



HAL
open science

Production, purification et caractérisation de peptides antimicrobiens d'archées halophiles isolées de la saline de Sfax en Tunisie

Fadoua Ghanmi

► **To cite this version:**

Fadoua Ghanmi. Production, purification et caractérisation de peptides antimicrobiens d'archées halophiles isolées de la saline de Sfax en Tunisie. Biologie moléculaire. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS; Université de Sfax. Faculté des sciences, 2016. Français. NNT : 2016MNHN0016 . tel-01941704

HAL Id: tel-01941704

<https://theses.hal.science/tel-01941704>

Submitted on 2 Dec 2018

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.



**MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE
NATURELLE**

ECOLE DOCTORALE « SCIENCES DE LA NATURE
ET DE L'HOMME » (ED 227)



UNIVERSITE DE SFAX

FACULTE DES SCIENCES DE SFAX

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THÈSE

Préparée en co-tutelle

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Microbiologie, biologie moléculaire et biochimie

Présentée et soutenue publiquement par

Fadoua Ghanmi

Le 1^{er} Décembre 2016

**Production, purification et caractérisation de peptides
antimicrobiens d'archées halophiles isolées de
la saline de Sfax en Tunisie**

Sous la direction de : **Mr. Sami Maalej et Mme. Sylvie Rebuffat**

JURY :

Mr. Hamadi Boussetta
Mr. Hamadi Boussetta
Mr. Djamel Drider
Mr. Sami Maalej
Mme. Sylvie Rebuffat
Mme. Alyssa Carré-Mlouka
Mr. Hafedh Mejdoub
Mr. Jean Peduzzi

Professeur, ISA, Sousse
Professeur, ISA, Sousse
Professeur, UST, Lille
Professeur, FSS, Sfax
Professeur, MNHN, Paris
Maître de conférences, MNHN, Paris
Professeur, FSS, Sfax
Chargé de recherche, CNRS, Paris

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Directeur de thèse
Invité
Invité
Invité

Je dédie ce travail :

A ma chère mère, **Sabeh**

Pour l'amour et l'affection que vous m'avez prodigué,
pour les sacrifices consentis pour me permettre d'atteindre mon objectif.
Que vous trouverez dans ce travail l'expression
de ma reconnaissance, mon amour et mon respect.
Que Dieu vous accorde, santé, bonheur, et longue vie.

A ma chère sœur, **Chiraz** et mes chers frères, **Achraf** et **Rabie**

Que vous m'avez toujours apporté l'affection, l'encouragement et le soutien
moral
Que ce travail soit l'expression de mon grand amour et ma reconnaissance
Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A tous mes amis,

Que ce travail soit le témoignage des bons moments que nous avons passé
ensemble.
Que Dieu procure succès et bonheur.

A tous ceux qui me sont chers

Fadoua

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de thèse, **Pr. Sami Maalej**, à la faculté des sciences de Sfax, de m'avoir acceptée dans son laboratoire et donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse en-cotutelle entre l'unité Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques de la Faculté des Sciences de Sfax (UR11ES72) et l'unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245 CNRS-MNHN) du Muséum national d'Histoire naturelle à Paris. Je le remercie également pour son aide et sa confiance.

Je remercie chaleureusement, ma directrice de thèse, **Pr. Sylvie Rebuffat**, au Muséum National d'Histoire Naturelle, de m'avoir accueillie dans son équipe de recherche, pour l'intérêt constant qu'elle a porté à mon travail ainsi que pour le suivi et l'encadrement scientifique de ce travail. J'ai beaucoup apprécié ses qualités humaines et scientifiques. J'en profite aussi pour lui exprimer ma reconnaissance d'avoir accepté le prolongement de mes séjours et jusqu'à passer la plupart de mon travail de thèse dans son laboratoire. A travers ce travail je lui exprime mon plus grand respect et ma plus profonde gratitude pour sa confiance, sa gentillesse, ses encouragements, son soutien et ses conseils.

Je remercie particulièrement ma co-encadrante **Dr. Alyssa Carré-Mlouka**, avec laquelle j'ai partagé toutes ces années de thèse et qui m'a donné le courage et la patience pour arriver à ce stade et à réaliser ce travail, sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Je vous remercie pour votre aide et votre disponibilité, tout le temps que vous m'avez accordé pour les discussions et pour trouver des solutions et des idées, pour les explications et les réponses à mes questions. Je vous remercie pour les connaissances théoriques et pratiques que vous m'avez prodiguées. Je vous remercie sincèrement pour m'avoir appris à être autonome et une bonne étudiante. Je vous remercie également pour votre soutien, votre encouragement et votre attention constante à mon égard.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de travailler avec **Dr. Jean Peduzzi**, j'ai appris de lui les bonnes manières de travail avec ses remarques, ses conseils et ses directives, grâce à lui j'ai pu avancer et m'améliorer. Je vous remercie très sincèrement pour les corrections de mon manuscrit de thèse et tout le temps que vous m'avez consacré. Je vous remercie d'avoir veillé à la réalisation de ce travail. Je vous remercie pour votre soutien durant toute la période de la rédaction de ma thèse, pour votre gentillesse et votre attention. Vos qualités humaines et scientifiques ont largement contribué au bon déroulement de cette thèse. Vous trouvez ici l'expression de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent aussi au **Pr. Hafedh Majdoub**, de la faculté des sciences de Sfax, qui m'avez soutenu durant cette thèse, par l'accueille dans son laboratoire de biochimie, pour la purification et le séquençage d'Edman. Je vous remercie pour votre aide et vos conseils.

Mes remerciements sont également adressés à mon jury de thèse :

A monsieur le professeur **Hamadi Boussetta**, de l'institut Supérieur Agronomique de Cott-Marien, à Sousse.

A monsieur le professeur **Djamel Drider**, de l'université des Sciences et Technologies de Lille.

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de faire partie de mon jury de thèse. Vous trouvez ici l'expression de ma gratitude et mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier également **Dr. Zied Zarai**, qui m'a beaucoup aidé dans la partie de purification, par ses expériences pratiques et ses idées. Je le remercie infiniment pour sa disponibilité, son soutien et ses conseils.

Je remercie vivement les membres de mon comité de suivi de thèse durant deux ans, le professeur **Ali Ladram**, à l'UPMC et **Benjamin Marie**, chargé de recherche CNRS, au MNHN, leurs suggestions et leurs conseils m'ont permis de clarifier mes pensées à certaines idées.

Un grand merci au **Dr. Severine Zirah**, qui m'a aidé beaucoup dans la partie spectrométrie de masse, elle m'a toujours accueillie avec le sourire. Merci pour les analyses et les explications des principes de spectrométrie de masse. Je remercie aussi **Arul Marie**, pour son aide pour la réalisation des analyses par MALDI-TOF.

Je remercie également **Manon Vandervennet**, en bactériologie qui m'a aidé pour réaliser mes expériences dans les bonnes conditions, je la remercie aussi pour ces qualités humaines, ses conseils et sa gentillesse.

Je n'oublie évidemment pas de remercier **Carine Lombard**, **Christophe Goulard** et **Yanyan Li**, qui m'ont aidé pour la purification.

Une pensée particulière à mes amis et mes collègues de laboratoire, **Alison Besse**, **Jimmy Mevaere**, qui m'ont aidé et m'ont soutenu durant ces années de thèse.

J'exprime aussi ma reconnaissance aux membres de l'unité **MCAM**, plus particulièrement à **Michel Cheminant**, **Brice Molinelli**, **Nora Ouache**, **Christine Maulay-Bailly**, et **Cétaise Hyacinthe**, qui m'ont gentiment accepté parmi eux comme ma deuxième famille, m'en enrichie avec les discussions et les conseils. J'ai passé avec eu des bons moments au laboratoire, les fêtes de Noel et les fêtes de retraites...

Je remercie également mes collègues de laboratoires de microbiologie de la faculté des sciences de Sfax, **Donyez Frikha**, **Ines Boujelben**, **Hana Trigui**, **Salma Masmoudi** et **Bilel Bel Hassen**, pour leurs aides et leurs pensées.

Je remercie aussi les différents financeurs de ce travail, sans leurs aides ce travail n'aurait pu être mené à bien, le projet Utique CMCU, l'école doctorale de la faculté des sciences de Sfax, et le CNRS.

Je remercie le directeur de la société COTUSAL, **Ridha Amdouni**, qui m'a permis d'accéder à la saline de Sfax et l'aide de ses employés pour collecter mes échantillons.

Finalement, je remercie tous les gens qui m'ont souhaité la réussite et qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce joli travail.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Etude bibliographique	4
I. Environnements hypersalins.....	5
I.1 Environnements athalassohalins	6
I.2 Environnements thalassohalins.....	7
I.3 La saline de Sfax.....	8
II. Micro-organismes halophiles	10
II.1 Composition des communautés microbiennes	10
II. 2 Les communautés microbiennes dans la saline de Sfax.....	15
II. 3 Adaptation des procaryotes à la salinité	17
II.3.1 Accumulation de chlorure de potassium ou stratégie « Salt in ».....	17
II.3.2 Accumulation de solutés compatibles ou stratégie « Low salt in »	20
II.4 Réponse au stress oxydatif	22
II.5 Bactéries halophiles.....	25
II.6 Archées halophiles	27
III. Composés d'intérêts produits par les archées halophiles	35
III.1 Photorécepteurs	35
III.2 Exopolysacharides et polyhydroxyalkanoates	37
III.3 Enzymes hydrolytiques	38
III.4 Antioxydants	41
III. 5 Antimicrobiens.....	41
IV. Peptides antimicrobiens	42
IV.1 Peptides antimicrobiens des eucaryotes.....	43
IV.2 Peptides antimicrobiens des procaryotes	48
IV.2.1 Peptides antimicrobiens synthétisés par les bactéries ou bactériocines	48
IV.2.2 Peptides antimicrobiens synthétisés par les archées ou archaéocines	53
IV.2.2.1 <i>Découverte et identification des archaéocines</i>	53
IV.2.2.2 <i>Sulfolobicines</i>	53
IV.2.2.3 <i>Halocines</i>	55
a. Halocine S8/R1	56
b. Halocine C8/A4	58

c. Halocine H4/ H1	61
d. Halocine H6	63
e. Halocine Sech7a	63
f. Halocine HA1	64
<i>IV.2.2.3.1. Mécanismes d'action des halocines</i>	64
<i>IV.2.2.3.2 Rôle écologique des halocines</i>	66
<i>IV.2.2.3.3 Intérêts des halocines</i>	67
Matériels et méthodes	69
A. Matériels	70
I. Site d'échantillonnage : la saline de Sfax	70
II. Souches utilisées	71
II.1 Souches environnementales de procaryotes halophiles	71
II.2 Souches bactériennes non halophiles	72
II.3 Champignons halophiles	74
III. Milieux de culture	74
III.1 Milieux de culture liquide	74
III.2 Milieux de culture solide	76
B. Méthodes microbiologiques	77
I. Repiquage et mise en culture des souches	77
II. Tests d'activité antimicrobienne contre des souches de procaryotes halophiles, non halophiles et contre des champignons	77
III. Caractérisation des souches halophiles productrices d'agents antimicrobiens	79
IV. Etude de la stabilité de l'activité antimicrobienne des souches d'archées halophiles	80
IV.1 Dénaturation thermique	80
IV.2 Variation du pH	80
IV.3 Enzymes protéolytiques	81
V. Optimisation de la production des agents antimicrobiens	81
V.1 Effet de la nature de la source de carbone, d'azote et de certains éléments minéraux ..	81
V.2 Effet de la concentration en NaCl	82
V.3 Effet des conditions physicochimiques	82
<i>V.3.1 Effet de la température</i>	82
<i>V.3.2 Effet du pH</i>	82
<i>V.3.3 Effet de l'agitation</i>	83

VI. Effet de la phase de croissance.....	83
VII. Détection de la présence de virus	83
VII.1 En milieu liquide	83
VII.2 En milieu solide : test des plaques.....	84
C. Méthodes moléculaires.....	84
I. Extraction des acides nucléiques	84
II. Rétrotranscription.....	86
III. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaine.....	86
IV. Clonages des gènes	90
IV.1 Choix des vecteurs	91
IV.2 Digestion des vecteurs et des inserts	93
IV.3 Ligation.....	95
IV.4 Préparation des cellules compétentes	95
IV.5 Transformation	96
IV.6 Sélection des clones transformés	98
IV.7 Purification des plasmides recombinants.....	98
V. Séquençage des gènes	98
VI. Recherche bioinformatique et alignements multiples	99
VII. Analyses phylogénétiques.	99
D. Méthodes d'études des protéines, de purification et de caractérisation des halocines	
.....	100
I. Expression des protéines	100
I.1 Optimisation de l'expression des protéines chez <i>E. coli</i>	100
I.2 Optimisation de l'expression des protéines chez <i>Hfx. volcanii</i> H98	101
II. Extraction et dosages des protéines	102
III. Effet de différents composants sur l'activité antimicrobienne	103
III.1 Effet de détergents	103
III.2 Effet du NaCl	103
III.3 Effet des enzymes	103
III.4 Effet du seuil de filtration	104
IV. Techniques de chromatographie	104
IV.1 Préparation et traitement de l'échantillon.....	104
IV.2 Chromatographie	105
IV.2.1 Phase inverse SepPak® C18	105

IV.2.2 Phase inverse Octyle C8	105
IV.2.3 Phényle Sepharose	106
IV.2.4 Filtration sur gel	106
IV.2.5 Echangeuse d'anions MonoQ	107
IV.2.6 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse	107
V. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE.....	108
V.1 En condition dénaturante SDS-PAGE	108
V.2 En condition native	109
VI. Détection sur gel.....	109
VI.1 Coloration au bleu de Coomassie G250	109
VI.2 Coloration au bleu Safe	109
VI.3 Coloration au nitrate d'argent	110
VI.4 Gel overlay.....	110
VI.5 Test d'activité superoxide dismutase	110
VII. Analyse de la séquence en acides aminés	111
VII.1 Extraction des peptides à partir du gel	111
VII.1.1 Réduction et alkylation des ponts disulfures	112
VII.1.2 Digestion enzymatique.....	112
VII.1.3 Transfert des protéines sur des membranes en polyvinylidene difluorure (PVDF)	
.....	113
VII.2 Spectrométrie de masse	113
VII.2.1 MALDI-TOF	114
VII.2.2 LC MS-MS	114
VII.3 Séquençage des peptides par la dégradation d'Edman.....	115
Résultats	115
Chapitre I : Production des agents antimicrobiens par des souches de procaryotes halophiles.....	117
I. Criblage de souches de procaryotes halophiles productrices d'agents antimicrobiens	
.....	117
II. Caractérisation des souches productrices d'agents antimicrobiens.....	119
II.1 Caractérisation phylogénétique des souches halophiles.....	119
II.2. Relations phylogénétiques des souches d'archées	120
II.3 Caractérisation phénotypique et enzymatique des souches productrices.....	122

III. Caractérisation préliminaire des agents antimicrobiens	122
III.1. Localisation cellulaire de l'activité antimicrobienne chez les onze souches productrices.....	122
III.2. Nature de l'activité antimicrobienne.....	123
IV. Optimisation de la production des peptides antimicrobiens chez les souches ETD5, ETD8 et SS1R12	125
IV.1 Effet de la source de carbone.....	125
IV.2 Effet de la source d'azote.....	127
IV.3 Effet d'autres éléments nutritifs.....	129
IV.4 Effet de différentes concentrations en NaCl.....	130
IV.5 Effet des conditions physico-chimiques de culture	132
IV.5.1 Effet de la température	132
IV.5.2 Effet du pH.....	133
IV.5.3 Effet de l'agitation	135
V. Cinétiques de croissance et de production des agents antimicrobiens des souches ETD5, ETD8 et SS1R12.....	136
VI. Spectre d'activité des agents antimicrobiens synthétisés par <i>Halobacterium salinarum</i> ETD5.....	138
VII. Tests d'activité antimicrobienne due à des virus halophiles	139
Conclusions	141

Chapitre II : Identification et caractérisation des gènes codant des halocines produites par les archées halophiles *Halobacterium salinarum* ETD5 et ETD8, et *Haloterrigena thermotolerans* SS1R12

I. Identification des gènes codant les halocines.....	143
II. Détermination de la séquence nucléotidique et alignement multiple des séquences en acides aminés	144
III. Etude de la transcription des gènes <i>halS8</i> et <i>halH4</i> par RT-PCR	148
IV. Transposons ou séquences d'insertion	149
Conclusions	153

Chapitre III : Production, purification et caractérisation des peptides antimicrobiens produites par *Halobacterium salinarum* ETD5.....

I. Effet de différents facteurs sur l'activité antimicrobienne	154
---	------------

I.1. Détergents	154
I.2 Sels.....	155
I.3 Enzymes.....	156
I.4 Filtrations.....	157
II. Production par expression hétérologue de l’halocine S8.....	157
II.1 Chez <i>E. coli</i>	157
II.2 Chez <i>Hfx. volcanii</i>	162
III. Purification des peptides antimicrobiens à partir de la culture <i>Halobacterium salinarum</i> ETD5.....	166
III.1 Essais de purification	166
III.2 Protocole de purification.....	170
III.2.1 Chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose	171
III.2.2. Seconde étape de purification des agents antimicrobiens.....	174
a. CLHP sur colonne C4.....	174
b. Filtration sur gel sur colonne de Superose 6.....	175
c. Chromatographie d’échangeuse d’anions MonoQ	178
IV. Caractérisation structurale et fonctionnelle des peptides antimicrobiens	180
IV.1. Analyse de la séquence N-terminale par dégradation d’Edman	180
IV.2 Spectrométrie de masse	181
IV.2.1. MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF.....	181
IV.2.2. LC MS-MS.....	183
IV.3 Test d’activité SOD	184
Conclusions	186
Discussion générale et perspectives.....	190
Distribution et propriétés antagonistes des archées en milieux hypersalins.....	191
Influence des paramètres nutritionnels et environnementaux sur la production des agents antimicrobiens	195
Caractérisation de l’identité des séquences des gènes codant des halocines de différentes origines géographiques	197
Caractérisation d’halocines isolées de la saline de Sfax.....	199
Conclusion générale et perspectives	201
Résultats complémentaires	203

I. Quantification de l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens.....	204
II. Isolement et identification moléculaire de la communauté microbienne dominante dans la saline de Sfax	204
III. Test de l'activité antimicrobienne des échantillons prélevés dans la saline de Sfax	207
IV. Recherche du gène <i>halS8</i> dans l'ADN des échantillons environnementaux.....	208
Références Bibliographiques.....	
Annexe	

Liste des figures

Figure 1. Carte de distribution des environnements hypersalins : athalassohalins et thalassohalins, à travers le monde (Trigui 2011).	5
Figure 2. Exemple d'un environnement hypersalin athalassohalin : la Mer Morte (Oren 2015).	6
Figure 3. Exemple d'un environnement hypersalin thalassohalin : la saline d'Eilat en Israël (Oren 2015).	7
Figure 4. Carte de la localisation et de l'organisation de la saline de Sfax en Tunisie.	9
Figure 5. Arbre phylogénétique universel de la vie basé sur des études comparatives des séquences de la petite sous-unité ribosomale 16S et 18S, et distribution des micro-organismes halophiles dans les trois domaines du vivant (Oren 2008).	11
Figure 6. Profils taxonomiques de la communauté microbienne au sein de la saline de Santa Pola à Alicante en Espagne, en fonction de la salinité (Ventosa et al. 2014)	13
Figure 7. Transport des ions et des acides aminés chez les archées halophiles selon la stratégie « Salt in » (Oren 2006).	18
Figure 8. Structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase montrant la distribution en surface des acides aminés acides chez une archée halophile, <i>Haloarcula marismortui</i> (a) et chez une bactérie non halophile, <i>Lactobacillus pentosus</i> (b).	20
Figure 9. Schéma illustrant l'effet de la forte concentration saline sur la structure tridimensionnelle d'une protéine (Oren 2002c).	21
Figure 10. Exemples de solutés compatibles (Oren 2008).	22
Figure 11. Mécanisme de fonctionnement de la superoxyde dismutase (Fukai et Ushio-Fukai 2011).	24
Figure 12. Souches bactériennes halophiles extrêmes : <i>Salinibacter ruber</i> isolée de la saline d'Alicante en Espagne (Anton et al. 2002) et <i>Halovibrio denitrificans</i> isolée à partir d'un lac en Asie (Sorokin et al. 2006).	27
Figure 13. Diversité morphologique des archées halophiles extrêmes : <i>Halobacterium salinarum</i> de forme bacillaire et <i>Haloquadratum walsbyi</i> de forme carrée isolée à partir d'une sebkha dans le Sinaï en Egypte (Ventosa, 2006).	28
Figure 14. Structure tridimensionnelle de la protéine rétinale, bactériorhodopsine d'une souche d'archée halophile, <i>Halobacterium salinarum</i> (Kimura et al. 1997).	35
Figure 15. Structure des dicétopipérazines produites par l'archée halophile <i>Haloterrigena hispanica</i> (Charlesworth et Burno 2015).	42

Figure 16. Structures tridimensionnelles de peptides antimicrobiens d'eucaryotes. a : la magainine 2 isolée de la grenouille <i>Xenopus laevis</i> (Gesell et al. 1997), b : la drosomycine, défensine isolée de l'insecte <i>Drosophila melanogaster</i> (Yi et al. 2014) et c : l'histatine isolée de la salive humaine (Khurshid et al. 2016).....	46
Figure 17. Mécanisme d'action de l'histatine, peptide antimicrobien isolé à partir de la salive humaine, contre <i>Candida albicans</i> (Khurshid et al. 2016).	48
Figure 18. Mécanismes d'action des bactériocines contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Cotter et al. 2013).	52
Figure 19. Locus des gènes impliqués dans la biosynthèse des sulfolobocines des souches <i>Sulfolobus tokodaii</i> DSM16993 et <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM639 (Ellen et al. 2011, Besse et al. 2015).	54
Figure 20. Locus génétique de l'halocine S8 (Besse et al. 2015).....	57
Figure 21. Alignement des séquences en acides aminés des halocines S8 et R1 (Besse et al. 2015).....	58
Figure 22. Locus génétique de l'halocine C8 (Besse et al. 2015).	60
Figure 23. Alignement des séquences en acides aminés des halocines C8 et A4 (Besse et al. 2015).....	61
Figure 24. Locus génétique de l'halocine H4.....	62
Figure 25. Effet de l'halocine H6 sur la morphologie cellulaire d' <i>Halobacterium</i>	65
Figure 26. Images de microscopie électronique de cellules d' <i>Halorubrum saccharovororum</i> traitées avec l'halocine C8	66
Figure 27. Localisation de la saline de Sfax et des deux étangs d'échantillonnages TS18 et M1.	71
Figure 28. Schéma présentant les étapes des tests antimicrobiens effectués contre les souches de procaryotes halophiles par la méthode de diffusion en puits.	78
Figure 29. Schéma des deux hypothèses de la maturation protéolytique de l'halocine S8, (a) : hypothèse Price et Shand, 2000, (b) : notre hypothèse, 2016.	90
Figure 30. Carte du vecteur pGEM®-T.	92
Figure 31. Carte du vecteur pET28b.	93
Figure 32. Carte du vecteur navette pTA963	94
Figure 33. Arbre phylogénétique des souches isolées de la saline de Sfax basé sur la séquence nucléotidique du gène codant l'ARNr 16S.	121

Figure 34. Effet de la nature de la source de carbone sur l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition pour les souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et la souche <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.	127
Figure 35. Effet de différentes sources d'azote sur l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition pour les souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et la souche <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.	128
Figure 36. Effet de différents éléments nutritifs sur l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition pour les souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.	130
Figure 37. Effet de différentes concentrations en NaCl sur la croissance et l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition pour les souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.	132
Figure 38. Effet de la température sur la croissance et l'activité antimicrobienne pour les souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.....	133
Figure 39. Effet de la variation du pH sur la croissance et l'activité antimicrobienne pour les souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.....	134
Figure 40. Effet de l'agitation sur la croissance et l'activité antimicrobienne chez les souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.	136
Figure 41. Courbes de variation de la croissance des souches <i>Hbt. salinarum</i> ETD5, <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12 et de leur activité antimicrobienne dans le surnageant de culture en fonction du temps.	137
Figure 42. Cinétiques de croissance de trois souches cibles d'archées halophiles <i>Hrr. chaoviator</i> ETR14 (a), <i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17 (b) et <i>Hrr. chaoviator</i> ETD3 (c) en absence et en présence d'un fragment de gélose prélevé de la zone d'inhibition des souches productrices <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 (a), <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 (b) et <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12 (c).	140
Figure 43. Amplification des gènes codant les halocines avec des amorces spécifiques halS8 chez <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 et <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 et avec des amorces spécifique halH4 chez <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.	144
Figure 44. Alignements des séquences en acides aminés des précurseurs de l'halocine S8a : souche haloarchaeon non caractérisée S8a (Price et Shand 2000), <i>Halobacterium</i> sp. GN 101 (Besse et al 2015), <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 (cette étude) et <i>Hbt. salinarum</i> ETD8 (cette étude).	146

