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain NJ631. *Canadian Journal of Microbiology* 2009;55:219–27. <https://doi.org/10.1139/W08-125>.
- [31] Yu Z, Wang J, Lin J, Zhao M, Qiu J. Exploring regulation genes involved in the expression of L-amino acid oxidase in *Pseudoalteromonas* sp. Rf-1. *PLOS ONE* 2015;10:e0122741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122741>.
- [32] Sonnenschein EC, Stierhof M, Goralczyk S, Vabre FM, Pellissier L, Hanssen KØ, *et al.* Pseudochelin A, a siderophore of *Pseudoalteromonas piscicida* S2040. *Tetrahedron* 2017;73:2633–7. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.03.051>.
- [33] Fukuda D, Haines AS, Song Z, Murphy AC, Hothersall J, Stephens ER, *et al.* A natural plasmid uniquely encodes two biosynthetic pathways creating a potent anti-MRSA antibiotic. *PLoS ONE* 2011;6:e18031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018031>.
- [34] Riley MA, Wertz JE. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 2002;84:357–64. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01421-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01421-9).
- [35] Riley MA, Chavan MA, editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin ; New York: Springer; 2007.
- [36] Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 2010;27:637. <https://doi.org/10.1039/b906679a>.
- [37] Lee W, Baalen M van, Jansen VAA. An evolutionary mechanism for diversity in siderophore-producing bacteria. *Ecology Letters* 2012;15:119–25. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01717.x>.

- [38] Ahmed E, Holmström SJM. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* 2014;7:196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>.
- [39] Schöner TA, Gassel S, Osawa A, Tobias NJ, Okuno Y, Sakakibara Y, *et al.* Aryl polyenes, a highly abundant class of bacterial natural products, are functionally related to antioxidative carotenoids. *ChemBioChem* 2016;17:247–53. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500474>.
- [40] Rattray JE, van de Vossenberg J, Hopmans EC, Kartal B, van Niftrik L, Rijpstra WIC, *et al.* Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria. *Arch Microbiol* 2008;190:51–66. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0364-8>.
- [41] Chekan JR, Cogan DP, Nair SK. Molecular basis for resistance against phosphonate antibiotics and herbicides. *Med Chem Commun* 2016;7:28–36. <https://doi.org/10.1039/C5MD00351B>.
- [42] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003;7:285–95. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00020-6).
- [43] Chatterjee C, Paul M, Xie L, van der Donk WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews* 2005;105:633–84. <https://doi.org/10.1021/cr030105v>.
- [44] Willey JM, van der Donk WA. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:477–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093501>.
- [45] Bagley MC, Dale JW, Merritt EA, Xiong X. Thiopeptide antibiotics. *Chemical Reviews* 2005;105:685–714. <https://doi.org/10.1021/cr0300441>.
- [46] Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, *et al.* Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* 2013;30:108–60. <https://doi.org/10.1039/C2NP20085F>.
- [47] Conti E. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *The EMBO Journal* 1997;16:4174–83. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4174>.

- [48] Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 1999;6:493–505. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80082-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80082-9).
- [49] Wang X, Zhou H, Chen H, Jing X, Zheng W, Li R, *et al.* Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in *Burkholderiales* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E4255–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720941115>.
- [50] Agarwal V, El Gamal AA, Yamanaka K, Poth D, Kersten RD, Schorn M, *et al.* Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria. *Nat Chem Biol* 2014;10:640–7. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1564>.
- [51] Fedorov R, Böhl M, Tsiavaliaris G, Hartmann FK, Taft MH, Baruch P, *et al.* The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:80–8. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1542>.
- [52] Kunfermann A, Witschel M, Illarionov B, Martin R, Rottmann M, Höffken HW, *et al.* Pseudilins: halogenated, allosteric inhibitors of the non-mevalonate pathway enzyme IspD. *Angew Chem Int Ed* 2014;53:2235–9. <https://doi.org/10.1002/anie.201309557>.
- [53] Coates RC, Podell S, Korobeynikov A, Lapidus A, Pevzner P, Sherman DH, *et al.* Characterization of cyanobacterial hydrocarbon composition and distribution of biosynthetic pathways. *PLoS ONE* 2014;9:e85140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085140>.
- [54] Tobias NJ, Wolff H, Djahanschiri B, Grundmann F, Kronenwerth M, Shi Y-M, *et al.* Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Nat Microbiol* 2017;2:1676–85. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0039-9>.
- [55] Rouhiainen L, Jokela J, Fewer DP, Urmann M, Sivonen K. Two alternative starter modules for the non-ribosomal biosynthesis of specific anabaenopeptin variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). *Chemistry & Biology* 2010;17:265–73. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.01.017>.
- [56] Koketsu K, Mitsuhashi S, Tabata K. Identification of homophenylalanine biosynthetic genes from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC73102 and application to its microbial production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:2201–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.03596-12>.
- [57] Ross AC, Gulland LES, Dorrestein PC, Moore BS. Targeted capture and heterologous expression of the *Pseudoalteromonas alterochromide* gene cluster in *Escherichia coli*

represents a promising natural product exploratory platform. *ACS Synthetic Biology* 2015;4:414–20. <https://doi.org/10.1021/sb500280q>.

[58] Barona-Gómez F, Wong U, Giannakopoulos AE, Derrick PJ, Challis GL. Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J Am Chem Soc* 2004;126:16282–3. <https://doi.org/10.1021/ja045774k>.

[59] Smits THM, Duffy B. Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E. *Arch Microbiol* 2011;193:693–9. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0739-0>.

[60] Jiang P, Wang H, Xiao S, Fang M, Zhang R, He S, *et al.* Pathway redesign for deoxyviolacein biosynthesis in *Citrobacter freundii* and characterization of this pigment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012;94:1521–32. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3960-0>.

[61] Durán M, Ponezi AN, Faljoni-Alario A, Teixeira MFS, Justo GZ, Durán N. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research* 2012;21:1524–32. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9654-9>.

[62] Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH, *et al.* antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* 2021:gkab335. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>.

[63] Bosi E, Fondi M, Orlandini V, Perrin E, Maida I, de Pascale D, *et al.* The pangenome of (Antarctic) *Pseudoalteromonas* bacteria: evolutionary and functional insights. *BMC Genomics* 2017;18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3382-y>.

[64] Blin K, Pascal Andreu V, de los Santos ELC, Del Carratore F, Lee SY, Medema MH, *et al.* The antiSMASH database version 2: a comprehensive resource on secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research* 2019;47:D625–30. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1060>.

[65] Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, *et al.* The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 2016;44:D279–85. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>.

[66] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* 2018;46:D493–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx922>.

- [67] de Jong A, van Heel AJ, Kok J, Kuipers OP. BAGEL2: mining for bacteriocins in genomic data. *Nucleic Acids Research* 2010;38:W647–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq365>.
- [68] Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D. Towards Prediction of Metabolic Products of Polyketide Synthases: An In Silico Analysis. *PLoS Computational Biology* 2009;5:e1000351. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000351>.
- [69] Conway KR, Boddy CN. ClusterMine360: a database of microbial PKS/NRPS biosynthesis. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D402–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gks993>.
- [70] Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, *et al.* Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nature Chemical Biology* 2015;11:625–31. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>.
- [71] Bachmann BO, Ravel J. Chapter 8 Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods in Enzymology*, vol. 458, Elsevier; 2009, p. 181–217. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04808-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04808-3).
- [72] Schneider TD, Stephens RM. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6097–100.
- [73] Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 2004;14:1188–90. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>.

### 3. Conclusion

Suite à l'étude génomique du genre *Pseudoalteromonas*, un fort potentiel de biosynthèse de composés originaux a été décrit.

Les annotations automatiques des génomes et prédictions en découlant révèlent déjà une grande diversité de systèmes de biosynthèse de métabolites secondaires. Les systèmes non ribosomiaux tels que les NRPS sont proportionnellement au moins aussi importants que chez le genre *Bacillus*.

L'analyse approfondie des systèmes NRPS du genre *Pseudoalteromonas* a permis d'extraire les binding pockets des domaines d'adénylation. La comparaison des séquences permettant la prédiction des monomères pris en charge a révélé des motifs peu fréquents. Il apparaît, en effet, que 25% des séquences des binding pockets des domaines d'adénylation des NRPS putatives sont absentes des bases de données étudiées. Environ 30 séquences différentes de binding pockets ne sont pas attribuées à un résidu connu. Ces résultats suggèrent la prise en charge de monomères originaux dont la séquence de la binding pocket n'est pas encore décrite dans les bases de données. Malgré le peu de génomes disponibles, ces données confortent l'intérêt porté au genre *Pseudoalteromonas* qui apparaît comme une source de NRPS originaux encore sous-explorée.

Les BGC identifiés chez ce genre bactérien ne sont pas nécessairement exprimés de manière constitutive. C'est pourquoi ces identifications bioinformatiques sont souvent complétées par des méthodes de culturomique. En effet, les métabolites secondaires étant produits selon les conditions physiologiques et environnementales particulières, il est nécessaire d'explorer la diversité chimique en faisant varier ces dernières. Ainsi, l'approche « OSMAC » (One Strain, MAny Compounds) permet de tester des conditions de culture variées telles que les éléments nutritifs du milieu de culture, le pH, la salinité ou encore l'agitation (Romano *et al.* 2018). Les conditions de co-culture pour induire la production des métabolites sont également un paramètre important à explorer.

---

## **Chapitre 4 – Biosynthèse des altérines**

---





## 1. Introduction

La souche *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 a été choisie comme souche modèle pour l'étude du mécanisme de production des altérines. Le génome de cette souche a été complètement assemblé suite à un séquençage PacBio par la méthode SMRT.

La structure originale des altérines suggère une biosynthèse non ribosomale impliquant des NRPS. Des outils tels que la plateforme MaGe ou le logiciel NRPS predictor ont été utilisés pour identifier les gènes impliqués dans la biosynthèse des altérines chez *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6. La régulation de la production d'altérine a été étudiée grâce à l'analyse du phénotype de la souche dans différents milieux de culture induisant ou non la production d'altérines.

Une analyse RNAseq a permis d'observer le transcriptome de *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 en condition de production ou absence de production d'altérines. Cette étude a été réalisée afin d'identifier les gènes transcrits dans les deux conditions de manière globale et d'élucider le mécanisme de biosynthèse et de régulation de la production des altérines.

Les altérines étant produites par d'autres bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, les synténies ont été analysées afin de confirmer les gènes impliqués ainsi que définir les bornes du cluster de biosynthèse. Les génomes de souches productrices d'altérines *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42, *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66, hOe-124 et hOe-125 ont été déposés sur MaGe pour l'analyse des synténies. Suite à la recherche de synténie, la souche *Pseudoalteromonas* sp. HM-SA03 a été identifiée comme possédant une organisation similaire au cluster putatif de biosynthèse des altérines. Cette souche a été découverte et étudiée par l'équipe de Brett Neilan à l'université de Newcastle en Australie. Une collaboration a donc été initiée avec cette équipe afin d'enrichir les recherches sur les altérines.

La voie de biosynthèse des altérines a été présentée dans l'article en préparation à suivre.

## 2. Biosynthèse des altérines chez *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6

### Alterins biosynthetic gene cluster identification from *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 : a genomic and transcriptomic study

Hélène CUNY <sup>1</sup>, Benjamin BRILLET <sup>1</sup>, Erwan CORRE <sup>2</sup>, Brett NEILAN <sup>3</sup>, Alexis BAZIRE <sup>1</sup> and Yannick FLEURY <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, Univ Bretagne Sud, LBCM, EA 3884, F-29000 Quimper, F-56100 Lorient, France.

<sup>2</sup> Station Biologique de Roscoff, Plateforme ABiMS, CNRS: FR2424, Sorbonne Université (UPMC), Paris VI, Place Georges Teissier, 74 29682, Roscoff Cedex, BP, France.

<sup>3</sup> School of Environmental and Life Sciences, University of Newcastle, Callaghan 2308, Australia.

\* Correspondence: [yannick.fleury@univ-brest.fr](mailto:yannick.fleury@univ-brest.fr)

#### Abstract

Marine organisms host wide diversity of associated microbiota in which bacteria play a significant role in holobiont health. *Pseudoalteromonas* strains showing antimicrobial activity were isolated for oysters hemolymph for their production of antibacterial cyclolipopeptides, called alterins. The aim of this study was to identify the alterin biosynthesis pathway and production profile. Using various bioinformatic tools, we explored the genome of the alterin-producing strain, *Pseudoalteromonas* hCg-6. The genome-mining allowed the identification of the Biosynthetic Gene Cluster (BGC). Moreover, we shown that this BGC is involved in the alterin production in several bacterial strains within the *Pseudoalteromonas* genus. The responsible cluster is an 30kb BGC with two main *nrps* genes and associated biosynthetic genes. We performed a differential analysis of the transcriptome of the strain cultured in alterin-producing versus in non alterin-producing conditions. The *nrpsA* and *nrpsB* gene transcripts were amazingly equal, whatever was the culture condition. However, the upstream genes of the two *nrps* genes, involved in the monomer biosynthesis were significantly

upregulated. We concluded that the alterin production depends on the monomer availability rather than the nrps expression.

**Keywords:** *Pseudoalteromonas*; alterin; Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS); antibiotic; transcriptome

## 1. Introduction

The strain *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 was isolated in the hemolymph of healthy *Crassostera gigas* oyster. *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 has been selected thanks to its strong activity against Gram negative bacteria (Defer *et al.*, 2013; Desriac *et al.*, 2014). This antibacterial activity results from the production of a new family of cyclolipopeptides named alterin (Desriac *et al.*, 2020).

These peptides range from 926Da to 982Da. They exhibit a ring of 7 amino acid residues of which Dehydrobutyrin (Dhb), Diaminobutyric acid (Dab), 2 rare hydroxylated Dab called Dab( $\beta$ HO). This peptidic cycle carries a lipid acyl chain ranging from 8 to 13 carbons with or without hydroxylation on C3 and/or unsaturation on C5 (Desriac *et al.*, 2020). As polymyxins would do, alterins interact with lipid A of LPS from Gram negative bacteria membrane thanks to their cationic profil (Desriac *et al.*, 2020; Li and Velkov, 2019; Nikaido, 2003). When alterins interact with LPS, it leads to membrane permeabilization and depolarization and finally to the cell death (Desriac *et al.*, 2020).

Due to the unusual structure of alterin family, a Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) was suspected to be responsible of alterin biosynthesis. In this study, we explored the *Pseudoalteromonas* genome for BGC identification. Using various bioinformatic tools, we identified a putative biosynthetic pathway. In order to get new insight into the regulation of alterin production, we investigated the hCg-6 transcriptome in alterin-producing or non alterin-producing culture conditions. Finally, we showed that three species of *Pseudoalteromonas* are able to produce alterins. Two of them are closely related to *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* and *Pseudoalteromonas ostreae* while the third one is taxonomically much more distant.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacteria cultivation

Marine bacterial strains *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6, *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* CECT 9079T, *Pseudoalteromonas* sp. HM-SA03, *Vibrio tapetis* CECT 4600<sup>T</sup> and *Vibrio harveyi* ORM4 were grown in Marine Broth media (MB, 2216E Difco) or Tryptone Soya Broth supplemented with 1.5% NaCl (TSB<sub>NaCl</sub>, Biokar) at 18°C with agitation at 100 rpm, usually during 48h. For some analysis, they were sometimes cultivated at 30°C. The strains *Escherichia coli* SBS 363 and *Escherichia coli* ATCC25922<sup>T</sup> were grown in Luria Bertani media (LB, Dutscher) at 37°C with agitation at 100rpm, usually for 24h.

For the alterins production, *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 was cultivated in an optimized salted synthetic medium (Desriac *et al.*, 2020) at 18°C, 100rpm for 72h.

### 2.2. Antimicrobial profile

The bioactive potential of the strains *Pseudoalteromonas* hCg-6 was assessed through microbiological analyses. *Pseudoalteromonas* strain was grown in MB and TSB<sub>NaCl</sub>, at 18°C or 30°C to assess the antibacterial profile. Once the strains grew in each culture conditions, 1ml of each culture was centrifuged (6000x g for 5 min at 4°C) and the supernatant was inactivated 5min at 100°C before being tested against target bacteria. To test the activity of these supernatants, marine agar plates (MA) were inoculated on the surface with the target bacteria at 1.106 UFC/mL and 20µl of supernatants were dropped in agar holes of 0.5 cm. Plates were then incubated at the target bacteria growth temperature during 24h for *E. coli* or 48h for marine strains, *Vibrio harveyi* ORM4, *Vibrio tapetis* CECT 4600<sup>T</sup>. After the incubation time, growth inhibition could be observed around the agar holes.

Also, cell-free supernatants from both media were pre-purified with Solid Phase Extraction C18 (SPE, C18 2G UPTI-clean cartridges, Interchim, France), eluted in 60% acetonitrile and concentrated by lyophilization and then analyzed by UPLC-MS/MS to link the bioactivity to the detection of alterins or not in the crude extract.

## 2.3. Genome mining

### 2.3.1. DNA extraction and whole genome sequencing

From a 48h culture in MB, the genomic DNA was extracted using the Monarch Total Genomic DNA Extraction kit (NewEngland Biolabs, Massachusetts, USA) according to the supplier recommendations. Genomic DNA was quantified with the dsDNA High Sensitivity assay kit using the Qubit 4 fluorometer (Invitrogen, California, USA) and the gDNA quality checked through a 260/280nm spectrum.

The 16S rRNA sequence was amplified according to Weisburg *et al.* (Weisburg *et al.*, 1991) and then sequenced thanks to the Sanger method (Eurofins GATC, Cologne, Germany).

The whole genome was also sequenced thanks to the InView *de novo* Genome 2.0 method (Pacific Biosciences). The *de novo* assembly performed by the PacBio platform.

An PyANI v.0.2.11 was used for the average nucleotide identity (ANI) values (Pritchard *et al.*, 2015) and Genome to Genome Distances (GGDC) web server (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013) were used for in silico DNA-DNA hybridization (isDDH) (Goris *et al.*, 2007) to identify the species of hCg-6.

The genome assembly, was uploaded on the RAST webserver (Overbeek *et al.*, 2014) and MaGe platform in order to predict and annotate genes function (Microbial Genome Annotation and Analysis platform, MicroScope, Genoscope, (Vallenet *et al.*, 2013)).

### 2.3.2. Biosynthetic Gene Clusters

Regarding the interesting antimicrobial potential of alterins, the biosynthesis pathway has been first investigated using bioinformatic tools. Due to the unusual amino acids residue composition of the alterins, the research has been focusing on Biosynthetic Gene Clusters (BGCs) called Non Ribosomal Peptide synthetase (NRPS) which are known to be involved in non ribosomal peptide (NRP) biosynthesis. The Antibiotics & Secondary Metabolites Analysis Shell (AntiSMASH) platform v6.0.0. (Blin *et al.*, 2021) was used to predict secondary metabolite biosynthesis regions such as NRPS, Polyketide synthase (PKS), Siderophore...

These analyses are based on the FastANI similarities with genomes annotated as “Complete genomes”, “Chromosome” and some “Draft genomes” in NCBI Refseq (Blin *et al.*, 2017). BGCs are identified by the research of conserved core-enzymes (Blin *et al.*, 2019) based on the

Hidden Markov Model (HMM) in Pfam data base (Finn *et al.*, 2016), SMART (Letunic and Bork, 2018), BAGEL (de Jong *et al.*, 2010), (Yadav *et al.*, 2009).

NRPS BGC sequences were extracted and analysed. The module and domain organisation was determined on AntiSMASH and NRPS/PKS prediction tool (Bachmann and Ravel, 2009). The latter also allowed the binding pocket sequences extraction and the prediction of amino acid residues specific to each adenylation domain. Condensation domains were analysed using NaPDos (Ziemert *et al.*, 2012).

### 2.4. Transcriptomic analysis

The transcriptome was analyzed on RNA from hCg-6 cultures in MB and TSB<sub>NaCl</sub> conditions to observe the differentially expressed genes (DEG).

Total RNA were extracted from 5 biological replicates for each conditions using the Monarch total RNA extraction kit (NewEngland Biolabs, Massachusetts, USA). The quality was verified by a 260/280 spectrum with a Nanophotometer N60 (Implen, Germany) and the quantification done by using Qubit 4 fluorometer and RNA HS assay kit according to manufacturer recommendations (Invitrogen, California, USA). The RNAseq experiment was performed by GenomeQuebec center (GenomeQuebec, Montreal, Canada). The RNA quality was verified with absorbance ratio and the RIN (bioanalyser) before the ribodepletion and Illumina cDNA library constitution. Stranded libraries were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies) and the Kapa Illumina GA with Revised Primers-SYBR Fast Universal kit (Kapa Biosystems). Average size fragment was determined using a LabChip GX (PerkinElmer) instrument. The sequencing of cDNA was achieved with the NovaSeq 6000 platform to a depth of 25M reads and 100bp paired-end reads were generated. Data were processed on Galaxy (Europe and ABiMS). The raw data quality was checked using FASTQC tool (v0.11.8) and trimmed by the Trimmomatic tool (v0.38.0). Reads were then mapped to the reference genome using the Bowtie2 tool (v2.3.2.2). The mapping rate was evaluated for each read using the HTseq tool and finally, the DEG assessed using the DESeq2 tool (Love *et al.*, 2014) and the False Discovery Rate controlled with the adjusted P values according to Benjamini and Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995). Identified DEGs were sorted out, keeping data with a FDR cut-off < 0.05.