Figure 45. Alignements des séquences en acides aminés déduites du gène <i>halH4</i> de la souche <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12 (cette étude) et <i>Hfx. mediterranei</i> R4 (Cheung et al 1997).....	147
Figure 46. Analyse transcriptionnelle des gènes codant l’halocine S8 chez <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 et ETD8 et codant l’halocine H4 chez <i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12.	149
Figure 47. Amplification des gènes de la souche <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 avec des amorces spécifiques des IS.	150
Figure 48. Alignement nucléotidique de la séquence complète du gène codant le précurseur de l’halocine S8 de la souche <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 (cette étude), de la souche d’archée halophile non identifiée S8a (Price et Shand 2000) et <i>Halobacterium</i> sp. GN 101 (Besse et al 2015).....	152
Figure 49. Test antimicrobien contre la souche cible <i>Hrr. chaoviator</i> ETR14, après traitement protéolytique du surnageant de la culture productrice <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 par la thermolysine, l’endoprotéinase GluC et la chymotrypsine.	156
Figure 50. Schéma des deux hypothèses de la maturation protéolytique de l’halocine S8, (a) : Price et Shand, 2000, (b) : cette étude.	158
Figure 51. Expression de l’halocine S8 de 3,6 kDa chez <i>E. coli</i> BL21, analysée par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide.	160
Figure 52. Expression de l’halocine S8 de 3,6 kDa par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide chez <i>E. coli</i> Origami et <i>E. coli</i> Rosetta.	161
Figure 53. Expression de l’halocine S8 de 3,6 kDa chez <i>Hfx. volcanii</i> H98 par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide.....	164
Figure 54. Expression de l’halocine S8 de 8,6 kDa chez <i>Hfx. volcanii</i> H98 par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide.....	165
Figure 55. Profil de purification des agents antimicrobiens produits par la souche <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 par chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose.	169
Figure 56. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide Tris-tricine des fractions actives F9 et F10, purifiées sur la colonne de Phényle Sepharose.	169
Figure 57. Protocole adopté pour la purification des agents antimicrobiens produits par la souche <i>Hbt. salinarum</i> ETD5.....	170
Figure 58. Profil de FPLC montrant la purification des agents antimicrobiens d’ <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 par chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose.	171
Figure 59. Tests d’activité antimicrobienne contre la souche cible <i>Hrr. chaoviator</i> ETR14 des fractions éluées dans le pic P3 en sortie de la colonne de Phényle Sepharose.....	172

Figure 60. Résultat de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide Tris-tricine des fractions actives purifiées sur colonne de Phényle Sepharose, coloré au nitrate d'argent.....	173
Figure 61. Détection de l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens d' <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 par gel overlay.....	174
Figure 62. Profil de CLHP montrant la séparation des peptides antimicrobiens d' <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 sur une colonne C4.....	175
Figure 63. Profil de FPLC montrant la purification des agents antimicrobiens d' <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 par chromatographie de filtration sur gel sur une colonne de Superose™ 6.....	177
Figure 64. Gel d'électrophorèse Tris-tricine coloré au nitrate d'argent, des fractions actives après chromatographies sur colonne Superose 6.....	177
Figure 65. Chromatogramme FPLC montrant la purification des agents antimicrobiens d' <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 par chromatographie échangeuse d'anions MonoQ.....	178
Figure 66. Gel d'électrophorèse Tris-tricine coloré au nitrate d'argent, des fractions actives purifiées par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne MonoQ.....	179
Figure 67. Protocole de purification utilisé pour la séparation des deux peptides antimicrobiens de 8 et 14 kDa produits par la souche <i>Hbt. salinarum</i> ETD5.....	180
Figure 68. Localisation, dans la séquence du précurseur ProS8, de la séquence obtenue par dégradation d'Edman de la bande de 8 kDa.....	181
Figure 69. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de l'halocine S8 contenu dans les fractions actives issues de la colonne Phényle Sepharose.....	182
Figure 70. Caractérisation structurale de l'halocine S8 produite par <i>Hbt. salinarum</i> ETD5. Localisation dans la séquence du précurseur ProS8 des peptides obtenus par spectrométrie de masse LC MS-MS et par dégradation d'Edman.....	183
Figure 71. Caractérisation structurale de l'halocine S14 produite par <i>Hbt. salinarum</i> ETD5. Localisation dans la séquence de la superoxyde dismutase d' <i>Hbt. salinarum</i> NRC-1, des peptides identifiés par spectrométrie de masse LC MS-MS et par dégradation d'Edman.....	184
Figure 72. Révélation d'une activité superoxyde dismutase sur gel polyacrylamide.....	185
Figure 73. Activité antimicrobienne des échantillons des stations M1, TS18, AP17 et FC2 de la saline de Sfax, contre la souche cible <i>Hrr. chaoviator</i> ETR14.....	207
Figure 74. Amplification des gènes codant les halocines avec des amorces spécifiques de l'halocine S8 avec les ADN extraits des échantillons de quatre stations d'échantillonnage de la saline de Sfax, TS18, M1, AP17 et FC2.....	209

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification phylogénétique des archées halophiles sur la base des analyses de l'ARNr 16S et des séquences de protéines conservées (Gupta et al. 2015, 2016).....	29
Tableau 2. Origine, spectre d'activité et mode d'action de peptides antimicrobiens issus du clivage protéolytique de protéines des organismes supérieurs : l'hémoglobine, les histones et l'hémocyanine.	45
Tableau 3. Souches de procaryotes halophiles utilisées au cours de cette étude.	73
Tableau 4. Souches bactériennes non halophiles, origine et conditions de culture et leur utilisation.	74
Tableau 5. Composition des milieux de culture utilisés dans la présente étude.	75
Tableau 6. Produits ajoutés dans les milieux de cultures.	76
Tableau 7. Amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude, pour l'amplification des gènes codant l'ARNr 16S, les halocines C8, S8, H4 et R1 et les IS.	88
Tableau 8. Solutions pour la transformation chez <i>Hfx. volcanii</i> H98.	97
Tableau 9. Interactions antagonistes entre les isolats de micro-organismes halophiles.	118
Tableau 10. Souches halophiles identifiées et utilisées dans ce travail.	120
Tableau 11. Caractérisation phénotypique des 11 souches présentant une activité antimicrobienne.....	122
Tableau 12. Localisation de l'activité antimicrobienne chez les souches halophiles productrices.	123
Tableau 13. Effet de la chaleur et de la protéase halophile sur les halos d'inhibition induits sur les souches cibles par les isolats sélectionnés.	124
Tableau 14. Effet du pH sur l'activité antimicrobienne des 11 souches de procaryotes halophiles productrices d'agents antimicrobiens.	125
Tableau 15. Spectre d'activité du surnageant d' <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 contre des souches d'archées et bactéries halophiles et de bactéries non halophiles à Gram positif et à Gram négatif.....	139
Tableau 16. Effet des détergents sur l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens au niveau des surnageants de la souche <i>Hbt. salinarum</i> ETD5..	155
Tableau 17. Effet de différentes concentrations en NaCl sur l'activité des halocines dans le surnageant dialysé de la souche <i>Hbt. salinarum</i> ETD5	156

Tableau 18. Résultat de traitement du surnageant de culture <i>Hbt. salinarum</i> ETD5 contenant les peptides antimicrobiens, sur des membranes de filtration de différents seuils de coupure..	157
Tableau 19. Bilan récapitulatif des résultats d'expression hétérologue des différentes formes d'halocine S8 chez <i>Hfx. volcanii</i> H98 et <i>E. coli</i>	166
Tableau 20. Activité antimicrobienne des différentes fractions après purification par chromatographie du surnageant de culture d' <i>Hbt. salinarum</i> ETD5.	167
Tableau 21. Facteurs environnementaux déterminés des deux stations TS18, M1, AP17 et FC2 de la saline de Sfax.	205
Tableau 22. Souches halophiles identifiées, isolées à partir des bassins d'échantillonnages TS18 et M1 de la saline de Sfax.....	206

Liste des abréviations

ABC	ATP-Binding cassette
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AF	acide formique
Amp^R	résistance à l'ampicilline
ARN	acide ribonucléique
ARNr16S	acide ribonucléique de la petite sous unité ribosomale 16S
ARNm	acide ribonucléique messager
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adénosine triphosphate
atm	atmosphère
BSA	« Bovine serum albumine », Albumine de sérum bovin
cm	centimètre
CID	« Collision-induced dissociation », Dissociation induite par collision
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
CMF	cytométrie en flux
Cu/Zn-SOD	cuivre/zinc-suproxyde dismutase
Da	Dalton
DCP	dicétopipérazine
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DSMZ	Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturenGmbH Collection allemande de cultures cellulaires et de microorganismes
DTT	dithiothréitol
°C	degré Celsius
°E	Degré Est
<i>E. coli</i>	<i>Escherchia coli</i>
EDTA	éthylène diamine tétra-acétate
EPS	exopolysaccharides
ESI	« Electrospray ionization », Ionisation par électronébulisation
ERO	espèces réactives d'oxygène
FA	acide formique
Fe-SOD	fer-superoxyde dismutase
FISH	fluorescence in Situ Hybridation
g	gramme
g.L⁻¹	gramme par litre
h	Heure
ha	Hectare
HalC8	halocine C8
HalH4	halocine H4
HalS8	halocine S8
<i>Har.</i>	<i>Haloarcula</i>
<i>Hbt.</i>	<i>Halobacterium</i>
<i>Hfx.</i>	<i>Haloferax</i>

Hqr.	<i>Haloquadratum</i>
Hrr.	<i>Halorubrum</i>
Htg.	<i>Haloterrigena</i>
HCCA	acide α -cyano-4-hydrocinamique
HNA	« high nucleic acid content », haute teneur en acides nucléiques
IPTG	isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside
IS	« insertion sequences », séquences d'insertion
JCM	Japan Collection of Microorganisms
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KCl	chlorure de potassium
L	litre
LB	Luria Gertani
LCP	collection de souches fongiques du MNHN
LNA	« low nucleic acid content », faible teneur en acides nucléiques
MNHN	Muséum national d'Histoire naturelle
mm	millimètre
mL	millilitre
mM	millimolaire
mPa	mégapascal
μ	vitesse spécifique de croissance
μm	micromètre
μL	microlitre
M	molaire
MALDI	« matrix assisted laser desorption ionisation », désorption-ionisation par impact laser assistée par matrice
Mb	mégabase
min	minute
Mn-SOD	manganèse-superoxyde dismutase
MS	« mass spectrometry », spectrométrie de masse
NaCl	chlorure de sodium
Nab.	<i>Natrialba</i>
NBT	nitro-bleu de tétrazolium
Nnm.	<i>Natrinema</i>
Nmn.	<i>Natronomonas</i>
nm	nanomètre
NCBI	National Center for Biotechnology Information
°N	Degré Nord
PAM	peptide antimicrobien
pb	paire de base
PCR	polymerase chain reaction, réaction en chaîne par polymérase
PEG	polyéthylène glycol
pH	potentiel hydrogène
PMF	force protomotrice
PHA	polyhydroxyalcanoate
pI	point isoélectrique
p/v	poids par volume
PVDF	difluorure de polyvinylidène

q-PCR	PCR quantitative ou en temps réel
RMN	résonance magnétique nucléaire
rpm	rotation par minute
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SOD	superoxyde dismutase
TAE	tris acétate EDTA
TOF	« time of flight », temps de vol
TFA	acide trifluoro acétique
SW	« sea water », eau de mer
UA	unité arbitraire
UA.mL⁻¹	unité arbitraire par millilitre
UV	ultraviolet
v/v	volume par volume

La vie microbienne est omniprésente sur terre depuis les calottes polaires jusqu'aux sources hydrothermales sous-marines, à l'intérieur de la croûte terrestre, dans les déserts, dans les eaux hypersalines ou les eaux profondes. Ces environnements longtemps considérés comme hostiles à la vie à cause de conditions physicochimiques extrêmes comme la température, la pression, le pH ou la salinité, sont souvent colonisés par une remarquable diversité de micro-organismes qualifiés d'extrêmophiles. Notre étude s'est focalisée sur les milieux hypersalins caractérisés par une salinité pouvant atteindre jusqu'à 390 g.L⁻¹. Ces milieux extrêmes sont colonisés par de nombreux micro-organismes procaryotes, issus de deux domaines du vivant, bactéries et archées, ayant développé des mécanismes adaptatifs leur permettant de surmonter les conditions hostiles à la vie. Parmi les milieux hypersalins, les marais salants, encore appelés salines sont constitués par des bassins d'évaporation contenant de l'eau de salinité croissante jusqu'aux tables de cristallisation dans lesquelles est récolté le sel. Les salines sont caractérisées par une coloration rouge-orangé, correspondant aux pigments de caroténoïdes dus aux proliférations de micro-organismes.

Le domaine des *Archaea* constitue la troisième lignée évolutive, avec les domaines des *Bacteria* et des *Eukarya*, définis par Carl Woese dans les années 70 sur la base des gènes codants les ARNr de la petite sous-unité ribosomale (Woese et Fox, 1977). Les archées sont beaucoup moins connues et moins caractérisées que les bactéries, bien qu'elles aient développé des mécanismes leur permettant d'occuper une très grande place dans de nombreux écosystèmes, et tout particulièrement dans les environnements extrêmes. Cette particularité rend leur étude stratégique pour mieux comprendre l'adaptation au sens large du terme et isoler des souches productrices de nouvelles biomolécules pouvant présenter un intérêt biotechnologique. Dans les milieux hypersalins et en particulier dans les tables salantes des salines, les archées halophiles extrêmes dominent pour atteindre 85 à 90% de la masse cellulaire totale (Ghai et al 2011, Boujelben et al. 2012, 2014, Ventosa et al. 2014). Ces archées halophiles appartenant à la classe des *Halobacteria* et aux ordres des *Halobacteriales*, *Haloferacales*, et *Natrialbales* (Gupta 2015), ont besoin pour leur croissance de concentrations comprises entre 90 et 300 g.L⁻¹ en NaCl (Oren, 2006). Ces archées halophiles extrêmes ont développé des mécanismes efficaces pour se multiplier en présence de telles concentrations en sel et dominer les bactéries. Cependant, très peu d'information est disponible sur les mécanismes qui permettent aux archées halophiles de dominer leurs compétiteurs pour atteindre des densités cellulaires largement supérieures à celles des autres populations microbiennes. Si on sait aujourd'hui que la prédation, en absence de prédateurs

capables de supporter des concentrations en sel aussi importantes (Colangelo-Lillis et al. 2016), et la lyse virale ne sont pas les facteurs principaux (Bettarel et al. 2010, Colangelo-Lillis et al. 2016), dans le contrôle de ces populations, la production de substances antimicrobiennes, particulièrement de nature peptidique, capables d'inactiver les populations microbiennes concurrentes pourrait être l'un des facteurs capables de conférer un avantage sélectif aux archées halophiles dans ces environnements hostiles.

En effet, *les peptides antimicrobiens* sont des effecteurs de l'immunité innée ou des compétitions, universellement produits par les trois domaines du vivant. Si chez les bactéries et les eucaryotes, ces molécules de nature protéique/peptidique, sont bien connues et largement étudiées en ce qui concerne leurs structures et leurs propriétés antimicrobiennes, il n'en est pas de même chez les archées. A ce jour, seulement une dizaine d'agents antimicrobiens de nature protéique ou peptidique nommés *halocines* ont été décrits de manière préliminaire, chez les archées halophiles (Besse et al. 2015). En particulier, la séquence en acides aminés n'est connue que pour trois d'entre elles (halocine C8, H4, S8) et le mécanisme d'action impliquant un transporteur membranaire n'a été élucidé que pour une seule, l'halocine H6 (Torreblanca et al. 1989). Les halocines de petite masse moléculaire sont très stables et résistent aux conditions extrêmes (salinité, température, pH) (Shand et Leyva. 2007, Pašić et al. 2008). La capacité des archées halophiles productrices d'halocines à s'adapter à des conditions extrêmes et la stabilité de leurs peptides antimicrobiens aux variations de pH, de salinité, ou d'autres facteurs environnementaux, suscitent également un fort potentiel (O'Connor et Shand. 2002, Shand et Leyva, 2007). Les halocines pourraient, en particulier être utilisées dans l'industrie alimentaire comme agents de conservation, dans l'industrie de tannage pour préserver la qualité des peaux et du cuir, ou encore impliquées dans l'industrie pharmaceutique pour la conception ou la production de nouveaux produits naturels antimicrobiens stables vis-à-vis du pH et de la température. La recherche de nouvelles halocines en tant qu'agents antimicrobiens naturels est donc très intéressante. Il est également important d'optimiser les conditions d'expression et de purification des halocines pour obtenir des quantités suffisantes permettant d'étudier de façon approfondie ces peptides antimicrobiens, leurs structures, leurs mécanismes d'action et leur rôle dans les écosystèmes où se développent les souches d'archées productrices, ce qui permettra aussi une meilleure compréhension de la vie et des interactions microbiennes dans les milieux hypersalins.

De nombreuses questions restent aujourd'hui posées par la communauté scientifique étudiant les halocines et leurs intérêts biotechnologiques :

- Quelle est la proportion des souches productrices et quels sont les paramètres nutritionnels et environnementaux qui contrôlent cette production ?

- La densité cellulaire a-t-elle une influence sur la production d'halocines ?

- Quels sont les mécanismes de contrôle de la synthèse des halocines (intervention de protéases clivant un précurseur) ?

- Quel est le spectre d'activité de ces halocines ?

- Les halocines présentent-elles une spécificité inter-domaines avec les bactéries ?

- Y a-t-il une diversité structurale et fonctionnelle d'une même halocine en fonction du genre ou en fonction de l'espèce dans des biotopes séparés géographiquement ?

Les réponses à ces questions passent par l'étude de la diversité structurale et fonctionnelle de nouvelles halocines produites par des souches d'archées halophiles isolées de différents sites. C'est ce que nous aborderons dans cette thèse qui s'est déroulée en cotutelle entre « l'unité Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques (UR11ES/72) » de l'université de Sfax en Tunisie et « l'équipe Molécules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens (MDCEM) de l'Unité MCAM (UMR 7245) » du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, qui dispose d'un savoir-faire et d'une longue expertise dans la purification et la caractérisation des peptides antimicrobiens. Durant ces travaux, nous nous sommes intéressés à la production, la purification et la caractérisation génétique et fonctionnelle de nouvelles halocines produites par des souches d'archées halophiles isolées de la saline de Sfax en Tunisie, dans le but d'accroître les connaissances sur la diversité des peptides antimicrobiens et sur le rôle des halocines dans la dominance des archées halophiles dans les milieux hypersalins.

La première partie de ma thèse consiste en une étude bibliographique portant sur les milieux hypersalins et les micro-organismes rencontrés dans ces milieux extrêmes, ainsi qu'une présentation de la diversité, des activités et de l'intérêt des peptides antimicrobiens.

Après une description des protocoles expérimentaux utilisés (matériels et méthodes), les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse seront présentés dans les chapitres I à III.

Le premier chapitre est consacré au criblage de l'activité antagoniste d'une collection locale de 35 souches isolées à partir de différents bassins de la saline de Sfax. Les résultats ont permis de sélectionner trois souches, nommées ETD5, ETD8 et SSR12 productrices de peptides antimicrobiens. Après la caractérisation morphologique, physiologique et moléculaire de ces souches productrices, les conditions optimales pour la production des peptides antimicrobiens ont été déterminées.

Le deuxième chapitre décrit l'identification et la caractérisation moléculaire des gènes des halocines produites par les trois souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12. La majorité des expériences menées ont été réalisées à l'unité MCAM du MNHN, qui possède une expertise dans le domaine et dans laquelle j'ai pu effectuer de nombreux stages dans le cadre d'un projet PHC-Utique. Ainsi, des amplifications par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes d'halocines connues, *halC8*, *halS8* et *halH4*, ont été menées et les produits ont été séquencés et comparés avec les séquences de la base de données GenBank. Les résultats obtenus lors de ces deux chapitres ont fait l'objet d'une publication intitulée " Antagonistic interactions and production of halocin antimicrobial peptides among extremely halophilic prokaryotes isolated from the solar saltern of Sfax, Tunisia " parue dans la revue *Extremophiles* en 2016. Cela a également permis une contribution dans une seconde publication intitulée " Characterization of halo-alkaline and thermostable protease from *Halorubrum ezzemoulense* strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia " parue en 2016 dans *Journal of Basic Microbiology*.

Le troisième chapitre s'intéresse à la production à grande échelle, la purification et la caractérisation des peptides antimicrobiens produits par la souche *Hbt. salinarum* ETD5. Les outils et méthodes mis en place à l'unité MCAM ont permis de purifier deux halocines : l'halocine S8 qui a été séquencée par le séquenceur d'Edman de la faculté des Sciences de Sfax, et caractérisée par LC/MS-MS au Muséum national d'Histoire naturelle, et une nouvelle halocine nommée S14 qui pourrait dériver d'un clivage protéolytique de la superoxyde dismutase d'*Hbt. salinarum*. Il s'agirait du premier exemple chez les archées d'une activité antimicrobienne obtenue après clivage d'une protéine possédant une autre fonction. En ce qui concerne l'halocine S8, nous avons montré que chez la souche d'*Hbt. salinarum* ETD5, la maturation du précurseur ne subissait pas de clivage dans sa région C-terminale. L'halocine S8 de 81 résidus, isolée lors de cette étude, diffère donc de celle précédemment décrite par Price et Shand (2000). Ces résultats feront l'objet d'une publication intitulée " Purification and structural characterization of two halocins produced by *Halobacterium salinarum* ETD5 isolated from a hypersaline environment" à soumettre dans la revue *Biochimie*.

Enfin, l'ensemble des différents résultats sera discuté pour conduire à une conclusion générale et aux perspectives envisagées.

Etude bibliographique

I. Environnements hypersalins

Les environnements hypersalins, naturels ou artificiels, sont définis comme étant des milieux où la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer généralement comprise entre 30 et 35 g.L⁻¹ en moyenne (Oren 1999, DasSarma et DasSarma, 2015). Ces milieux se retrouvent partout à travers le monde, sur tous les continents, en Antarctique et sous les latitudes tropicales ou subtropicales des climats arides ou semi-arides (Litchfield et Gillevet 2002, Laybourn-Parry et Pearce 2007, Oren 2015) (Figure 1). Les milieux hypersalins sont divisés en deux catégories selon leur composition chimique et leur mode de genèse : les environnements athalassohalins et les environnements thalassohalins.

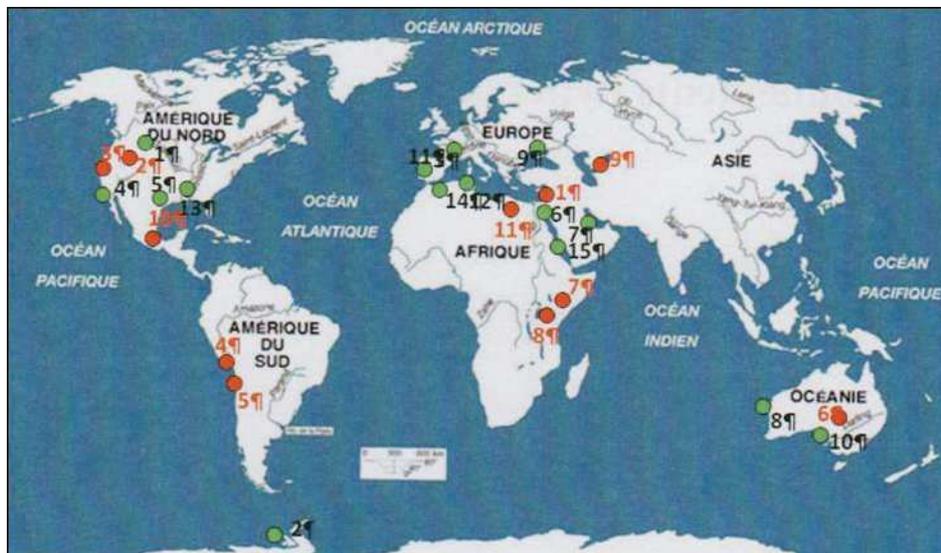


Figure 1. Carte de distribution des environnements hypersalins : athalassohalins et thalassohalins, à travers le monde (Trigui 2011).

● Milieux athalassohalins : (1) Mer Morte (entre Israël, la Jordanie et la Palestine), (2) Vallée de la Mort (Californie, USA), (3) Lac Mono, lac Searles, lac Big Soda (Ouest des USA) (4) Salar Uyuni (Bolivie), (5) Salar Atacama (Chili), (6) Lac Eyre (Australie), (7) Lac Magadi (Kenya), (8) Lac Natron (Tanzanie), (9) Mer Caspienne (Asie occidentale et Russie) (10) LacTexcococo (Mexique), et (11) Wadi Natrun (Egypte).

● Milieux thalassohalins : (1) Grand Lac Salé (Utah, USA), (2) Lac Vanda (Antarctique), (3) Salines de Salin-de-Giraud (France), (4) Lagune de Ojo de Liebre (Mexique), (5) Lagune de Madre (Texas, USA), (6) Lac Solaire, Gavish Sabkha Ras Mohammad (Egypte), (7) Golfe Persique (Iran), (8) Baie Shark (Australie), (9) Mer d'Azov (Ukraine), (10) Golfe Spencer, (Australie), (11) Vallée Alto Vinalopo (Espagne), (12) Saline de Sfax, saline de Monastir, sebkha Chott el-Jérid, (Tunisie), (13) Bassin Orca (Golfe du Mexique), (14) Sebkha d'Ezzemoul, (Algérie) et (15) Mer Rouge (Entre l'Afrique et le Moyen-Orient).

I.1 Environnements athalassohalins

Les environnements athalassohalins sont formés par l'évaporation des eaux de ruissellement des formations géologiques et/ou le lessivage des roches. Cette évaporation, généralement complète, est à l'origine des formations de dépôts de sels qui constituent à travers le temps des évaporites. La dissolution de ces dépôts fossiles par l'eau de pluie ou les eaux de ruissellement aboutit à la formation de milieux athalassohalins, c'est-à-dire dont les compositions en sels sont différentes de celle de l'eau de mer (Oren 2002d, Oren 1994). C'est le cas, par exemple des lacs alcalins qui sont caractérisés par l'absence de cations bivalents, Ca^{2+} et Mg^{2+} mais contiennent de fortes concentrations en ions CO_3^{2-} et HCO_3^- (Oren 2002d). Ces milieux hypersalins regroupent les lacs salins comme le lac Eyre en Australie, des lacs très alcalins comme le lac Magadi au Kenya, et les lacs Mono et Owens aux Etats-Unis et la Mer Morte localisée entre Israël, la Jordanie et la Palestine (Figure 2) (Oren 2015). A titre d'exemple, la concentration en sels dans la Mer Morte est dix fois supérieure à celle de l'eau de mer et caractérisée par un pH acide compris entre 5,8 et 6 (Oren 2006, Bodaker et al. 2010, Oren 2010). Les eaux de la Mer Morte sont riches en cations divalents tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} et pauvres en cations monovalents tels que Na^+ et K^+ (Oren 2002b, Oren 2006, 2010). Les ions Cl^- et Br^- sont les plus abondants, par contre les ions SO_4^{2-} sont présents en faible concentration (Oren 2002b, c 2006, 2010).