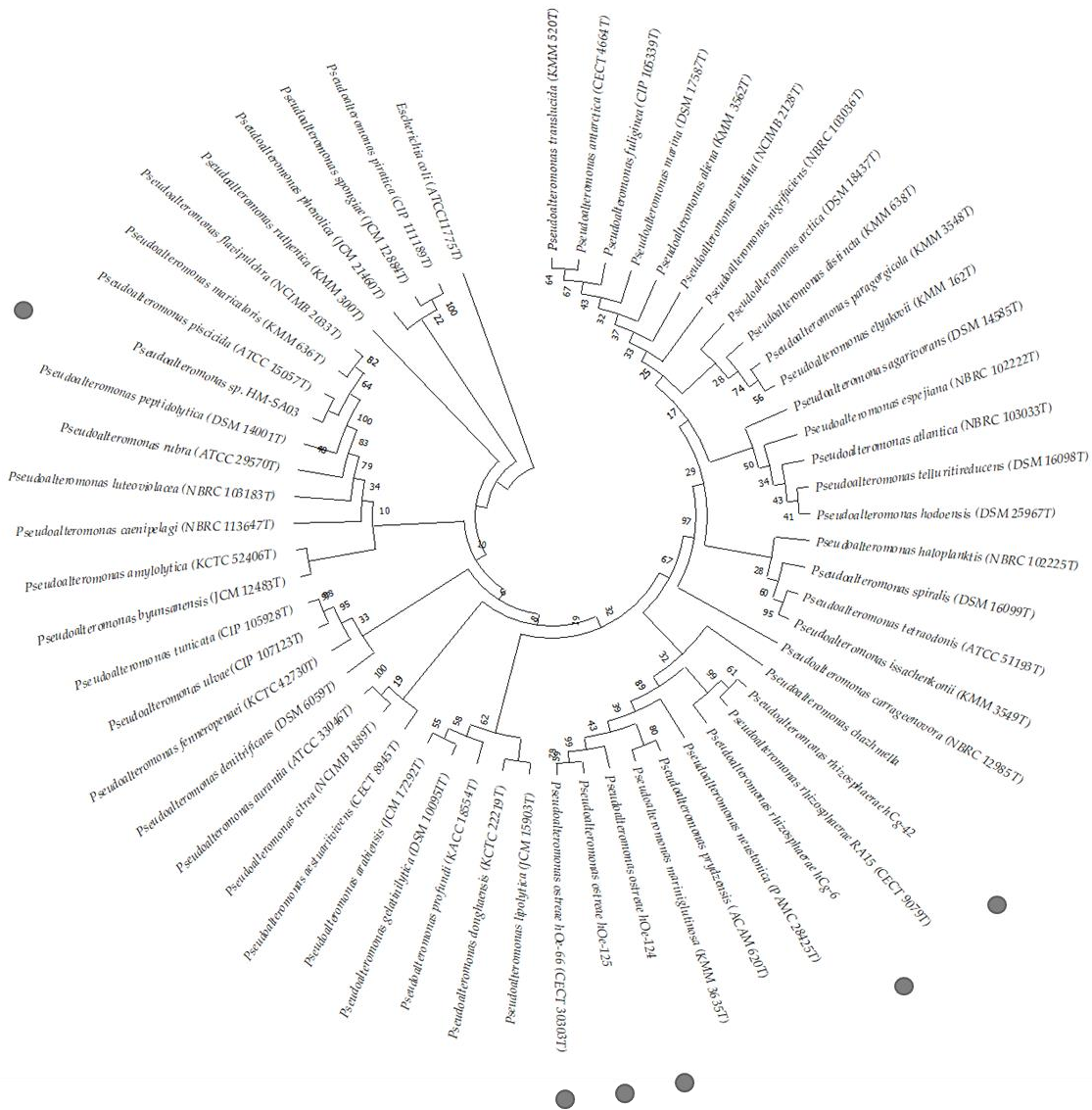
The ten DEGs of interest were selected to validate the RNAseq data by Reverse Transcription and fluorescence-based quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). The corresponding cDNA were synthesized from extracted RNA by reverse transcription (RT) using the High-Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, California, USA) according to the manufacturer recommendations. The fluorescence based qPCR reactions were realized using the FastStart Essential DNA Green Master (Roche applied science, Penzberg, Germany) following the manufacturers recommendations and a CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR System (BioRad, California, USA). The 16S and *rpoB* genes were used as internal reference genes for normalization. Data were processed with the CFX Maestro software (Biorad, California, USA) and the relative transcription of target genes was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

The transcriptomic results of the alterin cluster were confirmed by RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative PCR). The same RNA samples were used and converted into corresponding cDNA following the manufacturer's instructions (High Capacity cDNA RT kit, AppliedBiosystems, Massachusetts, USA). DNA were quantified with a Qubit 4 fluorometer. The qPCR reactions were performed using the FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Switzerland) and primers were purchased from Eurogentec (Table S1.2). Transcription levels were measured by the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  comparison with reference genes (16S and *rpoB*).

### 3. Results

#### 3.1. Genomic analysis

The 16S partial sequence of *Pseudoalteromonas* hCg-6 (1384pb) was deposited in the GenBank data library with the accession number MT271987.1. From the 16S RNA analysis, the strain hCg-6 is closely related to the *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* and *Pseudoalteromonas neustonica* species (Figure 1).



**Figure 1.** Neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) with the sum of branch length = 0.52482707 shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 58 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1377 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al., 2018).

The strain hCg-6 has a genome of 5,5Mb gathering 2 chromosomes of 4,4 and 1Mb, a 94kb plasmid, a total of 5085 CDS and a mean of 41% GC bases. The genome clustering tool was used to compute a tree based on the genomic similarities using the Average Nucleotide Identity (ANI). The strain hCg-6 is clustered with the reference strain *P. rhizosphaerae* RA15. The ANI and Genome to genome distance (GGDC) revealed that the strain hCg-6 belongs to



the *rhizosphaerae* species (75,7% score GGDC and 97% score ANI), thus called *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6. It shares 3508 gene families (7161 genes) with the reference strain *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15 and has 1321 specific gene families. From the fasta sequence of the hCg-6 genome and through the AntiSMASH tool, 7 regions of BGCs were predicted, all within the 1st chromosome. They are involved in the biosynthesis of non ribosomal peptides (NRPs), ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide products (RiPPs), siderophores or T1PKS-NRPS hybrids (Table 1).

**Table 1.** Secondary metabolites biosynthetic regions detected within the *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 genome.

Region	Type	From	To	Adenylation	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	RiPP-Like.1	675,451	685,93	/		
Region 2	T1PKS-NRPS.1	919,241	990,82	7		
Region 3	NRPS.1	2,245,619	2,308,980	7	Odilorhabdins NRP	13%
Region 4	RiPP-Like.2	3,721,948	3,732,889	/		
Region 5	Siderophore.1	3,548,143	3,560,545	/	Desferrioxamine E	75%
Region 6	NRPS.2	66	42,997	2		
Region 7	NRPS.3	128,554	216,224	15		

As previously described, alterins are made of a macrocyclic peptidic ring made of 7 amino-acids residues. The alterin molecular masses are around 1 kDa. After an initial analysis based on the molecular weight of the predicted biosynthetic products, we eliminated regions 1 and 4 and regions 5, 6 and 7. Indeed, the former are predicted to be involved in RiPPs biosynthesis and their resulting products would have a molecular weight above 90 kDa. The latter are putative NRPS and exhibit a number of adenylation domains incompatible with alterin production. Therefore, our investigations focused on Region 2 and 3.

Thanks to bioinformatic analysis, the suspected PKS-NRPS.1 (region 2) was analysed using the Maryland University NRPS/PKS prediction tool. The resulting predicted sequence (PK-Mal-Gly-Asp-Asn-Asn-Thr-Leu) exhibit no significant homology with alterin structure. Therefore, we focused on the last region to be investigated, region 3. This region is an 30kb BGC with two main *nrps* genes (*a2039* and *a2040*) and associated biosynthetic genes. Since *a2039* (9570pb) and *a2040* (13788pb) may encode NRPS, we named them *nrpsA* and *nrpsB*, respectively. They respectively code proteins of 3189 and 4595 amino acids residues.

The AntiSMASH analysis allowed to preview the NRPS modules organization with 3 modules in the NRPS A and 4 modules in the NRPS B, each composed of a condensation, adenylation

and thioesterase domains. This organization predict a 7 amino acid residues peptidic structure (Figure 2). Each domain and module were analysed by combining bioinformatics tools such as (i) the Maryland University NRPS/PKS prediction tool, (ii) the Natural Product Domain Seeker web-based tool (NaPDoS, (Ziemert *et al.*, 2012)) and (iii) finally, a research of published work in literature.

Based on the Stachelhaus code, the adenylation binding pockets sequences analysis resulted in the following sequence: X<sup>1</sup>-Thr<sup>2</sup>-X<sup>3</sup>-Leu<sup>4</sup>-Arg<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-X<sup>7</sup> (X = No correspondences, superscript numbers indicate the position of the residue within the peptidic sequence) (Figure 2). Using NaPDoS, the 3rd C domain was identified as Modify Amino Acid (ModAA) which could be responsible for Thr dehydration into Dhb as already reported (Ortega and van der Donk, 2016). The first C domain is identified as Cstart on NaPDoS allowing allow to hire a lipid chain on the corresponding amino acid (Huang *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2012). The other C domains were predicted as LCL, which confirm that the correponding modules select a L-amino acid residue. The TE domain at the end of the chain is capable of cyclisation of the final molecule (Miller and Gulick, 2016).

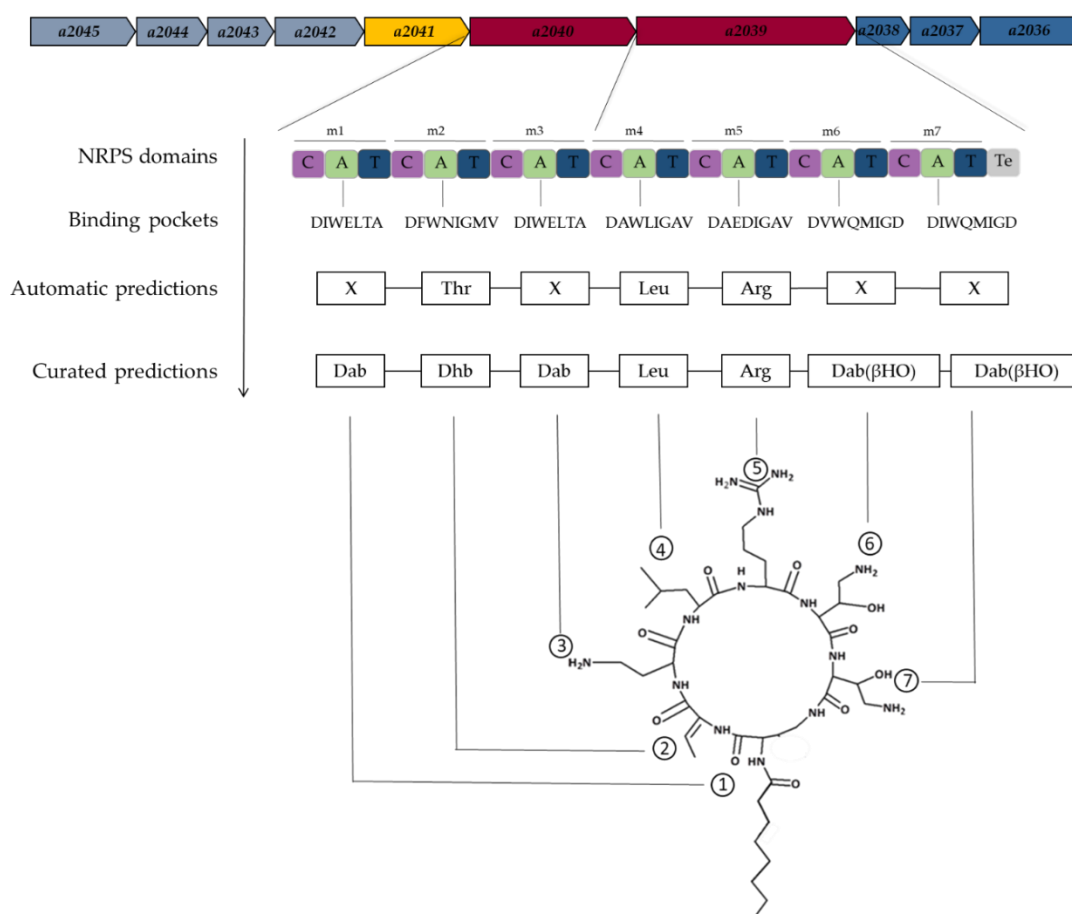


Figure 2. BGC organization for alterin production within and binding pocket predictions

In order to define the unpredicted amino acid, we explored the various NRPS known to date. It appeared that the binding pockets in first and third modules are described for the Dab selection (Kem *et al.*, 2015; Schalk and Guillon, 2013) while the adenylation domains of the two last modules have recently been described to select of Dab( $\beta$ HO) (Pantel *et al.*, 2018). This genomic analysis resulted in the identification of the putative NRPS involved in alterin biosynthesis.

Thus, we investigated the environment of these two *nrps* genes (Figure 2). As part of the 5 upstream genes, *a2045* is identified with 52% as 2-oxoglutarate 4-aminotransferase (E.C. number : 2.6.1.76, KEGG : R06977) and *a2042* is identified with 37.5% as aspartokinase (E.C. number : 2.7.2.4, KEGG : R00480). Both are identified in the KEGG Glycine, serine and threonine metabolic pathway (MAP00260) which is involved in the diaminobutyric acid biosynthesis. The *a2043* and *a2044* genes were analysed using UniProtKB/Swiss-Prot, TrEMBL database and finally BLASTp on the NCBI website. All of them agreed on homologies with JmjC domain-containing protein (Dunwell *et al.*, 2001). It is supposed that these two genes play a role in the hydroxylation of Dab, leading to the biosynthesis of the rare monomer Dab( $\beta$ HO). Moreover, the *a2043* and *a2045* genes exhibited homologies with CDS presents in the odilorhabdin NRPS cluster (Pantel *et al.*, 2018), with respectively 55%Id-96%Cov and 47%Id-97%Cov which also carry two Dab( $\beta$ HO) supporting the implication of these 2 genes in the Dab and Dab( $\beta$ HO) biosynthesis.

The first up-stream gene, *a2041*, before the *nrps A* (*a2040*), is annotated as ATP Binding Cassette transporter (ABC transporter), especially, cyclic peptide transporter with 51% similarities.

The three genes downstream the *nrps B* (*a2039*), *a2036*, *a2037* and *a2038* exhibit similarities with respectively a diacylglycerol kinase (*dgkA*), an acid phosphatase and a phosphoethanolamine transferase (*eptA*).

Based on the bioinformatics results, the region 3 seems to be the BGC involved in alterin production.

## 3.2. Alterin production from *Pseudoalteromonas* hCg-6

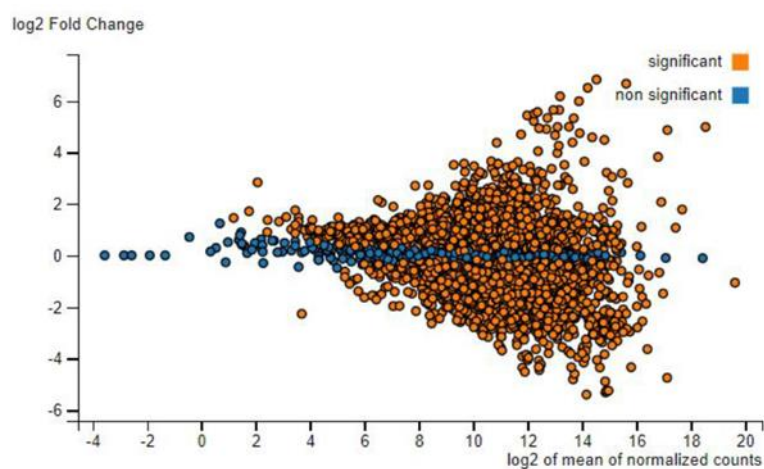
### 3.2.1. Culture conditions for alterin production

Our objective was to define the culture conditions for alterin production. We therefore investigated various culture media and conditions. For each culture condition, the cell-free culture supernatant was collected, assayed for antibacterial activity and subjected to C-18 solid phase extraction and LC-MS analysis according to (Desriac *et al.*, 2020; Offret *et al.*, Under review). At 18 °C, the antimicrobial activity was detected and correlated to alterin production (Figure S1) in Marine Broth. The alterin production was estimated at around 200 µg/mL of SPE crude extract in MB. On the contrary, the cell-free culture supernatant of *Pseudoalteromonas* hCg-6 grown in TSB<sub>NaCl</sub> exhibited no antibacterial activity and the C18-SPE extract, no alterin (Figure S1).

### 3.2.2. Transcriptomic analysis

Since the alterin production differs depending on the cultivation media, a transcriptomic study was led in order to identify all the differentially expressed genes (DEG) involved in alterin biosynthesis.

Around 98% reads were mapped on the hCg-6 genome assembly. From this, 4983 genomic objects were detected and a total of 4190 genes were significantly differentially expressed (84%). Almost half of them were up-regulated in MB compared to TSB<sub>NaCl</sub> whereas the other half was down-regulated (FDR cut-off < 0.05) (Figure 3).

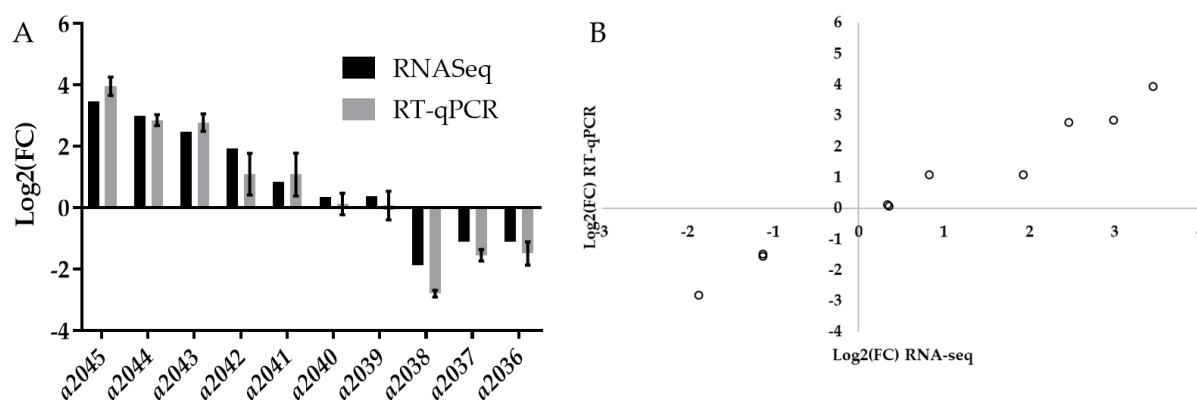


**Figure 3.** Representation of DEGs repartition with the normalized count number and the Log2 FoldChange

Within the 4190 DEG, a few were attributed to metabolic pathways (33%) and  $\frac{3}{4}$  of them were down-regulated in MB compared to TSB<sub>NaCl</sub>. The most represented MicroCycle categories were fatty acids and lipids biosynthesis, cofactors biosynthesis, nucleosides and nucleotides biosynthesis and amino acids biosynthesis. The latter was more up-regulated than down-regulated in MB compared to TSB<sub>NaCl</sub>.

The two *nrps* genes (*a2039* and *a2040*) were not significantly differentially expressed in MB compared to TSB<sub>NaCl</sub> despite the difference of alterin production in these 2 conditions. However, these two biosynthetic genes are still highly transcribed in both conditions with an average of  $1.2 \cdot 10^4$  normalized read counts.

In order to validate the implication of the identified NPRS system into the alterins biosynthesis, their relative expression was also assessed by RT-qPCR to correlate with RNA-seq results. The 10 genes of the NRPS cluster were studied, the 3 downstream genes (*a2036*, *a2037* and *a2038*), the 2 *nrps* (*a2039* and *a2040*) and the 5 upstream genes (*a2042*, *a2043*, *a2044* and *a2045*) (Figure 4).