Figure 2. Exemple d'un environnement hypersalin athalassohalin : la Mer Morte (Oren 2015).

I.2 Environnements thalassohalins

Les environnements thalassohalins ont pour origine l'eau de mer, ils sont caractérisés par des concentrations en sels similaires ou supérieures à celle de l'eau de mer, avec une dominance des ions Na^{2+} et Cl^- et un pH neutre à légèrement alcalin (Oren 2006). La composition ionique de ces milieux hypersalins varie selon la nature du milieu et surtout selon la quantité des sels qu'elle contient. L'eau de mer complètement évaporée au cours du temps est à l'origine de la formation de dépôts de sels appelés évaporites. Des changements peuvent survenir dans la composition ionique de l'eau, expliqués par la précipitation de certains sels qui forment des dépôts de calcite (CaCO_3), suivis par des dépôts de gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), d'halite (NaCl), de sylvite (KCl), et en dernier de carnallite ($\text{KMgCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Litchfield et Gillevet 2002, Grant 2004, Gerday et Glansdorff 2007). Ces environnements présentent souvent une coloration rouge car ils abritent un grand nombre de micro-organismes pigmentés (Oren 2002d). A titre d'exemple on peut citer parmi ces environnements les milieux naturels : les sebkhas, comme la sebkha de Chott el-Jérid en Tunisie, la sebkha d'Ezzemoul en Algérie, les lagunes côtières, comme la lagune de Madre Texas, et la lagune d'Ojo de Liebre au Mexique, les bassins sous-marins profonds comme le bassin Orca dans le golfe du Mexique et les lacs hypersalins comme le lac Vanda en Antarctique et le Grand Lac Salé d'Utah à l'Ouest des Etats-Unis. D'autres milieux artificiels sont construits par l'Homme pour l'exploitation commerciale du sel : les marais salants, encore nommés salines ou salins selon les pays ou les régions (Figure 3). Ces marais salants sont constitués par une série de bassins alimentés directement par l'eau de mer, qui est progressivement concentrée jusqu'à précipitation du NaCl . Le sel est ensuite récolté et commercialement exploité. Parmi les salines les plus étudiées, on trouve la saline de Costa Blanca en Espagne, la saline de San Francisco aux USA et la saline de Sfax en Tunisie.



Figure 3. Exemple d'un environnement hypersalin thalassohalin : la saline d'Eilat en Israël (Oren 2015).

I.3 La saline de Sfax

La saline de Sfax, qui est le site d'étude de ce travail de thèse, est un milieu hypersalin thalassohalin, localisé dans la zone centrale de la côte Est de Tunisie (Figure 4). Elle est bordée par la Mer Méditerranée à l'Est, qui est la source d'alimentation des bassins en eaux marines. Les marais salants de la saline de Sfax s'étendent sur une superficie totale de cristallisation du sel de 1500 hectares, la superficie évaporatoire est de l'ordre de 1350 hectares, dont environ 10% sont réservés aux tables salantes. Cet environnement hypersalin est caractérisé par un climat aride et un déficit hydrique important, ce qui fait que l'évaporation est plus élevée que la précipitation (Ayadi et al. 2002, Elloumi et al. 2009, Trigui et al. 2011a). La saline de Sfax est le deuxième site d'exploitation du sel en Tunisie, géré par la société COTUSAL (Compagnie Tunisienne des Salines). Elle génère selon les conditions météorologiques environ 350 000 tonnes de sel par an (Ayadi et al. 2002, Elloumi et al. 2009, Trigui et al. 2011a). L'alimentation de la saline à partir des eaux de la Mer Méditerranée se fait à marée haute. Elle est constituée de bassins d'évaporation contenant de l'eau de salinité croissante jusqu'aux tables de cristallisation dans lesquelles est récolté le sel. Les eaux entrant dans la saline passent successivement dans six types de bassins qui diffèrent par leur concentration en sel : les bassins dits d'avant-pièce (34 g.L^{-1} à 75 g.L^{-1} de sels totaux), les bassins partènements extérieurs (130 g.L^{-1} de sels totaux), les bassins partènements intérieurs (210 g.L^{-1} de sels totaux), les bassins avant-pièce maîtresses (270 g.L^{-1} de sels totaux), les six bassins pièces maîtresses ou bassins de réserves (300 g.L^{-1} de sels totaux) et les tables salantes qui sont les bassins d'halite, NaCl (figure 4) (Ayadi et al. 2002, Trigui et al. 2011a).

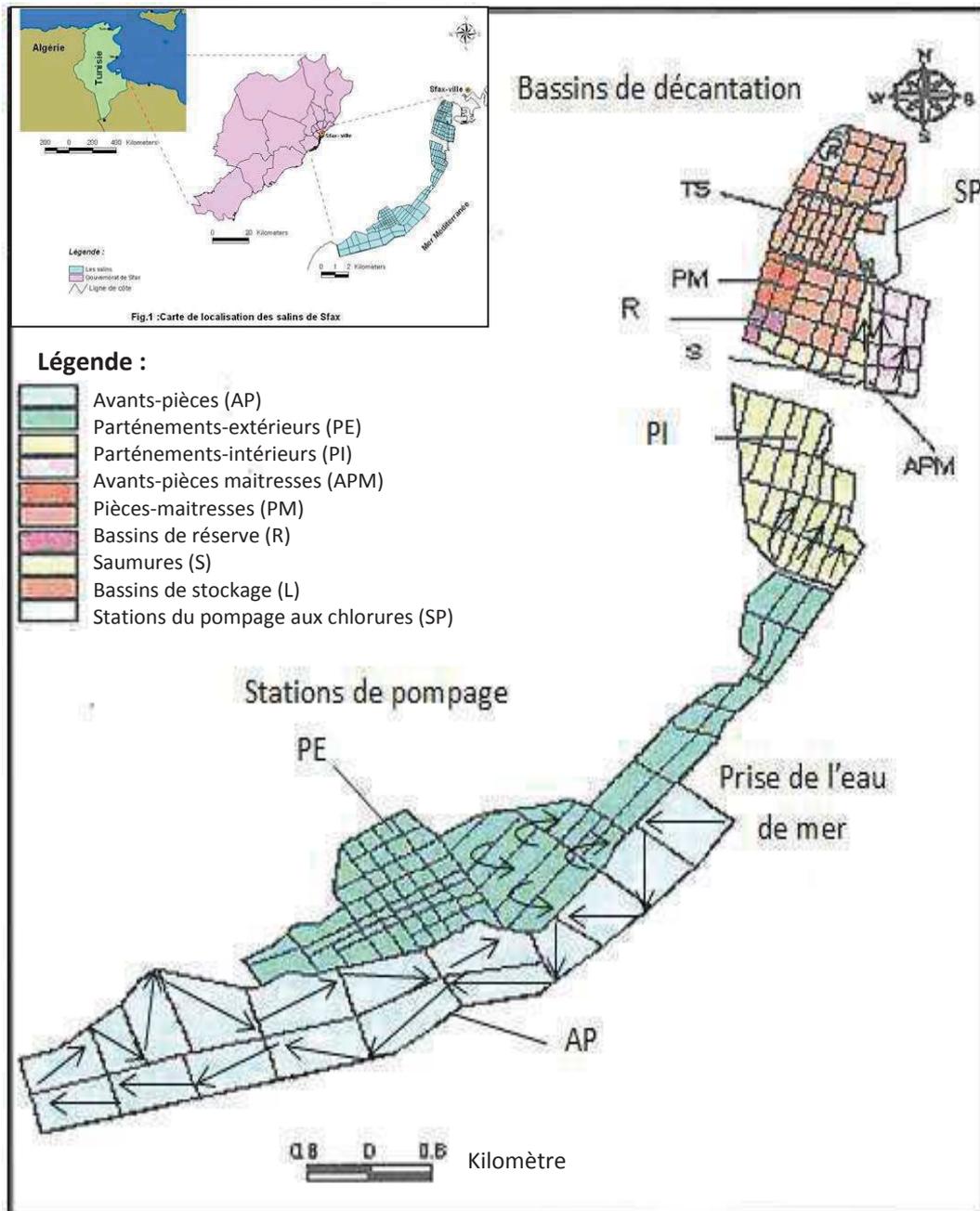


Figure 4. Carte de la localisation et de l'organisation de la saline de Sfax en Tunisie. AP : avant-pièces, PE : partènements extérieurs, PI : partènements intérieurs, APM : avant-pièces maîtresses, PM : pièces maîtresses, TS : tables salantes, R : bassins de réserve, S : saumures, L : bassins de stockage, SP : stations de pompage aux chlorures. Les flèches indiquent la circulation de l'eau dans les bassins de la saline (Trigui et al. 2011a, b).

Les milieux hypersalins, athalassohalins ou thalassohalins, sont caractérisés par une grande variabilité dans la composition chimique et en sels. Cette variabilité explique la présence de communautés microbiennes halophiles qui s'adaptent efficacement à la vie dans des conditions extrêmes, par des mécanismes spécifiques et qui présentent des structures et des activités métaboliques différentes.

II. Micro-organismes halophiles

II.1 Composition des communautés microbiennes

Sur notre planète, de nombreux micro-organismes colonisent tous les écosystèmes aquatiques. Ces micro-organismes se développent dans des conditions physico-chimiques favorables à leur croissance, dont pour la plupart une bonne disponibilité en eau, une température entre 20 et 30°C, une pression de 1 atm, et un pH neutre (Rothschild et Mancinelli 2001, Satyanarayana et al. 2005). En revanche, d'autres micro-organismes qualifiés d'extrêmophiles sont capables de coloniser des environnements extrêmes en termes de température, de pH, de salinité, de profondeur ou d'autres paramètres physico-chimiques. Ces environnements sont caractérisés par des conditions physico-chimiques considérées comme hostiles à la vie de la plupart des organismes. Parmi les environnements extrêmes, les environnements hypersalins sont colonisés par des micro-organismes dits halophiles présents dans les marais salants, dans les lacs hypersalins acides, neutres ou alcalins (Oren 2002c).

Dans les années 1960, Larsen a classé les halophiles en trois catégories distinctes en se basant sur leur tolérance au sel et leur besoin en sel :

- les *halotolérants* qui désignent les micro-organismes qui tolèrent des variations de concentration en sel avec une concentration en NaCl comprise entre 0 et 60 g.L⁻¹ ;
- les *halophiles modérés* qui regroupent les micro-organismes qui exigent une concentration en NaCl variant de 25 à 200 g.L⁻¹ ;
- les *halophiles extrêmes* qui désignent les micro-organismes qui nécessitent une concentration en NaCl élevée atteignant fréquemment 300 g.L⁻¹ (Larsen 1962).

A partir des années 1980, de nombreuses techniques ont été développées pour l'identification et la détermination de la composition des communautés microbiennes halophiles au sein des environnements hypersalins. L'étude de ces communautés est indispensable pour comprendre le fonctionnement de ce type d'écosystème et les interactions qui existent entre les communautés microbiennes (Fernandez et al. 2014, León et al, 2014, Oren 2015). Plusieurs travaux se sont focalisés sur la biodiversité de ces micro-organismes dans les marais salants, qui représentent un écosystème particulièrement intéressant pour l'étude de la diversité microbienne en fonction de la concentration en sels. En effet, comme nous l'avons indiqué dans la description de la saline de Sfax, il existe un gradient de salinité entre les différents bassins. Ces études ont montré que les micro-organismes halophiles sont présents dans les trois domaines du vivant : archées, bactéries et eucaryotes (Oren 2008) (Figure 5), et que leurs proportions et leur identité varient en fonction de la salinité. Pour des

salinités inférieures à 190 et 200 g.L⁻¹, la vie microbienne au sein de ces environnements est surtout représentée par différentes communautés de bactéries halophiles ou halophiles modérées (Oren 2008, 2015). Ces bactéries halophiles appartiennent à de nombreux phyla : *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes* dont de nombreux genres tels que *Shewanella*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas* ou *Marinobacter* (Tazi et al. 2014). Plusieurs études portant sur la diversité microbienne ont montré par d'approches moléculaires que la dominance des micro-organismes halophiles dépend fortement de la salinité. A des salinités proches de la saturation en NaCl, les membres des archées halophiles sont largement dominants, alors qu'à des faibles salinités les membres des bactéries halophiles dominant tels que les actinobactéries (Anton et al. 1999, Ghai et al. 2011, Boujelben et al. 2012a, 2012b, 2014, Hozzein 2015).

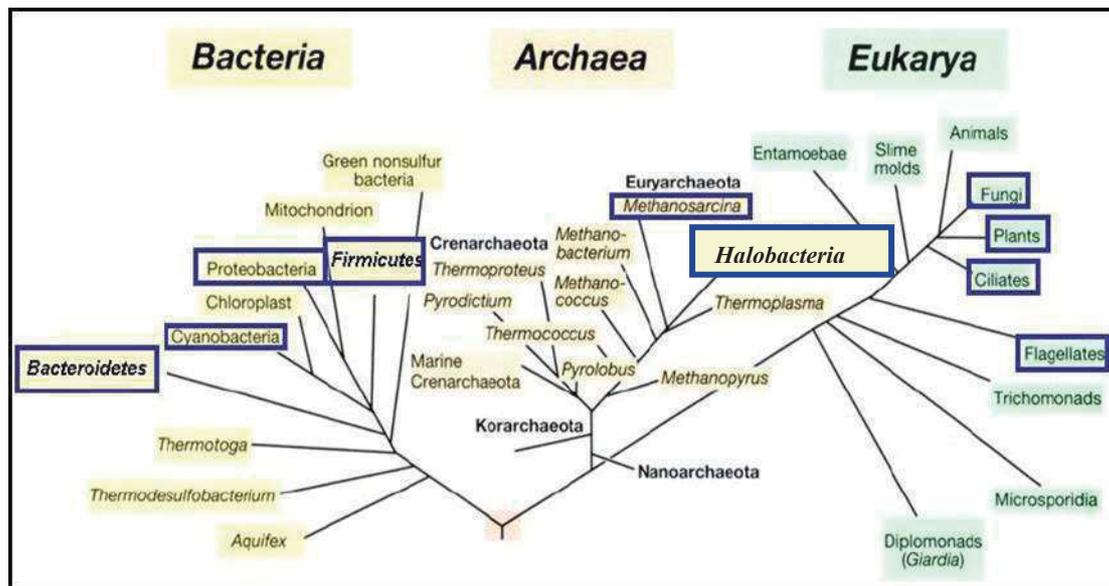


Figure 5. Arbre phylogénétique universel de la vie basé sur des études comparatives des séquences de la petite sous-unité ribosomale 16S et 18S, et distribution des micro-organismes halophiles dans les trois domaines du vivant. Les groupes entourés en bleu abritent les organismes halophiles (Oren 2008).

La majorité des archées halophiles isolées de ces écosystèmes appartiennent à la classe des *Halobacteria* (Oren 2008), alors que quelques micro-organismes eucaryotes, comme le cilié *Trimyena* (Ventosa 2006, Cho et al. 2008, De la Haba et al. 2011) ou l'algue verte du genre *Dunalliella* responsable de la production primaire dans les milieux hypersalins se retrouvent également dans ces environnements (figure 5) (Oren 2008). Des levures et

champignons halophiles ont été également observés dans les environnements hypersalins (DasSarma et DasSarma 2012).

Lorsque la salinité dépasse le seuil de 300 g.L^{-1} et atteint la saturation, les communautés d'archées dominent les communautés bactériennes (Oren 2008, 2015). Le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S a été souvent utilisé pour évaluer les communautés d'archées et de bactéries halophiles à des salinités proches de la saturation dans différents environnements hypersalins comme le Grand Lac Salé d'Utah et la Mer Morte (Tazi et al. 2014). Les résultats montrent que les archées halophiles du phylum des *Euryarchaeota* et des genres *Natronomonas*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Haloquadratum*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Haloarcula*, et *Halobacterium* dominent. Cependant, seulement quelques bactéries halophiles du genre *Salicola* appartenant au phylum des *Proteobacteria* ou du genre *Salinibacter* du phylum des *Bacteroidetes* peuvent tolérer cette salinité (Tazi et al. 2014).

Ventosa et al. 2014, ont analysés par des études métagénomiques portant sur les gènes codant l'ARNr 16S, la diversité microbienne de 5 bassins de la saline Santa Pola à Alicante en Espagne (Figure 6). A une salinité de 3% correspondant à l'eau de la Mer Méditerranée (DCM3), la communauté microbienne est dominée par des *Alphaproteobacteria* qui représentent 41%, le genre *Pelagibacter* étant le plus abondant (Ventosa et al. 2014). A une salinité de 13% (SS13), les archées font leur apparition et les *Euryarchaeota* représentent 27%, légèrement devant les *Gammaproteobacteria* (22%) et les *Alphaproteobacteria* (20%). A une salinité de de 19% (SS19), Les *Euryarchaeota* représentent presque la moitié de la communauté microbienne (46%), et le genre *Halorubrum* est le plus abondant. C'est à cette salinité que l'on voit apparaître les bactéries du phylum *Bacteroidetes* (15%). Aux salinités plus élevées à 33 et 37% (SS33 et SS37) les *Euryarchaeota* dominent largement avec presque 90%. C'est *Haloquadratum* qui est le genre dominant à ces salinités et les *Bacteroidetes* représentés essentiellement par *Salinibacter ruber* représentent le reste de la communauté microbienne (Ventosa et al. 2014).

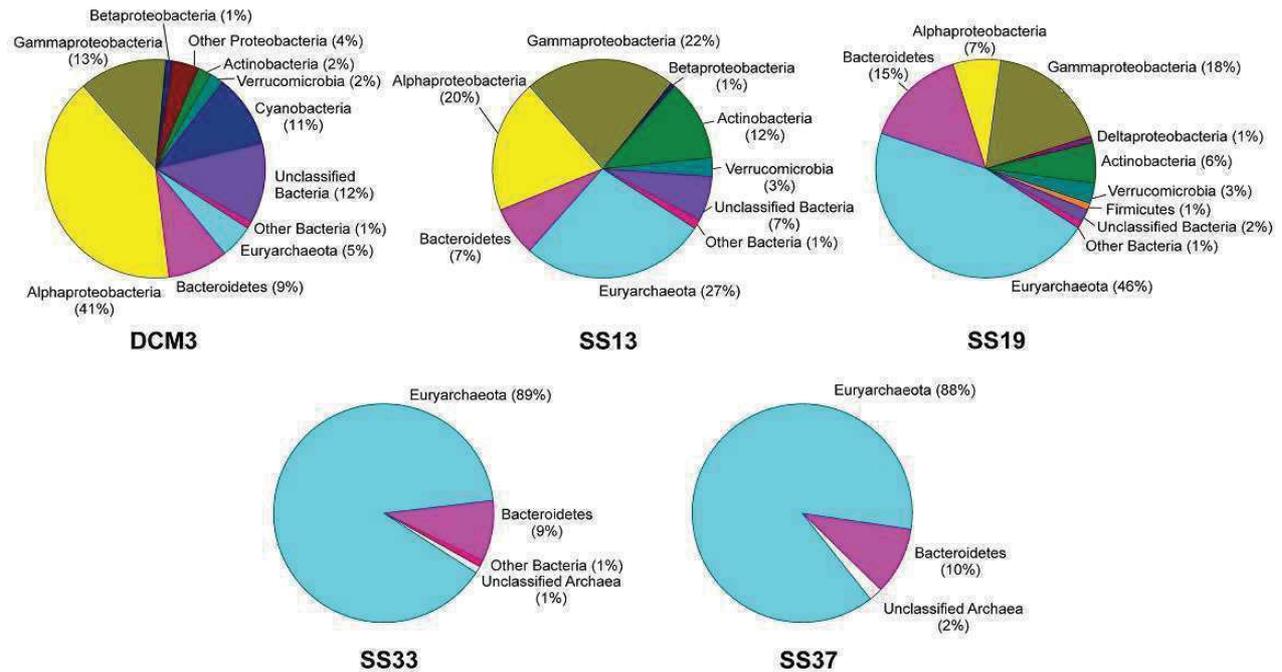


Figure 6. Profils taxonomiques de la communauté microbienne au sein de la saline de Santa Pola à Alicante en Espagne, en fonction de la salinité. Les profils résultent d'études métagénomiques portant sur les séquences des gènes codant l'ARNr 16S. DCM3 correspond à l'eau de la Mer Méditerranée, SS13, SS19, SS33 et SS37 correspondent à des bassins de salinité respectivement de 13, 19, 33 et 37% (Ventosa et al. 2014).

D'autres analyses de métagénomique ont été aussi effectuées pour identifier et étudier la diversité des procaryotes cultivables et non cultivables issus des environnements extrêmes. Dans les lacs en Antarctique, caractérisés par de fortes concentrations en diméthylsulfure, produit naturellement par les bactéries, des analyses métagénomiques ont montré l'abondance des bactéries des genres *Marinobacter*, *Rosevarius*, *Psychroflexus* (Oren 2015). Par contre, une étude menée dans un lac profond hypersalé en Antarctique a montré un écosystème dominé par des archées halophiles, tels que *Halorubrum lacuprofundum* (Oren 2015). D'autres études ont montré la diversité des procaryotes halophiles dans les écosystèmes hypersalins, notamment dans la saline d'Alicante en Espagne et ont permis d'identifier les populations dominantes qui sont des espèces d'archées halophiles comme *Haloquadratum walsbyi*, des *Bacteroidetes* (*Salinibacter ruber*), et des *Nanohaloarchaea* (Ventosa et al. 2015). Les membres des *Nanohaloarchaea* ont été identifiés pour la première fois lors du séquençage de génomes d'archées halophiles prélevées dans un lac salé en Australie. Ces analyses ont montré que le contenu génétique et la capacité métabolique de ces micro-organismes sont différents de toutes les espèces microbiennes précédemment identifiées et forment un nouveau phylum d'archées proche du super phylum DPANN (Oren 2015, Castelle et al. 2015). Ces

archées ont été isolées à partir du Lac Tyrrell en Australie, sont de très petite taille (0,6 μm), et possèdent un génome ayant une taille de l'ordre de 1,2 Mb (Narasimgarao et al. 2012, Ghai et al. 2011, Ventosa et al. 2015). Depuis leur découverte, toutes les études de métagénomiques dans des environnements hypersalins ont montré que les membres des *Nanohaloarchaeota* sont abondamment répandus (Andrei et al. 2015, Gomariz et al. 2015, De Meglio et al. 2016).

Bien qu'ils soient abondants dans les écosystèmes hypersalins, les études sur les halovirus sont peu nombreuses et peu d'informations sont disponibles sur les interactions virus-hôte dans ces milieux. Seul un petit nombre de virus d'archées ont été isolés et pour quelques-uns entre eux leurs génomes complets ont été séquencés (Tang et al. 2004). Le 1^{er} virus qui a été détecté Hs1 a été décrit en 1974 par Torsvik et Dundas (Torsvik et Dundas 1974). Trente ans plus tard seulement 15 halovirus avaient été décrits, avec une majorité possédant un morphotype tête queue et un ADN double brin, et une spécificité pour des souches *Halobacterium salinarum* (Zillig et al. 1988, Dyall-Smith et al. 2003). Actuellement, 130 virus d'archées, dont 90 infectant des archées halophiles, ont été décrits (Pietila et al. 2014, Atanasova et al. 2015, Atanasova et al. 2016). Des données récentes indiquent la présence d'une variété importante de morphotypes viraux dans les milieux hypersalins (Pietila et al. 2012, Luk et al. 2014, Atanasova et al. 2015). Cinq des virus qui infectent les archées halophiles, SH1, PH1, HHIV-2, SNJ1, et HCIV-1, se retrouvent dans les différentes régions à travers le monde (Porter et al. 2005, Dyall-Smith 2013, Atanasova et al. 2015). Les virus d'archées halophiles constituent ainsi également une composante importante des environnements hypersalins (Santos et al. 2012, Luk et al. 2014). Des observations par microscopie électronique d'échantillons d'eau de salines montrent une grande diversité de particules virales (Oren et al. 1997, Pedrós-Alió 2004). Parmi les halovirus les mieux connus et les plus étudiés au niveau moléculaire dans les milieux hypersalins, on trouve l'halovirus ΦH infectant les souches d'archées halophile *Hbt. salinarum* (Schnabel et al. 1982), l'halovirus ΦCh1 infectant *Natrialba magadii* (Klein et al. 2002) et d'autres types d'halovirus avec une morphologie identique tête queue, HF1 et HF2 infectant *Hbt. salinarum* et *Haloferax volcanii*, ont été isolés à partir des étangs cristallins en Australie (Tang et al. 2004). Les virus tête queue représentent la morphologie la plus connue chez les virus des procaryotes (Ackermann et Prangishvili 2012). Trois types de virus tête queue existent dans les trois familles de virus *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae* (Manîlof et Ackermann, 1998, King 2011). Ces virus sont lytiques et infectent plusieurs membres d'archées halophiles, tels que les genres *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*,

Haloterrigena et *Halorubrum* (Ventosa 2006). De plus, quelques études ont été réalisées sur l'écologie des halovirus (Wais et al. 1975, Wais et Daniels 1985, Daniels et Wais, 1990), la présence des particules virales dans les eaux hypersalines naturelles (Guixa-Boixereu et al. 1996, Oren et al. 1997). Dans de nombreux milieux aquatiques analysés, l'abondance des particules virales détectées dépasse largement celle des cellules procaryotiques identifiées, en particulier en ce qui concerne les virus des halophiles détectés à des salinités élevées (Guixan-Boixareau et al. 1996, Oren et al. 1997, Santos et al. 2007). Ces halovirus jouent un rôle important dans le contrôle de la population des archées et des bactéries halophiles, en raison de l'absence d'autres prédateurs dans les environnements à fortes concentrations en sels (Santos et al. 2007). Cependant, certains halovirus perdent leur activité en présence de faible concentration en NaCl (Kukkaro et Bamford, 2009). Pour d'autres halovirus, l'augmentation de la concentration en NaCl modifie leur cycle de vie comme pour Hs1 (Torsvik et Dundas 1974).