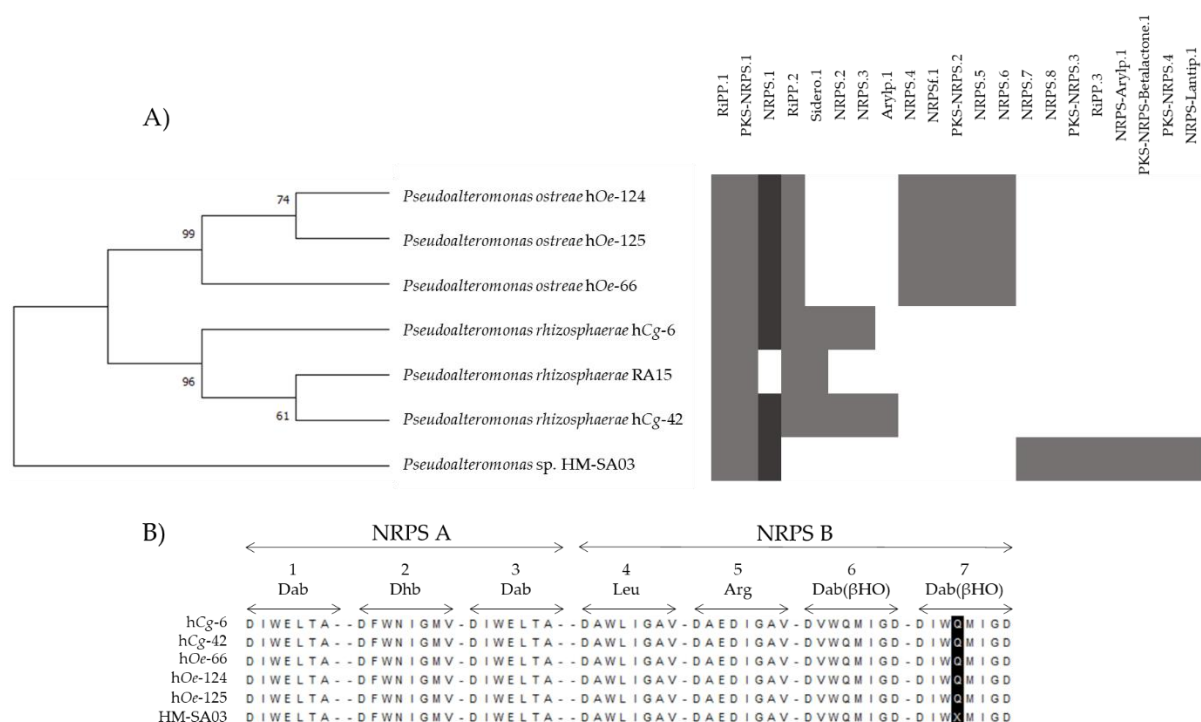
**Figure 4.** Transcript level of genes within the alterins cluster and validation by RT-qPCR. A, Relative expression of genes from *hCg-6* cultivated in MB compared to *hCg-6* cultivated in TSB<sub>NaCl</sub> (Log<sub>2</sub>(FC)).

Upstream genes are significantly up-regulated in MB compared to TSB<sub>NaCl</sub> (with a Log<sub>2</sub>(FC) ranging from -1.87 to 3.45). Since these genes are supposed to be involved in the Dab and Dab( $\beta$ HO) monomer biosynthesis, their up-regulation in MB strongly suggests that the alterin production depends on monomers availability more than *nrps* transcription. The 3 downstream genes are, conversely, down-regulated in MB compared to TSB<sub>NaCl</sub>.

### 3.3. Synteny

In order to explore the *Pseudoalteromonas* genus for alterin BGCs, the synteny with other strains was evaluated thanks to AntiSMASH (Blin *et al.*, 2019), NCBI, the webserver BAGEL4 (de Jong *et al.*, 2010), PRISM 4.4.5 (Skinnider *et al.*, 2020, 2015), SeMPI 2.0 (Zierop *et al.*, 2020) and MaGe (Microbial Genome Annotation and Analysis Platform, Genoscope, (Vallenet *et al.*, 2019)).

As expected the very closely related strain, *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42 and three *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66, hOe-124 and hOe-125 were highlighted. All of these strains are known to produce alterins (Desriac *et al.*, 2020; Offret *et al.*, Under review). They carry the same BGC organisation with 100% identity. The closely related type strain *P. rhizosphaerae* RA15 genome shows a poorer cluster diversity with 4 BGCs (Figure 5). Also, the alterin BGC was not identified within its genome. We were unable to detect any alterin production in its cell-free supernatant whatever the methods (biological assay and LC/MS analysis of SPE extract) and culture medium used (MB and TSB<sub>NaCl</sub>). Therefore, we conclude that the RA15 strain is not able to produce alterins.



**Figure 5.** A. Heatmap representation of BGCs identified by AntiSMASH within several alterin-producing *Pseudoalteromonas* genomes, except the *P. rhizosphaerae* type strain RA15. Light grey, BGCs found within the strains; Dark grey, hypothetical alterin BGC. B. Binding pocket sequences alignment of alterins NRPS system with MEGAX and MUSCLE (Edgar, 2004; Kumar *et al.*, 2018). Binding pockets numbered from 1 to 7 as module organization. X, undetermined.

The alterin BGC was surprisingly detected in another strain *Pseudoalteromonas* strain, called *Pseudoalteromonas* sp. HM-SA03. The strain was isolated in Australia from the salivary gland of the toxic blue-ring octopus *Hapalochlaena maculosa* (Chau *et al.*, 2013; Kalaitzis *et al.*, 2016) and is distant from the hCg and hOe strains in the 16S phylogenetic tree (Figure 1). The BGC of the HM-SA03 strain exhibits a high degree of homology (80%) with the BGC 3 of the hCg-6 strain. The same CDS organization was recovered. We therefore explored the alterin production by cultivating the HM-SA03 strain in MB and TSB<sub>NaCl</sub>, the alterin-producing and – non producing media, respectively. The cell-free supernatants were subjected to antibacterial assay and LC/MS analysis after SPE extraction. As expected we detected antibacterial activity against the Gram negative bacteria assayed when the HM-SA03 strain was grown in MB but not in TSB<sub>NaCl</sub>. Also, alterins were identified within the supernatant of HM-SA03 grown in MB (Supplementary material). Hence, the presence of the same BGC in the HMSA-03, hCg and hOe strains and the alterin production thus strongly enforce the identification of this BGC as responsible for alterin biosynthesis.

The other common BGCs within the alterin-producing strains (RiPP1 and PKS-NRPS 1) were eliminated since their final product molecular weight are incompatible with alterin.

## 4. Discussion

The strain *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 isolated from pacific oyster hemolymph is known to produce a set of antibacterial peptides called alterins (Defer *et al.*, 2013; Desriac *et al.*, 2014). Alterins are a family of cyclolipopeptides made of a heptapeptidic cycle linked via an amino bond to a hydrocarbon tail. Using a bio-guided strategy, 7 different alterins were structurally and functionally characterized (Desriac *et al.*, 2020). As in many lipopeptides, the hydrocarbon tail varies in length (from 8 and up to 12 Carbons), unsaturation and hydroxylation. The unusual amino acid monomers in the peptidic cycle are Dab, Dab( $\beta$ HO) and Dhb. The mechanism of action of these alterins is similar to the polymyxin B activity thanks to the cationic profile and the lipid chain (Desriac *et al.*, 2020; Li and Velkov, 2019).

Four more strains of *Pseudoalteromonas* named hCg-42 and hOe-66, hOe-124 and hOe-125 are also known to produce alterins. The latter belong to a new species named *Pseudoalteromonas ostreae* (Cuny *et al.*, 2021). Another *Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903

was described for the production of 4 different ogipeptins, closely related cyclolipopeptides but differed by the stereochemistry of the Dhb residue (Desriac *et al.*, 2020; Hirota-Takahata *et al.*, 2017; Kozuma *et al.*, 2017). One member of the alterin family also exhibits a longer unsaturated hydrocarbon tail (C14) than those of oyster-sourced alterin-producing *Pseudoalteromonas*.

The alterin chemodiversity was recently investigated in the oyster sourced *Pseudoalteromonas* strains (Offret *et al.*, Under review). At least 37 isoforms were identified with structure variations on the fatty acyl chain ranging from 8 to 13 carbons and sometimes unsaturation or hydroxylation. It was noticed that hOe strains produced shorter fatty acyl chain alterins whereas hCg longer fatty acyl chains, up to 13 carbons. In a more original way, the amino acid residues in position 1 and 3 are either Dab or Dab( $\beta$ HO) while in position 6 and 7 they are constantly Dab( $\beta$ HO).

Thanks to the genome sequencing of the genome of hCg-6, we investigated the biosynthesis pathway of alterins. Several BGCs were identified by genome mining. Due to the original structure and amino acid residues composition of alterins, we sought for a NRPS system with 7 adenylation domains, able to assemble original peptides as alterins. Indeed, this kind of systems were demonstrated to be responsible for the production of original bioactive peptides (Felnagle *et al.*, 2008; Pantel *et al.*, 2018; Tambadou *et al.*, 2015). Genome mining of alterin producers revealed a common NRPS cluster composed of 2 main *nrps* genes of which modules distribution and binding pockets predictions correspond to the resulting alterin products. Despite the detection of activity and alterins in the MB condition but not in the TSB<sub>NaCl</sub> condition, the transcription levels of the 2 *nrps* genes were identical in both media.

The combination of the chemodiversity of alterins with genome mining results raises questions about the non-ribosomal assembly mechanism. Indeed, alterins diversity showed that the 1st residue is largely Dab( $\beta$ HO) and also but to a lesser extent for Dab at position 3 although the binding pockets should select a Dab residue. By contrast the Dab( $\beta$ HO) in position 6 and 7 are extremely conserved. Two upstream genes, *a2043* and *a2044*, are suspected to play a role in the Dab hydroxylation, allowing the strain to add these rare residues to the alterin peptide. Even more, the odilhorabdins BGC carry 2 upstream genes with 50% homologies with the latter of the alterins BGC, suspected to be involved in the Dab( $\beta$ HO) biosynthesis. Therefore, we suspected (i) a low selectivity of the adenylation domain in



module 1 and 3 may result in such structures and/or (ii) a Dab side chain hydroxylation of the once the peptidic chain completed. Heterologous production of the putative hydroxylase encoded by genes *a2043* and *a2044* has been initiated in order to validate one or the other hypothesis. Whatever it might be, this Dab( $\beta$ HO) residue is one of the rarest amino-acid residue known to date. The hydroxylation function of the genes *a2043* and *a2044* needs to be investigated in order to clarify the Dab( $\beta$ HO) natural biosynthesis and maybe develop its bioproduction. The transcriptomic results suggest that the alterin biosynthesis is enhanced by the upstream genes and so, their transcription allows the addition of specific residues by NRPS proteins of which *nrps* genes are constitutive.

Finally, the alterin BGC and/or alterin production is recovered in taxonomically distant strains, *Pseudoalteromonas* sp. HM-SA03 and *Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903. This large distribution of alterin BGC is, however, rare since none of the 74 *Pseudoalteromonas* genomes queried exhibited such a BGC. The ecological advantages resulting from alterin production may justify its high energetic cost.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.C., B.B. and Y.F.; methodology, H.C., B.B., E.C. and Y.F.; software, H.C. and E.C.; validation, H.C., B.B., E.C., B.N., A.B. and Y.F.; formal analysis, H.C. and B.B.; investigation, H.C. and B.N.; resources, B.B., B.N. and Y.F.; data curation, H.C. and B.B.; writing—original draft preparation, H.C.; writing—review and editing, H.C., B.B., E.C., B.N., A.B. and Y.F.; visualization, H.C. and Y.F.; supervision, B.B., A.B. and Y.F.; project administration, B.B., A.B. and Y.F.; funding acquisition, A.B. and Y.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the University of Western Brittany (UBO) and the University of South Brittany (UBS).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

Bachmann, B.O., Ravel, J., 2009. Chapter 8 Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 181–217. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04808-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04808-3)

- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Blin, K., Medema, M.H., Kottmann, R., Lee, S.Y., Weber, T., 2017. The antiSMASH database, a comprehensive database of microbial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research* 45, D555–D559. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw960>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A.M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G.P., Medema, M.H., Weber, T., 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* gkab335. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S.Y., Medema, M.H., Weber, T., 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* 47, W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
- Chau, R., Kalaitzis, J.A., Wood, S.A., Neilan, B.A., 2013. Diversity and Biosynthetic Potential of Culturable Microbes Associated with Toxic Marine Animals. *Marine Drugs* 11, 2695–2712. <https://doi.org/10.3390/md11082695>
- Cuny, H., Offret, C., Boukerb, A.M., Parizadeh, L., Lesouhaitier, O., Chevalier, P.L., Jégou, C., Bazire, A., Brillet, B., Fleury, Y., 2021. *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harboured by the flat oyster *Ostrea edulis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 13.
- de Jong, A., van Heel, A.J., Kok, J., Kuipers, O.P., 2010. BAGEL2: mining for bacteriocins in genomic data. *Nucleic Acids Research* 38, W647–W651. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq365>
- Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2013. Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357>
- Desriac, F., Chevalier, P.L., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., Fleury, Y., 2014. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiology Letters* 350, 107–116. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12308>
- Desriac, F., El Harras, A., Simon, M., Bondon, A., Brillet, B., Le Chevalier, P., Pugnère, M., Got, P., Destoumieux-Garzón, D., Fleury, Y., 2020. Alterins produced by oyster-associated *Pseudoalteromonas* are antibacterial cyclolipopeptides with LPS-binding activity. *Marine Drugs* 18, 630. <https://doi.org/10.3390/md18120630>

- Dunwell, J.M., Culham, A., Carter, C.E., Sosa-Aguirre, C.R., Goodenough, P.W., 2001. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem Sci* 26, 740–746. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01981-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01981-8)
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahon, M.D., Thomas, M.G., 2008. Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products. *Mol Pharm* 5, 191–211. <https://doi.org/10.1021/mp700137g>
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44, D279–D285. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M., 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Hirota-Takahata, Y., Kozuma, S., Kuraya, N., Fukuda, D., Nakajima, M., Takatsu, T., Ando, O., 2017. Ogipeptins, novel inhibitors of LPS: physicochemical properties and structural elucidation. *J Antibiot* 70, 84–89. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.61>
- Huang, E., Guo, Y., Yousef, A.E., 2014. Biosynthesis of the new broad-spectrum lipopeptide antibiotic paenibacterin in *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE. *Research in Microbiology* 165, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.02.002>
- Kalaitzis, J.A., Ingre, S.D., Chau, R., Simon, Y., Neilan, B.A., 2016. Genome-Guided Discovery of Natural Products and Biosynthetic Pathways from Australia’s Untapped Microbial Megadiversity. *Australian Journal of Chemistry* 69, 129. <https://doi.org/10.1071/CH15601>
- Kem, M.P., Naka, H., Inishi, A., Haygood, M.G., Butler, A., 2015. Fatty Acid Hydrolysis of Acyl Marinobactin Siderophores by *Marinobacter* Acylases. *Biochemistry* 54, 744–752. <https://doi.org/10.1021/bi5013673>

- Kozuma, S., Hirota-Takahata, Y., Fukuda, D., Kuraya, N., Nakajima, M., Ando, O., 2017. Identification and biological activity of ogipeptins, novel LPS inhibitors produced by marine bacterium. *J Antibiot* 70, 79–83. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.81>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Letunic, I., Bork, P., 2018. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* 46, D493–D496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx922>
- Li, Z., Velkov, T., 2019. Polymyxins: Mode of Action, in: Li, J., Nation, R.L., Kaye, K.S. (Eds.), *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 37–54. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_4)
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P., Göker, M., 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Miller, B.R., Gulick, A.M., 2016. Structural Biology of Non-Ribosomal Peptide Synthetases. *Methods Mol Biol* 1401, 3–29. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3375-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3375-4_1)
- Nikaido, H., 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.* 67, 64.
- Offret, C., Cuny, H., Bodet, P.-E., Jégou, C., Bazire, A., Chevrot, R., Thiéry, V., Brillet, B., Fleury, Y., Under review. Alterins, a new family of marine antibacterial cyclolipopeptides. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Ortega, M.A., van der Donk, W.A., 2016. New Insights into the Biosynthetic Logic of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Natural Products. *Cell Chemical Biology* 23, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.012>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., Stevens, R., 2014. The SEED and the

Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42, D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>

Pantel, L., Florin, T., Dobosz-Bartoszek, M., Racine, E., Sarciaux, M., Serri, M., Houard, J., Campagne, J.-M., de Figueiredo, R.M., Midrier, C., Gaudriault, S., Givaudan, A., Lanois, A., Forst, S., Aumelas, A., Cotteaux-Lautard, C., Bolla, J.-M., Vingsbo Lundberg, C., Huseby, D.L., Hughes, D., Villain-Guillot, P., Mankin, A.S., Polikanov, Y.S., Gualtieri, M., 2018. Odilorhabdins, Antibacterial Agents that Cause Miscoding by Binding at a New Ribosomal Site. *Molecular Cell* 70, 83-94.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.001>

Pritchard, L., Glover, R., Humphris, S., Elphinstone, J., Toth, I., 2015. Genomics and Taxonomy in Diagnostics for Food Security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods* 8. <https://doi.org/10.1039/C5AY02550H>

Qian, C.-D., Liu, T.-Z., Zhou, S.-L., Ding, R., Zhao, W.-P., Li, O., Wu, X.-C., 2012. Identification and functional analysis of gene cluster involvement in biosynthesis of the cyclic lipopeptide antibiotic pelgipeptin produced by *Paenibacillus elgii*. *BMC Microbiol* 12, 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-197>

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Schalk, I.J., Guillon, L., 2013. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology* 15, 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>

Skinnider, M.A., Dejong, C.A., Rees, P.N., Johnston, C.W., Li, H., Webster, A.L.H., Wyatt, M.A., Magarvey, N.A., 2015. Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Res* gkv1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1012>

Skinnider, M.A., Johnston, C.W., Gunabalasingam, M., Merwin, N.J., Kieliszek, A.M., MacLellan, R.J., Li, H., Ranieri, M.R.M., Webster, A.L.H., Cao, M.P.T., Pfeifle, A., Spencer, N., To, Q.H., Wallace, D.P., Dejong, C.A., Magarvey, N.A., 2020. Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nat Commun* 11, 6058. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19986-1>

Tambadou, F., Caradec, T., Gagez, A.-L., Bonnet, A., Sopéna, V., Bridiau, N., Thiéry, V., Didelot, S., Barthélémy, C., Chevrot, R., 2015. Characterization of the colistin (polymyxin E1 and E2)

biosynthetic gene cluster. *Archives of Microbiology* 197, 521–532.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-015-1084-5>

Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11030–11035.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>

Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., Le Fèvre, F., Longin, C., Mornico, D., Roche, D., Rouy, Z., Salvignol, G., Scarpelli, C., Thil Smith, A.A., Weiman, M., Médigue, C., 2013. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Research* 41, D636–D647.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1194>

Vallenet, D., Calteau, A., Dubois, M., Amours, P., Bazin, A., Beuvin, M., BURLLOT, L., Bussell, X., Fouteau, S., Gautreau, G., Lajus, A., Langlois, J., Planel, R., Roche, D., Rollin, J., Rouy, Z., Sabatet, V., Médigue, C., 2019. MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Research*.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703.  
<https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>

Yadav, G., Gokhale, R.S., Mohanty, D., 2009. Towards Prediction of Metabolic Products of Polyketide Synthases: An In Silico Analysis. *PLoS Computational Biology* 5, e1000351.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000351>

Ziemert, N., Podell, S., Penn, K., Badger, J.H., Allen, E., Jensen, P.R., 2012. The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A Phylogeny Based Bioinformatic Tool to Classify Secondary Metabolite Gene Diversity. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034064>

Zierep, P.F., Ceci, A.T., Dobrusin, I., Rockwell-Kollmann, S.C., Günther, S., 2020. SeMPI 2.0—A Web Server for PKS and NRPS Predictions Combined with Metabolite Screening in Natural Product Databases. *Metabolites* 11, 13. <https://doi.org/10.3390/metabo11010013>

### 3. Conclusion

Les altérines sont produites par plusieurs souches du genre *Pseudoalteromonas*, telles que les hCg et hOe. Le séquençage des génomes de ces dernières a révélé qu'elles possèdent toutes un même cluster de gènes d'environ 30 kb (>98% de similarité). Il est composé de deux gènes majoritaires permettant la synthèse de deux protéines NRPS ainsi que des gènes associés et essentiels à la biosynthèse des altérines fonctionnelles.

Une étude *in silico* des deux gènes majoritaires *nrps* a permis de prédire les monomères assemblés. Les prédictions de spécificité des modules des NRPS ont révélé la séquence peptidique Dab-Dhb-Dab-Leu-Arg-Dab( $\beta$ HO)-Dab( $\beta$ HO) correspondant à la structure peptidique des altérines.

Les gènes environnants présentent des similarités de séquence avec des gènes pouvant jouer un rôle dans la biosynthèse des altérines. En amont des deux *nrps*, les gènes codent des protéines impliquées dans la voie métabolique des monomères Dab, de potentielles hydroxylases des Dab en Dab( $\beta$ HO) et un transporteur de peptides cyclique.

De plus, l'étude du phénotype d'activité et de production a permis de mettre en avant un mécanisme de production d'altérines milieu dépendant. En effet, les altérines sont détectées dans les surnageants la souche *Pseudoalteromonas* hCg-6 lorsque cultivée en MB mais ne sont pas détectées en TSB<sub>NaCl</sub>. Ainsi, l'étude du transcriptome de la souche dans ces deux conditions a révélé une modification du niveau transcriptionnel des gènes en amont et en aval des deux NRPS lorsque la souche est cultivée dans l'une ou l'autre des conditions. En revanche, l'expression des deux *nrps* n'est pas modifiée dans ces deux conditions de culture.

A l'heure actuelle, le mécanisme de résistance de la souche à ses propres PAM reste inconnu et nécessite des recherches plus approfondies. En effet, bien que les gènes présentant des homologies de séquence avec des gènes impliqués dans la résistance aux polymyxines soient surexprimés en milieu TSB<sub>NaCl</sub>, les bactéries apparaissent sensibles aux altérines et aux polymyxines. Le signal de régulation de la production des altérines est également à identifier sur la base des résultats obtenus de cultures dans différents milieux.





---

## **Conclusion et perspectives**

---



Dans le contexte de croissance démographique et d'augmentation des besoins alimentaires, il est nécessaire de fournir un effort sur la production alimentaire notamment en aquaculture qui deviendra la source principale de produits de la mer dans un proche avenir. Malheureusement, la production de masse et l'industrialisation sont étroitement liées à l'utilisation d'antibiotiques pour améliorer les taux de production et limiter les risques infectieux, et ce, malgré leur rôle ou implication dans l'apparition d'antibiorésistance.

Les bactéries marines restent une source de nouveaux composés actifs sous-explorée, tels que les lipopeptides antimicrobiens. Elles participeraient donc au renouvellement de l'arsenal thérapeutique et à la lutte contre les bactéries multi-résistantes (MDR) (Epanand et Epanand 2011).

Cette thèse s'est inscrite dans l'étude de bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas* et de leurs activités anti-bactériennes. Il s'agit des souches bactériennes *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 et hCg-42, isolées de l'hémolymphe d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* ainsi que les souches *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66, hOe-124 et hOe-125 isolées de l'hémolymphe d'huîtres plates *Ostrea edulis*. Ces 5 souches produisent des cyclolipopeptides antibactériens appelés altérines (Desriac *et al.* 2020). Les travaux menés se sont attachés à caractériser les souches productrices au niveau génomique et à élucider la diversité moléculaire des altérines ainsi que leur voie de biosynthèse.

Les trois souches isolées de l'hémolymphe d'huîtres plates, nommées hOe-66, hOe-124 et hOe-125 présentent des génotypes et phénotypes similaires bien qu'elles aient été isolées de 3 animaux différents. D'un point de vue phylogénétique, ces souches sont proches des espèces *Pseudoalteromonas rhizosphaerae*, *Pseudoalteromonas prydzensis* et *Pseudoalteromonas neustonica*. Les analyses génomiques ont montré que ces souches étaient les représentantes d'une nouvelle espèce que nous avons nommée *Pseudoalteromonas ostreae* au regard de leur origine, l'hémolymphe d'*Ostrea edulis*. La souche type, *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66<sup>T</sup>, a été déposée en collections de microorganismes sous les identifiants CECT 30303<sup>T</sup> et CIP 111911<sup>T</sup> et vient s'ajouter aux 53 espèces de *Pseudoalteromonas* décrites. Cette nouvelle espèce de *Pseudoalteromonas* a fait l'objet d'un article scientifique dans le journal « International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ».

Les souches de l'espèce *Pseudalteromonas ostreae* produisent des composés antibiotiques appelés altérines. Ces cyclolipopeptides ont été initialement isolés à partir des surnageants de culture des souches *Pseudalteromonas* hCg-6 et hCg-42 (Desriac *et al.* 2020). Nous avons établi la chimiodiversité des altérines des 5 souches en utilisant une technique de caractérisation structurale plus sensible (UPLC-HRMS/MS) que celle utilisée par Desriac *et al.*, 2020. Il apparaît que les altérines constituent une grande famille de lipopeptides composée, *a minima*, de 37 structures différentes d'altérines. Les différences structurales sont observées à deux principaux niveaux :

- la chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue (de 8 à 13 C), saturée ou non et hydroxylée ou non
- le cycle heptapeptidique où les Dab en position 1 et 3 du cycle peuvent être hydroxylés ou non

Par ailleurs, des lipotriptides Dab-Dhb-Dab ont été détectés dans les surnageants de culture. La présence de ces tripeptides pourrait résulter d'une biosynthèse partielle ou de la dégradation partielle des altérines.

Si la stratégie mise en place dans ces travaux a abouti à la caractérisation d'un grand nombre de structures d'altérines, elle n'a pas permis de définir l'activité biologique des peptides caractérisés et donc de préciser les relations structure-activité de ces derniers. Il semble que les extraits des souches hCg-6 et hCg-42 soient plus riches en altérines à chaînes hydrocarbonées en C10 et C12 et soient plus actifs contre les souches à Gram négatif que les extraits des souches hOe-66, hOe-124 et hOe-125 plus riches en altérines à chaînes hydrocarbonées en C8 et C10. Ces résultats sont en accord avec Desriac *et al.*, 2020. En revanche, l'impact des hydroxylations des résidus Dab en position 1 et 3 sur l'activité biologique n'a pu être mesuré.

Pour pouvoir étudier les relations structure-activité des altérines, il faudrait être en mesure de modifier le peptide naturel afin d'observer le rôle de chaque élément de structure sur l'activité anti-bactérienne. A l'heure actuelle, la quantité de peptides produite par les bactéries reste limitée : de l'ordre de 20 mg/L de culture en Marine Broth. Il est donc nécessaire d'envisager d'autres stratégies de production telles que des conditions de culture différentes favorisant la production, la synthèse peptidique en phase solide ou la production

en système hétérologue. La première va être explorée mais est aléatoire et chronophage puisqu'elle implique une étape de purification. La seconde et la troisième approches sont actuellement inaccessibles dans la mesure où le monomère Dab( $\beta$ HO) n'est pas commercialement disponible et les constructions génétiques restent à l'état d'ébauches.

Néanmoins, l'une ou l'autre de ces approches permettraient d'établir le rôle des principaux motifs structuraux dans l'activité des altérines et de tenter d'élaborer des analogues structuraux plus actifs.

L'objectif principal de la thèse était d'identifier les gènes de biosynthèse des altérines dans les génomes des souches de *Pseudoalteromonas* productrices. La structure des altérines étant cyclique, lipidique et portant des résidus non protéogéniques, l'hypothèse d'une biosynthèse par une voie autre que la voie ribosomale classique a été émise. Grâce aux données des génomes séquencés, il a été possible d'identifier plusieurs groupes de gènes dont un commun aux cinq souches productrices. Ce dernier est un système NRPS composé de 2 mega enzymes. La première, nommée NRPS A, est composée de 3 modules et la seconde, nommée NRPS B, de 4 modules correspondant par conséquent à un système NRPS linéaire pour la biosynthèse d'un peptide de 7 résidus d'acides aminés. Les prédictions bioinformatiques de prise en charge d'acides aminés correspondent à la séquence peptidique des altérines avec, de plus, un domaine Cstarter pour la prise en charge d'une chaîne hydrocarbonée sur le 1<sup>er</sup> résidu d'acide aminé. Les gènes environnants ont également été étudiés. Les cinq gènes en amont des *nrps* ont été identifiés comme codant un transporteur de peptides cycliques (*a2041*), des gènes codant des enzymes impliquées dans la biosynthèse des monomères Dab (*a2042* et *a2045*) et des gènes codant des enzymes que nous suspectons être responsables de l'hydroxylation des Dab en Dab( $\beta$ HO) (*a2043* et *a2044*). En aval des *nrps*, des gènes apparentés à des gènes de résistance à la polymyxine (environ 36% d'homologie) ont été détectés.

Cette thèse a permis d'identifier et valider le système NRPS responsable de la biosynthèse des altérines chez les 5 souches de *Pseudoalteromonas* issues de l'huître ainsi que chez une autre souche de *Pseudoalteromonas* isolée de la pieuvre *Haplochlæna maculosa* en Australie (Defer *et al.* 2013 ; Chau *et al.* 2013 ; Desriac *et al.* 2013 ; Kalaitzis *et al.* 2016).

Les identifications réalisées par analyse génomique ont été reliées aux observations phénotypiques. L'activité anti-bactérienne et les altérines ont été observées lorsque les souches sont cultivées dans du milieu Marine Broth mais pas lorsqu'elles sont cultivées en milieu Tryptone Soja enrichie en NaCl.

Sur la base de ces observations, les analyses du transcriptome de la souche hCg-6 cultivée en MB et TSB<sub>NaCl</sub> ont permis d'observer l'expression globale des gènes dans ces deux conditions. Il apparaît que les gènes *nrps* sont exprimés à des niveaux équivalents dans les deux conditions de culture. En revanche, les gènes impliqués dans la biosynthèse des monomères en amont des *nrps* sont surexprimés en MB où l'activité est détectée. Ces résultats ont été confirmés par RT-qPCR. Nous émettons donc l'hypothèse que la régulation de la biosynthèse des altérines dépend de la disponibilité en monomère plutôt que de l'expression des *nrps A* et *nrps B*.

L'identification des signaux environnementaux et des mécanismes de régulation de la transcription des gènes du BGC des altérines pourrait faciliter la mise au point d'un milieu optimal de production des alterines.

Des expérimentations en biologie moléculaire ont été initiées pour compléter et pour renforcer les travaux présentés dans ce manuscrit et font partie des perspectives. Ainsi, afin de vérifier la spécificité des modules prédite par bioinformatique, les modules ont été individuellement amplifiés par PCR, insérés dans le vecteur pRSET incluant un tag histidine et une résistance à l'ampicilline. Ces constructions ont été clonées chez *E.coli* BL21 DE3. L'expression hétérologue des modules recombinants a été suivie d'une purification sur colonne d'interaction grâce au tag histidine porté par la protéine recombinante. Le test de spécificité d'un module, vis-à-vis des résidus, reste à être réalisé selon la méthode basée sur la consommation d'ATP du module d'NRPS avec un résidu spécifique, en présence de vert de malachite (McQuade *et al.* 2009).

De la même manière, la fonction d'hydroxylation des gènes putatifs en amont des *nrps* devra être vérifiée par production hétérologue des protéines correspondantes. L'activité catalytique d'hydroxylation du monomère Dab devra être contrôlée.

L'expression hétérologue du système NRPS des altérines est une autre solution pour induire la production d'altérines chez un autre organisme tel qu'une souche bactérienne résistante aux polymyxines ou la levure. Au vu de la taille du cluster *nrps*, supérieure à 30 kb,

l'expérimentation nécessite la méthode d'assemblage de type Gibson ou HiFi assembly (Thomas *et al.* 2015). Cette méthode est basée sur l'amplification de la région en plusieurs fragments qui seront ensuite réassemblés par homologie de séquence et insérés dans un vecteur. Enfin, le système hétérologue sera exprimé chez un hôte.

De plus, le mécanisme d'immunité des souches à leurs propres composés reste à être identifié. En effet, les souches de *Pseudoalteromonas* sont des bactéries à Gram négatif produisant des composés actifs contre les bactéries à Gram négatif. Par conséquent un mécanisme d'immunité est indispensable pour la souche productrice.

Nous avons observé que les gènes *a2038*, *a2037* et *a2036*, en aval des *nrps*, présentant des homologies de séquence avec des gènes impliqués dans les phénomènes de résistance aux polymyxines, étaient surexprimés en TSB<sub>NaCl</sub>. Dans ce milieu, la souche hCg-6 ne produit pas d'altérines et est sensible à ces dernières. Les gènes *a2038*, *a2037* et *a2036* ne semblent donc pas impliqués dans l'immunité de la souche à ces propres altérines et aux polymyxines. Il est donc nécessaire de poursuivre l'annotation experte des génomes afin d'identifier le mécanisme d'immunité des souches productrices.

Nous avons constaté l'absence du gène *mcr* dans le génome de la souche hCg-6, décrit chez certaines souches résistantes aux polymyxines (Liu *et al.* 2016 ; Gallardo *et al.* 2020). Nous suspectons que des plasmides porteurs des gènes *mcr* n'aient pas été extraits et par conséquent séquencés. Un tel mécanisme de résistance *mcr* expliquerait, de surcroît, la sous-expression des gènes précédemment mentionnés puisqu'ils sont décrits comme inhibiteurs du système impliquant les phosphoéthanolamine transférases.

Ce travail de doctorat m'a permis d'ouvrir 3 perspectives principales qui consistent à élucider :

- les relations structure-activité des altérines au niveau de la partie peptidique. Pour ce faire, surmonter l'absence du monomère Dab( $\beta$ HO) est incontournable.
- les mécanismes de régulation de la production d'altérines
- les mécanismes d'immunité des souches productrices à leurs propres cyclolipopeptides.





---

## Références

---



- Abou Fayad, A., J. Herrmann & R. Müller 2018 « Octapeptins: Lipopeptide Antibiotics against Multidrug-Resistant Superbugs », *Cell Chemical Biology* 25.4 : 351-353. doi : 10.1016/j.chembiol.2018.04.003.
- Agarwal, V., A. A. El Gamal, K. Yamanaka, D. Poth, R. D. Kersten, M. Schorn, E. E. Allen & B. S. Moore 2014 « Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria », *Nature chemical biology* 10.8 : 640-647. doi : 10.1038/nchembio.1564.
- Agrawal, P., S. Amir, Deepak, D. Barua & D. Mohanty 2021 « RiPPMiner-Genome: A Web Resource for Automated Prediction of Crosslinked Chemical Structures of RiPPs by Genome Mining », *Journal of Molecular Biology* 433.11 : 166887. doi : 10.1016/j.jmb.2021.166887.
- Agrawal, P., S. Khater, M. Gupta, N. Sain & D. Mohanty 2017 « RiPPMiner: a bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links », *Nucleic Acids Research* 45.Web Server issue : W80-W88. doi : 10.1093/nar/gkx408.
- Ainsworth, G. C., A. M. Brown & G. Brownlee 1947 « "Aerosporin", an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer », *Nature* 160.263. doi : <https://doi.org/10.1038/160263a0>.
- Ajesh, K., S. Sudarshil, C. Arunan & K. Sreejith 2013 « Kannurin, a Novel Lipopeptide from *Bacillus Cereus* Strain AK1: Isolation, Structural Evaluation and Antifungal Activities », *Journal of Applied Microbiology* 115.6 : 1287-1296. doi : 10.1111/jam.12324.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman 1990 « Basic Local Alignment Search Tool », *Journal of Molecular Biology* 215.3 : 403-410. doi : 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Ameyama, S., S. Onodera, M. Takahata, S. Minami, N. Maki, K. Endo, H. Goto, H. Suzuki & Y. Oishi 2002 « Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (penA) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to Cefixime », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46.12 : 3744-3749. doi : 10.1128/AAC.46.12.3744-3749.2002.

- Amiri Moghaddam, J., T. Jautzus, M. Alanjary & C. Beemelmans 2021 « Recent Highlights of Biosynthetic Studies on Marine Natural Products », *Organic & Biomolecular Chemistry* 19.1 : 123-140. doi : 10.1039/D0OB01677B.
- Antoniadou, A., F. Kontopidou, G. Poulakou, E. Koratzanis, I. Galani, E. Papadomichelakis, P. Kopterides, M. Souli, A. Armaganidis & H. Giamarellou 2007 « Colistin-Resistant Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* Emerging in Intensive Care Unit Patients: First Report of a Multiclonal Cluster », *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59.4 : 786-790. doi : 10.1093/jac/dkl562.
- Arakawa, K., S. Yoshida, H. Aikawa, C. Hano, T. Bolormaa, S. Burenjargal & T. Miyamoto 2016 « Production of a Bacteriocin-like Inhibitory Substance by *Leuconostoc Mesenteroides* Subsp. *Dextranicum* 213M0 Isolated from Mongolian Fermented Mare Milk, Airag », *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho* 87.3 : 449-456. doi : 10.1111/asj.12445.
- Araújo, C., E. Muñoz-Atienza, P. Poeta, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz & L. M. Cintas 2016 « Characterization of *Pediococcus Acidilactici* Strains Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Feed and Larvae: Safety, DNA Fingerprinting, and Bacteriocinogenicity », *Diseases of Aquatic Organisms* 119.2 : 129-143. doi : 10.3354/dao02992.
- Arima, K., A. Kakinuma & G. Tamura 1968 « Surfactin, a Crystalline Peptidelipid Surfactant Produced by *Bacillus Subtilis*: Isolation, Characterization and Its Inhibition of Fibrin Clot Formation », *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31.3 : 488-494. doi : 10.1016/0006-291x(68)90503-2.
- Arp, J., S. Götze, R. Mukherji, D. J. Mattern, M. García-Altres, M. Klapper, D. A. Brock, A. A. Brakhage, J. E. Strassmann, D. C. Queller, B. Bardl, K. Willing, G. Peschel & P. Stallforth 2018 « Synergistic Activity of Cosecreted Natural Products from Amoebae-Associated Bacteria », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115.15 : 3758-3763. doi : 10.1073/pnas.1721790115.
- Bachmann, B. O. & J. Ravel 2009 « Chapter 8 Methods for *in Silico* Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data », in *Methods in Enzymology*, Elsevier : 181-217. doi : 10.1016/S0076-6879(09)04808-3.

- Bahar, A. A., Z. Liu, M. Garafalo, N. Kallenbach & D. Ren 2015 « Controlling Persister and Biofilm Cells of Gram-Negative Bacteria with a New 1,3,5-Triazine Derivative », *Pharmaceuticals* 8.4 : 696-710. doi : 10.3390/ph8040696.
- Balibar, C. J., F. H. Vaillancourt & C. T. Walsh 2005 « Generation of D Amino Acid Residues in Assembly of Arthrofactin by Dual Condensation/Epimerization Domains », *Chemistry & Biology* 12.11 : 1189-1200. doi : 10.1016/j.chembiol.2005.08.010.
- Baltz, R. H. 2021 « Genome Mining for Drug Discovery: Cyclic Lipopeptides Related to Daptomycin », *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 48.3-4 : kuab020. doi : 10.1093/jimb/kuab020.
- Barnett, M., S. R. Bushby & S. Wilkinson 1964 « Sodium Sulphomethyl Derivatives of Polymyxins », *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 23 : 552-574. doi : 10.1111/j.1476-5381.1964.tb01610.x.
- Bassarello, C., S. Lazzaroni, G. Bifulco, P. Lo Cantore, N. S. Iacobellis, R. Riccio, L. Gomez-Paloma & A. Evidente 2004 « Tolaasins A--E, Five New Lipodepsipeptides Produced by *Pseudomonas Tolaasii* », *Journal of Natural Products* 67.5 : 811-816. doi : 10.1021/np0303557.
- Bastian, A. & H. Schäfer 2001 « Human  $\alpha$ -Defensin 1 (HNP-1) Inhibits Adenoviral Infection *in Vitro* », *Regulatory Peptides* 101.1 : 157-161. doi : 10.1016/S0167-0115(01)00282-8.
- Béchet, M., T. Caradec, W. Hussein, A. Abderrahmani, M. Chollet, V. Leclère, T. Dubois, D. Lereclus, M. Pupin & P. Jacques 2012 « Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. », *Applied Microbiology and Biotechnology* 95.3 : 593-600. doi : 10.1007/s00253-012-4181-2.
- Béchet, M., J. Castéra-Guy, J.-S. Guez, N.-E. Chihib, F. Coucheney, F. Coutte, P. Fickers, V. Leclère, B. Wathelet & P. Jacques 2013 « Production of a Novel Mixture of Mycosubtilins by Mutants of *Bacillus Subtilis* », *Bioresource Technology* 145 : 264-270. doi : 10.1016/j.biortech.2013.03.123.

- Belaid, A., M. Aouni, R. Khelifa, A. Trabelsi, M. Jemmali & K. Hani 2002 « In Vitro Antiviral Activity of Dermaseptins against *Herpes Simplex Virus Type 1\** », *Journal of Medical Virology* 66.2 : 229-234. doi : 10.1002/jmv.2134.
- Ben Braïek, O., S. Morandi, P. Cremonesi, S. Smaoui, K. Hani & T. Ghraïri 2018 « Biotechnological Potential, Probiotic and Safety Properties of Newly Isolated Enterocin-Producing *Enterococcus Lactis* Strains. », *LWT - Food Science and Technology* 92. [En ligne] : <https://www.cabdirect.org/globalhealth/abstract/20183149600> : 361-370.
- Berry, C. L., A. K. C. Brassinga, L. J. Donald, W. G. D. Fernando, P. C. Loewen & T. R. de Kievit 2012 « Chemical and Biological Characterization of Sclerosin, an Antifungal Lipopeptide », *Canadian Journal of Microbiology* 58.8 : 1027-1034. doi : 10.1139/w2012-079.
- Bertelli, C. & G. Greub 2013 « Rapid Bacterial Genome Sequencing: Methods and Applications in Clinical Microbiology », *Clinical Microbiology and Infection* 19.9 : 803-813. doi : 10.1111/1469-0691.12217.
- Berti, A. D., N. J. Greve, Q. H. Christensen & M. G. Thomas 2007 « Identification of a Biosynthetic Gene Cluster and the Six Associated Lipopeptides Involved in Swarming Motility of *Pseudomonas Syringae* Pv. Tomato DC3000 », *Journal of Bacteriology* 189.17 : 6312-6323. doi : 10.1128/JB.00725-07.
- Besson, F., M. L. Hourdou & G. Michel 1990 « Studies on the Biosynthesis of Iturin, an Antibiotic of *Bacillus Subtilis*, and a Lipopeptide Containing Beta-Hydroxy Fatty Acids », *Biochimica Et Biophysica Acta* 1036.2 : 101-106. doi : 10.1016/0304-4165(90)90020-w.
- Biswas, S., J.-M. Brunel, J.-C. Dubus, M. Reynaud-Gaubert & J.-M. Rolain 2012 « Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century », *Expert Review of Anti-infective Therapy* 10.8 : 917-934. doi : 10.1586/eri.12.78.
- Blin, K., S. Shaw, A. M. Kloosterman, Z. Charlop-Powers, G. P. van Wezel, M. H. Medema & T. Weber 2021 « AntiSMASH 6.0: Improving Cluster Detection and Comparison Capabilities », *Nucleic Acids Research* : gkab335. doi : 10.1093/nar/gkab335.