II. 2 Les communautés microbiennes dans la saline de Sfax

Les milieux hypersalins sont donc colonisés par une biodiversité microbienne importante constituant les communautés microbiennes halophiles. C'est en particulier le cas de la saline de Sfax qui est le site de notre étude. En 2009, Elloumi *et al.* ont identifié la répartition, l'abondance et la biomasse des micro-organismes halophiles procaryotes et eucaryotes au sein de plusieurs bassins de différentes salinités. Ces études menées sur cinq bassins A1, A16, C2-1, M2 et TS (voir Figure 4, p. 9), ont montré l'abondance des procaryotes hétérotrophes à des concentrations très élevées en sel, tandis que les eucaryotes diminuent avec l'augmentation de la salinité (Elloumi et al. 2009). Le picoplancton phototrophe a été détecté à des salinités entre 70 et 200 g.L⁻¹ NaCl avec une abondance de dinoflagellés, tandis que le nanoplancton non flagellé a été observé uniquement à des faibles salinités (Elloumi et al. 2009). D'autres techniques d'analyse et d'identification moléculaires comme la technique d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) et des techniques d'analyse des lipides polaires ont été utilisées pour caractériser la communauté microbienne dans cette saline (Trigui et al. 2011a, b, Boujelben et al. 2012a, Boujelben et al. 2014). L'étude de la dynamique spatiale de la communauté de procaryotes dans les bassins de la saline, montre que les archées halophiles dominent dans la table de cristallisation de sel TS18 (salinité de 370 g.L⁻¹) et constituent 80% de la masse cellulaire totale.

Parmi les genres identifiés, *Haloquadratum* et *Halorubrum* sont capables de se multiplier dans des conditions extrêmes de salinité avec une croissance optimale à 250 g.L⁻¹ NaCl et à pH 7,4 (Boujelben et al. 2012a). En revanche, les bactéries halophiles dans TS18 sont surtout représentées par les genres *Salinibacter* et *Salicola*. A des salinités plus faibles comme dans la station M1 avec une salinité de 200 g.L⁻¹, les bactéries dominent les archées halophiles. Plusieurs phylotypes ont été caractérisés, comme *Alkalimnicola* ainsi que de nouvelles séquences de *Bacteroidetes* non cultivables (Boujelben et al. 2012a). Ces études ont confirmé que les archées halophiles extrêmes constituent la composante principale de la communauté de procaryotes dans les milieux hypersalins et notamment les salines (Boujelben et al. 2012a).

La cytométrie en flux a été également utilisée pour estimer la viabilité des communautés d'archées et de bactéries dans la saline de Sfax (Trigui et al. 2011a). Une étude portant sur deux bassins TS18 et M1 a permis d'identifier les populations de procaryotes halophiles prospérant dans ces deux bassins à l'aide d'analyses phylogénétiques des gènes codant l'ARNr 16S et la cytométrie en flux (Trigui et al. 2011a). Deux groupes ont été détecté par cytométrie en flux, un premier groupe HNA correspond aux cellules actives, ayant un fort contenu en acide nucléique « High Nucleic Acid Content », et un deuxième groupe LNA correspond aux cellules inactives ayant un faible contenu en acide nucléique « Low Nucleic Acid Content ». Les résultats d'analyse phylogénétique de ces deux groupes montrent pour la première fois la présence des archées halophiles affiliés aux genres *Haloquadratum* et *Halorubrum* dans les deux fractions HNA et LNA dans les deux bassins TS18 et M1. Au contraire, une population de bactéries affiliées au phylum des *Bacteroidetes*, des genres *Sphingobacteria* et *Salinobacter* n'a été détectée que dans la fraction LNA du bassin M1, tandis qu'une population bactérienne appartenant à la classe *Alphaproteobacteria*, du genre *Phylobacterium* a été détectée seulement dans la fraction HNA du bassin TS18 (Trigui et al. 2011a).

Des études métagénomiques ont été effectuées sur la saline de Sfax, notamment dans les bassins C4, M1 et TS présentant respectivement une salinité de 140, 190 et 350 g.L⁻¹ pour déterminer les assemblages viraux dans les milieux hypersalins en fonction de la concentration en sels et en fonction du temps (Boujelben et al. 2012b). Ces analyses montrent l'abondance des procaryotes halophiles dans ces bassins, les archées dans TS à une forte salinité et les bactéries dans C4 et M1 à des salinités moyennes. D'autres analyses par microscopie électronique à transmission et par électrophorèse en champ pulsé ont montré que

la concentration virale augmente avec la salinité pour atteindre 10^9 à 10^{10} particules virales par mL en fonction des bassins étudiés (Boujelben et al. 2012b). De plus, une large variété de morphotypes viraux a été observée par microscopie électronique dans les 4 bassins étudiés. On a ainsi, observé des virus sphériques, tête queue, en forme de citron et filamenteux, en proportions différentes. Plus de 900 particules virales ont été analysées au total, dont 53% des virus avec une taille comprise entre 50 et 100 nm, et 41% avec une taille inférieure à 50 nm. Certains virus filamenteux supérieurs à 100 nm ont été également observés. Les virus sphériques dominent la communauté virale dans la saline de Sfax et atteignent jusqu'à 80% de la densité virale totale dans les échantillons du bassin C4 (Boujelben et al. 2012b). Cependant, le nombre des virus sphériques diminue en fonction de la salinité en faveur des virus en forme citron et tête queue, dans les bassins M1 et TS18. Ces résultats suggèrent que ces morphotypes sont bien adaptés à la salinité (Boujelben et al. 2012b).

II. 3 Adaptation des procaryotes à la salinité

La vie des micro-organismes dans des environnements à fortes concentrations en sels et de compositions ioniques variables, nécessite des mécanismes d'adaptation spécifiques pour permettre à ces micro-organismes de se développer et de faire face aux conditions de stress osmotique. En effet, les modifications de constitution du milieu extracellulaire dans les milieux hypersalins peuvent entraîner une fuite d'eau ou une entrée d'eau dans les cellules par passage à travers la membrane plasmique semi-perméable. Pour éviter une diminution (choc hyperosmotique) ou une augmentation (choc hypoosmotique) du volume du cytoplasme des mécanismes d'osmorégulation sont nécessaires pour maintenir l'équilibre osmotique de la cellule et ajuster la pression osmotique par apport au milieu extracellulaire. Deux stratégies d'osmorégulation ont été développées chez les procaryotes en milieu hypersalin. La première, implique l'accumulation de sel, le chlorure de potassium KCl à l'intérieur du cytoplasme (Oren 2006), alors que la seconde consiste en l'accumulation de solutés organiques compatibles dans le cytoplasme (Oren et al 2002b, c).

II.3.1 Accumulation de chlorure de potassium ou stratégie « Salt in »

Cette stratégie nommée « salt in » concerne les archées aérobies des trois ordres de la classe des *Halobacteria* : familles *Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales*, les bactéries du genre *Salinibacter* et d'autres bactéries anaérobies de l'ordre des *Halanaerobiales* (Oren 1990, 2013, Oren et al. 2002b, c). Dans le cas d'accumulation de KCl intracellulaire les micro-organismes halophiles montrent une grande adaptation et résistance,

car leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles (stables, actives) aux fortes salinités, mais par contre, elles pourront se dénaturer à de plus faibles forces ioniques, dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 50 à 100 g.L⁻¹. Elles sont en ce sens qualifiées de protéines halophiles (Brown-Peterson et Salin 1994, Madern et al. 2000).

Dans le cas de l'accumulation de KCl, les phénomènes d'osmorégulation s'effectuent à l'aide de pompes membranaires qui permettent les échanges bidirectionnels de molécules et d'ions. Ces différents échanges sont illustrés dans la Figure 7. Chez les archées halophiles extrêmes, le transport des électrons s'effectue par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire et est accompagné par l'extrusion des protons (voie 1, Figure 7). Les bactériorhodopsines sont des protéines membranaires caractérisées par la présence de rétinol qui sous l'effet de la lumière peuvent aussi être utilisées pour la génération d'un gradient de protons (voie 2, Figure 7). Le gradient de protons H⁺ entraîne la formation d'ATP par l'ATP synthase (voie 3, Figure 7). A des concentrations en sel élevées, le flux des ions Na⁺ diffuse vers l'espace extracellulaire à l'aide de l'échangeur Na⁺/H⁺ (voie 4, Figure 7). Cet échangeur permettrait également la régulation du pH intracellulaire. Le Na⁺ extracellulaire peut également être utilisé pour permettre l'import de différentes substances organiques telles que les acides aminés (voie 5, Figure 7). L'export de Na⁺ via l'échangeur Na⁺/H⁺ est compensé par l'entrée à travers la membrane d'ions K⁺, ce qui permet le maintien de l'électroneutralité (voie 6, Figure 7).

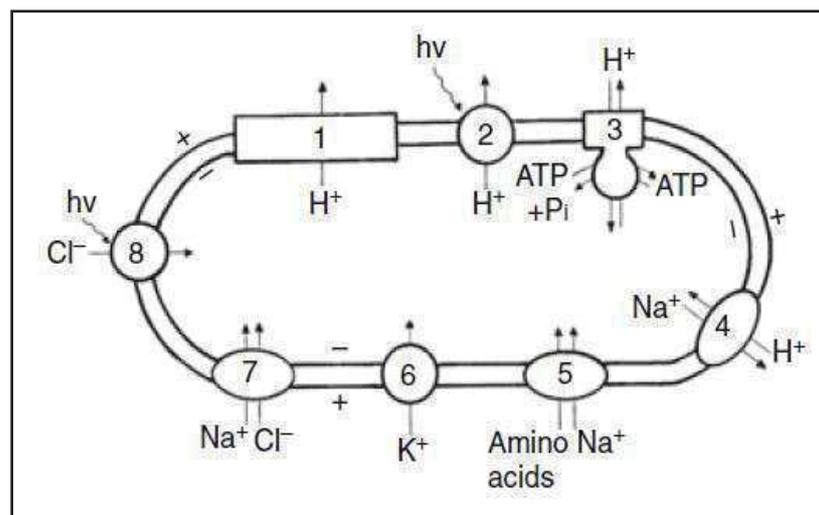


Figure 7. Transport des ions et des acides aminés chez les archées halophiles selon la stratégie « Salt in ». Les numéros indiquent les différentes voies de la stratégie « salt-in » (Oren 2006).

La différence entre l'influx des ions K^+ et l'efflux des ions Na^+ va être compensée par un nombre équivalent d'ions chlorure (Cl^-) grâce à deux pompes membranaires. La première pompe est un système de transport couplé Na^+/Cl^- qui permet l'import des ions Cl^- (voie 7, Figure 7). La seconde pompe est l'halorhodopsine, protéine spécifique des halophiles extrêmes, qui va être activée en présence de lumière (voie 8, Figure 7) (Oren 2006).

Pour s'adapter à une forte concentration intracellulaire en KCl , les protéines des halophiles extrêmes vont adopter des conformations particulières. Les protéines halophiles présentent en surface une structure chargée négativement grâce à un excès en acides aminés acides (acides aspartique et glutamique). Ces acides aminés interagissent facilement avec les ions K^+ ce qui permet d'accumuler les molécules d'eau nécessaires à leur repliement, à leur stabilisation et à leur solubilité. La couche de sel et d'eau forme une « cage » protectrice qui empêche le dépliement des protéines, entraînant leur dénaturation et leur perte d'activité (Madern et al. 1995, Madern et al. 2000, Mevarech et al. 2000). Cette propriété permet à ces protéines halophiles de rester stables en présence de fortes concentrations intracellulaires en sels, ce qui les distingue des protéines non halophiles incapables de fonctionner dans des conditions similaires (Ebel et al. 1995). La détermination de la structure cristallographique de diverses protéines d'archées halophiles, comme la malate déshydrogénase d'*Haloarcula*, la dihydrofolate réductase et la galactose/peroxydase d'*Haloferax*, la phosphatase alcaline et la bactériorhodopsine d'*Halobacterium*, ainsi que le séquençage de génomes d'organismes halophiles a permis une meilleure compréhension de l'adaptation de ces micro-organismes halophiles à de fortes concentrations en sels (Madern et al. 2000, DasSarma et DasSarma 2015). La figure 8, montre la comparaison entre la structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase d'une archée halophile, *Haloarcula marismortui*, déterminée par cristallographie aux rayons X avec son homologue provenant d'une bactérie non halophile *Lactobacillus pentosus*. Cette comparaison montre les caractéristiques structurales spécifiques responsables de la stabilité des protéines halophiles aux fortes concentrations en sel, comme la présence d'un excès d'acides aminés acides (aspartate et glutamate) déjà mentionnée, et une diminution d'acides aminés basiques (lysine) par rapport à son homologue provenant d'une bactérie non halophile. Une autre caractéristique qui contribue à la stabilisation de la lactate déshydrogénase chez les organismes non halophiles est l'incorporation d'acides aminés hydrophobes (phénylalanine, tyrosine, alanine, glycine et valine) dans des hélices α et la présence de peu d'acides aminés aliphatiques (Lanyi 1974, Dym et al. 1995, Madern et al. 1995). Des cations comme les ions Mg^{2+} et des anions sont également susceptibles de

contribuer à la stabilisation de la structure des protéines chez les organismes halophiles (Lanyi 1974, Madern et al. 2000).

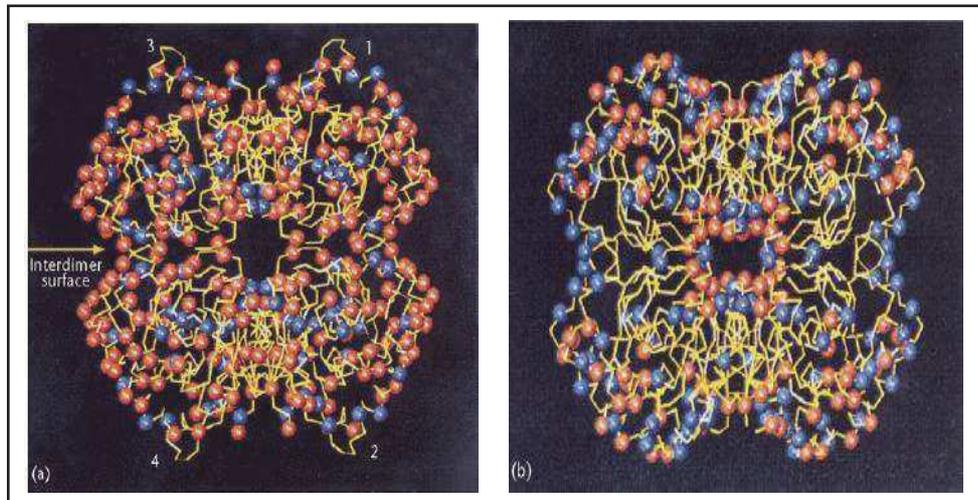


Figure 8. Structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase montrant la distribution en surface des acides aminés acides chez une archée halophile, *Haloarcula marismortui* (a) et chez une bactérie non halophile, *Lactobacillus pentosus* (b). Les sphères rouges indiquent les résidus acides et les sphères bleues indiquent les résidus basiques (DasSarma et DasSarma 2012).

II.3.2 Accumulation de solutés compatibles ou stratégie « Low salt in »

La seconde stratégie d'adaptation osmotique « Low salt in » permet le maintien de l'équilibre osmotique chez les bactéries halophiles modérées et extrêmes, les archées méthanogènes, les levures, les champignons et les algues (DasSarma et Arora 2001, Oren 2008). Ce mécanisme met en œuvre des solutés compatibles, soit par import à partir du milieu extracellulaire, soit par synthèse endogène (Ventosa et al. 1998). A l'inverse de la stratégie « salt in », cette stratégie nécessite beaucoup d'énergie et une faible quantité d'ions K^+ et Cl^- dans le cytoplasme (Oren 2006). Les solutés compatibles sont des molécules organiques polaires et hautement hydrosolubles. La plupart de ces composés sont neutres à pH 7 et de faible poids moléculaire. Dans le cytoplasme, les solutés accumulés n'interfèrent pas, même à forte concentration, avec les protéines et les réactions enzymatiques (Oren 2008). Ces solutés agissent en augmentant la tension superficielle de l'eau. Par conséquent, les interactions eau-eau deviennent énergétiquement plus difficiles à rompre que les complexes protéine-eau (Oren 2008). L'eau forme alors à la surface des protéines un maillage épais duquel les solutés compatibles sont exclus. Dans ces conditions, les protéines halophiles sont capables de conserver leur structure et leur hydratation dans l'environnement hypersalé (Figure 9) (Oren 2008). Grâce à l'effet protecteur des solutés compatibles, la stabilité remarquable de la

structure protéique permet d'augmenter la tolérance de la bactérie halophile vis-à-vis du sel. Cette tolérance peut atteindre une concentration de 250 g.L^{-1} de NaCl (Ventosa et al. 1998, Oren 2008).

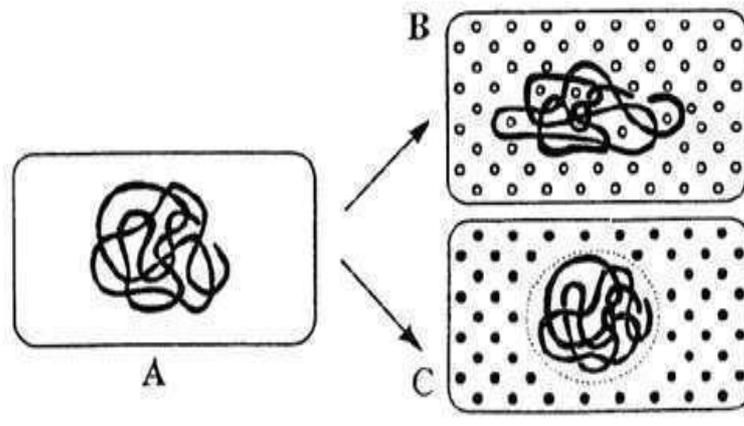


Figure 9. Schéma illustrant l'effet de la forte concentration saline sur la structure tridimensionnelle d'une protéine (Oren 2002c). **A** : protéine dans sa conformation fonctionnelle, **B** : les solutés non compatibles (en cercles blancs) interagissent avec la protéine et dénaturent sa structure tridimensionnelle, **C** : les solutés compatibles (cercles noirs), exclus de la surface de la protéine, permettent le maintien de la structure de la protéine dans des conditions de forte osmolarité.

Lorsque la concentration en sel diminue à l'extérieur, les halophiles ajustent automatiquement la concentration des solutés organiques en arrêtant leur synthèse, ou bien en dégradant ou en inactivant les solutés. Les solutés compatibles utilisés peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), certains acides aminés et dérivés d'acides aminés (proline, acide glutamique, glutamine, acide aminobutyrique, glycine bêtaïne, éctoïne) ou des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol) (Figure 10). Les osmoprotecteurs les plus utilisées par les bactéries halophiles sont l'ectoïne, la glycine bêtaïne (Courtenay et al. 2000). L'ectoïne est synthétisée par une grande variété de micro-organismes halophiles et halotolérants comme les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archées méthanogènes, tandis que la glycine bêtaïne est synthétisée exclusivement par des procaryotes photosynthétiques et accumulée à partir du milieu par des bactéries hétérotrophes (Oren 2008).

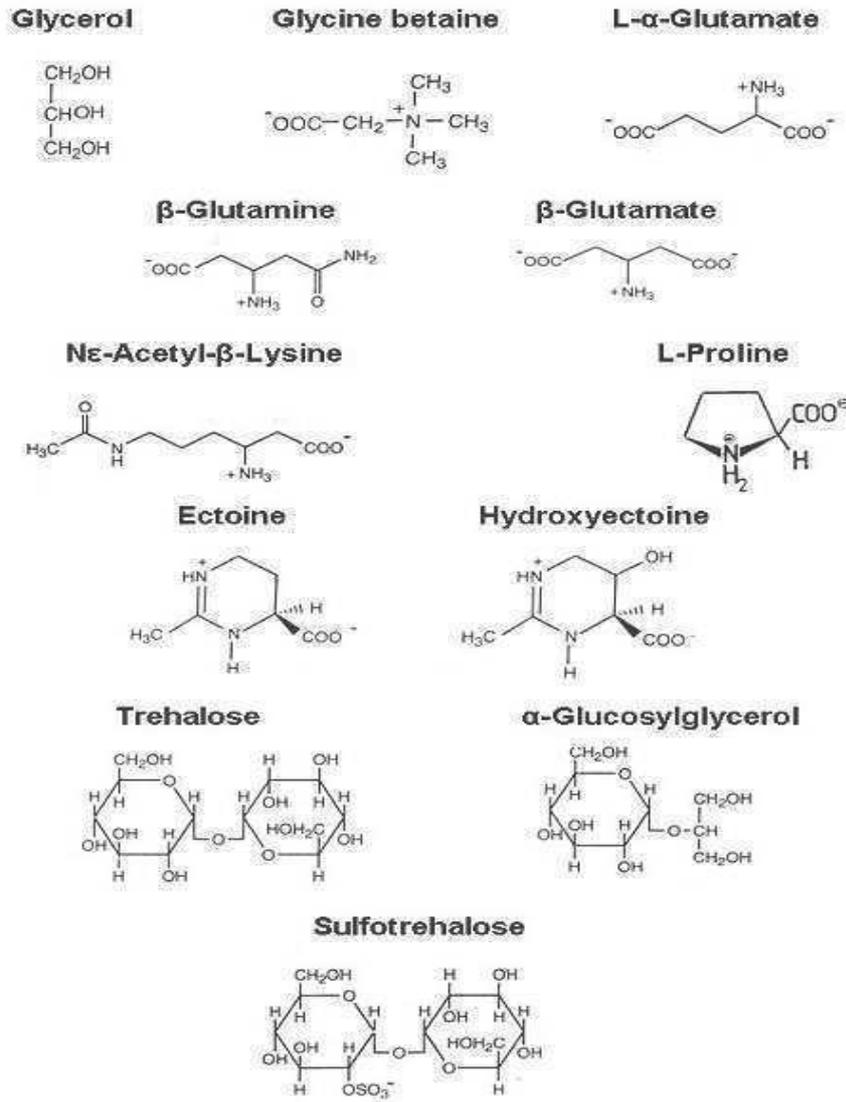


Figure 10. Exemples de solutés compatibles (Oren 2008).

II.4 Réponse au stress oxydatif

La vie des micro-organismes halophiles dans les environnements hypersalins, ne nécessite pas seulement une adaptation à des concentrations très élevées en sels, mais aussi à l'adaptation au stress oxydant dû aux espèces réactives de l'oxygène (ERO). Parmi ces espèces on trouve l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et l'oxygène singulet (1O_2) (Kaur et al. 2010). De nombreux micro-organismes halophiles sont soumis à de forts stress oxydatifs à cause des conditions environnementales sévères. Parmi ces micro-organismes, on trouve ceux qui survivent dans un milieu aride, à des températures élevées et qui sont exposés à des forts rayonnements UV

solaires qui induisent la formation d'ERO (Rampelotto 2010). D'autres micro-organismes halophiles qui sont aérobies vivant dans des milieux hypersalins, nécessitent de l'oxygène pour survivre. Ils utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons via le processus de respiration qui réduit les molécules d'O₂ en H₂O. Au cours de ces processus, des espèces toxiques de l'oxygène peuvent se former. De plus, ces micro-organismes sont exposés aux EROs produits par des processus photochimiques impliquant la matière organique, l'UV-R et l'oxygène (Cooper et al. 1988). D'autres facteurs comme la carence nutritionnelle et les polluants métalliques sont capables d'induire la surproduction d'EROs à l'intérieur des cellules des micro-organismes (Imlay 2003, Scandalios 2005). Les EROs constituent un véritable danger pour les cellules microbiennes, car elles peuvent oxyder et endommager les macromolécules biologiques (Trigui et al. 2011a). Ainsi, les micro-organismes halophiles doivent lutter contre ces espèces réactives et par conséquent contre le stress oxydant. Des études ont montré que les espèces d'archées halophiles extrêmes des genres *Haloferax*, *Halobacterium*, *Haloterrigena* et *Halorubrum* sont plus résistantes aux EROs et aux UV-B que les souches bactériennes halophiles (Scandalios 2005, Trigui et al. 2011a). Les mécanismes de détoxification les plus utilisés par les halophiles en réponse aux stress oxydant et qui permettent de limiter ou dégrader les EROs sont des systèmes de dégradation enzymatiques. Ceux-ci, comme la superoxyde dismutase (SOD), sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène. Cette réaction s'effectue par la réduction de premières molécules (O₂^{·-}) par le métal présent dans le site actif de l'enzyme en libérant l'O₂, puis une deuxième molécule (O₂^{·-}) ré-oxyde le métal en libérant H₂O₂ (Figure 11). Ces mécanismes enzymatiques ne sont pas spécifiques aux halophiles et sont également présents chez tous les organismes aérobies (Salin et al. 1988, Salin et Oesterhelt 1988, Takao et al. 1989). Plusieurs espèces d'archées halophiles ont été étudiées pour la présence de gènes codant des protéines de la famille superoxyde dismutase : *Halobacterium cutirubrum*, *Halobacterium* sp. GRB, *Hfx. volcanii*. Ces trois espèces contiennent des gènes dupliqués paralogues de la famille SOD, alors que l'espèce *Haloarcula marismortui* ne contient qu'un seul gène (Joshi et Dennis 1993). Ces gènes ont été clonés, séquencés et caractérisés par la suite dans le but de les comparer, ce qui montre une grande similitude entre les séquences de SOD et permet d'étudier la diversité des gènes chez les différents membres d'archées halophiles (Joshi et Dennis 1993). L'espèce la plus étudiée, *Hbt. salinarum*, anaérobie facultatif ou aérobie, possède à la fois la SOD et la catalase (Salin et Oesterhelt 1988, Takao et al. 1989). Deux familles de SOD existent chez les archées halophiles selon la nature du métal catalyseur, la Mn-SOD et la Fe-SOD (Brown-Peterson et

al. 1995, Martin et al. 1986). La première famille de Mn-SOD codée par le gène *sodA*, est l'enzyme cytoplasmique majoritaire pendant la croissance en aérobiose. L'expression du gène *sodA* est régulée par les régulateurs transcriptionnels CfxB, SoxRS, IHF, ArcA-B, Fnr, Fur, et OxyR (Compan et Touati 1993). La seconde famille, Fe-SOD codée par le gène *sodB*, est régulée par le taux de fer dans la cellule via un petit ARN anti-sens, RyhB et une protéine Hfq (Niederhoffer et al. 1990, Geissmann et Touati 2004). Actuellement, seule la famille de Mn-SOD a été bien caractérisée et purifiée chez les archées halophiles et particulièrement chez *Hbt. salinarum* (Salin et Oesterhelt 1988, Takao et al. 1989) et *Hbt. cultirubrum* (May et Dennis 1989).