- Bloudoff, K. & T. M. Schmeing 2017 « Structural and Functional Aspects of the Nonribosomal Peptide Synthetase Condensation Domain Superfamily: Discovery, Dissection and Diversity », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1865.11, Part B : 1587-1604. doi : 10.1016/j.bbapap.2017.05.010.
- Boparai, J. K. & P. K. Sharma 2019 « Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications », *Protein & Peptide Letters* 27.1 : 4-16. doi : 10.2174/0929866526666190822165812.
- Bosma, T., A. Kuipers, E. Bulten, L. de Vries, R. Rink & G. N. Moll 2011 « Bacterial Display and Screening of Posttranslationally Thioether-Stabilized Peptides », *Applied and Environmental Microbiology* 77.19 : 6794-6801. doi : 10.1128/AEM.05550-11.
- Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg & J. Bartlett 2009 « Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America », *Clinical Infectious Diseases* 48.1 : 1-12. doi : 10.1086/595011.
- Bowdish, D. M. E., D. J. Davidson, Y. E. Lau, K. Lee, M. G. Scott & R. E. W. Hancock 2005 « Impact of LL-37 on Anti-Infective Immunity », *Journal of Leukocyte Biology* 77.4 : 451-459. doi : 10.1189/jlb.0704380.
- Breazeale, S. D., A. A. Ribeiro & C. R. H. Raetz 2003 « Origin of Lipid A Species Modified with 4-Amino-4-Deoxy-L-Arabinose in Polymyxin-Resistant Mutants of *Escherichia Coli*: An Aminotransferase (ArnB) That Generates UDP-4-Amino-4-Deoxy-L-Arabinose », *Journal of Biological Chemistry* 278.27 : 24731-24739. doi : 10.1074/jbc.M304043200.
- Brillet-Viel, A., M.-F. Pilet, P. Courcoux, H. Prévost & F. Leroi 2016 « Optimization of Growth and Bacteriocin Activity of the Food Bioprotective *Carnobacterium divergens* V41 in an Animal Origin Protein Free Medium », *Frontiers in Marine Science* 3 : 128. doi : 10.3389/fmars.2016.00128.
- Brogden, K. A. 2005 « Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? », *Nature Reviews Microbiology* 3.3 : 238-250. doi : 10.1038/nrmicro1098.

- Brown, K. L. & R. E. W. Hancock 2006 « Cationic Host Defense (Antimicrobial) Peptides », *Current Opinion in Immunology* 18.1 : 24-30. doi : 10.1016/j.coi.2005.11.004.
- Cabello, F. C. 2006 « Heavy Use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture: A Growing Problem for Human and Animal Health and for the Environment », *Environmental Microbiology* 8.7 : 1137-1144. doi : 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x.
- Canepari, P. & M. Boaretti 1996 « Lipoteichoic Acid as a Target for Antimicrobial Action », *Microbial Drug Resistance* 2.1 : 85-89. doi : 10.1089/mdr.1996.2.85.
- Cao, X., A. Wang, C. Wang, D. Mao, M. Lu, Y. Cui & R. Jiao 2010 « Surfactin Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through a ROS/JNK-Mediated Mitochondrial/Caspase Pathway », *Chemico-Biological Interactions* 183.3 : 357-362. doi : 10.1016/j.cbi.2009.11.027.
- Cazorla, F. M., D. Romero, A. Pérez-García, B. J. J. Lugtenberg, A. de Vicente & G. Bloemberg 2007 « Isolation and Characterization of Antagonistic *Bacillus Subtilis* Strains from the Avocado Rhizoplane Displaying Biocontrol Activity », *Journal of Applied Microbiology* 103.5 : 1950-1959. doi : 10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x.
- Chau, R., J. A. Kalaitzis, S. A. Wood & B. A. Neilan 2013 « Diversity and Biosynthetic Potential of Culturable Microbes Associated with Toxic Marine Animals », *Marine Drugs* 11.8 : 2695-2712. doi : 10.3390/md11082695.
- Chau, R., L. A. Pearson, J. Cain, J. A. Kalaitzis & B. A. Neilan 2021 « A Pseudoalteromonas Clade with Remarkable Biosynthetic Potential », *Applied and Environmental Microbiology*. doi : 10.1128/AEM.02604-20.
- Chen, Y.-S., H.-C. Wu, C.-Y. Kuo, Y.-W. Chen, S. Ho & F. Yanagida 2018 « Leucocin C-607, a Novel Bacteriocin from the Multiple-Bacteriocin-Producing *Leuconostoc Pseudomesenteroides* 607 Isolated from Persimmon », *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 10.2 : 148-156. doi : 10.1007/s12602-017-9359-6.
- Chevreau, G., M. Dravecká, T. Batur, A. Guvenek, D. H. Ayhan, E. Toprak & T. Bollenbach 2015 « Quantifying the Determinants of Evolutionary Dynamics Leading to Drug Resistance », *PLoS Biology* 13.11 : e1002299. doi : 10.1371/journal.pbio.1002299.



Chin, C.-Y., K. A. Gregg, B. A. Napier, R. K. Ernst & D. S. Weiss 2015 « A PmrB-Regulated Deacetylase Required for Lipid A Modification and Polymyxin Resistance in *Acinetobacter Baumannii* », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59.12 : 7911-7914. doi : 10.1128/AAC.00515-15.

Cho, K. M., R. K. Math, S. Y. Hong, S. Md. Asraful Islam, D. K. Mandanna, J. J. Cho, M. G. Yun, J. M. Kim & H. D. Yun 2009 « Iturin Produced by *Bacillus Pumilus* HY1 from Korean Soybean Sauce (Kanjang) Inhibits Growth of Aflatoxin Producing Fungi », *Food Control* 20.4 : 402-406. doi : 10.1016/j.foodcont.2008.07.010.

CIDRAP 2021 « European Report Finds Declining Antibiotic Use in Food-Producing Animals », *CIDRAP*. [En ligne] : <https://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2021/06/european-report-finds-declining-antibiotic-use-food-producing-animals>.

Clausell, A., M. Garcia-Subirats, M. Pujol, M. A. Busquets, F. Rabanal & Y. Cajal 2007 « Gram-Negative Outer and Inner Membrane Models: Insertion of Cyclic Cationic Lipopeptides », *The Journal of Physical Chemistry. B* 111.3 : 551-563. doi : 10.1021/jp064757+.

Clugston, S. L., S. A. Sieber, M. A. Marahiel & C. T. Walsh 2003 « Chirality of Peptide Bond-Forming Condensation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases: The C5 Domain of Tyrocidine Synthetase Is a DCL Catalyst », *Biochemistry* 42.41 : 12095-12104. doi : 10.1021/bi035090+.

Conti, E. 1997 « Structural Basis for the Activation of Phenylalanine in the Non-Ribosomal Biosynthesis of Gramicidin S », *The EMBO Journal* 16.14 : 4174-4183. doi : 10.1093/emboj/16.14.4174.

Coquet, L., J. Kolodziejek, T. Jouenne, N. Nowotny, J. D. King & J. M. Conlon 2016 « Peptidomic Analysis of the Extensive Array of Host-Defense Peptides in Skin Secretions of the Dodecaploid Frog *Xenopus Ruwenzoriensis* (Pipidae) », *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics* 19 : 18-24. doi : 10.1016/j.cbd.2016.04.006.

Coyne, S., N. Rosenfeld, T. Lambert, P. Courvalin & B. Périchon 2010 « Overexpression of Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeFGH Confers Multidrug Resistance in

- Acinetobacter Baumannii* », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54.10 : 4389-4393. doi : 10.1128/AAC.00155-10.
- Cunliffe, R. N. & Y. R. Mahida 2004 « Expression and Regulation of Antimicrobial Peptides in the Gastrointestinal Tract », *Journal of Leukocyte Biology* 75.1 : 49-58. doi : 10.1189/jlb.0503249.
- Das, D., M. Jaiswal, F. N. Khan, S. Ahamad & S. Kumar 2020 « PlantPepDB: A Manually Curated Plant Peptide Database », *Scientific Reports* 10.1 : 2194. doi : 10.1038/s41598-020-59165-2.
- Das, P., S. Mukherjee & R. Sen 2008 « Antimicrobial Potential of a Lipopeptide Biosurfactant Derived from a Marine *Bacillus Circulans* », *Journal of Applied Microbiology* 104.6 : 1675-1684. doi : 10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x.
- Defer, D., F. Desriac, J. Henry, N. Bourgougnon, M. Baudy-Floc'h, B. Brillet, P. Le Chevalier & Y. Fleury 2013 « Antimicrobial Peptides in Oyster Hemolymph: The Bacterial Connection », *Fish & Shellfish Immunology* 34.6 : 1439-1447. doi : 10.1016/j.fsi.2013.03.357.
- Desriac, F., Y. Fleury, P. Le Chevalier, D. Destoumieux & M. Simon 2018 . [En ligne] : <https://patents.google.com/patent/US9956262B2/en>.
- Desriac, F., A. E. Harras, M. Simon, A. Bondon, B. Brillet, P. L. Chevalier, M. Pugnère, P. Got, D. Destoumieux-Garzón & Y. Fleury 2020 « Alterins Produced by Oyster-Associated Pseudoalteromonas Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity », *Mar. Drugs* : 17.
- Desriac, F., C. Jégou, E. Balnois, B. Brillet, P. Chevalier & Y. Fleury 2013 « Antimicrobial Peptides from Marine Proteobacteria », *Marine Drugs* 11.10 : 3632-3660. doi : 10.3390/md11103632.
- Desriac, F., P. Le Chevalier, B. Brillet, I. Leguerinel, B. Thuillier, C. Paillard & Y. Fleury 2014 « Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture », *FEMS Microbiology Letters* 350.1 : 107-116. doi : 10.1111/1574-6968.12308.

- Dey, G., R. Bharti, G. Dhanarajan, S. Das, K. K. Dey, B. N. P. Kumar, R. Sen & M. Mandal 2015 « Marine Lipopeptide Iturin A Inhibits Akt Mediated GSK3 $\beta$  and FoxO3a Signaling and Triggers Apoptosis in Breast Cancer », *Scientific Reports* 5.1 : 10316. doi : 10.1038/srep10316.
- Di Luca, M., G. Maccari, G. Maisetta & G. Batoni 2015 « BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides », *Biofouling* 31.2 : 193-199. doi : 10.1080/08927014.2015.1021340.
- Dorrestein, P. C., E. Yeh, S. Garneau-Tsodikova, N. L. Kelleher & C. T. Walsh 2005 « Dichlorination of a Pyrrolyl-S-Carrier Protein by FADH<sub>2</sub>-Dependent Halogenase PltA during Pyoluteorin Biosynthesis », *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.39 : 13843-13848. doi : 10.1073/pnas.0506964102.
- Ebrahimipour, G. H., Z. Khosravibabadi, H. Sadeghi & A. Aliahmadi 2014 « Isolation, Partial Purification and Characterization of an Antimicrobial Compound, Produced by *Bacillus Atrophaeus* », *Jundishapur Journal of Microbiology* 7.9. doi : 10.5812/jjm.11802.
- Epand, R. M. & R. F. Epand 2011 « Bacterial Membrane Lipids in the Action of Antimicrobial Agents », *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 17.5 : 298-305. doi : 10.1002/psc.1319.
- Falagas, M. E. & S. K. Kasiakou 2005 « Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections », *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 40.9 : 1333-1341. doi : 10.1086/429323.
- Fan, L., J. Sun, M. Zhou, J. Zhou, X. Lao, H. Zheng & H. Xu 2016 « DRAMP: A Comprehensive Data Repository of Antimicrobial Peptides », *Scientific Reports* 6 : 24482. doi : 10.1038/srep24482.
- FAO 2015 « Défi Faim Zéro – Unis pour un monde durable ». [En ligne] : <http://www.fao.org/un-expo/fr/theme.html>.
- 2019 *The State of the World's Aquatic Genetic Resources for Food and Agriculture*,.

- Fedorov, R., M. Böhl, G. Tsiavaliaris, F. K. Hartmann, M. H. Taft, P. Baruch, B. Brenner, R. Martin, H.-J. Knölker, H. O. Gutzeit & D. J. Manstein 2009 « The Mechanism of Pentabromopseudilin Inhibition of Myosin Motor Activity », *Nature Structural & Molecular Biology* 16.1 : 80-88. doi : 10.1038/nsmb.1542.
- Feldman, C. & R. Anderson 2020 « Recent Advances in the Epidemiology and Prevention of *Streptococcus Pneumoniae* Infections », *F1000Research* 9 : F1000 Faculty Rev-338. doi : 10.12688/f1000research.22341.1.
- Flissi, A., E. Ricart, C. Campart, M. Chevalier, Y. Dufresne, J. Michalik, P. Jacques, C. Flahaut, F. Lisacek, V. Leclère & M. Pupin 2020 « Norine: update of the nonribosomal peptide resource », *Nucleic Acids Research* 48.D1 : D465-D469. doi : 10.1093/nar/gkz1000.
- de la Fuente-Núñez, C., M. H. Cardoso, E. de Souza Cândido, O. L. Franco & R. E. W. Hancock 2016 « Synthetic Antibiofilm Peptides », *Biochimica et biophysica acta* 1858.5 : 1061-1069. doi : 10.1016/j.bbamem.2015.12.015.
- Fuller, R. 1989 « Probiotics in Man and Animals », *The Journal of Applied Bacteriology* 66.5 : 365-378.
- Galdiero, S., A. Falanga, M. Cantisani, R. Tarallo, M. Pepa & V. D’Orlando 2012 « Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins », *Current protein & peptide science* 13. doi : 10.2174/138920312804871120.
- Gallardo, A., M. Ugarte-Ruiz, M. Hernández, P. Miguela-Villoldo, D. Rodríguez-Lázaro, L. Domínguez & A. Quesada 2020 « Involvement of *Hpap2* and *DgkA* Genes in Colistin Resistance Mediated by Mcr Determinants », *Antibiotics* 9.9 : 531. doi : 10.3390/antibiotics9090531.
- Gao, P., D. Mao, Y. Luo, L. Wang, B. Xu & L. Xu 2012 « Occurrence of Sulfonamide and Tetracycline-Resistant Bacteria and Resistance Genes in Aquaculture Environment », *Water Research* 46.7 : 2355-2364. doi : 10.1016/j.watres.2012.02.004.
- Geudens, N. & J. C. Martins 2018 « Cyclic Lipodepsipeptides From *Pseudomonas* Spp. - Biological Swiss-Army Knives », *Frontiers in Microbiology* 9 : 1867. doi : 10.3389/fmicb.2018.01867.

- Gogoladze, G., M. Grigolava, B. Vishnepolsky, M. Chubinidze, P. Duroux, M.-P. Lefranc & M. Pirtskhalava 2014 « DBAASP: Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides », *FEMS microbiology letters* 357.1 : 63-68. doi : 10.1111/1574-6968.12489.
- González-Jaramillo, L. M., F. J. Aranda, J. A. Teruel, V. Villegas-Escobar & A. Ortiz 2017 « Antimycotic Activity of Fengycin C Biosurfactant and Its Interaction with Phosphatidylcholine Model Membranes », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 156 : 114-122. doi : 10.1016/j.colsurfb.2017.05.021.
- Griffin, J. H. & J. K. Judice 2002 . [En ligne] : <https://patents.google.com/patent/US6380356B1/en>.
- Gu, Y., Y.-N. Ma, J. Wang, Z. Xia & H.-L. Wei 2020 « Genomic Insights into a Plant Growth-Promoting *Pseudomonas Koreensis* Strain with Cyclic Lipopeptide-Mediated Antifungal Activity », *MicrobiologyOpen* 9.9 : e1092. doi : 10.1002/mbo3.1092.
- Gudiña, E. J., V. Rangarajan, R. Sen & L. R. Rodrigues 2013 « Potential Therapeutic Applications of Biosurfactants », *Trends in Pharmacological Sciences* 34.12 : 667-675. doi : 10.1016/j.tips.2013.10.002.
- Gupta, J., B. Es & S. Bhat 2018 « Modelling and Computational Sequence Analysis of a Bacteriocin Isolated from *Bacillus licheniformis* strain BTHT8 », *International Journal for Computational Biology* 7. doi : 10.34040/IJCB.7.1.2018.93.
- Guzmán-Rodríguez, J. J., A. Ochoa-Zarzosa, R. López-Gómez & J. E. López-Meza 2015 « Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents », *BioMed Research International* 2015 : 735087. doi : 10.1155/2015/735087.
- Hammi, I., F. Delalande, R. Belkhou, E. Marchioni, S. Cianferani & S. Ennahar 2016 « Maltaricin CPN, a New Class IIa Bacteriocin Produced by *Carnobacterium Maltaromaticum* CPN Isolated from Mould-Ripened Cheese », *Journal of Applied Microbiology* 121.5 : 1268-1274. doi : 10.1111/jam.13248.
- Han, Q., F. Wu, X. Wang, H. Qi, L. Shi, A. Ren, Q. Liu, M. Zhao & C. Tang 2015 « The Bacterial Lipopeptide Iturins Induce *Verticillium Dahliae* Cell Death by Affecting Fungal Signalling

Pathways and Mediate Plant Defence Responses Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity », *Environmental Microbiology* 17.4 : 1166-1188. doi : 10.1111/1462-2920.12538.

Hancock, R. E. 1997a « Antibacterial Peptides and the Outer Membranes of Gram-Negative Bacilli », *Journal of Medical Microbiology* 46.1 : 1-3. doi : 10.1099/00222615-46-1-1.

— 1997b « The Bacterial Outer Membrane as a Drug Barrier », *Trends in Microbiology* 5.1 : 37-42. doi : 10.1016/S0966-842X(97)81773-8.

— 1997c « Peptide Antibiotics », *Lancet (London, England)* 349.9049 : 418-422. doi : 10.1016/S0140-6736(97)80051-7.

— 2001 « Cationic Peptides: Effectors in Innate Immunity and Novel Antimicrobials », *The Lancet. Infectious Diseases* 1.3 : 156-164. doi : 10.1016/S1473-3099(01)00092-5.

Hancock, R. E. & R. Lehrer 1998 « Cationic Peptides: A New Source of Antibiotics », *Trends in Biotechnology* 16.2 : 82-88. doi : 10.1016/s0167-7799(97)01156-6.

Hancock, R. E. W. & D. S. Chapple 1999 « Peptide Antibiotics », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43.6. [En ligne] : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89271/> : 1317-1323.

Haney, E. F., S. C. Mansour & R. E. W. Hancock 2017 « Antimicrobial Peptides: An Introduction », *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1548 : 3-22. doi : 10.1007/978-1-4939-6737-7\_1.

Hashizume, H., S. Hirose, R. Sawa, Y. Muraoka, D. Ikeda, H. Naganawa & M. Igarashi 2004 « Tripropeptins, Novel Antimicrobial Agents Produced by *Lysobacter* Sp », *The Journal of Antibiotics* 57.1 : 52-58. doi : 10.7164/antibiotics.57.52.

Heidary, M., A. D. Khosravi, S. Khoshnood, M. J. Nasiri, S. Soleimani & M. Goudarzi 2018 « Daptomycin », *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73.1 : 1-11. doi : 10.1093/jac/dkx349.

- Henriksen, E. D., D. R. Phillips & J. B. D. Peterson 2007 « Polymyxin E Production by *P. Amylolyticus* », *Letters in Applied Microbiology* 45.5 : 491-496. doi : 10.1111/j.1472-765X.2007.02210.x.
- Hilchie, A. L., K. Wuerth & R. E. W. Hancock 2013 « Immune Modulation by Multifaceted Cationic Host Defense (Antimicrobial) Peptides », *Nature Chemical Biology* 9.12 : 761-768. doi : 10.1038/nchembio.1393.
- Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda & T. Ito 2001 « The Emergence and Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* », *Trends in Microbiology* 9.10 : 486-493. doi : 10.1016/S0966-842X(01)02175-8.
- Hirota-Takahata, Y., S. Kozuma, N. Kuraya, D. Fukuda, M. Nakajima, T. Takatsu & O. Ando 2017 « Ogipeptins, Novel Inhibitors of LPS: Physicochemical Properties and Structural Elucidation », *The Journal of Antibiotics* 70.1 : 84-89. doi : 10.1038/ja.2016.61.
- Ho, J., P. A. Tambyah & D. L. Paterson 2010 « Multiresistant Gram-Negative Infections: A Global Perspective », *Current Opinion in Infectious Diseases* 23.6 : 546-553. doi : 10.1097/QCO.0b013e32833f0d3e.
- Ho, S. W., D. Jung, J. R. Calhoun, J. D. Lear, M. Okon, W. R. P. Scott, R. E. W. Hancock & S. K. Straus 2008 « Effect of Divalent Cations on the Structure of the Antibiotic Daptomycin », *European biophysics journal: EBJ* 37.4 : 421-433. doi : 10.1007/s00249-007-0227-2.
- Ho, S.-T., Y.-N. Ho, C. Lin, W.-C. Hsu, H.-J. Lee, C.-C. Peng, H.-T. Cheng & Y.-L. Yang 2021 « Integrated Omics Strategy Reveals Cyclic Lipopeptides Empedopeptins from *Massilia* Sp. YMA4 and Their Biosynthetic Pathway », *Marine Drugs* 19.4 : 209. doi : 10.3390/md19040209.
- Hobbs, J. K., K. Miller, A. J. O'Neill & I. Chopra 2008 « Consequences of Daptomycin-Mediated Membrane Damage in *Staphylococcus Aureus* », *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62.5 : 1003-1008. doi : 10.1093/jac/dkn321.
- Hobson, C., A. N. Chan & G. D. Wright 2021 « The Antibiotic Resistome: A Guide for the Discovery of Natural Products as Antimicrobial Agents », *Chemical Reviews*. doi : 10.1021/acs.chemrev.0c01214.

- Hooper, G. J., J. Orjala, R. C. Schatzman & W. H. Gerwick 1998 « Carmabins A and B, New Lipopeptides from the Caribbean Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula* », *Journal of Natural Products* 61.4 : 529-533. doi : 10.1021/np970443p.
- Horne, W. S., C. M. Wiethoff, C. Cui, K. M. Wilcoxon, M. Amorin, M. R. Ghadiri & G. R. Nemerow 2005 « Antiviral Cyclic d,l- $\alpha$ -Peptides: Targeting a General Biochemical Pathway in Virus Infections », *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13.17 : 5145-5153. doi : 10.1016/j.bmc.2005.05.051.
- Hoskin, D. W. & A. Ramamoorthy 2008 « Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides », *Biochimica et biophysica acta* 1778.2 : 357-375. doi : 10.1016/j.bbamem.2007.11.008.
- Huang, E., Y. Guo & A. E. Yousef 2014 « Biosynthesis of the New Broad-Spectrum Lipopeptide Antibiotic Paenibacterin in *Paenibacillus Thiaminolyticus* OSY-SE », *Research in Microbiology* 165.3 : 243-251. doi : 10.1016/j.resmic.2014.02.002.
- Huang, X., Z. Lu, H. Zhao, X. Bie, F. Lü & S. Yang 2006 « Antiviral Activity of Antimicrobial Lipopeptide from *Bacillus Subtilis* Fmbj Against Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus, Newcastle Disease Virus and Infectious Bursal Disease Virus in Vitro », *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 12.4 : 373-377. doi : 10.1007/s10989-006-9041-4.
- Jeannot, K., A. Bolard & P. Plésiat 2017 « Resistance to Polymyxins in Gram-Negative Organisms », *International Journal of Antimicrobial Agents* 49.5 : 526-535. doi : 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029.
- Jenssen, H., P. Hamill & R. E. W. Hancock 2006 « Peptide Antimicrobial Agents », *Clinical Microbiology Reviews* 19.3 : 491-511. doi : 10.1128/CMR.00056-05.
- Jiang, H., X. Tang, Q. Zhou, J. Zou, P. Li, E. Breukink & Q. Gu 2018 « Plantaricin NC8 from *Lactobacillus Plantarum* Causes Cell Membrane Disruption to *Micrococcus Luteus* without Targeting Lipid II », *Applied Microbiology and Biotechnology* 102.17 : 7465-7473. doi : 10.1007/s00253-018-9182-3.



- Johnson, B. A., A. Hage, B. Kalveram, M. Mears, J. A. Plante, S. E. Rodriguez, Z. Ding, X. Luo, D. Bente, S. S. Bradrick, A. N. Freiberg, V. Popov, R. Rajsbaum, S. Rossi, W. K. Russell & V. D. Menachery 2019 « Peptidoglycan-Associated Cyclic Lipopeptide Disrupts Viral Infectivity », *Journal of Virology* 93.22 : e01282-19. doi : 10.1128/JVI.01282-19.
- de Jong, A., A. J. van Heel, J. Kok & O. P. Kuipers 2010 « BAGEL2: Mining for Bacteriocins in Genomic Data », *Nucleic Acids Research* 38.suppl\_2 : W647-W651. doi : 10.1093/nar/gkq365.
- Kadar, B., B. Kocsis, K. Nagy & D. Szabo 2013 « The Renaissance of Polymyxins », *Current Medicinal Chemistry* 20.30 : 3759-3773. doi : 10.2174/09298673113209990185.
- Kalaitzis, J. A., S. D. Ingre, R. Chau, Y. Simon & B. A. Neilan 2016 « Genome-Guided Discovery of Natural Products and Biosynthetic Pathways from Australia's Untapped Microbial Megadiversity », *Australian Journal of Chemistry* 69.2 : 129. doi : 10.1071/CH15601.
- Kanazawa, K., Y. Sato, K. Ohki, K. Okimura, Y. Uchida, M. Shindo & N. Sakura 2009 « Contribution of Each Amino Acid Residue in Polymyxin B3 to Antimicrobial and Lipopolysaccharide Binding Activity », *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57.3 : 240-244. doi : 10.1248/cpb.57.240.
- Kang, X., F. Dong, C. Shi, S. Liu, J. Sun, J. Chen, H. Li, H. Xu, X. Lao & H. Zheng 2019 « DRAMP 2.0, an Updated Data Repository of Antimicrobial Peptides », *Scientific Data* 6.1 : 148. doi : 10.1038/s41597-019-0154-y.
- Kanlayavattanakul, M. & N. Lourith 2010 « Lipopeptides in Cosmetics », *International Journal of Cosmetic Science* 32.1 : 1-8. doi : 10.1111/j.1468-2494.2009.00543.x.
- Katz, E. & A. L. Demain 1977 « The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. », *Bacteriological Reviews* 41.2. [En ligne] : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC414008/> : 449-474.
- Kim, K., S. Y. Jung, D. K. Lee, J.-K. Jung, J. K. Park, D. K. Kim & C.-H. Lee 1998 « Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, 11Surfactin Was Formerly Referred to as PI-003. a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A2 », *Biochemical Pharmacology* 55.7 : 975-985. doi : 10.1016/S0006-2952(97)00613-8.

- Kim, S., J. Y. Kim, S.-H. Kim, H. J. Bae, H. Yi, S. H. Yoon, B. S. Koo, M. Kwon, J. Y. Cho, C.-E. Lee & S. Hong 2007 « Surfactin from *Bacillus Subtilis* Displays Anti-Proliferative Effect via Apoptosis Induction, Cell Cycle Arrest and Survival Signaling Suppression », *FEBS Letters* 581.5 : 865-871. doi : 10.1016/j.febslet.2007.01.059.
- Kozuma, S., Y. Hirota-Takahata, D. Fukuda, N. Kuraya, M. Nakajima & O. Ando 2017 « Identification and Biological Activity of Ogipeptins, Novel LPS Inhibitors Produced by Marine Bacterium », *The Journal of Antibiotics* 70.1 : 79-83. doi : 10.1038/ja.2016.81.
- Kracht, M., H. Rokos, M. Ozel, M. Kowall, G. Pauli & J. Vater 1999 « Antiviral and Hemolytic Activities of Surfactin Isoforms and Their Methyl Ester Derivatives », *The Journal of Antibiotics* 52.7 : 613-619. doi : 10.7164/antibiotics.52.613.
- Kunfermann, A., M. Witschel, B. Illarionov, R. Martin, M. Rottmann, H. W. Höffken, M. Seet, W. Eisenreich, H.-J. Knölker, M. Fischer, A. Bacher, M. Groll & F. Diederich 2014 « Pseudilins: Halogenated, Allosteric Inhibitors of the Non-Mevalonate Pathway Enzyme IspD », *Angewandte Chemie International Edition* 53.8 : 2235-2239. doi : 10.1002/anie.201309557.
- Kuzma, M., A. Jegorov, P. Kacer & V. Havlíček 2001 « Sequencing of New Beauverolides by High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry », *Journal of mass spectrometry: JMS* 36.10 : 1108-1115. doi : 10.1002/jms.213.
- Lawen, A. & R. Zocher 1990 « Cyclosporin Synthetase. The Most Complex Peptide Synthesizing Multienzyme Polypeptide so Far Described. », *Journal of Biological Chemistry* 265.19 : 11355-11360. doi : 10.1016/S0021-9258(19)38600-4.
- Le, T. N., T. H. Do, T. N. Nguyen, N. T. Tran, S. O. Enfors & N. H. Truong 2014 « Expression and Simple Purification Strategy for the Generation of Antimicrobial Active Enterocin P from *Enterococcus Faecium* Expressed in *Escherichia Coli* ER2566 », *Iranian Journal of Biotechnology* 12.4 : 17-25. doi : 10.15171/ijb.1154.
- Li, J. & R. L. Nation 2006 « Old Polymyxins Are Back: Is Resistance Close? », *Clinical Infectious Diseases* 43.5 : 664-666. doi : 10.1086/506572.

- Li, J., X. Xu, C. Xu, W. Zhou, K. Zhang, H. Yu, Y. Zhang, Y. Zheng, H. H. Rees, R. Lai, D. Yang & J. Wu 2007 « Anti-Infection Peptidomics of Amphibian Skin », *Molecular & cellular proteomics: MCP* 6.5 : 882-894. doi : 10.1074/mcp.M600334-MCP200.
- Li, S., S. Chi, X. Cheng, C. Wu, Q. Xu, P. Qu, W. Gao & Y. Liu 2020 « Effects of Antimicrobial Peptides on the Growth Performance, Antioxidant and Intestinal Function in Juvenile Largemouth Bass, *Micropterus Salmoides* », *Aquaculture Reports* 16 : 100252. doi : 10.1016/j.aqrep.2019.100252.
- Li, Z. & T. Velkov 2019 « Polymyxins: Mode of Action », in J. Li, R. L. Nation & K. S. Kaye dir. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, Cham : Springer International Publishing (« Advances in Experimental Medicine and Biology ») : 37-54. doi : 10.1007/978-3-030-16373-0\_4.
- Lipmann, F., W. Gevers, H. Kleinkauf & R. Roskoski 1971 « Polypeptide Synthesis on Protein Templates: The Enzymatic Synthesis of Gramicidin S And Tyrocidine », in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Ltd : 1-34. doi : 10.1002/9780470122808.ch1.
- Liu, Y.-Y., Y. Wang, T. R. Walsh, L.-X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L.-F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J.-H. Liu & J. Shen 2016 « Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study », *The Lancet Infectious Diseases* 16.2 : 161-168. doi : 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Loho, T. & A. Dharmayanti 2015 « Colistin: An Antibiotic and Its Role in Multiresistant Gram-Negative Infections », *Acta Medica Indonesiana* 47.2 : 157-168.
- Luesch, H., W. Y. Yoshida, R. E. Moore & V. J. Paul 2000 « Apramides A-G, Novel Lipopeptides from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula* », *Journal of Natural Products* 63.8 : 1106-1112. doi : 10.1021/np000078t.
- Lulijwa, R., E. J. Rupia & A. C. Alfaro 2020 « Antibiotic Use in Aquaculture, Policies and Regulation, Health and Environmental Risks: A Review of the Top 15 Major Producers », *Reviews in Aquaculture* 12.2 : 640-663. doi : 10.1111/raq.12344.

- Maldonado-Barragán, A., B. Caballero-Guerrero, V. Martín, J. L. Ruiz-Barba & J. M. Rodríguez 2016 « Purification and Genetic Characterization of Gassericin E, a Novel Co-Culture Inducible Bacteriocin from *Lactobacillus Gasseri* EV1461 Isolated from the Vagina of a Healthy Woman », *BMC microbiology* 16 : 37. doi : 10.1186/s12866-016-0663-1.
- Mandal, S. M., A. E. A. D. Barbosa & O. L. Franco 2013 « Lipopeptides in Microbial Infection Control: Scope and Reality for Industry », *Biotechnology Advances* 31.2 : 338-345. doi : 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004.
- Mansour, S. C., O. M. Pena & R. E. W. Hancock 2014 « Host Defense Peptides: Front-Line Immunomodulators », *Trends in Immunology* 35.9 : 443-450. doi : 10.1016/j.it.2014.07.004.
- Marahiel, M. A. 2009 « Working Outside the Protein-Synthesis Rules: Insights into Non-Ribosomal Peptide Synthesis: INSIGHTS INTO NON-RIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHESIS », *Journal of Peptide Science* 15.12 : 799-807. doi : 10.1002/psc.1183.
- Martin, E., T. Ganz & R. I. Lehrer 1995 « Defensins and Other Endogenous Peptide Antibiotics of Vertebrates », *Journal of Leukocyte Biology* 58.2 : 128-136. doi : 10.1002/jlb.58.2.128.
- Martin, N. I., H. Hu, M. M. Moake, J. J. Churey, R. Whittal, R. W. Worobo & J. C. Vederas 2003 « Isolation, Structural Characterization, and Properties of Mattacin (Polymyxin M), a Cyclic Peptide Antibiotic Produced by *Paenibacillus Kobensis* M \* », *Journal of Biological Chemistry* 278.15 : 13124-13132. doi : 10.1074/jbc.M212364200.
- Martinez, J. S., J. N. Carter-Franklin, E. L. Mann, J. D. Martin, M. G. Haygood & A. Butler 2003 « Structure and Membrane Affinity of a Suite of Amphiphilic Siderophores Produced by a Marine Bacterium », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.7 : 3754-3759. doi : 10.1073/pnas.0637444100.
- Martis, N., S. Leroy & V. Blanc 2014 « Colistin in Multi-Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Blood-Stream Infections », *Journal of Infection* 69.1 : 1-12. doi : 10.1016/j.jinf.2014.03.001.

- Mattick, A. T. R. & A. Hirsch 1947 « Further Observations on an Inhibitory Substance (Nisin) from Lactic Streptococci », *Lancet (London, England)* 2.6462 : 5-8. doi : 10.1016/s0140-6736(47)90004-4.
- McPhee, J. B., M. Bains, G. Winsor, S. Lewenza, A. Kwasnicka, M. D. Brazas, F. S. L. Brinkman & R. E. W. Hancock 2006 « Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg<sup>2+</sup>-Induced Gene Regulation in *Pseudomonas Aeruginosa* », *Journal of Bacteriology* 188.11 : 3995-4006. doi : 10.1128/JB.00053-06.
- McQuade, T. J., A. D. Shallop, A. Sheoran, J. E. DelProposto, O. V. Tsodikov & S. Garneau-Tsodikova 2009 « A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis », *Analytical Biochemistry* 386.2 : 244-250. doi : 10.1016/j.ab.2008.12.014.
- Meena, K. R., A. Sharma & S. S. Kanwar 2020 « Antitumoral and Antimicrobial Activity of Surfactin Extracted from *Bacillus Subtilis* KLP2015 », *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26.1 : 423-433. doi : 10.1007/s10989-019-09848-w.
- Melo, F. M. P. de, M. F. Fiore, L. A. B. de Moraes, M. E. Silva-Stenico, S. Scramin, M. de A. Teixeira & I. S. de Melo 2009 « Antifungal Compound Produced by the Cassava Endophyte *Bacillus Pumilus* MA111M4a », *Scientia Agricola* 66 : 583-592. doi : 10.1590/S0103-90162009000500002.
- Michalopoulos, A. S. & D. C. Karatza 2010 « Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections: The Use of Colistin », *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8.9 : 1009-1017. doi : 10.1586/eri.10.88.
- Mills, S., C. Griffin, P. M. O'Connor, L. M. Serrano, W. C. Meijer, C. Hill & R. P. Ross 2017 « A Multibacteriocin Cheese Starter System, Comprising Nisin and Lacticin 3147 in *Lactococcus Lactis*, in Combination with Plantaricin from *Lactobacillus Plantarum* », *Applied and Environmental Microbiology* 83.14 : e00799-17. doi : 10.1128/AEM.00799-17.
- Miranda, C. D. & R. Zemelman 2002a « Antimicrobial Multiresistance in Bacteria Isolated from Freshwater Chilean Salmon Farms », *Science of The Total Environment* 293.1 : 207-218. doi : 10.1016/S0048-9697(02)00022-0.

— 2002b « Bacterial Resistance to Oxytetracycline in Chilean Salmon Farming », *Aquaculture* 212.1-4 : 31-47. doi : 10.1016/S0044-8486(02)00124-2.

Mnif, I. & D. Ghribi 2015 « Review Lipopeptides Biosurfactants: Mean Classes and New Insights for Industrial, Biomedical, and Environmental Applications », *Peptide Science* 104.3 : 129-147. doi : 10.1002/bip.22630.

Moffatt, J. H., M. Harper & J. D. Boyce 2019 « Mechanisms of Polymyxin Resistance », in J. Li, R. L. Nation & K. S. Kaye dir. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, Cham : Springer International Publishing (« Advances in Experimental Medicine and Biology ») : 55-71. doi : 10.1007/978-3-030-16373-0\_5.

Moffatt, J. H., M. Harper, P. Harrison, J. D. F. Hale, E. Vinogradov, T. Seemann, R. Henry, B. Crane, F. St Michael, A. D. Cox, B. Adler, R. L. Nation, J. Li & J. D. Boyce 2010 « Colistin Resistance in *Acinetobacter Baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54.12 : 4971-4977. doi : 10.1128/AAC.00834-10.

Mohammadipour, M., M. Mousivand, G. Salehi Jouzani & S. Abbasalizadeh 2009 « Molecular and Biochemical Characterization of Iranian Surfactin-Producing *Bacillus Subtilis* Isolates and Evaluation of Their Biocontrol Potential against *Aspergillus Flavus* and *Colletotrichum Gloeosporioides* », *Canadian Journal of Microbiology* 55.4 : 395-404. doi : 10.1139/w08-141.

Mootz, H. D., D. Schwarzer & M. A. Marahiel 2002 « *Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases A List of Abbreviations Can Be Found at the End of the Text.* » : 15.

Moran, M. A. 2015 « The Global Ocean Microbiome », *Science* 350.6266 : aac8455-aac8455. doi : 10.1126/science.aac8455.

Muhammad, S. A., A. Ali, A. Naz, A. Hassan, N. Riaz, S. Saeed-ul-Hassan, S. Andleeb & D. Barh 2016 « A New Broad-Spectrum Peptide Antibiotic Produced by *Bacillus Brevis* Strain MH9 Isolated from Margalla Hills of Islamabad, Pakistan », *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 22.2 : 271-279. doi : 10.1007/s10989-015-9508-2.

- Muraih, J. K., J. Harris, S. D. Taylor & M. Palmer 2012 « Characterization of Daptomycin Oligomerization with Perylene Excimer Fluorescence: Stoichiometric Binding of Phosphatidylglycerol Triggers Oligomer Formation », *Biochimica Et Biophysica Acta* 1818.3 : 673-678. doi : 10.1016/j.bbamem.2011.10.027.
- Murray, F. J. & P. A. Tetrault 1949 « Circulin, an Antibiotic from an Organism Resembling *Bacillus Circulans* », *Journal of Bacteriology* 57.3 : 305-312. doi : 10.1128/JB.57.3.305-312.1949.
- Naghmouchi, K., Y. Belguesmia, J. Baah, R. Teather & D. Drider 2011 « Antibacterial Activity of Class I and IIa Bacteriocins Combined with Polymyxin E against Resistant Variants of *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* », *Research in Microbiology* 162.2 : 99-107. doi : 10.1016/j.resmic.2010.09.014.
- Nakao, Y., W. Y. Yoshida, C. M. Szabo, B. J. Baker & P. J. Scheuer 1998 « More Peptides and Other Diverse Constituents of the Marine Mollusk *Philineopsis speciosa* », *The Journal of Organic Chemistry* 63.10 : 3272-3280. doi : 10.1021/jo9719867.
- Nitschke, M. & S. G. V. A. O. Costa 2007 « Biosurfactants in Food Industry », *Trends in Food Science & Technology* 18.5 : 252-259. doi : 10.1016/j.tifs.2007.01.002.
- Niu, B., J. Vater, C. Rueckert, J. Blom, M. Lehmann, J.-J. Ru, X.-H. Chen, Q. Wang & R. Borriss 2013 « Polymyxin P Is the Active Principle in Suppressing Phytopathogenic *Erwinia* Spp. by the Biocontrol Rhizobacterium *Paenibacillus Polymyxa* M-1 », *BMC Microbiology* 13.1 : 137. doi : 10.1186/1471-2180-13-137.
- Offret, C., F. Desriac, P. Le Chevalier, J. Mounier, C. Jégou & Y. Fleury 2016 « Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: chemodiversity and ecological significance », *Marine Drugs* 14.7. doi : 10.3390/md14070129.
- OMS 2017 « Cessons d'utiliser des antibiotiques chez des animaux en bonne santé ». [En ligne] : <https://www.who.int/fr/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>.

Ongena, M. & P. Jacques 2008 « Bacillus Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol », *Trends in Microbiology* 16.3 : 115-125. doi : 10.1016/j.tim.2007.12.009.