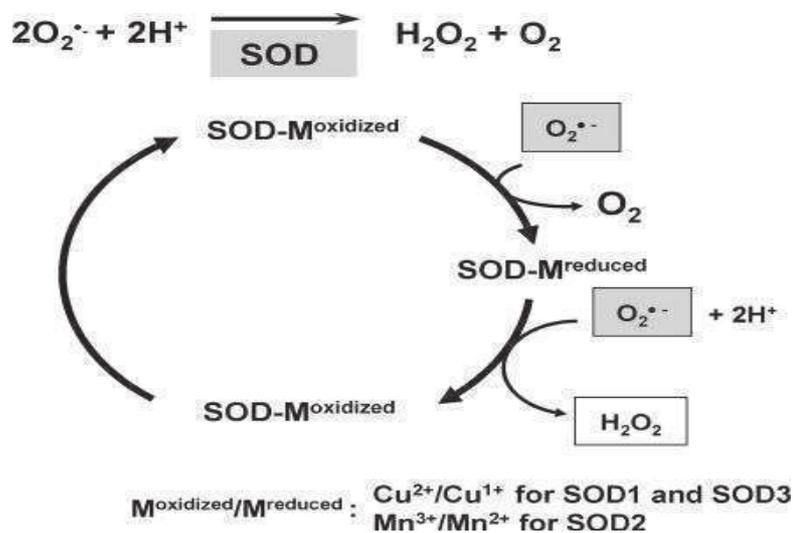


Figure 11. Mécanisme de fonctionnement de la superoxyde dismutase (SOD). L'activité enzymatique implique une alternance de réduction et réoxydation du métal catalytique M (Cu ou Mn) au site actif de l'enzyme (Fukai et Ushio-Fukai 2011).

D'autres enzymes comme la catalase et la catalase peroxydase sont également impliquées dans la détoxification des EROs. Ces enzymes permettent la réduction du peroxyde d'hydrogène (Dalton et al. 1999, Scandalios 2004). Chez les halophiles, il existe trois enzymes de détoxification du peroxyde d'hydrogène : les catalases monofonctionnelles, les catalases hémiques bi-fonctionnelles et les peroxydases qui sont présentes chez les archées *Hbt. salinarum* et *Har. marismortui* (Brown-Peterson et Salin 1994). D'autres enzymes comme les peroxydases à thiol, forment une famille de protéines qui réduisent les hydroperoxydes en une molécule d' H_2O .

D'autres composés intéressants comme les pigments caroténoïdes, les bactériorubérines et la méthionine sont impliqués dans la protection des micro-organismes halophiles extrêmes

contre les UV, et par conséquent contre le stress oxydant (Shahmohammadi et al. 1998, Asgarani et al 1999, Kish et al. 2009). Les pigments caroténoïdes, notamment les β -carotènes sont des accepteurs des EROs, et par conséquent sont des extincteurs de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et des antioxydants des lipides (Burton et Ingold, 1984, Hunter et al. 2002). Les bactériorubérines ont plus d'affinité pour le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$, ce qui aide à dégrader ces agents oxydants (Saito et al. 1997). De plus, la méthionine peut jouer un rôle antioxydant chez *Hbt. salinarum* lorsqu'elle se trouve à la surface des protéines. Les méthionines libres peuvent subir des cycles d'oxydoréduction, leur permettant de jouer le rôle de bouclier et d'abaisser la concentration intracellulaire en EROs (Levine et al. 1996). *Hbt. salinarum* a été un modèle chez les archées halophiles extrêmes pour identifier la diversité des mécanismes en réponse à des agents stressants, y compris l'exposition à des fortes doses de rayonnements ionisants (Kish et al. 2009, Robinson et al. 2011, Webb et al. 2013), des oxydants chimiques (Kaur et al. 2010), et des rayonnements UV (Baliga et al. 2004). Dans les mécanismes de réparation de l'ADN, l'accumulation de sels intracellulaires joue un rôle essentiel pour éliminer les EROs (Kish et al 2009). Il a ainsi été montré que les ions bromure Br^- protègent l'ADN d'*Hbt. salinarum* NRC-1 contre les EROs générés par l'irradiation ionisante. Ces ions étant très réactifs vis à vis des radicaux hydroxyles, ils protègent les macromolécules dans les cellules (Kish et al. 2009). Par ailleurs, le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$ peut réagir avec des anions Cl^- pour donner un radical $\text{Cl}\cdot$ qui est beaucoup moins réactif vis à vis de l'ADN que le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$ (Ward et Kuo 1970).

II.5 Bactéries halophiles

Les bactéries halophiles des milieux hypersalins sont majoritairement représentées par les halotolérants et les halophiles modérés avec quelques espèces halophiles extrêmes (Antón et al. 2002). Les bactéries halotolérantes se répartissent dans un grand nombre de groupes phylogénétiques (Ventosa et al. 1998). Ces bactéries ont une croissance optimale pour des concentrations en NaCl comprises entre 10 et 60 g.L^{-1} . Les bactéries halophiles modérées, poussent généralement sur une gamme de salinité qui peut atteindre 220 g.L^{-1} de NaCl (Ventosa et al. 1998). Enfin, les bactéries halophiles extrêmes exigent des concentrations en sel très élevées de l'ordre de 320 g.L^{-1} de NaCl (Maturrano et al. 2006, Sorokin et al. 2006).

Les bactéries halophiles sont essentiellement des bactéries à Gram négatif. On les retrouve dans 4 phyla du domaine des bactéries : *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Flavobacterium* et *Cytophaga* (Anton et al. 2000, Vaisman et Oren 2009). La majorité des bactéries aérobies à Gram négatif appartiennent à la famille *Halomonadaceae* de l'ordre

Halanaerobiales (Arahal et Ventosa 2006). Parmi les genres les plus connus de ces bactéries halophiles, on rencontre *Salinivibrio*, *Dichotomicrobium* et *Arhodomonas* (Ventosa et al. 1998, Kamekura 1998). Ces espèces ont été isolées à partir de nombreux environnements hypersalins, comme les lacs salés alcalins, la Mer Morte ou les marais salants (Arahal et al. 2002, Oren 2008). Cependant, certaines bactéries halophiles ont une coloration de Gram positive, et se trouvent surtout dans le phylum des *Firmicutes* et la famille des *Bacillaceae* (Oren 2002d). Parmi les espèces identifiées, on trouve les genres *Halobacillus*, *Salinococcus*, *Marinococcus*, *Tetragenococcus* et *Nesterenkonia* (Ventosa et al. 1998). Concernant les bactéries halophiles extrêmes, elles sont représentées essentiellement par le genre *Salinibacter* et l'espèce *Salinibacter ruber*, une bactérie halophile extrême isolée pour la première fois de la saline d'Alicante en Espagne (Figure 12) (Anton et al. 2002). Cette bactérie contient des caroténoïdes, comme la bacteriorubérine et le caroténoïde C40-acyle glycoside au niveau de sa membrane cellulaire. Ce sont des pigments dont le rôle est de protéger les cellules contre les dommages dus à la photo-oxydation, contre les UV et par conséquent contre le stress oxydant (Oren 2009a, b). Cette bactérie se trouve ainsi pigmentée en rouge grâce à la présence de ces pigments. *Salinibacter ruber* utilise le même mécanisme d'accumulation de KCl (stratégie « salt-in ») que les archées halophiles aérobies pour maintenir l'équilibre osmotique intracellulaire (Anton et al. 2002). En outre, cette souche est proche des archées halophiles de la classe des *Halobacteria* en ce qui concerne sa physiologie et ses conditions de culture (Colwell et al. 1979, Bardavid et al. 2007). En effet, cette bactérie supporte des concentrations en sel très élevées, avec une croissance optimale pour des concentrations comprises entre 200 et 300 g.L⁻¹ de NaCl, une température comprise entre 37 et 47°C, et une gamme de pH entre 6 et 8. De plus, cette souche chimio-organotrophe est strictement aérobie. Des analyses de cellules de *Salinibacter* montrent la présence de concentrations élevées en ions K⁺ dans le cytoplasme. De telles concentrations ont été détectées chez la souche d'archée halophile extrême *Hbt. salinarum* R1 (Anton et al. 2002). Récemment, une dizaine d'espèces de bactéries halophiles extrêmes des genres *Salicola*, *Halovibrio* et *Halospina* du phylum *Proteobacteria* ont été isolées et caractérisées (Figure 12) (Kharroub et al. 2006, Sorokin et al. 2006). Ces espèces ressemblent beaucoup aux archées halophiles et partagent le même environnement. La caractéristique commune est l'exigence en sel pour leur croissance et une capacité à tolérer des concentrations élevées en sel dépendant de la température et des nutriments disponibles (Kushner 1993). Ces bactéries ont une croissance à des concentrations optimales de NaCl entre 100 et 300 g.L⁻¹ et utilisent les acides organiques comme sources de carbone et d'énergie (Romano et al. 1996, Sorokin et al. 2006).

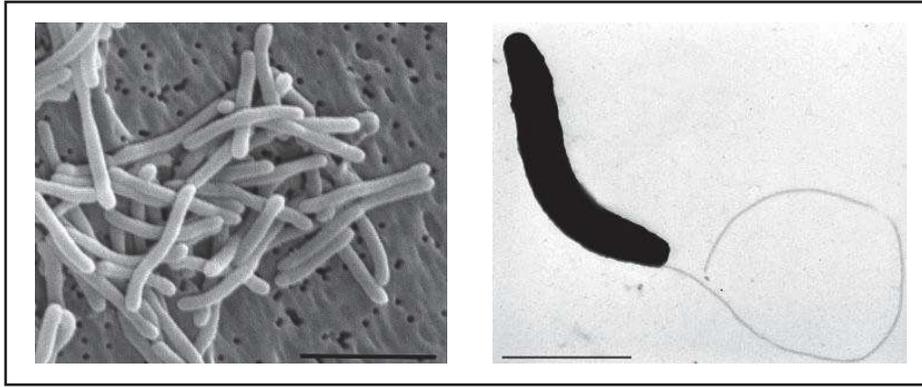


Figure 12. Souches bactériennes halophiles extrêmes : *Salinibacter ruber* isolée de la saline d'Alicante en Espagne (Anton et al. 2002) [barre 2,5µm] et *Halovibrio denitrificans* isolée à partir d'un lac en Asie (Sorokin et al. 2006) [barre 1µm].

II.6 Archées halophiles

Les archées halophiles sont des micro-organismes extrémophiles prospérant dans des milieux hypersalins où la concentration en sels est très élevée. Elles appartiennent au domaine des archées, au phylum des *Nanohaloarchaeota* ou au phylum des *Euryarchaeota*, et à la classe des *Halobacteria* (Oren 2015, Ventosa et al. 2015). Des études phylogénétiques récentes sur de nombreux génomes d'archées halophiles de la classe des *Halobacteria* ont permis de définir deux nouveaux ordres d'archées halophiles, les *Natrialbales* et les *Haloferacales* comportant respectivement les familles *Natrialbaceae*, *Haloferacaceae* et *Halorubaceae*, en plus de l'ordre *Halobacteriales* qui comporte maintenant les familles *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* et *Halococaceae* (Gupta et al. 2015, 2016) (Tableau 1). Ces dernières années ont vu la description de nombreux nouveaux genres et espèces d'archées halophiles. En juin 2016, on peut recenser 56 genres et 229 espèces approuvées par le comité international sur la systématique des procaryotes (ICSP). Plus de la moitié de ces genres et espèces ont été décrits depuis 2010. Une grande diversité d'espèces a été détectée dans différents environnements hypersalins comme les sédiments des lacs salins, les lacs alcalins, les marais salants et la Mer Morte et les aliments salés (Oren 2015, Ventosa et al. 2015). Ces micro-organismes halophiles exigent une concentration minimale en NaCl de 90 g.L⁻¹ pour leur croissance et sont capables de se multiplier de façon optimale à de fortes concentrations en NaCl pouvant atteindre 350 g.L⁻¹ (Oren 2002d). Les premières souches d'archées halophiles décrites appartenaient aux genres *Halobacterium*, *Halorubrum* et *Halococcus*. Les archées halophiles sont caractérisées par une grande variété morphologique ce qui suggère l'existence de mécanismes de morphogénèse (Fendrihan et al. 2012, Oren 2013). On distingue les archées en formes classiques de bâtonnets comme *Halobacterium*, ovoïdes comme

Halococcus (taille entre 0,6 et 1,5 μm) ou pléomorphiques comme *Haloferax* et *Halorubrum* (Eglert et al. 1992). D'autres archées présentent des formes atypiques sous forme de disques, de polygones, de tétrades ou sous forme carrée comme *Haloquadratum walsbyi* (Bolhuis et al. 2004) (Figure 13).

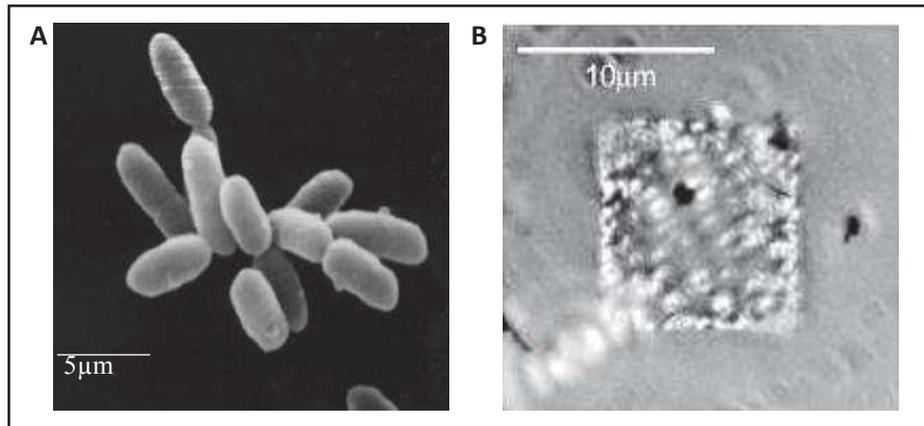


Figure 13. Diversité morphologique des archées halophiles extrêmes : **A** : *Halobacterium salinarum* de forme bacillaire (<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Halobacterium>) [barre 5 μm] et **B** ; *Haloquadratum walsbyi* de forme carrée isolée à partir d'une sebkha dans le Sinaï en Egypte, [barre 10 μm] (Ventosa, 2006).

Tableau 1. Classification phylogénétique des archées halophiles sur la base des analyses de l'ARNr 16S et des séquences de protéines conservées (Gupta et al. 2015, 2016).

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Références		
Euryarchaeota	Halobacteria	Halobacteriales	<i>Haloarculaceae</i>	<i>Halapricum</i>	Song et al., 2014		
				<i>Haloarcula</i> T	Torreblanca et al., 1986		
				<i>Halomicroarcula</i>	Echigo et al., 2013		
				<i>Halomicrobium</i>	Oren et al., 2002		
				<i>Halorhabdus</i>	Waino et al., 2000		
				<i>Halorientalis</i>	Cui et al., 2011		
				<i>Halosiccatus</i>	Mehrshad et al., 2016		
			<i>Halosimplex</i>	Vreeland et al., 2002			
			<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Haladaptatus</i>	Savage et al., 2007		
				<i>Halalkalicoccus</i>	Xue et al., 2005		
				<i>Halarchaeum</i>	Minegishi et al., 2010		
				<i>Haloarchaeobius</i>	Makhdoumi-Kakhki et al., 2012a		
				<i>Halobacterium</i> T	Skerman et al., 1980		
				<i>Halocalculus</i>	Minegishi et al., 2015		
				<i>Halomarina</i>	Inoue et al., 2011		
				<i>Halorubellus</i>	Cui et al., 2012		
				<i>Halorussus</i>	Cui et al., 2010a		
				<i>Halovenus</i>	Makhdoumi-Kakhki et al., 2012b		
				<i>Natronoarchaeum</i>	Shimane et al., 2010		
				<i>Natronomonas</i>	Kamekura et al., 1997		
				<i>Salarchaeum</i>	Shimane et al., 2011		
		<i>Salinarubrum</i>	Cui et Qiu, 2014				
		<i>Halococcaceae</i>	<i>Halococcus</i> T	Skerman et al., 1980			
		Haloferacales	<i>Haloferacaceae</i>	<i>Halobellus</i>	Cui et al., 2011c		
				<i>Haloferax</i> T	Torreblanca et al., 1986		
				<i>Halogeometricum</i>	Montalvo-Rodriguez et al., 1998		
				<i>Haloparvum</i>	Chen et al., 2016		
				<i>Halopelagius</i>	Cui et al., 2010c		
				<i>Haloplanus</i>	Elevi Bardavid et al., 2007		
				<i>Haloquadratum</i>	Burns et al., 2007		
			<i>Halorubraceae</i>	<i>Halosarcina</i>	Savage et al., 2008		
				<i>Halanaeroarchaeum</i>	Sorokin et al., 2016		
				<i>Halobaculum</i>	Oren et al., 1995		
				<i>Halobium</i>	Mori et al., 2016		
				<i>Halogramum</i>	Cui et al., 2010b		
				<i>Halohasta</i>	Mou et al., 2012		
				<i>Halolamina</i>	Cui et al., 2011b		
				<i>Halonotius</i>	Burns et al., 2010		
				<i>Halopenitus</i>	Amoozegar et al., 2012		
				<i>Halorubrum</i> T	McGenity et Grant, 1995		
				<i>Salinigranum</i>	Cui et Zhang, 2014		
				<i>Natrialbales</i>	<i>Natrialbaceae</i>	<i>Halobiforma</i>	Hezayen et al., 2002
						<i>Halopiger</i>	Gutierrez et al., 2007
<i>Halostagnicola</i>	Castillo et al., 2006b						
<i>Halobium</i>	Song et al., 2016						
<i>Haloterrigena</i>	Ventosa et al., 1999						
<i>Halovivax</i>	Castillo et al., 2006a						
<i>Natrialba</i> T	Kamekura et Dyll-Smith, 1995						
<i>Natribaculum</i>	Liu et al., 2015						
<i>Natrinema</i>	McGenity et al., 1998						
<i>Natronobacterium</i>	Tindall et al., 1984						
<i>Natronococcus</i>	Tindall et al., 1984						
<i>Natronolimnobius</i>	Itoh et al., 2005						
<i>Natronorubrum</i>	Xu et al., 1999						
<i>Salinarchaeum</i>	Cui et al., 2011a						

T : Genre ayant servi à définir la famille.

La structure de leur paroi et de leur membrane cellulaire est une des caractéristiques qui distingue les archées des bactéries. La caractérisation de la paroi cellulaire des archées est d'une importance capitale pour identifier leurs interactions au sein de leur milieu naturel. La plupart des archées possèdent une couche protéique de surface ou couche S (S-Layer), qui sert à la protection des cellules contre le stress osmotique, les perturbations du pH et les prédateurs (Albers et Meyer 2011). La première couche S a été identifiée chez *Hbt. salinarum* en 1956. Cette couche S a été ensuite observée chez de nombreux genres d'archées halophiles, à l'exception du genre *Halococcus* (Albers et Meyer 2011). Dans certains cas, la paroi cellulaire des archées est constituée uniquement de la couche S. Dans d'autres cas, la paroi cellulaire est constituée de plusieurs polymères, y compris des polysaccharides, les pseudomuréines et les méthanocondroïtines (Albers et Meyer 2011). La paroi cellulaire des archées halophiles à couche S est souvent dotée d'une seule couche de protéines ou glycoprotéines externes (Albers et Meyer 2011). Le pseudopeptidoglycane ou pseudomuréine, est un composant de la paroi cellulaire de certaines archées, d'une épaisseur de 15 à 20 nm et est similaire au peptidoglycane bactérien. Contrairement aux peptidoglycanes des bactéries constitués par de l'acide N-acétylmuramique lié par une liaison osidique β -1,4 avec le N-acétylglucosamine, la pseudomuréine est composée de résidus de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyltalosaminuronique liés par une liaison osidique β -1,3 (Albers et Meyer 2011).

Dans le cas d'une souche d'archée halophile *Natronococcus occulatus*, qui se développe dans des conditions extrêmes jusqu'à 200 g.L⁻¹ de NaCl, et à pH 9,5, la paroi cellulaire se compose d'un polymère glutaminyglycane. Ce polymère est sous forme d'un squelette composé d'une chaîne de poly- γ -glutamine d'une longueur de 60 monomères, liée de façon covalente à deux oligosaccharides (Tindall et al. 1984). Une autre souche d'archée extrême d'*Halococcus*, possède une enveloppe cellulaire rigide, avec une couche homogène de 50 à 60 nm d'épaisseur, composée d'hétéropolysaccharides hautement sulfatés, dont les composants principaux sont le mannose, le glucose, la glucosamine, et l'acide glucosaminuronique, ainsi que des sucres aminés N-acétyl-osamine (Steber et Schleifer 1979, Schleifer et al. 1982). Une autre archée halophile très étudiée, *Hqr. walsbyi* qui tolère des concentrations en sel très élevées, est caractérisée par une enveloppe typique avec une couche S au-dessus de la membrane cytoplasmique. La capacité de cette souche à s'adapter à des conditions extrêmes comme des concentrations élevées en MgCl₂ allant jusqu'à 100 g.L⁻¹, est expliquée par la présence d'une protéine de surface, nommée halomucine constituée de 9159 acides aminés. L'halomucine représente la plus grosse protéine identifiée chez les archées jusqu'à présent (Ashiuchi et Misono 2002, Bolhuis et al. 2006). Les archées possèdent des flagelles et des

pilis, qui leur permettent de se déplacer dans leur milieu naturel, d'échanger des éléments nutritifs et de se fixer. D'autres particules connues sous le nom de hamus, formées d'une structure hélicoïdale permettent aux cellules de se lier les unes aux autres (Albers et Meyer 2011).

Le caractère le plus distinctif des membranes des archées halophiles est la nature de leurs lipides. Ces lipides sont constitués par une bicouche ou une monocouche d'éthers d'isoprényl-L-glycérol qui forment une matrice dans laquelle les différentes protéines flottent. Ces lipides présentent des chaînes d'acides gras ramifiés liés au glycérol par des liaisons éther plus stables que les liaisons ester présentes chez les bactéries (Kates 1978, 1996, Konings et al. 2002). La composition des lipides membranaires de deux souches d'*Halorubrum* a été déterminée. Ils sont constitués par du phosphatidylglycérol, du phosphate d'ester méthylique de phosphatidylglycérol, du sulfate de phosphatidylglycérol et du mannosyle glucosyle diéther sulfaté (Corral et al. 2016). Des études sur les composants de la membrane chez les archées ont également montré la présence de vitamines MK8 et de squalènes. Les principaux lipides polaires sont les phosphatidylcholines, les esters méthyliques, les glycérophosphates, les phosphatidylglycérosulfates, les phosphatidyl-glycérols, les lipides sulfatés et les glycosyldiéthers (Lobasso et al. 2008). D'autres études récentes sur la composition des lipides membranaires chez les souches méthanogènes halophiles *Methanomassilicoccus luminyensis*, ont montré la présence de lipides à la base de glycérol diéther sesterpanyl-phytanyle qui ont été identifiées précédemment uniquement chez les archées halophiles. Ces lipides sont, constituées surtout par des groupes glucosidiques (heptose) ou des quinones ou des méthanophénazines (Becker et al. 2016). De plus, la présence de tétraéthers de lipides dans lesquels le glycérol est remplacé parfois par du butane ou du pentanetriol a été observée chez *M. luminyensis* (Becker et al. 2016). Chez *Hqr. walsbyi*, on observe des granules de polyhydroxy-butyrates (Walsby 1980). De plus, la glycolcardiolipine a été détectée dans l'extrait lipidique d'*Haloquadratum* (Hsu et al. 2015).

Les archées halophiles se distinguent également des bactéries par la présence de pigments membranaires rouge-orangé de type caroténoïdes (bacteriorubérines, bactériorhodopsines, halorhodopsines, β -carotènes). Ces pigments jouent un rôle important dans la protection des cellules contre les rayonnements solaires et les formes réactives de l'oxygène comme nous l'avons vu précédemment (Oren et Rodríguez-Valera 2001, Calegari-Santos et al. 2016). En dépit de leurs environnements hypersalins, les archées halophiles sont différentes dans leurs besoins nutritionnels et leurs voies métaboliques. Par exemple la

croissance d'*Hfx. volcanii* et *Natronomonas pharaonis* nécessite un milieu de culture simple (Kauri et al. 1990, Falb et al. 2005). Par contre, la croissance d'*Hbt. salinarum* exige un milieu nutritionnel complexe, riche en acides aminés et en cofacteurs (acide folique, biotine, thiamine) (Oesterhelt et Stoeckenius 1973, Grey et Fitt 1976, Oren 2002b, c). Cependant, la majorité des archées halophiles sont des chimioorganohétérotrophes aérobies qui utilisent les composés organiques produits par les producteurs primaires comme l'algue *Dunaliella* (Adl et al. 2005). Ainsi, *Hfx. volcanii* est capable de croître sur du glycérol et des acides organiques (Kauri et al. 1990). D'autres archées halophiles sont capables de se développer en condition d'anaérobiose, en utilisant différents accepteurs d'électrons alternatifs tels que le nitrate, le fumarate, la cholate, le diméthylsulfoxyde, le sulfure et la triméthylamine (Torregrosa-Crespo et al. 2016). A titre d'exemple, les souches *Hfx. mediterranei* et *Haloferax denitrificans* sont capables de croître en utilisant la dénitrification ou la voie de respiration des nitrates (Torregrosa-Crespo et al. 2016). De plus les souches d'archées halophiles peuvent se développer par autotrophie grâce aux bacteriorhodopsines, protéines membranaires, qui fonctionnent en utilisant l'énergie lumineuse pour générer un gradient des protons qui sert à la synthèse d'ATP via l'ATPase membranaire. Ces protéines ont été initialement identifiées dans la membrane pourpre de la souche d'archée halophile *Hbt. salinarum* (Oren 1994) mais existent chez d'autres archées halophiles comme *Hqr. walsbyi* (Hsu et al 2015).