ONU 2019 « Deux milliards de personnes de plus sur la Terre en 2050, selon l'ONU | ONU DAES | Nations Unies Département des affaires économiques et sociales ». [En ligne] : <https://www.un.org/development/desa/fr/news/population/world-population-prospects-2019.html>.

— 2021 « Des dirigeants mondiaux et des experts appellent à réduire les antimicrobiens dans les systèmes alimentaires », *ONU Info*. [En ligne] : <https://news.un.org/fr/story/2021/08/1102352>.

Ordooei Javan, A., S. Shokouhi & Z. Sahraei 2015 « A Review on Colistin Nephrotoxicity », *European Journal of Clinical Pharmacology* 71.7 : 801-810. doi : 10.1007/s00228-015-1865-4.

Palmer, A. C. & R. Kishony 2014 « Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms », *Nature communications* 5 : 4296. doi : 10.1038/ncomms5296.

Pandiyam, P., D. Balaraman, R. Thirunavukkarasu, E. G. J. George, K. Subramaniyan, S. Manikkam & B. Sadayappan 2013 « Probiotics in Aquaculture », *Drug Invention Today* 5.1 : 55-59. doi : 10.1016/j.dit.2013.03.003.

Pantel, L., T. Florin, M. Dobosz-Bartoszek, E. Racine, M. Sarciaux, M. Serri, J. Houard, J.-M. Campagne, R. M. de Figueiredo, C. Midrier, S. Gaudriault, A. Givaudan, A. Lanois, S. Forst, A. Aumelas, C. Cotteaux-Lautard, J.-M. Bolla, C. Vingsbo Lundberg, D. L. Huseby, D. Hughes, P. Villain-Guillot, A. S. Mankin, Y. S. Polikanov & M. Gualtieri 2018 « Odilorhabdins, Antibacterial Agents That Cause Miscoding by Binding at a New Ribosomal Site », *Molecular Cell* 70.1 : 83-94.e7. doi : 10.1016/j.molcel.2018.03.001.

Park, S. Y., J.-H. Kim, Y. J. Lee, S. J. Lee & Y. Kim 2013 « Surfactin suppresses TPA-induced breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9 expression », *International Journal of Oncology* 42.1 : 287-296. doi : 10.3892/ijo.2012.1695.

Park, S.-Y., S.-K. Choi, J. Kim, T.-K. Oh & S.-H. Park 2012 « Efficient Production of Polymyxin in the Surrogate Host *Bacillus subtilis* by Introducing a Foreign *ectB* Gene and Disrupting the *abrB*



Gene », *Applied and Environmental Microbiology* 78.12 : 4194-4199. doi : 10.1128/AEM.07912-11.

Pathak, K. V. & H. Keharia 2014 « Identification of Surfactins and Iturins Produced by Potent Fungal Antagonist, *Bacillus Subtilis* K1 Isolated from Aerial Roots of Banyan (*Ficus Benghalensis*) Tree Using Mass Spectrometry », *3 Biotech* 4.3 : 283-295. doi : 10.1007/s13205-013-0151-3.

Perez, R. H., N. Ishibashi, T. Inoue, K. Himeno, Y. Masuda, N. Sawa, T. Zendo, P. Wilaipun, V. Leelawatcharamas, J. Nakayama & K. Sonomoto 2016 « Functional Analysis of Genes Involved in the Biosynthesis of Enterocin NKR-5-3B, a Novel Circular Bacteriocin », *Journal of Bacteriology* 198.2 : 291-300. doi : 10.1128/JB.00692-15.

Petersen, A., J. S. Andersen, T. Kaewmak, T. Somsiri & A. Dalsgaard 2002 « Impact of Integrated Fish Farming on Antimicrobial Resistance in a Pond Environment », *Applied and Environmental Microbiology* 68.12 : 6036-6042. doi : 10.1128/AEM.68.12.6036-6042.2002.

Piotto, S. P., L. Sessa, S. Concilio & P. Iannelli 2012 « YADAMP: Yet Another Database of Antimicrobial Peptides », *International Journal of Antimicrobial Agents* 39.4 : 346-351. doi : 10.1016/j.ijantimicag.2011.12.003.

Pirtskhalava, M., A. A. Amstrong, M. Grigolava, M. Chubinidze, E. Alimbarashvili, B. Vishnepolsky, A. Gabrielian, A. Rosenthal, D. E. Hurt & M. Tartakovsky 2021 « DBAASP v3: Database of Antimicrobial/Cytotoxic Activity and Structure of Peptides as a Resource for Development of New Therapeutics », *Nucleic Acids Research* 49.D1 : D288-D297. doi : 10.1093/nar/gkaa991.

Powers, J.-P. S. & R. E. W. Hancock 2003 « The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity », *Peptides* 24.11 : 1681-1691. doi : 10.1016/j.peptides.2003.08.023.

Prieto, C., C. García-Estrada, D. Lorenzana & J. F. Martín 2012 « NRPSsp: non-ribosomal peptide synthase substrate predictor », *Bioinformatics* 28.3 : 426-427. doi : 10.1093/bioinformatics/btr659.

- Qi, G., F. Zhu, P. Du, X. Yang, D. Qiu, Z. Yu, J. Chen & X. Zhao 2010 « Lipopeptide Induces Apoptosis in Fungal Cells by a Mitochondria-Dependent Pathway », *Peptides* 31.11 : 1978-1986. doi : 10.1016/j.peptides.2010.08.003.
- Raaijmakers, J. M., I. de Bruijn & M. J. D. de Kock 2006 « Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas* Spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation », *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 19.7 : 699-710. doi : 10.1094/MPMI-19-0699.
- Raetz, C. R. H., Z. Guan, B. O. Ingram, D. A. Six, F. Song, X. Wang & J. Zhao 2009 « Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story », *Journal of Lipid Research* 50.Suppl : S103-S108. doi : 10.1194/jlr.R800060-JLR200.
- Raja, A. & P. Gajalakshmi 2017 « Selective Isolation and Characterization of Rare Actinomycetes Adopted in Glacier Soil of Manali Ice Point and Its Activity against *Mycobacterium* Spp », *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 7.5 : 1. doi : 10.24896/jmbr.2017751.
- Rausch, C., I. Hoof, T. Weber, W. Wohlleben & D. H. Huson 2007 « Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution », *BMC Evolutionary Biology* 7 : 78. doi : 10.1186/1471-2148-7-78.
- Rausch, C., T. Weber, O. Kohlbacher, W. Wohlleben & D. H. Huson 2005 « Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs) », *Nucleic Acids Research* 33.18 : 5799-5808. doi : 10.1093/nar/gki885.
- Reimann, C., H. M. Patel, L. Serino, M. Barone, C. T. Walsh & D. Haas 2001 « Essential PchG-Dependent Reduction in Pyochelin Biosynthesis of *Pseudomonas Aeruginosa* », *Journal of Bacteriology* 183.3 : 813-820. doi : 10.1128/JB.183.3.813-820.2001.
- Reynolds, C. M., S. R. Kalb, R. J. Cotter & C. R. H. Raetz 2005 « A Phosphoethanolamine Transferase Specific for the Outer 3-Deoxy-D-Manno-Octulosonic Acid Residue of Escherichia Coli Lipopolysaccharide: IDENTIFICATION OF THE *EptB* GENE AND Ca<sup>2+</sup> HYPERSENSITIVITY OF AN *EptB* DELETION MUTANT\* », *Journal of Biological Chemistry* 280.22 : 21202-21211. doi : 10.1074/jbc.M500964200.

- Rhodes, G., G. Huys, J. Swings, P. McGann, M. Hiney, P. Smith & R. W. Pickup 2000 « Distribution of Oxytetracycline Resistance Plasmids between Aeromonads in Hospital and Aquaculture Environments: Implication of Tn1721 in Dissemination of the Tetracycline Resistance Determinant Tet A », *Applied and Environmental Microbiology* 66.9 : 3883-3890. doi : 10.1128/AEM.66.9.3883-3890.2000.
- Rico, A., T. M. Phu, K. Satapornvanit, J. Min, A. M. Shahabuddin, P. J. G. Henriksson, F. J. Murray, D. C. Little, A. Dalsgaard & P. J. Van den Brink 2013 « Use of Veterinary Medicines, Feed Additives and Probiotics in Four Major Internationally Traded Aquaculture Species Farmed in Asia », *Aquaculture* 412-413 : 231-243. doi : 10.1016/j.aquaculture.2013.07.028.
- Risse, D., H. Beiderbeck, K. Taraz, H. Budzikiewicz & D. Gustine 1998 « Corrugatin, a Lipopeptide Siderophore from *Pseudomonas Corrugata* », *Zeitschrift für Naturforschung C* 53.5-6 : 295-304. doi : 10.1515/znc-1998-5-601.
- Robens, J. F. & J. L. Richard 1992 « Aflatoxins in Animal and Human Health », in G. W. Ware dir. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, New York, NY : Springer US (« Reviews of Environmental Contamination and Toxicology ») : 69-94. doi : 10.1007/978-1-4613-9751-9\_3.
- Robinson, W. E., B. McDougall, D. Tran & M. E. Selsted 1998 « Anti-HIV-1 Activity of Indolicidin, an Antimicrobial Peptide from Neutrophils », *Journal of Leukocyte Biology* 63.1 : 94-100. doi : 10.1002/jlb.63.1.94.
- Rodrigues, L., I. M. Banat, J. Teixeira & R. Oliveira 2006 « Biosurfactants: Potential Applications in Medicine », *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57.4 : 609-618. doi : 10.1093/jac/dkl024.
- Romano, S., S. A. Jackson, S. Patry & A. D. W. Dobson 2018 « Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms », *Marine Drugs* 16.7 : E244. doi : 10.3390/md16070244.
- Röttig, M., M. H. Medema, K. Blin, T. Weber, C. Rausch & O. Kohlbacher 2011 « NRSPredictor2—a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity », *Nucleic Acids Research* 39.suppl\_2 : W362-W367. doi : 10.1093/nar/gkr323.

- Sapkota, A., A. R. Sapkota, M. Kucharski, J. Burke, S. McKenzie, P. Walker & R. Lawrence 2008 « Aquaculture Practices and Potential Human Health Risks: Current Knowledge and Future Priorities », *Environment International* 34.8 : 1215-1226. doi : 10.1016/j.envint.2008.04.009.
- Sarciaux, M., L. Pantel, C. Midrier, M. Serri, C. Gerber, R. Marcia de Figueiredo, J.-M. Campagne, P. Villain-Guillot, M. Gualtieri & E. Racine 2018 « Total Synthesis and Structure–Activity Relationships Study of Odilorhabdins, a New Class of Peptides Showing Potent Antibacterial Activity », *Journal of Medicinal Chemistry* 61.17 : 7814-7826. doi : 10.1021/acs.jmedchem.8b00790.
- Schneider, T. L., B. Shen & C. T. Walsh 2003 « Oxidase Domains in Epothilone and Bleomycin Biosynthesis: Thiazoline to Thiazole Oxidation during Chain Elongation », *Biochemistry* 42.32 : 9722-9730. doi : 10.1021/bi034792w.
- Schoenafinger, G., N. Schracke, U. Linne & M. A. Marahiel 2006 « Formylation Domain: An Essential Modifying Enzyme for the Nonribosomal Biosynthesis of Linear Gramicidin », *Journal of the American Chemical Society* 128.23 : 7406-7407. doi : 10.1021/ja0611240.
- Seebah, S., A. Suresh, S. Zhuo, Y. H. Choong, H. Chua, D. Chuon, R. Beuerman & C. Verma 2007 « Defensins Knowledgebase: A Manually Curated Database and Information Source Focused on the Defensins Family of Antimicrobial Peptides », *Nucleic Acids Research* 35.Database issue : D265-268. doi : 10.1093/nar/gkl866.
- Serrano, P. H. & F. and A. O. of the U. Nations 2005 *Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture*, Food & Agriculture Org.
- Shamsuzzaman, M. 2012 « *Aqua Chemicals in Shrimp Farm: A Study from South-West Coast of Bangladesh* » : 11.
- Sharma, G., S. Dang, S. Gupta & R. Gabrani 2018 « Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and the Mechanism of Action of Bacteriocin from *Bacillus Subtilis* GAS101 », *Medical Principles and Practice* 27.2 : 186-192. doi : 10.1159/000487306.

- Shoji, J., H. Hinoo, T. Katayama, Y. Nakagawa, Y. Ikenishi, K. Iwatani & T. Yoshida 1992 « Structures of New Peptide Antibiotics, Plusbacins A1-A4 and B1-B4 », *The Journal of Antibiotics* 45.6 : 824-831. doi : 10.7164/antibiotics.45.824.
- Siddiqui, Y. & A. Ali 2014 « Chapter 11 - *Colletotrichum Gloeosporioides* (Anthracnose) », in S. Bautista-Baños dir. *Postharvest Decay*, San Diego : Academic Press : 337-371. doi : 10.1016/B978-0-12-411552-1.00011-9.
- Sieber, S. A. & M. A. Marahiel 2005 « Molecular Mechanisms Underlying Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics », *Chemical Reviews* 105.2 : 715-738. doi : 10.1021/cr0301191.
- Singh, R., S. S. Miriyala, L. Giri, K. Mitra & V. V. Kareenhalli 2017 « Identification of Unstructured Model for Subtilin Production through *Bacillus Subtilis* Using Hybrid Genetic Algorithm », *Process Biochemistry* 60 : 1-12. doi : 10.1016/j.procbio.2017.06.005.
- Sitaram, N. & R. Nagaraj 1999 « Interaction of Antimicrobial Peptides with Biological and Model Membranes: Structural and Charge Requirements for Activity », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462.1 : 29-54. doi : 10.1016/S0005-2736(99)00199-6.
- Skalickova, S., Z. Heger, L. Krejcova, V. Pekarik, K. Bastl, J. Janda, F. Kostolansky, E. Vareckova, O. Zitka, V. Adam & R. Kizek 2015 « Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus », *Viruses* 7.10 : 5428-5442. doi : 10.3390/v7102883.
- Skinnider, M. A., C. A. Dejong, P. N. Rees, C. W. Johnston, H. Li, A. L. H. Webster, M. A. Wyatt & N. A. Magarvey 2015 « Genomes to Natural Products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM) », *Nucleic Acids Research* : gkv1012. doi : 10.1093/nar/gkv1012.
- Song, C., C. Zhang, L. Fan, L. Qiu, W. Wu, S. Meng, G. Hu, B. Kamira & J. Chen 2016 « Occurrence of Antibiotics and Their Impacts to Primary Productivity in Fishponds around Tai Lake, China », *Chemosphere* 161 : 127-135. doi : 10.1016/j.chemosphere.2016.07.009.
- Stachelhaus, T., H. D. Mootz & M. A. Marahiel 1999 « The Specificity-Confering Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases », *Chemistry & Biology* 6.8 : 493-505. doi : 10.1016/S1074-5521(99)80082-9.

- Stansly, P. G. & G. Brownlee 1949 « Nomenclature of Polymyxin Antibiotics », *Nature* 163.4146 : 611-611. doi : 10.1038/163611a0.
- Stein, T. 2005 « *Bacillus Subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses and Specific Functions », *Molecular Microbiology* 56.4 : 845-857. doi : 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- Su, Z., J. Jay Leitch, F. Abbasi, R. J. Faragher, A. L. Schwan & J. Lipkowski 2018 « EIS and PM-IRRAS Studies of Alamethicin Ion Channels in a Tethered Lipid Bilayer », *Journal of Electroanalytical Chemistry* 812 : 213-220. doi : 10.1016/j.jelechem.2017.12.039.
- Sun, E., C. R. Belanger, E. F. Haney & R. E. W. Hancock 2018 « 10 - Host Defense (Antimicrobial) Peptides », in S. Koutsopoulos dir. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, Woodhead Publishing : 253-285. doi : 10.1016/B978-0-08-100736-5.00010-7.
- Sunaga, S., H. Li, Y. Sato, Y. Nakagawa & T. Matsuyama 2004 « Identification and Characterization of the *PswP* Gene Required for the Parallel Production of Prodigiosin and Serrawettin W1 in *Serratia Marcescens* », *Microbiology and Immunology* 48.10 : 723-728. doi : 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03597.x.
- Tambadou, F., T. Caradec, A.-L. Gagez, A. Bonnet, V. Sopéna, N. Bridiau, V. Thiéry, S. Didelot, C. Barthélémy & R. Chevrot 2015 « Characterization of the Colistin (Polymyxin E1 and E2) Biosynthetic Gene Cluster », *Archives of Microbiology* 197.4 : 521-532. doi : 10.1007/s00203-015-1084-5.
- Tang, Q., X. Bie, Z. Lu, F. Lv, Y. Tao & X. Qu 2014 « Effects of Fengycin from *Bacillus Subtilis* FmbJ on Apoptosis and Necrosis in *Rhizopus Stolonifer* », *Journal of Microbiology* 52.8 : 675-680. doi : 10.1007/s12275-014-3605-3.
- Tedesco, K. L. & M. J. Rybak 2004 « Daptomycin », *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 24.1 : 41-57. doi : 10.1592/phco.24.1.41.34802.
- Tenover, F. C. 2006 « Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria », *The American Journal of Medicine* 119.6, Supplement 1 : S3-S10. doi : 10.1016/j.amjmed.2006.03.011.

- Thomas, S., S. Karnik, R. S. Barai, V. K. Jayaraman & S. Idicula-Thomas 2010 « CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides », *Nucleic Acids Research* 38.suppl\_1 : D774-D780. doi : 10.1093/nar/gkp1021.
- Thomas, S., N. D. Maynard & J. Gill 2015 « DNA Library Construction Using Gibson Assembly® », *Nature Methods* 12.11 : i-ii. doi : 10.1038/nmeth.f.384.
- Toprak, E., A. Veres, J.-B. Michel, R. Chait, D. L. Hartl & R. Kishony 2011 « Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug stress », *Nature genetics* 44.1 : 101-105. doi : 10.1038/ng.1034.
- Tran, T. T., J. M. Munita & C. A. Arias 2015 « Mechanisms of Drug Resistance: Daptomycin Resistance », *Annals of the New York Academy of Sciences* 1354 : 32-53. doi : 10.1111/nyas.12948.
- Tsuge, K., Y. Ohata & M. Shoda 2001 « Gene *yerP*, Involved in Surfactin Self-Resistance in *Bacillus subtilis* », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45.12 : 3566-3573. doi : 10.1128/AAC.45.12.3566-3573.2001.
- Tulini, F. L., C. T. Lohans, K. C. F. Bordon, J. Zheng, E. C. Arantes, J. C. Vederas & E. C. P. De Martinis 2014 « Purification and Characterization of Antimicrobial Peptides from Fish Isolate *Carnobacterium Maltaromaticum* C2: Carnobacteriocin X and Carnolysins A1 and A2 », *International Journal of Food Microbiology* 173 : 81-88. doi : 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.019.
- Turgay, K., M. Krause & M. A. Marahiel 1992 « Four Homologous Domains in the Primary Structure of GrsB Are Related to Domains in a Superfamily of Adenylate-Forming Enzymes », *Molecular Microbiology* 6.4 : 529-546. doi : 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01498.x.
- Vaara, M. 1991 « The Outer Membrane Permeability-Increasing Action of Linear Analogues of Polymyxin B Nonapeptide », *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 17.9 : 437-443.
- Vaara, M. & T. Vaara 1983 « Sensitization of Gram-Negative Bacteria to Antibiotics and Complement by a Nontoxic Oligopeptide », *Nature* 303.5917 : 526-528. doi : 10.1038/303526a0.

- Vanden Bergh, P. & J. Frey 2014 « *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system », *Microbial Biotechnology* 7.5 : 381-400. doi : 10.1111/1751-7915.12091.
- Vasquez, I., T. Cao, A. Hossain, K. Valderrama, H. Gnanagobal, M. Dang, R. H. J. Leeuwis, M. Ness, B. Campbell, R. Gendron, K. Kao, J. Westcott, A. K. Gamperl & J. Santander 2020 « *Aeromonas Salmonicida* Infection Kinetics and Protective Immune Response to Vaccination in Sablefish (*Anoplopoma Fimbria*) », *Fish & Shellfish Immunology* 104 : 557-566. doi : 10.1016/j.fsi.2020.06.005.
- Velkov, T., P. E. Thompson, R. L. Nation & J. Li 2010 « Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics », *Journal of Medicinal Chemistry* 53.5 : 1898-1916. doi : 10.1021/jm900999h.
- Venkateswerlu, G. 1981 « Antifungal Activity of Bacitracin and Its Interaction with Metals », *Journal of Biosciences* 3.1 : 1-5. doi : 10.1007/BF02703340.
- Venturina, D., L. Villegas, M. Perez & F. Elegado 2016 « Isolation and identification of subtilisin A-producing *Bacillus subtilis* from mongo sprouts, silage and soil samples in the Philippines », *Asia life sciences* 25 : 127-140.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete 2000 « Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture », *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 64.4 : 655-671. doi : 10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000.
- Volpon, L., F. Besson & J. M. Lancelin 2000 « NMR Structure of Antibiotics Plipastatins A and B from *Bacillus Subtilis* Inhibitors of Phospholipase A(2) », *FEBS letters* 485.1 : 76-80. doi : 10.1016/s0014-5793(00)02182-7.
- Waghu, F. H., L. Gopi, R. S. Barai, P. Ramteke, B. Nizami & S. Idicula-Thomas 2014 « CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides », *Nucleic Acids Research* 42.D1 : D1154-D1158. doi : 10.1093/nar/gkt1157.