D'autres archées halophiles sont capables de produire l'acétate, le lactate et le pyruvate (Tomlinson et Hochstein 1976, Oren et Gurevich 1995, Oren et al. 1995). Plusieurs genres d'archées halophiles comme *Haloarcula*, *Halococcus* et *Haloferax* peuvent utiliser l'acétate en tant que source unique de carbone et d'énergie (Oren 1994). Certaines archées halophiles se développent mieux sur des acides aminés. C'est le cas d'*Halobacterium* qui est capable, en condition d'anaérobiose et à l'obscurité, d'utiliser l'arginine en tant que source de carbone, d'azote et d'énergie selon la voie de l'arginine désaminase (Hartmann et al. 1980, Ruepp et Soppa 1996).

Les milieux hypersalins sont également colonisés par des méthanogènes halophiles. La majorité de ces méthanogènes sont capables de se développer à des concentrations en sel de 100 g.L⁻¹. Ils ont été isolés à partir de sédiments des lacs salés (MacGenity 2010, Andrei et al. 2012). La plupart des méthanogènes halophiles appartiennent à la famille *Methanosarcinaceae* (Oren 2014). Ces méthanogènes produisent de l'énergie à partir d'acides organiques comme l'acétate, le butyrate ou le CO₂ (Oren 2014). *Methanocalculus* de la famille *Methanocalculaceae* est la seule archée méthanogène halotolérante décrite comme

hydrogénotrophe. Les archées de ce genre produisent du méthane par réduction du CO₂ à l'aide de H₂ qu'elles utilisent comme donneur d'électrons (Zhilina et al. 2013).

Les archées méthanogènes les plus connues appartiennent à la famille *Methanosarcinaceae* et sont *Methanohalobium*, *Methanohalophilus* et *Methanosalsum*. L'archée méthanogène la plus halophile, qui tolère des concentrations en NaCl allant jusqu'à 300 g.L⁻¹, est *Methanohalobium evestigatum*. Elle a été isolée du lac salé Silvash en Ukraine (Zhilina et al. 2013). Le genre *Methanohalophilus* comprend des halophiles halotolérantes, telles que *Methanohalophilus mahii* isolée du Grand Lac salé dans l'Utah (Paterek et Smith 1988), *Methanohalophilus euhalobius* isolée à partir d'un gisement de pétrole en Russie (Lui et al. 1990), *Methanohalophilus halophilus* isolée de la Baie Shark en Australie (Wilharm et al. 1991) et *Methanohalophilus portucalensis* isolée d'une saline au Portugal (Boone et al. 1993). Récemment, des études ont examiné la modification de la phosphorylation des protéines qui contrôlent l'émission de méthane et jouent un rôle crucial chez les méthanogènes et l'osmoadaptation des méthanoarchées. Elles ont un impact sur la production de biogaz ou la réduction de l'émission de méthane en réponse au dérèglement climatique (Wu et al. 2016). Une autre étude a identifié un nouvel ordre de méthanogènes *Methanomassiliicoccales* par l'étude de leur composition en lipides membranaires (Becker et al. 2016).

En ce qui concerne les éléments génétiques, les archées halophiles renferment un génome constitué d'un chromosome circulaire et de gènes supplémentaires localisés sur des plasmides (Koonin et Wolf 2008). Les archées possèdent des plasmides soit sous forme cryptique portant un gène unique soit sous forme de mégaplasmides, des réplicons secondaires en plus du chromosome (Pfeiffer et al. 2008, Soppa et al. 2008). En particulier, les archées renferment un grand nombre et une grande variété d'éléments transposables de séquences d'insertion et d'éléments transposables répétés et inversés (Filee et al. 2007). Ces éléments jouent un rôle primordial dans le réarrangement de gènes dans les génomes des archées halophiles. Les premiers événements de transposition ont été mis en évidence chez *Hbt. salinarum* et *Hfx. volcanii* (Filee et al. 2007). Les plasmides des archées halophiles présentent des interactions dynamiques avec les chromosomes en raison de la présence d'un grand nombre d'éléments de séquences d'insertions. Ces plasmides existent sous forme épisomique ou intégrés dans les chromosomes principaux (Norais et al. 2007, Hawkins et al. 2013). Les interactions hôte-plasmide peuvent conduire à des échanges de fragments de l'information génétique. Deux réplicons ont été déterminés pour deux plasmides pHH1 et

pNRC100 impliqués dans la synthèse des vacuoles de gaz chez *Halobacterium* (Pfeifer et Ghahraman 1993, Ng et DasSarma 1993). D'autres protéines de réplication ont été identifiées comme RepH chez la plupart des archées halophiles (Wang et al. 2015), comme *Haloarcula hispanica* (Wu et al. 2012) et *Halobacterium halobium* (Ng et Dassarma 1993). Deux chromosomes et sept plasmides ont été identifiés chez *Har. marismortii* qui se différencient selon le contenu génétique des plasmides (Baliga et al. 2004).

Seulement quelques plasmides des archées halophiles ont des fonctions connues comme les mégaplasmides portant des gènes responsables de la formation des vacuoles de gaz et capables de se propager d'un hôte à un autre. La plupart des plasmides ont des fonctions inconnues, à l'exception de quelques fonctions putatives qui ont été déduites à l'aide d'analyses bioinformatiques. Les petits plasmides semblent être cryptiques car ils codent des protéines ayant des rôles putatifs dans leur propre réplication, ségrégation et régulation des gènes (Wang et al. 2015).

Le génome des archées est compacté soit à l'aide de protéines de type histones, comme chez les eucaryotes ou par des protéines associées au nucléoïde comme chez les bactéries. La chromatine joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et les facteurs de transcription des archées interviennent dans l'organisation de cette chromatine (Wang et al. 2015). Chaque génome d'archée présente au moins deux types de protéines associées à la chromatine avec des propriétés architecturales différentes. La famille la plus étudiée est celle de la super famille Alba, qui est presque universelle chez toutes les archées. L'Alba sous forme de dimères, d'homodimères ou d'hétérodimères, interagit avec l'ARN, ainsi qu'avec l'ADN double brin, ce qui suggère une fonction dans le métabolisme de l'ARN (Peeters et al. 2015). Chez les méthanogènes halophiles les protéines Alba sont moins abondantes et se lient spécifiquement à des séquences d'ADN double brin (Peeters et al. 2015). Chez les *Euryarchaeaota*, les histones sont les plus abondantes des protéines associées à la chromatine. La plupart des espèces possèdent dans leur génome deux homologues d'histones (H3 et H4), qui forment une structure de nucléoprotéines. Les histones des archées ont une légère préférence pour des séquences alternant des dinucléotides ou trinucleotides riches en AT et GC. La structure du nucléosome est tétramérique, composée par des hétérodimères ou des homodimères. Chez *Hfx. volcanii* la chromatine a une structure uniforme avec des tétrasomes régulièrement espacés (Peeters et al. 2015).

III. Composés d'intérêts produits par les archées halophiles

Les archées halophiles sont des micro-organismes qui sont capables de survivre dans des environnements variés à de fortes concentrations en sel comme les lacs salés, la Mer Morte et le Grand Lac Salé dans l'Utah (Oren 2014). Ces archées halophiles, ainsi que quelques espèces bactériennes ont développé différentes stratégies pour croître dans des environnements hostiles (Bardavid et Oren 2012). Par rapport aux autres micro-organismes, les archées halophiles sont peu exploitées pour un intérêt biotechnologique à l'exception de quelques composés produits par ces archées, comme les photorécepteurs, les bactériorhodopsines des *Halobacterium*, les polysaccharides, des enzymes hydrolytiques, des antioxydants et des peptides antimicrobiens.

III.1 Photorécepteurs

Les principaux photorécepteurs rencontrés chez les archées sont les bactériorhodopsines. Ce sont des protéines qui ont été découvertes au début des années 1970 chez les archées halophiles, en particulier au niveau de la membrane pourpre chez *Hbt. salinarum* (Oesterhelt et al. 1991). La structure tridimensionnelle de la bactériorhodopsine a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Cette protéine comporte 248 acides aminés organisés en 7 hélices α et renferme un cofacteur, le rétinal lié à la lysine 216 (Figure 14) (Kimura et al. 1997).

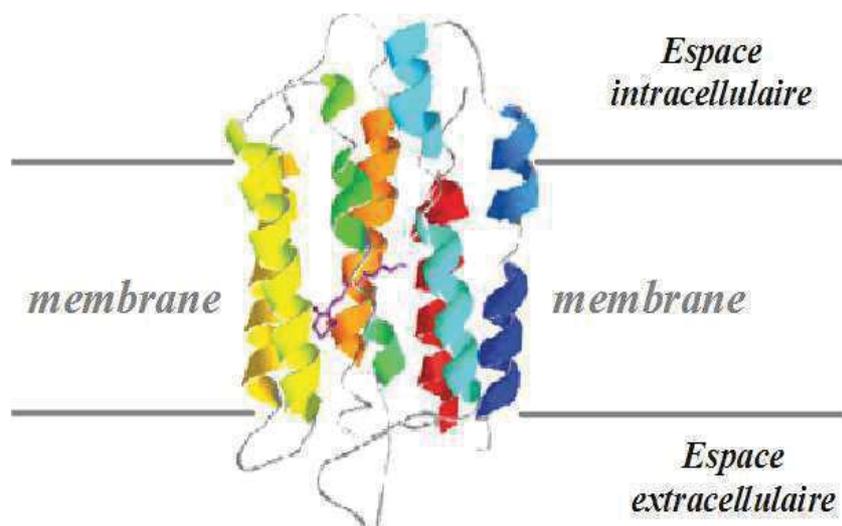


Figure 14. Structure tridimensionnelle de la protéine rétinal, bactériorhodopsine d'une souche d'archée halophile, *Halobacterium salinarum* (Kimura et al. 1997).

Les bactériorhodopsines ont pour fonctions essentielles la conversion photochimique et la photochromie et jouent un rôle de pompe à protons. Elles possèdent un chromophore qui permet la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, et qui absorbe à une longueur d'onde de 560 nm. Ce phénomène de conversion énergétique par les bactériorhodopsines a été observé pour la première fois par Danon et Stoeckenius en 1974 (Danon et Stoeckenius 1974). A l'obscurité, le rétinol est dans la configuration *trans*, et la base de Schiff est protonée. Suite à l'absorption de la lumière, le rétinol s'isomérisé en configuration 13-*cis* et la base de Schiff est déprotonée (Lanyi 2000). Les protons passent à travers la membrane plasmique et sortent à l'extérieur de la cellule. La base de Schiff repasse alors de nouveau sous sa forme protonée en prélevant un proton dans le cytoplasme, et le rétinol revient à la forme *trans* (Lanyi 2000).

Un intérêt appliqué possible de la bactériorhodopsine réside dans la densité importante de stockage qu'elle peut générer. Les bactériorhodopsines peuvent être utilisées pour le stockage d'images ou impliquées dans la construction d'éléments bioélectroniques dans les mémoires informatiques et dans la fabrication de biopuces pour les ordinateurs (Oesterhelt et al. 1991, Oren 2002c, Oren 2002a). Des études ont montré qu'une légère modification de la séquence en acides aminés de la bactériorhodopsine entraîne une variété de nouveaux matériaux avec des propriétés optiques adaptées à des besoins particuliers, la reconnaissance de motifs halographiques et le stockage de données optiques (Hampp et al. 1992). La sélection d'une longueur d'onde et d'une durée d'excitation spécifiques grâce à l'addition de certains additifs chimiques rend possible le blocage du cycle photochimique de la bactériorhodopsine, ce qui permet son utilisation pour l'enregistrement de l'information optique (Bandrovskaya et al. 1997). Les archées halophiles disposent d'autres photosystèmes comme l'halorhodopsine, qui utilise aussi le rétinol comme cofacteur photosensible et permet le transport membranaire des ions Cl⁻ vers l'extérieur, en absorbant la lumière à une longueur d'onde autour de 570 nm (Oesterhelt 1995, Pelmont 1995). De plus, l'halorhodopsine permet aussi l'export d'ions Na⁺ du cytoplasme et la synthèse d'ATP (Lanyi et Schobert, 1983). D'autres capteurs photosensibles comme la rhodopsine sont impliqués dans le phototactisme positif pour la lumière verte et négatif pour la lumière bleue et l'UV. Cela permet aux cellules de se déplacer vers les sources des substances organiques et de recevoir de l'énergie lumineuse pour assurer la photophosphorylation et le fonctionnement de la bactériorhodopsine et l'halorhodopsine (Schimz et Hildebrand, 1979).

III.2 Exopolysaccharides et polyhydroxyalkanoates

Des composés d'intérêts produits par les archées halophiles comme les biopolymères offrent de nombreuses opportunités en matière de nouveaux matériaux (Charlesworth et Burns 2015). Ces biopolymères sont synthétisés naturellement par ces micro-organismes. Ils peuvent être produits par fermentation et être facilement purifiés. Deux types de biopolymères se distinguent en termes d'applications biotechnologiques, les exopolysaccharides (EPS) et les polyhydroxyalcanoates (PHA).

Les EPS sont des glucides de haut poids moléculaires produits par les archées et aussi par les bactéries. Ils sont sécrétés dans le milieu environnant et constituent une composante importante des polymères extracellulaires entourant la plupart des cellules d'archées et de bactéries. Ces composés jouent un rôle protecteur pour les micro-organismes producteurs contre les agressions du milieu environnemental comme la dessiccation, la prédation, le rayonnement UV, la salinité et les basses températures (Schaefer et al. 1996). La production d'EPS par les archées a été étudiée surtout chez les halophiles et les thermophiles (Poli et al. 2011). On rencontre des souches productrices d'EPS parmi les genres *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus* et *Halobacterium* (Anton et al. 1988, Parolis et al. 1996).

Ces molécules ont de nombreuses applications biotechnologiques et industrielles, en particulier dans l'industrie alimentaire en tant qu'agents gélifiants ou émulsifiants. Par leurs propriétés, ils améliorent la texture des produits laitiers fermentés, et confèrent des propriétés immunostimulantes, antitumorales, ou diminuent les effets nuisibles du cholestérol (Van Kranenburg et al. 1999). Parmi les composés constituant les EPS identifiées chez *Hfx. mediterranei*, on peut citer le glucose, le mannose, le galactose, des aminoglucides et les acides uroniques (Lee et al. 1997, Ruas-Madiedo et Reyes-Gawilan 2005). La pollution par les métaux lourds représente un véritable problème environnemental en raison de leur toxicité élevée. De ce fait, la biosorption des métaux par les micro-organismes, par l'intermédiaire de leurs EPS représente une méthode de dépollution alternative aux moyens chimiques et à faibles coûts. Puisque les archées halophiles qui exigent des concentrations élevées en sel pour leur croissance sont considérées comme non pathogènes, leur utilisation est une alternative sûre pour éliminer les composés toxiques dans des milieux fortement concentrés en sel. La production d'EPS par *Haloferax* a été utilisée pour éliminer les métaux lourds dans des environnements hypersalins par le processus de biosorption (Popescu et Dumitru 2009). La capacité des souches à éliminer les métaux lourds peut être stimulée par l'ajout de glucose pour la biosorption de Cr, Zn, et Ni (Popescu et Dumitru 2009).—La synthèse des EPS est

généralement influencée par la composition du milieu de culture, en particulier les sources de carbone et d'azote, les sels minéraux, les oligoéléments. Les conditions de fermentation incluant le pH, la température, la concentration en O₂ et l'agitation influencent également la production des EPS (Nicolaus et al. 2010). Chez les archées halophiles, l'extrait de levure, le glucose, l'amidon, les acides casaminés, l'acétate et l'acide butyrique favorisent la production d'EPS (Poli et al. 2011).

D'autres composés comme les PHA endocellulaires, qui sont des polyesters biodégradables composés d'acides gras hydroxylés, sont biosynthétisés et stockés sous forme d'inclusions lipidiques. Ces PHA sont insolubles dans l'eau et sont utilisés par la cellule en tant que moyen de réserve et de stockage de carbone et d'énergie. Les PHA sont produits par différentes archées halophiles appartenant aux genres *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus*, *Haloquadratum*, *Halorubrum*, *Natrinobacterium*, *Natronococcus* et *Halobacterium* (Nicolaus et al. 1999, Waino et al. 2000, Antunes et al. 2008). Ces PHA sont produits en grandes quantités par les archées halophiles. Ils sont utilisés comme polymères biodégradables pour la réalisation de matériaux d'emballage pour les produits alimentaires. Ils servent également dans le domaine médical pour la production de matériaux résorbables, de matériaux de structure, ou d'implants (Poli et al. 2011). Biodégradables, biocompatibles et résistants à l'eau les PHAs peuvent être utilisés en remplacement de matières thermoplastiques. Ils ont donc un intérêt médical et pharmacologique par leur utilisation comme médicaments ou dans la régénération osseuse (Poli et al. 2011, Salgaonkar et al. 2013). Ces composés présentent également de nombreux avantages au niveau de leur production. Ils sont produits essentiellement par *Har. marismortui* et *Hfx. mediterranei*, en présence de glucose et d'amidon. *Har. marismortui* est capable d'accumuler les PHA jusqu'à 21% de matière sèche cellulaire lorsque ces archées sont cultivées dans un milieu minimal additionné de glucose (Han et al. 2009). *Hfx. mediterranei* peut accumuler environ 6 g de PHA (60% de la biomasse totale en poids sec) par litre de culture additionné d'amidon (Poli et al. 2011, Lui et al. 2015). L'isolement des PHA est facilité par la vulnérabilité des cellules d'archées halophiles en présence d'eau pure qui permet facilement leur libération dans le milieu extracellulaire (Poli et al. 2011, Salgaonkar et al. 2013).

III.3 Enzymes hydrolytiques

Les archées constituent aussi une source extrêmement variée d'enzymes hydrolytiques intéressantes, comme les amylases, les nucléases, les protéases et les lipases (Oren 2002c).

Ces enzymes sont de bons candidats pour des applications industrielles du fait de leur capacité à fonctionner en présence de fortes concentrations en sel, de tolérer des températures relativement élevées, des variations de pH, la présence de métaux lourds et de rayonnements ionisants UV (Bertoldo et Antranikian 2000). L'utilisation de ces molécules est particulièrement importante car elles sont caractérisées par des propriétés structurales spécifiques, une activité élevée, un large spectre d'utilisation, une spécificité de substrat et surtout une stabilité et une résistance à la dénaturation exceptionnelle conduisant à un maintien de leur fonctionnalité dans des conditions même défavorables. A des concentrations limitées en sel, la structure et la fonction changent pour la plupart de ces enzymes. Les haloenzymes sont caractérisés par la présence de résidus acides ce qui leur confère une charge négative qui leur permet d'hydrater les ions et réduire l'hydrophobie de surface et l'agrégation dans des concentrations élevées en sel (Amoozegar et Sinoosi 2015) (voir aussi le paragraphe II.3.1, p.17). De plus, ces enzymes halophiles actives dans des milieux organiques peuvent être utilisées comme biocatalyseurs en présence de solvants organiques (Balasubramanian et al. 2002).

* *Les lipases et les estérases.* Les enzymes hydrolytiques les plus étudiées sont les lipases et les estérases. Ces haloenzymes, grâce à leur mécanisme d'action et leur spécificité des substrats, peuvent agir en tant qu'hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et en glycérol. Plusieurs études se sont intéressées à la production et à la caractérisation de lipases et d'estérases des archées halophiles, cependant l'intérêt biotechnologique de ces enzymes a été mieux étudié chez les bactéries halophiles (Ozcan et al. 2009, Litchfield 2011, Del Campo et al. 2015, Ozgen et al. 2016). Des études ont permis d'isoler de nombreuses souches d'archées halophiles productrices de lipases comme des souches d'*Har. marismortui*, *Natronococcus* sp. TC6, et *Halobacterium* sp. NRC-1 (Del Campo et al. 2015). A titre d'exemple, on peut citer la lipase qui hydrolyse l'huile d'olive produite par la souche d'archée halophile *Natronococcus* sp. isolée de la Sebkha El Golea en Algérie (Boutaiba et al. 2006). Ces lipases présentent une activité optimale à une concentration en NaCl de 200 à 300 g.L⁻¹ M et un pH optimal entre 8 et 9. D'autres études ont testé l'activité de lipases et d'estérases d'une souche d'*Har. marismortui* et ont montré une activité lipase sur les triglycérides et une activité estérase sur les esters *p*-nitrophényles. Ces enzymes fonctionnent avec une concentration optimale de 30 à 300 g.L⁻¹ de NaCl (Camacho et al. 2009). D'autres études ont été effectuées sur les carboxylestérases de la souche *Halobacterium* sp NRC1 qui ont un intérêt pour l'industrie (Litchfield 2011).

* *Les amylases.* D'autres enzymes halophiles comme les amylases ont été caractérisées chez *Hfx. mediterranei* (Perez-Pomares et al. 2003). Leurs conditions de production ont été optimisées, comme la concentration en NaCl, le pH et la température. L'activité maximale de ces enzymes a été obtenue pour une concentration de 200 g.L⁻¹ de NaCl, un pH entre 7 et 8, et une température entre 50 et 60 °C (Perez-Pomares et al. 2003). Ces enzymes ont pour rôle de catalyser la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables (Saxena et al. 2007). Les amylases produites par les archées halophiles interviennent dans la saccharification de l'amidon, les textiles, l'alimentation, le brassage et la distillation (Gupta et al. 2003). Les activités amylolytiques les plus élevées ont été retrouvées chez *Hfx. volcanii* (Kobayashi et al. 1994), *Haloferax* sp. HA10 (Bajpai et al. 2015), *Haloarcula* sp. (Fukushima et al. 2005), *Hfx. mediterranei* (Perez-Pomares et al. 2003) et *Haloterrigena turkmenica* (Santorelli et al. 2016).

* *Les protéases.* Parmi les enzymes hydrolytiques les plus connues, les protéases catalysent les réactions d'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des protéines et des peptides avec différents degrés de spécificité. En dépit de leur diversité, les protéases peuvent avoir une action spécifique, qui est à l'origine de leur exploitation et leur application biotechnologique (Litchfield 2011). Ces enzymes sont utilisées dans les industries alimentaires, les produits laitiers, dans les industries de tannage de cuir, comme détergents et aussi pour la gestion des déchets (Karbalaie-Heidari et al. 2009). Des études ont été effectuées sur la caractérisation et l'identification des protéases extracellulaires chez des archées halophiles comme *Hbt. salinarum*, *Hbt. cultirubrum* (Ventosa et Oren 1996), *Natrialba asiatica* (Kamekura et al 1992), *Nab. magadii* (D'Alessandro et al. 2007) et *Halorubrum* (Dammak et al. 2016), qui constituent une source potentielle d'enzymes stables. D'autres études ont montré que ces protéases sont actives à des concentrations optimales en NaCl comprises entre 200 et 300 g.L⁻¹ (Lanyi 1974). De plus ces études ont suggéré que l'activité des protéases halophiles de deux souches d'archées halophiles *Nab. magadii* et *Halogeometricum borinquense* dépend de la présence de solutés compatibles tels que la betaïne, le saccharose, le mannitol et le glycérol (Giménez et al. 2000, Vidyasagar et al. 2006).

Une autre souche *Halobacterium* sp. 1 a été examinée pour sa capacité à produire une protéase avec une grande stabilité thermique (résistance jusqu'à 80°C) et son importance dans l'accélération du processus de fermentation de sauce de poisson (Alkolkar et Desai. 2010). Une sérine-protéase a été identifiée chez une souche *Hfx. mediterranei* et appelée halolysine.

Le gène codant l'halolysine a été isolé et cloné chez *Hfx. volcanii* en vue de sa surproduction (Kamekura et al 1992).

III.4 Antioxydants

La coloration rouge développée dans les environnements hypersalins est causée par les archées halophiles des ordres *Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales* appartenant à la classe *Halobacteria* riche en pigments caroténoïdes. Ces pigments sont fortement demandés en tant qu'agents anti-oxydants qui ont un effet bénéfique dans la lutte contre les radicaux libres (Ye et al. 2008). Une étude s'est portée sur la caractérisation et la purification des caroténoïdes produits par les souches d'archées halophiles *Hbt. salinarum*, *Halococcus morrhuae* dans le but d'identifier la capacité antioxydante des extraits de caroténoïdes de ces 2 souches. Cette étude suggère que la capacité antioxydante des deux souches d'archées halophiles est beaucoup plus importante que pour la bactérie halophile *Thermus filiformis*. Cette différence est liée à la présence de caroténoïdes acycliques avec une double liaison et des groupes hydroxyles (Mandelli et al. 2012). Les caroténoïdes sont des éliminateurs des espèces réactives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2) et les radicaux libres (Miller et al. 1996, Chisté et al. 2011). Ces caroténoïdes ont de nombreuses applications : ils sont utilisés comme des agents de coloration, dans les denrées alimentaires et les cosmétiques, ou comme additifs alimentaires. Ils sont aussi utilisés en médecine comme antioxydants, antitumoraux, agents de prévention des maladies cardiaques, précurseurs de la vitamine A ou activateurs de la production d'anticorps *in vitro*. D'autres applications industrielles en cosmétique, comme agents filtrants dans les crèmes solaires (Ye et al. 2008, Rodrigo-Banos et al. 2015) sont également à citer. Les caroténoïdes les plus explorés sont le β -carotène, les xanthophylles, l'astaxantine, la canthaxanthine et la lutéine (Vilchez et al. 2011, Mata-Gomez et al. 2014, Naziri et al. 2014). La plupart des caroténoïdes utilisés sont d'origine bactérienne (halophile ou non halophile), tandis que de nombreuses études ont été effectuées sur les pigments des archées halophiles mais leurs applications biotechnologiques restent encore peu explorées (Sui et al. 2014, Yang et al. 2015, Dela Vega et al. 2016).

III. 5 Antimicrobiens

A l'instar des bactéries ou des archées non halophiles, les archées halophiles sont aussi capables de produire une grande variété de substances antimicrobiennes, comme les dicétopipérazines (DCPs) (Tommonaro et al. 2012), les phénazines (Abken et al. 1998, Charlesworth et Burno 2015) et les halocines (Besse et al. 2015, Kumar et al. 2016, Quadri et

al. 2016). Les DCPs ont été identifiées chez une souche d'archée halophile *Haloterrigena hispanica* (Figure 15) (Tommonaro et al. 2012). Ces substances sont bien connues chez les bactéries, où elles sont produites par des voies enzymatiques non ribosomiques, la voie des synthèses de dipeptides cycliques (Belin et al. 2012). Les DCPs présentent une activité antibactérienne intéressante. Elles sont capables d'activer ou d'inhiber les systèmes de détection du quorum sensing des bactéries et archées. Ces systèmes sont utilisés par les micro-organismes comme mécanismes de communication lors de l'expression des gènes en présence d'une augmentation de la densité cellulaire. L'inhibition du quorum sensing par les DCPs est une solution pour le traitement potentiel contre des agents pathogènes, comme les infections par *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (Hentzer et al. 2003). Les DCPs provenant des archées peuvent aussi trouver des applications pour bloquer le quorum sensing et pour empêcher la croissance des biofilms (Lehtola et al. 2004, Raad et al. 2007, Schultz et al. 2011).

En plus de leurs activités antibactériennes, les DCPs peuvent présenter d'autres activités biologiques comme antifongiques, antivirales et anti-tumorales (Charlesworth et Burno 2015). Les archées halophiles extrêmes sont aussi capables de produire des peptides antimicrobiens nommés halocines, qui ont été découverts par Rodriguez-Valera *et al.* dans les années 1980. Ces molécules font l'objet d'une étude détaillée dans le paragraphe ci-dessous.

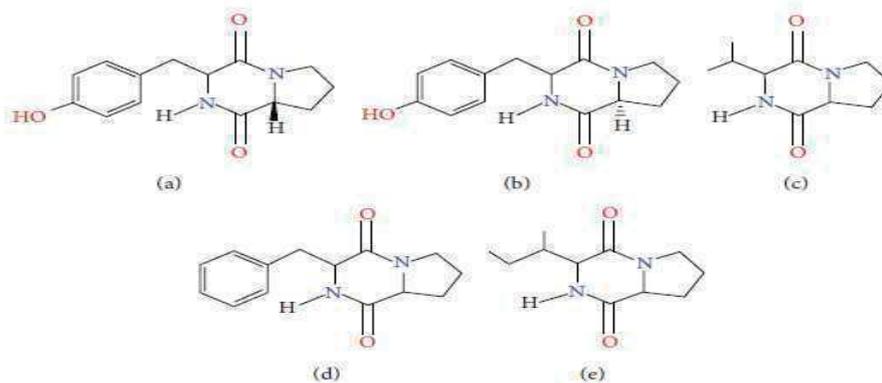


Figure 15. Structure des dicétopipérazines produites par l'archée halophile *Haloterrigena hispanica*. (a) Cyclo(D-prolyl-L-tyrosine), (b) cyclo(L-prolyl-L-tyrosine), (c) cyclo(L-prolyl-L-valine), (d) cyclo(L-prolyl-L-phénylalanine), et (e) cyclo(L-prolyl-L-isoleucine) (Charlesworth et Burno 2015).

IV. Peptides antimicrobiens

Depuis une vingtaine d'années, il a été montré que les peptides antimicrobiens (PAMs) représentent un élément clé du système immunitaire inné de tous les êtres vivants (Boman

1998, Lehrer et al. 1999, Lehrer et Ganz 1999). Ils ont été définis comme des substances naturelles constituées de séquences en acides aminés et agissant comme des antibiotiques contre les bactéries à Gram positif et/ou à Gram négatif, les virus et les champignons (Baker et al. 1993, Chinchar et al. 2004, Toke 2005). Ces peptides sont d'origine très variées, et on les retrouve dans les trois domaines du vivant, chez les bactéries (Duquesne et al. 2007, Aziz et al. 2016, Rashid et al. 2016), les archées (Besse et al. 2015, Quadri et al. 2016, Kumar et al. 2016), les plantes (Falcao et al. 2016, Sarma et al. 2016), les insectes (Tonk et Vilcinskas 2016, Wang et Wang 2016), les amphibiens, les poissons et les mammifères (De Smet et Contreras 2005, Bochenska et al. 2016, Han et al. 2016). Ces peptides ont été nommés selon leur domaine, eucaryocines produites par les eucaryotes, bactériocines produites par les bactéries et archaéocines produites par les archées. D'ailleurs, le terme archaéocine a été adopté pour distinguer les antimicrobiens peptidiques ou protéiques produits par les archées, de celles produits par les membres du domaine des bactéries (Price et Shand 2000).

IV.1 Peptides antimicrobiens des eucaryotes

La survie des eucaryotes dépend de leur capacité à se défendre face aux agressions des bactéries, des virus, des parasites ou autres pathogènes. Pour cela, les eucaryotes disposent de deux mécanismes d'immunité dites l'une innée et l'autre adaptative. Si l'immunité adaptative n'est rencontrée que chez certains vertébrés (gnathostomes), l'immunité innée se retrouve chez tous les vertébrés avec la production de molécules antifongiques, antibactériennes ou antivirales. Ces molécules naturelles, ou peptides antimicrobiens ont été découverts pour la première fois chez l'amphibien *Bombina variegata* (crapaud sonneur à ventre jaune). Ces PAMs ont été isolés à partir des sécrétions épidermiques et ont été nommés bombinines (Csordas et Michl 1970). Ce sont des peptides cationiques et amphiphiles, en raison de la présence de résidus arginine et lysine dans leurs séquences. Ils sont synthétisés par la voie ribosomique (Hancock et Chapple 1999). Certains PAMs sont issus du clivage protéolytique de protéines de masse moléculaire élevée (Andreu et Rivas 1998, Lehrer et Ganz 1999, Powers et Hancock 2003, Brogden 2005) et d'origine variée, comme l'hémoglobine, les histones ou l'hémocyanine chez les crustacés (Gifford et al. 2005, Cho et al. 2009) (Tableau 2). Les histones sont divisées en trois groupes, H1, H2A et H2B. Les peptides dérivés de l'histone H1 ont plutôt été isolés à partir de l'estomac, du foie du saumon *Salmo salar* en Atlantique et de l'intestin humain. Parmi ces peptides on note l'oncorhyncine II, HSDF-1 et SAMPH1. Les peptides dérivés de l'histone H2A, sont surtout trouvés chez le crapaud et la truite (Park et al. 1996, 1998). Ces peptides sont les buforine I, buforine II, l'hipposine I et la

parasine I. Pour le troisième type d'histone H2B, le peptide P3-A a été isolé à partir du foie de la poule *Gallus gallus* (Li et al. 2007). Des peptides résultant d'un clivage protéolytique ont été isolés à partir de l'hémoglobine humaine, des poissons ou des tiques. Ces peptides sont en majorité actifs contre les bactéries à Gram positif ou négatif. Trois types d'hémoglobines Hb α , Hb β et Hb γ peuvent conduire à des peptides antimicrobiens (Tableau 2) (Liepkie et al. 2003, Mak et al. 2004, Deng et al. 2009). L'hémocyanine, qui est l'équivalent de l'hémoglobine chez certains invertébrés comme les arthropodes et les mollusques, est également une source de peptides antimicrobiens. Des PAMs ont été isolés principalement à partir des crustacés, il s'agit de l'astacidine 1, et de PvHCt (Destoumieux-Garzon et al. 2001, 2016, Lee et al. 2003, Petit et al. 2016). D'autres peptides antimicrobiens proviennent du clivage de proenképhaline, des chromagranines et de l'ubiquitine (Goumon et al. 1996, Lugardon et al. 2002, Kim et al. 2007) ou des lactoferrines (Hunter et al. 2005).

Tableau 2. Origine, spectre d'activité et mode d'action de peptides antimicrobiens issus du clivage protéolytique de protéines des organismes supérieurs : l'hémoglobine, les histones et l'hémocyanine.

Protéines	Peptide antimicrobien	Origine	Spectre d'activité	Mode d'action	Références			
Hémoglobine	Hb α	Hb33-94	homme	bactéries à Gram négatif	ND	Deng et al, 2009		
		HbA 35-56	homme	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	ND	Mak et al, 2004		
		Hb 33-61	tiq (<i>Boophilus microplus</i>)	bactéries à Gram positif champignons	membrane cytoplasmique	Fogaoca et al, 1999		
		Hb 1-32	tiq (<i>Ornithodoros moubata</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	Nakajima et al, 2003		
	Hb β	hHEM- β	homme	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	membrane cytoplasmique	Liepke et al, 2003		
				<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
		HbB 115-146	homme	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	ND	Mak et al, 2004		
		Hb β P-1	poisson (<i>Ictalurus punctatus</i>)	bactéries à Gram négatif	ND	Ullal et al, 2003		
	Hb γ	hHEM- γ	homme	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	membrane cytoplasmique	Liepke et al, 2003		
				<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Histone	H1	oncorhynchine II	truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	membrane cytoplasmique	Fernandes et al, 2004		
		HSDF-1	saumon argenté (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	bactéries à Gram négatif	membrane cytoplasmique	Patrzykat et al, 2001		
		SAMP H1	saumon (<i>Salmo salar</i>)	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	ND	Luders et al, 2005		
	H2A	buforine I	crapaud (<i>Bufo bufo gargarizans</i>)	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif levures	ND	Park et al, 1996		
				buforine II	clivage invitro de la buforine	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif levures	se lie a l'ADN et a l'ARN	Park et al, 1996
						parasine I	poisson (<i>Parasilurus asotus</i>)	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif levures
		hipposine I	flétan (<i>hippoglossus hippoglossus L.</i>)	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	ND	Bikemo et al, 2003		
	Hémocyanine	PvHCt	crevette (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	astacidine 1	écrevisse (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	bactéries à Gram positif bactéries à Gram négatif	ND	Lee et al, 2003
				champignons filamenteux	ND	Destoumieux-Garzon et al, 2001		

Hb : hémoglobine, H : histone, ND : non déterminé

Généralement les PAMs des eucaryotes, mais également ceux des procaryotes, sont très hétérogènes en termes de structure et de modes d'action ce qui rend leur classification difficile. Cependant, plusieurs classifications ont été réalisées selon la structure, la longueur de la chaîne peptidique (Hancock 2001, Bulet et al. 2004). Trois classes ont été distinguées: (i) La première est constituée de PAMs de structure linéaire avec une conformation en hélice α , comme les magainines isolées chez les amphibiens (Bechinger et al. 1993, Bechinger et al. 1999) (Figure 16a) et les cécropines isolés chez les insectes et les mammifères (Berkowitz et al. 1990, Boman 1998, Powers et Hancock 2003).

(ii) Une deuxième classe renferme des PAMs de structure non linéaire stabilisée par des ponts disulfure, avec une structure en feuillet β , ou ceux avec une structure mixte hélice α / feuillet β (Bulet et al. 2004). A titre d'exemple, on peut citer les protégrines comportant une structure en feuillet β avec deux ponts disulfure, isolées à partir des leucocytes de porc (Yang et al. 2000), ou les défensines qui ont été isolées à partir des plantes, des insectes ou des mammifères, avec des structures variées (Wang 2014, Yi et al. 2014, Jurczak et al. 2015). Les défensines d'insectes comportent par exemple une structure en hélice α et feuillet β avec 3 ponts disulfures (Yi et al. 2014) (Figure 16b).

(iii) La troisième classe comporte les peptides de structure riche en acides aminés spécifiques, comme l'histatine, trouvée dans la salive humaine, qui est riche en histidines (29%) (De Smet et Contreras 2005, Sun et al. 2008) (Figure 16c). D'autres PAMs riches en tryptophane (40%) comme l'indolicidine bovine (Abel et al. 1995, Podorieszch et Huttunen-Hennelly 2010), ou riches en proline (25%) comme la drosocine de la drosophile (Dimarcq et al. 1988, Lele et al. 2015) ont été isolés.

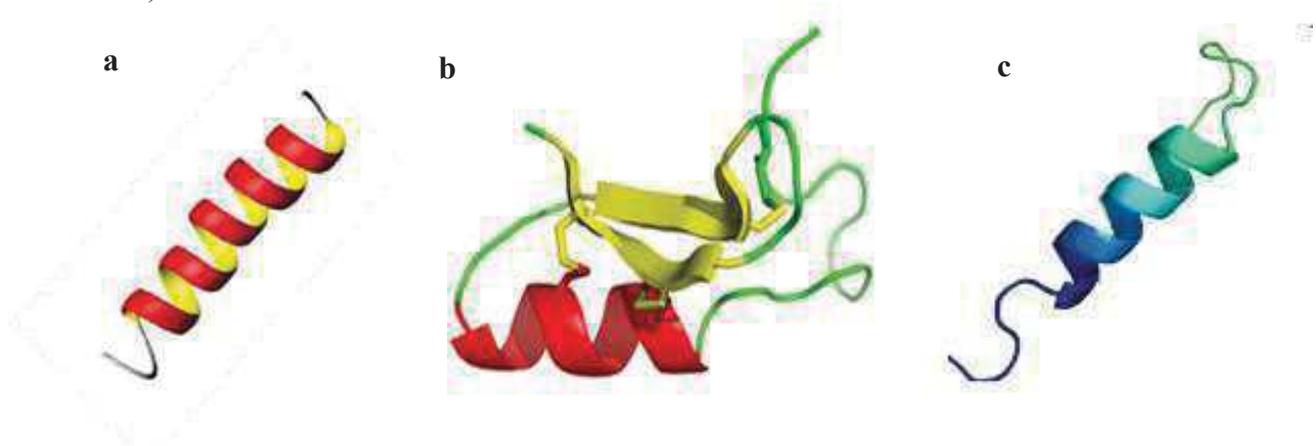


Figure 16. Structures tridimensionnelles de peptides antimicrobiens d'eucaryotes. **a** : la magainine 2 isolée de la grenouille *Xenopus laevis* (Gesell et al. 1997), **b** : la défensine isolée de l'insecte *Drosophila melanogaster* (Yi et al. 2014) et **c** : l'histatine isolée de la salive humaine (Khurshid et al. 2016).

Le mode d'action des PAMs dépend de la structure du peptide et aussi de la structure membranaire de la cellule cible. La majorité des PAMs interagissent avec la membrane cellulaire, cible majeure de ces antimicrobiens (Yang et al. 2014). D'autres PAMs agissent sur des cibles intracellulaires, telles que la synthèse d'ADN ou d'ARN et doivent donc traverser la membrane cellulaire (Yang et al. 2014). Par ailleurs, ces PAMs possèdent un large spectre d'activité et un mode d'action rapide et efficace. Ils interagissent facilement avec la membrane cellulaire cible grâce à leur caractère cationique et leur structure tridimensionnelle amphipathiques et grâce à la composition de la membrane plasmique qui présente une double

couche lipidique, constituée de phospholipides présentant un caractère amphiphile avec un pôle hydrophile orienté vers l'extérieur et un domaine hydrophobe, orienté vers l'intérieur (Yeaman et Yount 2003). Ces PAMs sont capables de distinguer entre les cellules hôtes et leurs cibles bactériennes pathogènes (Yeaman et Yount 2003) qui ne présentent pas la même charge. La fixation de ces peptides sur la membrane s'effectue par une attraction électrostatique ou grâce à la différence du potentiel transmembranaire (Matsuzaki et al. 1995). Les interactions électrostatiques se forment entre les PAMs et les phospholipides chargés négativement de la membrane de la bactérie à Gram négatif ou des acides lipoteichoïques dans le cas de bactéries à Gram positif (Jenssen et al. 2006). En effet, ces peptides s'accumulent à la surface cellulaire jusqu'à une concentration suffisante qui lui permettent d'interagir avec la membrane de la cellule cible (Zasloff, 1987) et d'exercer leur activité antibiotique. Puis, ces PAMs fixés à la membrane induisent une perturbation de la perméabilité membranaire de l'agent pathogène (Hécharad et Sahl 2002, Jenssen et al. 2006), soit par formation de pores à travers la membrane ce qui provoque l'entrée massive des éléments extracellulaires et la fuite des éléments intracellulaires (Yang et al. 2000), ou par dépolarisation de la membrane, ou bien encore par lyse membranaire suite à la fixation massive des peptides sur la membrane des cellules cibles (Tossi et al. 2000). L'histatine 5, avec sa structure amphipatique en hélices α , déstabilise la membrane cytoplasmique et inhibe rapidement des agents pathogènes comme les champignons (*Candida albicans*) et les bactéries (Xu et al. 1991, Han et al. 2016) (Figure 17). (Lehrer et Ganz, 1999). Les PAMs sont ainsi qualifiés d'exercer une activité antimicrobienne à large spectre. Ils sont actifs contre différentes cibles, comme les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, les champignons, les protozoaires et les virus (Lai et Gallo 2009, Powers et Hancock 2003). Chaque peptide possède un spectre d'activité différent, dépendant de son mode d'action précis et de la cellule cible. Ces peptides présentent une activité antibactérienne dirigés contre des bactéries essentiellement pathogènes de l'homme ; ainsi les défensines qui inhibent les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (Jonard et al. 2006). D'autres peptides antimicrobiens sont dotés d'une activité antivirale dirigée par exemple contre le virus de la grippe, le virus d'immunodéficience humaine (VIH), l'adénovirus (Bastian et Schäfer 2001) et les calicivirus (McCann et al. 2013). A titre d'exemple, les lactoferricines ont une activité antivirale contre le VIH (Jenssen et al. 2006). D'autres peptides antimicrobiens cationiques ont une activité antifongique, comme l'amphotéricine B utilisée pour le traitement des infections fongiques graves chez les patients immunodéprimés (Malejuk et al. 2010) et l'hépcidine 20, utilisée pour le traitement antifongique de l'infection vaginale causé par *Candida glabrata*

(Del Gaudio et al. 2013). D'autres peptides antimicrobiens possèdent une activité anticancéreuse, comme le peptide K4R2-Nal2-S1 utilisé dans le traitement des cellules cancéreuses (Chu et al. 2015).

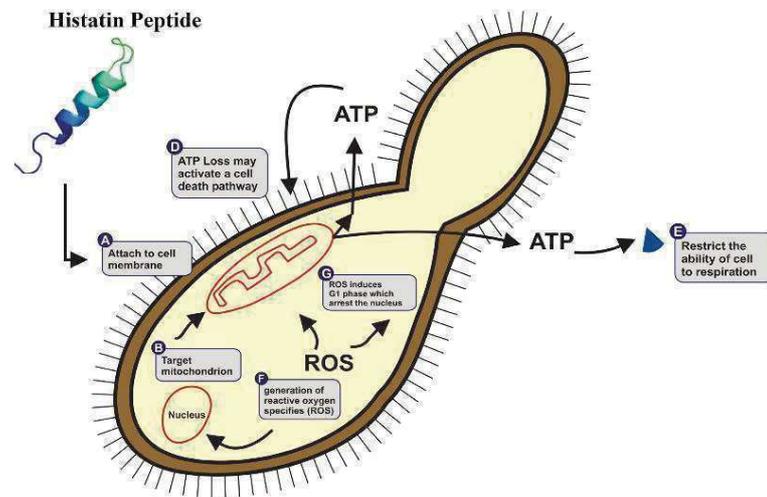


Figure 17. Mécanisme d'action de l'histatine, peptide antimicrobien isolé à partir de la salive humaine, contre *Candida albicans* (Khurshid et al. 2016).

IV.2 Peptides antimicrobiens des procaryotes

Les procaryotes, bactéries et archées, sont également capables de produire des peptides antimicrobiens. Ces peptides interviennent dans les phénomènes de compétition intra- et interspécifiques pour les nutriments ou pour l'espace.

IV.2.1 Peptides antimicrobiens synthétisés par les bactéries ou bactériocines

Parmi les PAMs produits par les bactéries, les bactériocines ont été définies comme des protéines, des polypeptides ou des peptides, produits naturellement par les bactéries par voie ribosomique. D'autres PAMs de bactéries résultent de la voie multienzymatique qui utilise des enzymes multifonctionnelles, les NRPS (non ribosomal peptide synthetases) (Kleinkauf et Von Dohren 1990, Arnison et al. 2013, Yang et al. 2014). La voie de synthèse ribosomique des bactériocines conduit à la synthèse de peptides ou de protéines précurseurs modifiés ou non post-traductionnellement (Arnison et al. 2013). Ces bactériocines sont codées par un groupe de gènes avec une ou plusieurs unités de transcription, y compris des gènes impliqués dans la régulation, la maturation, le transport et l'immunité (Rebuffat 2012, Cotter 2014). La plupart des souches productrices de bactériocines sont protégées de l'activité de leur propre composé antimicrobien par la co-expression de protéines d'immunité ou de pompes d'efflux (Dridier et al. 2006, Duquesne et al. 2007, Cui et al. 2012). La première bactériocine a été

découverte par Gratia en 1925: elle est synthétisée par *E. coli* et appelée colicine (Gratia 1925). La deuxième bactériocine a été découverte par Rogers en 1927 : elle est produite par la bactérie à Gram positif *Lactococcus lactis*, et appelée nisine (Radler 1990, Daeschel et al. 1991). Les bactériocines sont le plus généralement actives contre des bactéries phylogénétiquement proches, et présentent un effet bactéricide qui provoque la mort de la cellule ou un effet bactériostatique qui inhibe la croissance cellulaire (Cotter et al. 2005, Belguesmia et al. 2011). La production de ces peptides est stimulée par la présence de nombreuses bactéries dans un même environnement, dite surpopulation, ou par les conditions de stress comme la limitation ou la carence en nutriments (Riley et Gordon 1999). En effet, ces bactériocines jouent un rôle crucial dans les compétitions microbiennes et sont utilisées comme des molécules de défense par les bactéries productrices (Benz et Meinhart 2014). Du point de vue écologique, la capacité d'une souche bactérienne à produire des bactériocines est considérée comme une stratégie efficace pour le maintien de la population et pour réduire le nombre de bactéries concurrentes (Yang et al. 2014).

La plupart des espèces bactériennes produisent une ou plusieurs bactériocines et une même bactériocine peut être produite par plusieurs souches ou par des espèces différentes dont la capacité de production peut être variable (Moretro et al. 2000, Cascales et al. 2007). D'après Riley et Wertz (2002), plus de 99% des bactéries sont capables de produire au moins une bactériocine, dont la majorité sont non identifiées (Riley et Wertz 2002). Les bactériocines sont très nombreuses et très différentes du point de vue de leur structure primaire ou tridimensionnelle et de leur mode d'action. Pour cela, la classification de ces peptides antimicrobiens reste une tâche difficile. Actuellement, les bactériocines sont classés en deux grands groupes selon le morphotype de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (Yang et al. 2014).

Les bactéries à Gram négatif produisent une grande variété de bactériocines nommées spécifiquement d'après le genre des souches productrices. Ces bactériocines sont divisées en trois groupes principaux : les colicines (Gillor et al. 2004, Rebuffat 2012) et les colicines-like, les bactériocines de type queue de phage (tail-like phage) et les microcines (Chavan et Riley 2007). Les microcines sont un groupe bien étudié et ont été classées en fonction de différents critères génétiques et structuraux, parmi lesquels la masse moléculaire, par Duquesne et al. en 2007. La classe I est constituée par des peptides de masse moléculaire inférieure à 5 kDa portant des modifications post-traductionnelles, tels que les microcines B17, C7/C51, et J25. La classe II est constituée par des peptides dont la masse moléculaire est comprise entre 5 et 10 kDa, avec ou sans modification post-traductionnelle. On distingue deux sous-classes. Les

microcines de la classe IIa, ne présentent pas de modification post-traductionnelle et le groupe de gènes conduisant à leur biosynthèse comporte seulement 4 gènes : il s'agit des microcines V et N/24 (Duquesne et al. 2007). La classe IIb est constituée par les microcines sidérophores, qui présentent une modification post-traductionnelle (un sidérophore) à leur extrémité C-terminale ; ces peptides sont les microcines E492, M et H47 (Duquesne et al. 2007, Vassiliadis et al. 2010).

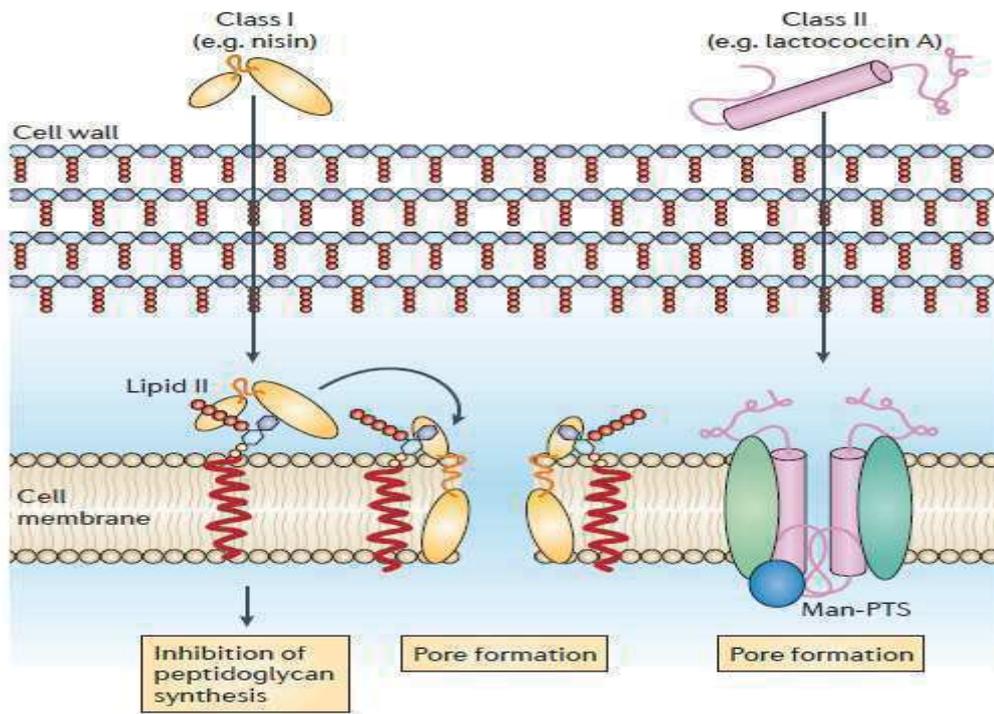
Cependant, les bactériocines des bactéries à Gram positif sont les plus étudiées. Klaenhammer a proposé de subdiviser les bactériocines des bactéries à Gram positif en 4 classes selon la structure des peptides (Klaenhammer 1993). La première classe renferme les lantibiotiques présentant d'importantes modifications post-traductionnelles. La deuxième classe renferme les bactériocines nommées « pediocin-like » qui ne présentent aucune modification post-traductionnelle. Une troisième classe regroupe les bactériolysines, définies comme des protéines thermosensibles à activité enzymatique. La quatrième classe regroupe des bactériocines protéiques liées à une partie lipidique ou glucidique (Heng et al. 2007).