- Wan, X., R. Li, P. E. J. Saris & T. M. Takala 2013 « Genetic Characterisation and Heterologous Expression of Leuocin C, a Class IIa Bacteriocin from *Leuconostoc Carnosum* 4010 », *Applied Microbiology and Biotechnology* 97.8 : 3509-3518. doi : 10.1007/s00253-012-4406-4.
- Wang, G. dir. 2017 *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*, Wallingford, Oxfordshire, UK Boston, Mass : CABI.
- Wang, G., X. Li & Z. Wang 2016 « APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education », *Nucleic Acids Research* 44.D1 : D1087-1093. doi : 10.1093/nar/gkv1278.
- Wang, Q., S. Chen, J. Zhang, M. Sun, Z. Liu & Z. Yu 2008 « Co-Producing Lipopeptides and Poly-Gamma-Glutamic Acid by Solid-State Fermentation of *Bacillus Subtilis* Using Soybean and Sweet Potato Residues and Its Biocontrol and Fertilizer Synergistic Effects », *Bioresource Technology* 99.8 : 3318-3323. doi : 10.1016/j.biortech.2007.05.052.
- Wang, Y., N. Shang, Y. Qin, Y. Zhang, J. Zhang & P. Li 2018 « The Complete Genome Sequence of *Lactobacillus Plantarum* LPL-1, a Novel Antibacterial Probiotic Producing Class IIa Bacteriocin », *Journal of Biotechnology* 266 : 84-88. doi : 10.1016/j.jbiotec.2017.12.006.
- Wang, Z. & G. Wang 2004 « APD: the Antimicrobial Peptide Database », *Nucleic Acids Research* 32.Database issue : D590-D592. doi : 10.1093/nar/gkh025.
- Weber, T. & M. A. Marahiel 2001 « Exploring the Domain Structure of Modular Nonribosomal Peptide Synthetases », *Structure* 9.1 : R3-R9. doi : 10.1016/S0969-2126(00)00560-8.
- Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore & F. C. Tenover 2003 « Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus Aureus* », *Science (New York, N.Y.)* 302.5650 : 1569-1571. doi : 10.1126/science.1090956.
- Weiser, J. N., D. M. Ferreira & J. C. Paton 2018 « *Streptococcus Pneumoniae*: Transmission, Colonization and Invasion », *Nature Reviews. Microbiology* 16.6 : 355-367. doi : 10.1038/s41579-018-0001-8.

- Yang, X., W.-H. Lee & Y. Zhang 2012 « Extremely Abundant Antimicrobial Peptides Existed in the Skins of Nine Kinds of Chinese Odorous Frogs », *Journal of Proteome Research* 11.1 : 306-319. doi : 10.1021/pr200782u.
- Yelin, I. & R. Kishony 2018 « Antibiotic Resistance », *Cell* 172.5 : 1136-1136.e1. doi : 10.1016/j.cell.2018.02.018.
- Zampieri, M., T. Enke, V. Chubukov, V. Ricci, L. Piddock & U. Sauer 2017 « Metabolic constraints on the evolution of antibiotic resistance », *Molecular Systems Biology* 13.3 : 917. doi : 10.15252/msb.20167028.
- Zhang, B., C. Dong, Q. Shang, Y. Han & P. Li 2013 « New Insights into Membrane-Active Action in Plasma Membrane of Fungal Hyphae by the Lipopeptide Antibiotic Bacillomycin L », *Biochimica Et Biophysica Acta* 1828.9 : 2230-2237. doi : 10.1016/j.bbamem.2013.05.033.
- Zhang, Y., C. Liu, B. Dong, X. Ma, L. Hou, X. Cao & C. Wang 2015 « Anti-Inflammatory Activity and Mechanism of Surfactin in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages », *Inflammation* 38.2 : 756-764. doi : 10.1007/s10753-014-9986-y.
- Zhao, H., D. Shao, C. Jiang, J. Shi, Q. Li, Q. Huang, M. S. R. Rajoka, H. Yang & M. Jin 2017 « Biological Activity of Lipopeptides from *Bacillus* », *Applied Microbiology and Biotechnology* 101.15 : 5951-5960. doi : 10.1007/s00253-017-8396-0.
- Zhao, N., Y. Pan, Z. Cheng & H. Liu 2016 « Lasso Peptide, a Highly Stable Structure and Designable Multifunctional Backbone », *Amino Acids* 48.6 : 1347-1356. doi : 10.1007/s00726-016-2228-x.
- Zhao, X., Y. Han, X. Tan, J. Wang & Z. Zhou 2014 « Optimization of Antifungal Lipopeptide Production from *Bacillus* Sp. BH072 by Response Surface Methodology », *Journal of Microbiology* 52.4 : 324-332. doi : 10.1007/s12275-014-3354-3.
- Zhao, X., H. Wu, H. Lu, G. Li & Q. Huang 2013 « LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides », *PloS One* 8.6 : e66557. doi : 10.1371/journal.pone.0066557.

- Zhao, Z., Q. Wang, K. Wang, K. Brian, C. Liu & Y. Gu 2010 « Study of the Antifungal Activity of *Bacillus Vallismortis* ZZ185 in Vitro and Identification of Its Antifungal Components », *Bioresource Technology* 101.1 : 292-297. doi : 10.1016/j.biortech.2009.07.071.
- Zhong, L., X. Diao, N. Zhang, F. Li, H. Zhou, H. Chen, X. Bai, X. Ren, Y. Zhang, D. Wu & X. Bian 2021 « Engineering and Elucidation of the Lipoinitiation Process in Nonribosomal Peptide Biosynthesis », *Nature Communications* 12.1 : 296. doi : 10.1038/s41467-020-20548-8.
- Zierep, P. F., A. T. Ceci, I. Dobrusin, S. C. Rockwell-Kollmann & S. Günther 2020 « SeMPI 2.0— A Web Server for PKS and NRPS Predictions Combined with Metabolite Screening in Natural Product Databases », *Metabolites* 11.1 : 13. doi : 10.3390/metabo11010013.
- Zweifel, U. L. & A. Hagstrom 1995 « Total Counts of Marine Bacteria Include a Large Fraction of Non-Nucleoid-Containing Bacteria (Ghosts) », *Applied and Environmental Microbiology* 61.6 : 2180-2185. doi : 10.1128/aem.61.6.2180-2185.1995.



---

## **Valorisation scientifique**

---



## Publications scientifiques

### ***Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harbored by the flat oyster *Ostrea edulis*.**

Hélène Cuny, Clément Offret, Amine M. Boukerb, Leila Parizadeh, Olivier Lesouhaitier, Patrick Le Chevalier, Camille Jégou, Alexis Bazire, Benjamin Brillet et Yannick Fleury

Article accepté le 13.09.2021 à l'International journal of systematic and evolutionary microbiology, DOI. 10.1099/ijsem.0.005070

### **Alterins, a new family of marine antibacterial cyclolipopeptides.**

Clément Offret, Hélène Cuny, Benjamin Brillet, Camille Jégou, Alexis Bazire, Romain Chevrot, Valérie Thiery, Pierre-Edouard Bodet et Yannick Fleury

Article soumis le 28.07.2021 à l'International journal of antimicrobial agents.

### **Genomic exploration of NRPS systems among the *Pseudoalteromonas* genus.**

Helena Cuny, Benjamin Brillet, Romain Chevrot, Alain Dufour, Alexis Bazire et Yannick Fleury

Article soumis le 01.10.2021 au journal Marine Drugs.

### **Alterins biosynthetic gene cluster identification from *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6: a genomic and transcriptomic study.**

Hélène Cuny, Benjamin Brillet, Erwan Corre, Brett Neilan, Alexis Bazire et Yannick Fleury

Article en préparation

## Communications orales en congrès scientifiques

### **Biosynthèse de cyclolipopeptides antibactériens de *Pseudoalteromonas* hCg-6.**

Hélène Cuny, Benjamin Brillet, Alexis Bazire et Yannick Fleury

*6<sup>e</sup> journées annuelles du GDR MuFoPAM, 17 et 18 Octobre 2019 à Besançon, communication orale.*

### **Microorganismes du monde marin.**

Hélène Cuny et Alexandra Guennec

*Nuit de la science de l'Université de Bretagne Sud, 8 Octobre 2019 à Lorient, atelier de vulgarisation scientifique.*

### **Chemodiversity and biosynthesis of Alterins: antibiotics peptides from *Pseudoalteromonas* marine bacteria.**

Hélène Cuny, Benjamin Brillet, Alexis Bazire et Yannick Fleury

*1<sup>ère</sup> session du webinaire International Electronic Conference, 14 Mai 2021 en ligne, communication orale.*

### **Chimiodiversité et biosynthèse des altérines : peptides marins antibiotiques produits par des bactéries du genre *Pseudoalteromonas*.**

Hélène Cuny, Clément Offret, Benjamin Brillet, Romain Chevrot, Alexis Bazire et Yannick Fleury

*Microbes 2021, 16<sup>e</sup> congrès national de la Société Française de Microbiologie, 24 Septembre 2021 à Nantes, communication orale.*



**Communications par affiches en congrès scientifiques**

**Biosynthèse de cyclolipopeptides antibactériens de *Pseudoalteromonas* hCg-6.**

Hélène Cuny, Benjamin Brillet, Alexis Bazire et Yannick Fleury

*5<sup>e</sup> journées annuelles du groupement de recherche MultiFonction des Peptides AntiMicrobiens (MuFoPAM), 11 et 12 Octobre 2018 à Paris, poster.*

**Etude génomique et transcriptomique de *Pseudoalteromonas* hCg-6, une bactérie marine productrice d'altérines antibiotiques.**

Hélène Cuny, Benjamin Brillet, Erwan Corre, Alexis Bazire et Yannick Fleury

*8<sup>e</sup> journées annuelles du groupement de recherche MultiFonction des Peptides AntiMicrobiens (MuFoPAM), 28 et 29 Octobre 2021 à Marseille, poster.*



---

# Annexes

---



Annexe 1. Table S1.1: Genome statistics of *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66<sup>T</sup>.

Attribute	Value
<b>Sequencing metrics</b>	
No. of total reads	2,656,022
Mean coverage (×)	123.9
<b>Accession no.</b>	
WGS GenBank	JAGPYN01
SRA	PRJNA718511
16S rRNA	MT271987
<b>Genomic data</b>	
Genome size (bp) <sup>a</sup>	4,643,030
G+C content (%) <sup>a</sup>	40.28
No. of chromosomes and plasmids <sup>a</sup>	0
No. of contigs <sup>a</sup>	101
N50 (bp) <sup>a</sup>	181,424
L50 (bp) <sup>a</sup>	10
No. of CDS <sup>b</sup>	4293
No. of tRNAs <sup>b</sup>	91
No. of rRNAs <sup>b</sup>	3
No. of RNAs <sup>b</sup>	121
CRISPR repeats <sup>c</sup>	5
Protein coding density (%) <sup>b</sup>	88.61

<sup>a</sup> Data from Quast v5.0.0 [15]

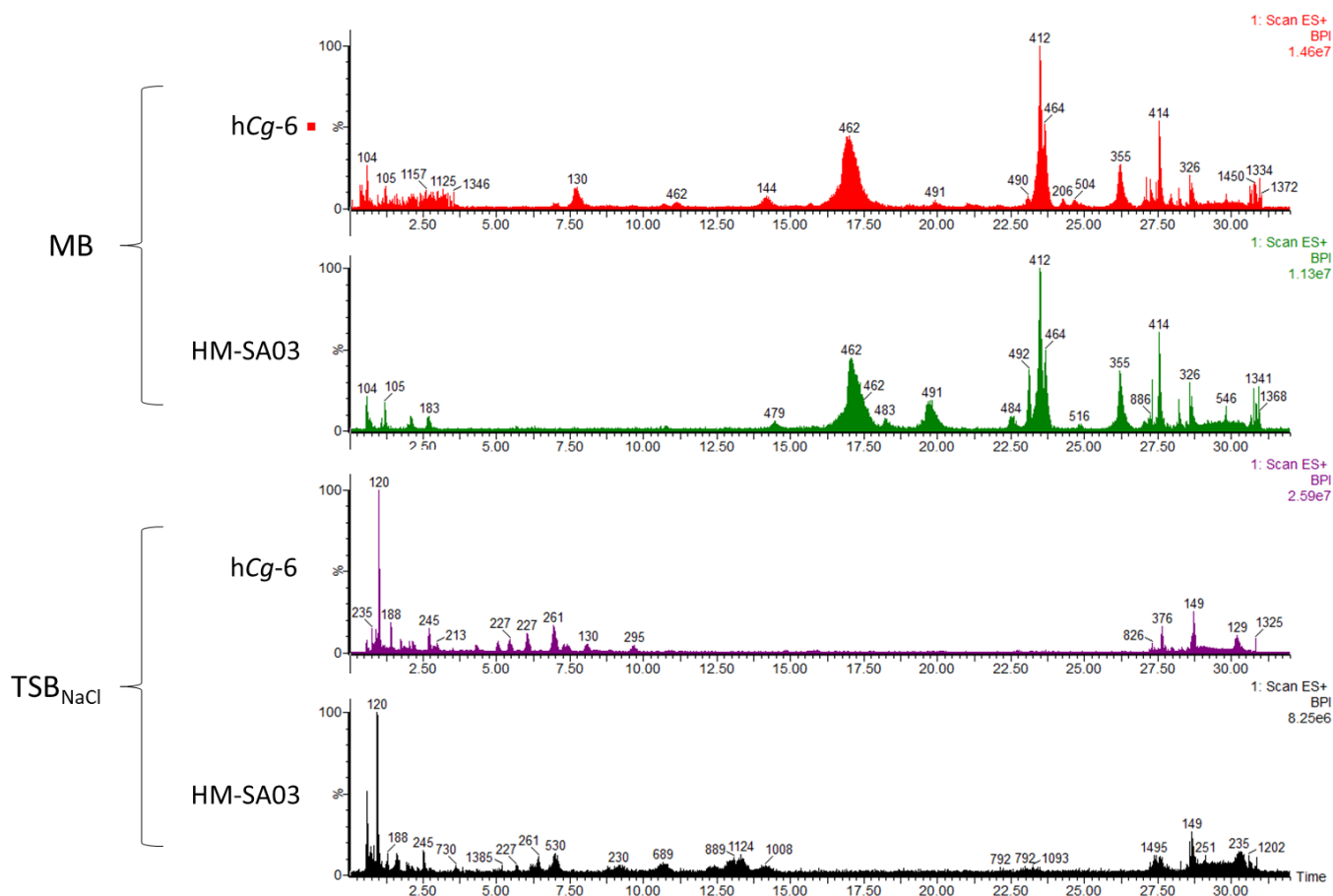
<sup>b</sup> Data from the Microscope platform v3.15.2 [20]

<sup>c</sup> Data from CRISPRCasFinder v4.2.19 [32]

Annexe 2. Table S1.2: Primer sequences ordered from Eurogentec. Primer for RT-qPCR designed for *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6.

Primer	Sequence (5' --> 3')
q_16S_F	ACTGAGACACGGCCCAGACT
q_16S_R	TGCAATATTCCCCACTGCTG
q_rpoB_F	CACGTAACACTACTATGGTCGCG
q_rpoB_R	TGGACCCTCAGGAGTCTCGAT
q_a2036_F	TGTTTACTTGCATGGGATACCG
q_a2036_R	TTCGTTTGTTCACTTGGAGCA
q_a2037_F	TGGATCTGATTGGCGACCTT
q_a2037_R	TGCATGACCACTCACACCATT
q_a2038_F	GGTACGGGTTTAGCGCGAAT
q_a2038_R	TCCTTGCTGCTGAGCAACGTG
q_a2039_F	CTTGCTTGGAAATGGGCTGA
q_a2039_R	TGGCCCGTAAGCATTGTATAAA
q_a2040_F	AATTGGCGGACACGCGTTA
q_a2040_R	GAGGCGATATGGTGCACAGTAA
q_a2041_F	CAAAGCGAGTACTTGCCACCA
q_a2041_R	GCCCCCTATTTTCTCCAAAT
q_a2042_F	TTAGTAGCGCATTCCCCAC
q_a2042_R	GTTGATTTGCTGTTTCCCAGC
q_a2043_F	TTGGTCTCGTTTTGCACAGTT
q_a2043_R	GCGTAACACTATTTTTCGCG
q_a2044_F	CCGGTTGCAAGTGAAGGTGA
q_a2044_R	TGAAATTGATCAGTGGTCGG
q_a2045_F	TGTTTGGTCACCGGGAGAAG
q_a2045_R	GCCAAGTTGTTGCCTCGAAA

Annexe 3. Figure S1: UPLC/MS chromatograms of *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 and *Pseudoalteromonas* sp. HM-SA03 with the same alterin production profile for both strains in MB.



**Titre :** Biosynthèse et régulation de l'expression des altérines, une famille de peptides antibiotiques produits par des bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas*

**Mots clés :** Altérines ; antibiotiques ; NRPS ; PAM ; *Pseudoalteromonas*

**Résumé :** L'exploration des propriétés antibactériennes du microbiote hémolympatique des animaux marins a conduit à l'isolement de différentes souches de *Pseudoalteromonas*. Deux d'entre elles, isolées de l'hémolymphe d'huître creuse et nommée hCg-6 et hCg-42, produisent une famille de peptides antibactériens nommés altérines. Les altérines sont composées d'un cycle heptapeptidique cationique contenant des résidus d'acides aminés exotiques, lié à une chaîne hydrocarbonée.

Dans le cadre de cette thèse, les travaux ont porté sur la caractérisation de la chimiodiversité des altérines et de leur mécanisme de biosynthèse.

Nous avons mené une étude par UPLC-MS de la structure des altérines produites par les souches hCg-6 et hCg-42 ainsi que par des souches isolées de l'hémolymphe d'huître plate, nommées hOe-66, hOe-124 et hOe-125. Cette étude a révélé que la famille des altérines est composée *a minima* de 37 isoformes présentant des modifications au niveau de certains résidus d'acides aminés ainsi que sur la chaîne hydrocarbonée. Nous avons entamé une analyse des

génomés des 5 souches qui a révélé que les souches *Pseudoalteromonas* hOe appartiennent à une nouvelle espèce de *Pseudoalteromonas*. Compte tenu de l'origine de ces bactéries, nous avons nommé cette nouvelle espèce *Pseudoalteromonas ostreae*.

Pour élucider les voies de biosynthèse et de régulation de l'expression des altérines nous avons combiné des analyses génomiques, transcriptomiques et culturomiques. La voie de biosynthèse des altérines est non ribosomale et implique un BGC de 30 kb contenant (i) 2 gènes codant des Non Ribosomal Peptide Synthétases (NRPS), (ii) des gènes environnants codant des enzymes de biosynthèse des monomères non proteogéniques et un transporteur de peptide cyclique et (iii) des gènes homologues à ceux décrits dans les mécanismes de résistance aux polymyxines. L'étude du transcriptome a révélé que la production d'altérines est dépendante de la disponibilité en résidus d'acides aminés originaux.

Ce travail de thèse ouvre des perspectives de recherches sur l'immunité des souches à leurs propres altérines.

**Title :** Biosynthesis and regulation of alterins expression, an antibiotic peptide family produced by marine *Pseudoalteromonas* bacteria

**Keywords :** Alterins ; antibiotics ; NRPS ; AMP ; *Pseudoalteromonas*

**Abstract :** The exploration of antibacterial properties from hemolymph of marins animals led to the isolation of several *Pseudoalteromonas* strains. Two of them were isolated from *Crassostrea gigas* hemolymph, called hCg-6 and hCg-42 and produce an antibacterial peptide family called alterins. These alterins are composed of a cationic heptapeptidic cycle with uncommon residues and a fatty acyl chain.

As part of this PhD, the work focused on alterins chemodiversity characterization and their biosynthesis mechanism.

We led a study through UPLC-MS method on alterins produced by the 2 strains hCg-6 and hCg-42 and also 3 other *Pseudoalteromonas* strains isolated from *Ostrea edulis* hemolymph, called hOe-66, hOe-124 and hOe-125. It revealed a family of at least 37 isoforms with modifications on specific residues and the fatty acyl chain. The genomic analysis of the 5 strains allowed the

identification of a new *Pseudoalteromonas* species for the 3 hOe strains, called *Pseudoalteromonas ostreae*.

In order to elucidate the alterins biosynthesis pathway et the regulation mechanisms, we combined genomic, transcriptomic and culturomic methods. The biosynthesis pathway of alterins is a non-ribosomal pathway and involve a 30 kb BGC composed of (i) 2 genes coding Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS), (ii) genes coding a peptide cyclic transporter and enzymes for the biosynthesis of non proteogenic residues and (iii) genes sharing homologies with genes involved in the polymyxins resistance. The transcriptomic study revealed that the alterin production depends on the availability of unusual residues.

This thesis opens research perspectives on strain immunity to their own alterins.