Les bactériocines utilisent différents modes d'action. Certaines agissent sur l'enveloppe cellulaire alors que d'autres ont une cible intracellulaire et affectent l'expression de gènes ou la production de protéines, ou une activité enzymatique (Cotter et al. 2013) (Figure 18). D'après Cotter et al (2013), la nisine et autres lantibiotiques de classe I et les bactériocines de classe II appartiennent au premier groupe qui agit sur l'enveloppe cellulaire. Les lantibiotiques ont comme cible principale le lipide II qui est le principal transporteur de monomères du peptidoglycane du cytoplasme vers la paroi cellulaire (Martin et Breukink 2007, Bierbaum et Sahl 2009). Le mode d'action de ces PAMs est de se lier au lipide II et d'inhiber ainsi la synthèse du peptidoglycane et par conséquent la synthèse de la paroi cellulaire, ce qui provoque la lyse et la mort de la cellule cible. D'autres bactériocines utilisent le lipide II pour faciliter la formation de pores transmembranaires, ce qui provoque la mort cellulaire (Martin et Breukink 2007, Bierbaum et Sahl 2009). Les mécanismes d'action des microcines de classe IIb comme la microcine E492 et des bactériocines de classe II comme la lactococcine A ou la pédiocine (Diep et al. 2007) sont associés au transporteur membranaire du mannose, la mannose phosphotransférase (Man-PTS). C'est le système de transport des sucres majeur chez les bactéries. Man -PTS catalyse la phosphorylation de sucres entrant dans la cellule couplée à une translocation à travers la membrane cellulaire. C'est un complexe composé de deux protéines membranaires IIC et IID chez les bactéries à Gram positif, qui sert de récepteur à plusieurs bactériocines (Kjos et al. 2011). Cette association entre la

bactériocine et Man-PTS perturbe le transport des sucres et conduit à la formation de pores transmembranaires (Cotter et al. 2013) (Figure 18 A).

Le deuxième groupe de bactériocines agit à l'intérieur de la cellule, principalement sur l'expression de gènes et la production de protéines. Dans ce cas, ces bactériocines peuvent agir par différents modes d'action soit sur l'ADN, l'ARN ou le métabolisme des protéines. Par exemple, la microcine MccB17, traverse la membrane externe par l'intermédiaire de la porine OmpF, et est transférée dans le cytoplasme par le transporteur SbmA localisé à la membrane interne, puis inhibe l'ADN gyrase ce qui bloque la réplication de l'ADN (Figure 18 B) (Parks et al. 2007). Une autre microcine, la microcine J25 structurée en lasso, MccJ25, est reconnue par le récepteur aux sidérophores FhuA situé à la membrane externe, et pénètre dans le cytoplasme par l'intermédiaire du complexe TonB-ExbB-ExbD et de SbmA et inhibe la transcription de l'ADN en bloquant le canal secondaire de l'ARN polymérase (Figure 18 B) (Vincent et Morero 2009). La microcine MccC7/C51 traverse la membrane externe par la porine OmpF et la membrane interne par le transporteur YejABEF et inhibe l'aspartyl-ARNt synthétase en bloquant la synthèse de l'ARNm (Figure 18 B) (Metlitskaya et al. 2006).

A : Bactéries à Gram positif



B : Bactéries à Gram négatif

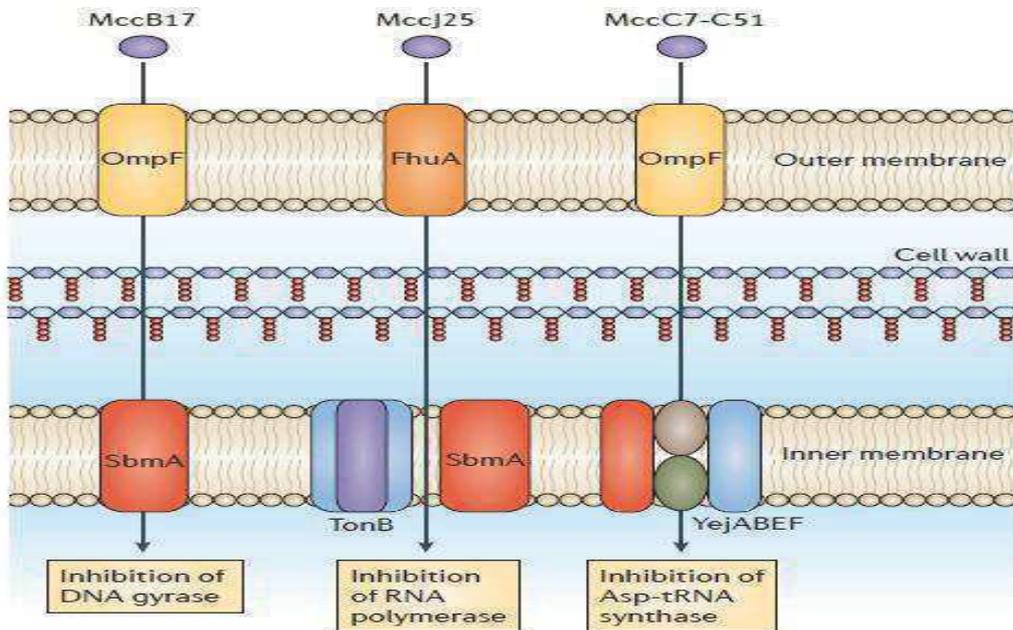


Figure 18. Mécanismes d'action des bactériocines contre des bactéries à Gram positif (A) et à Gram négatif (B) (Cotter et al. 2013).

IV.2.2 Peptides antimicrobiens synthétisés par les archées ou archaéocines

IV.2.2.1 Découverte et identification des archaéocines

Contrairement aux peptides antimicrobiens produits par les bactéries et les eucaryotes qui ont été largement étudiés depuis des décennies, les peptides antimicrobiens synthétisés par les archées ou archaéocines ont été découverts seulement depuis les années 1980 et on fait l'objet de peu d'études.

Ces archaéocines ont été détectés pour la première fois, en 1982 par Rodriguez-Valera et al., chez les membres d'archées halophiles de la classe des Halobacteria et nommés halocines. (Rodriguez-Valera et al. 1982) Après environ une vingtaine d'années, d'autres types d'archaéocines ont été caractérisés par Prangishvili et al. 2000 chez les archées du phylum des *Crenarchaeota*, de l'ordre des *Sulfolobales* et du genre *Sulfolobus*, et nommés sulfolobicines (Prangishvili et al. 2000, Ellen et al. 2011, Besse et al. 2015).

IV.2.2.2 Sulfolobicines

Les sulfolobicines sont des PAMs produits par des archées hyperthermophiles, aérobies et acidophiles du genre *Sulfolobus* (Prangishvili et al. 2000). L'activité antimicrobienne des sulfolobicines est principalement associée aux cellules car elles sont produites dans des vésicules membranaires (VMs) et ainsi secrétées associées à des fractions membranaires (Prangishvili et al. 2000). L'activité due aux sulfolobicines a été également détectée dans les surnageants très concentrés (O'Connor et Shand 2002). Les VMs sont formées par un bourgeonnement de la membrane cytoplasmique (Marguet et al. 2013). Elles sont enveloppées d'une couche S, qui entoure également les cellules d'archées. Elles ont un diamètre compris entre 20 et 200 nm. Ces VMs sont impliquées dans le transfert des sulfolobicines dans le milieu environnant pour inhiber la croissance d'autres cellules (Dobson et al. 2012). La relation sulfolobicines-VMs est indispensable pour la réalisation de l'effet toxique de la souche productrice (Ellen et al. 2011). Ces VMs interviennent dans la communication cellulaire, car elles peuvent aussi transférer des agents du quorum sensing, des toxines, des facteurs de pathogénie, de l'ADN et de l'ARN (Ellen et al. 2011, Marguet et al. 2013).

La caractérisation de ces substances antimicrobiennes montre leur sensibilité aux enzymes protéolytiques comme la pronase, la protéinase K et la trypsine, ce qui confirme leur nature protéique (O'Connor et Shand 2002). Par contre, les sulfolobicines sont résistantes aux enzymes α -amylase, α - β -glucosidase et phospholipase C (Prangishvili et al. 2000). Une masse

moléculaire de 20 kDa a été déterminée pour les sulfolobocines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (Prangishvili et al. 2000).

D'autres études de purification des vésicules membranaires à partir des souches productrices de sulfolobocines, *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639 et *Sulfolobus tokodaii* DSM16993, ont révélé une protéine de masse moléculaire de 42 kDa possédant une activité antimicrobienne (Ellen et al. 2011). Ces études ont permis d'identifier le locus de gènes impliqués dans la biosynthèse des sulfolobocines (Figure 19) (Ellen et al. 2011, Besse et al. 2015). Deux protéines hypothétiques ont été révélées, St1599 (*SulA*) et St1600 (*SulB*) de 29 et 30 kDa. Les gènes codant ces deux protéines sont présents dans le génome des deux souches étudiées *S. tokodaii* DSM16993 et *S. acidocaldarius* DSM639. L'organisation du locus des gènes dans les deux génomes est similaire et présente des protéines de fonction inconnue, (2 chez *S. tokodaii* DSM16993 et 1 seule chez *S. acidocaldarius* DSM639) (Figure 19). Ces deux gènes *sulB* et *sulC* sont retrouvés dans deux régions variables (Ellen et al. 2011), et des éléments génétiques mobiles ont été identifiés à proximité du gène *sulA* dans les deux souches étudiées (You et al. 2011). D'après ces études, les sulfolobocines actives seraient sous forme d'un complexe protéique de 40 kDa constitué des 2 protéines SulA et SulB.

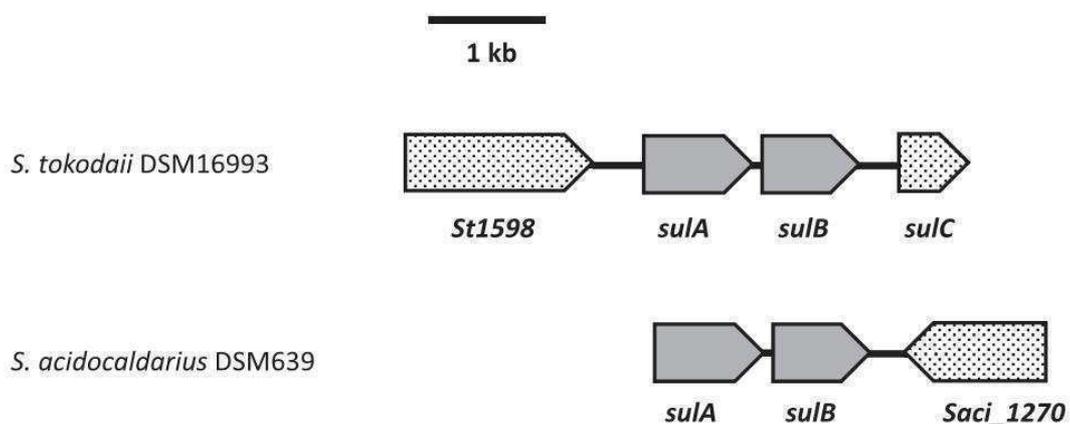


Figure 19. Locus des gènes impliqués dans la biosynthèse des sulfolobocines des souches *Sulfolobus tokodaii* DSM16993 et *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639. Les cadres de lectures ouverts sont indiqués par des flèches : les gènes codant les précurseurs des sulfolobocines : *sulA*, *sulB* sont en gris foncé et les gènes codant des protéines de fonctions inconnues : *St1598*, et *Saci_1270* sont en blanc avec des points noirs (Ellen et al. 2011, Besse et al. 2015).

Les sulfolobocines présentent un spectre d'activité étroit, dirigé contre des souches phylogénétiquement proches des souches productrices, comme *Sulfolobus solfataricus* P1, *Sulfolobus shibatae* DSM5389 et des souches non productrices comme *Sulfolobus islandicus*

(Prangishvili et al. 2000). Le mode d'action des sulfolobocines semble impliqué dans le blocage de la croissance cellulaire plutôt que dans la lyse cellulaire (Prangishvili et al. 2000).

IV.2.2.3 Halocines

Plusieurs études se sont focalisées sur la biodiversité des communautés microbiennes au sein des environnements hypersalins pour comprendre la dominance de la population des archées halophiles extrêmes productrices d'halocines. La production des halocines pourrait être un mécanisme utilisé par ces archées pour dominer ces écosystèmes par l'inhibition de leurs compétiteurs. Bien que des études aient suggéré que la production des halocines est une caractéristique universelle de toutes les archées halophiles (Messeguer et al. 1986, Torreblanca et al. 1994), seulement quelques halocines ont été décrites, identifiées et caractérisées et seulement de manière préliminaire (Torreblanca et al. 1994). Les halocines sont synthétisées par voie ribosomique mais le mécanisme exact de biosynthèse de ces peptides est encore inconnu (O'Connor et Shand 2002).

La découverte de nouvelles halocines est basée sur des techniques d'isolement et de culture spécifiques aux archées halophiles isolées d'environnements hypersalins. Plusieurs genres sont capables de produire ces agents antimicrobiens comme *Haloferax* (Rodriguez-Valera et al. 1982, Kumar et al. 2016), *Halobacterium* (Price et Shand. 2000), *Natrinema* (Sun et al. 2005, Imadalou-Idrès et al. 2013, Quadri et al. 2016, Besse et al. 2015). De nombreuses souches d'archées appartenant à la classe *Halobacteria* ont été criblées pour une activité antimicrobienne. Cette activité peut être due à des halocines, à d'autres agents antimicrobiens non peptidiques, à des virus ou à un ensemble d'agents antimicrobiens. Actuellement, 12 halocines ont été partiellement ou totalement identifiées (Besse et al. 2015). Parmi les halocines partiellement identifiées, on trouve les halocines H2, H3 et H5 (Besse et al. 2015), qui sont produites respectivement par des archées halophiles non caractérisées, GLA22, GAA12 et MA220, isolées d'une même saline en Espagne (Besse et al. 2015). De plus, ces halocines ont été classés selon leurs spectres d'activités et leurs sensibilités à la protéase, mais sans aucune indication sur leur masse moléculaire ou leur séquence en acides aminés. Deux autres halocines G1 et KPS1, produites respectivement par les souches d'archées halophiles *Halobacterium* sp. GRB isolée d'une saline en France (Soppa et Oesterhelt 1989) et *Hfx. volcanii* KPS1 isolée de la saline Kovalam en Inde (Kavitha et al. 2011), ont été également décrites. Seules trois halocines ont été caractérisées au niveau de la séquence nucléotidique et de leur séquence en acides aminés. Il s'agit de l'halocine C8 (Sun

et al. 2005), l'halocine H4 (Cheung et al. 1997) et l'halocine S8 (Price et Shand 2000). La majorité des gènes des halocines sont exprimés pendant la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance (Cheung et al. 1997, Price et Shand 2000), à l'exception du gène de l'halocine H1 qui est exprimé lors de la phase exponentielle de croissance (Platas et al. 1996). Les gènes codant les halocines peuvent être localisés dans des mégaplasmides et les précurseurs des halocines semblent être exportés par la voie de translocation "twin-arginine" (Tat). La voie de translocation Tat est une voie d'export des protéines dans l'enveloppe cellulaire et dans l'espace extracellulaire. Contrairement à la voie de translocation Sec, les chaînes peptidiques sont exportées avec leur repliement actif par la voie Tat (Sargent et al. 2006). La nature protéique des halocines est généralement déterminée après traitement des extraits actifs avec une ou plusieurs enzymes protéolytiques (Shand et Leyva 2007).

a. Halocine S8/R1

L'halocine S8 est la première halocine dont on a identifié la séquence en acides aminés. Le traitement par la trypsine et la protéinase K confirme la nature protéique de l'halocine S8 (Price et Shand 2000). La masse moléculaire de l'halocine S8 purifiée, déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE Tris-tricine, est de 3,6 kDa (Price et Shand 2000). Cette halocine est produite par une souche d'archée halophile extrême S8a non identifiée, isolée du Grand Lac Salé dans l'Utah aux Etats-Unis (Shand et al. 1998, Price et Shand 2000, Haseltine et al. 2001). Cette halocine possède un spectre d'activité étroit, dirigé contre *Hbt. salinarum* NRC817, *Halobacterium*. sp. GRB et *Haloferax gibbonsii* (Price et Shand 2000). De plus, l'activité antimicrobienne de cette halocine est indépendante de la concentration en sel, car l'halocine reste active pendant plusieurs mois à pH 7 et à 4°C après dessalage par du tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 g.L⁻¹. L'halocine S8 est également thermorésistante. En effet, elle conserve 100% de son activité après un traitement pendant une heure à 93°C. L'activité de l'halocine S8 résiste aussi aux solvants organiques (Price et Shand 2000). L'activité de cette halocine est faiblement détectable dans le surnageant d'une culture de la souche productrice en phase exponentielle de croissance et atteint son maximum au début de la phase stationnaire de croissance (Shand et al. 1998, Price et Shand 2000, Haseltine et al. 2001, O'Connor et Shand 2002). Cette halocine a été purifiée par plusieurs méthodes de chromatographie, filtration sur gel et chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Price et Shand. 2000). La séquence en acides aminés décrite pour l'halocine S8 a été identifiée uniquement par séquençage d'Edman: C'est un peptide de 36 résidus et de masse

moléculaire de 3,6 kDa, relativement hydrophobe, contenant 4 résidus de cystéine (Price et Shand. 2000). Le séquençage de l'ADN génomique de la souche S8a a révélé une séquence nucléotidique avec une phase ouverte de lecture composé de 933 pb, codant une protéine de 311 acides aminés et contenant la séquence de l'halocine S8 mature déterminée par la dégradation d'Edman, avec la présence d'une seule substitution d'un acide aminé (Figure 20) (Price et Shand 2000, Besse et al. 2015). Cependant, le rôle du précurseur est encore mal défini. Cette protéine précurseur pourrait être impliquée dans de nombreuses fonctions comme la régulation, l'induction de la production de l'halocine, l'export ou l'immunité de la souche productrice (Besse et al. 2015).

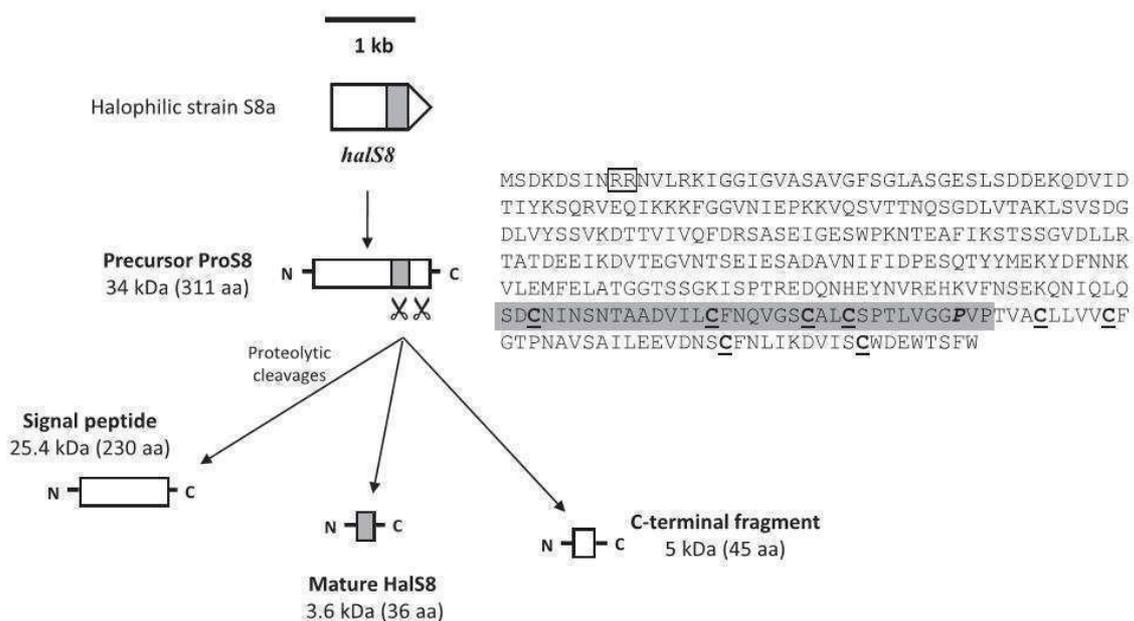


Figure 20. Locus génétique de l'halocine S8 montrant le gène *halS8* impliqué dans la biosynthèse de l'halocine S8 et la voie de maturation de l'halocine S8. Le cadre de lecture ouvert codant le précurseur ProS8 est indiqué par une flèche, la partie mature de l'halocine S8 est indiquée en gris foncé. Les 2 arginines de la séquence Tat sont entourées. La séquence de l'halocine mature est surlignée en gris foncé dans le précurseur. Les cystéines sont en caractères gras et soulignées (Besse et al. 2015).

Une autre halocine nommée R1, avec une masse moléculaire de 3,8 kDa, a été isolée à partir d'une souche d'archée halophile *Halobacterium* sp. GN101, isolée de la saline de Guerrero Negro au Mexique (Shand et al. 1998, Haseltine et al. 2001, O'Connor 2002). L'activité de l'halocine R1 est aussi détectée au niveau du surnageant de la culture productrice pendant la transition vers la phase stationnaire de croissance. Cette halocine est caractérisée par une activité qui ne dépend pas de la concentration en sel, sa résistance aux acides, aux solvants et aux enzymes papaïne, trypsine et thermolysine (Shand et al. 1998,

O'Connor et Shand 2002). Par contre, elle est sensible aux enzymes protéinase K, pronase et élastase (Torreblanca et al. 1994, O'Connor et Shand 2002). L'activité de l'halocine R1 résiste à un traitement à 60°C pendant 24 h mais disparaît après une exposition de 5 min à 93°C. Par ailleurs, l'halocine R1 possède un large spectre d'activité dirigé contre des archées méthanogènes mésophiles productrices de méthane, comme *Methanosarcina thermophila*, et *Sulfolobus* spp (Haseltine et al. 2001, O'Connor et Shand 2002).

La comparaison de la séquence en acides aminés de l'halocine S8 mature avec la séquence de l'halocine R1 déterminée par séquençage d'Edman, montre 63% d'identité entre ces deux halocines. De plus, l'analyse de la séquence complète du mégaplasme 2 de 283 kb de la souche *Halobacterium*.sp GN101 (GenBank, numéro d'accèsion EU080936) montre la présence du gène *halS8* (Besse et al. 2015). Ces observations indiquent que les deux halocines S8 et R1 présentent de fortes similarités, ce qui pourrait être expliqué par le fait que ces halocines pourraient être codées par le même gène (Figure 21) (Besse et al. 2015).

```
HalS8   SDCNINSNTAADVILCFNQVGSCALCSPTLV-GG-PVP
HalR1   LQSNININTAAVILIFNQVQVGALCAPTPVSGGGPVP
```

Figure 21. Alignement des séquences en acides aminés des halocines S8 et R1. Les acides aminés identiques sont indiqués en caractère gras (Besse et al. 2015).

b. Halocine C8/A4

L'halocine C8 est produite par la souche d'archée halophile *Natrinema* sp. AS7092 (anciennement appelée *Halobacterium* AS7092), isolée du grand lac salé Chaidan dans la province de Qinghai, en Chine (Li et al. 2003). Cette halocine a également été identifiée de plusieurs souches d'archées halophiles du genre *Natrinema* isolées de plusieurs sites en Algérie (Imadalou-Idres et al. 2013, Meknaci et al. 2015, Besse et al. 2015, Quadri et al. 2016). La masse moléculaire de l'halocine C8 déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE est de 7,4 kDa.

L'halocine C8 est hydrophobe, sensible à la papaïne, résistante à la chaleur (jusqu'à un traitement d'une heure à 100°C) et conserve son activité après un stockage pendant 1 an à 4°C. Elle présente une activité qui est indépendante de la présence de NaCl et résiste à l'action de la trypsine et à des solvants organiques comme le méthanol, l'éthanol et l'acétonitrile (Sun et al. 2005). Le gène *halC8* code un précurseur de 283 acides aminés, nommé ProC8, contenant 10 cystéines qui pourraient être impliqués dans la formation de 5

ponts disulfure, ce qui pourrait expliquer la grande stabilité de cette halocine (Sun et al. 2005, Besse et al. 2015). L'analyse transcriptionnelle de l'halocine C8 montre que l'expression de ce peptide commence pendant la phase exponentielle de croissance et atteint son maximum pendant la phase stationnaire (Sun et al. 2005). Cette halocine est active contre plusieurs espèces comme *Natronobacterium gregoryi*, *Nab. magadii* et *Nmn. pharaonis* (Li et al. 2003). Le précurseur ProC8 est clivé et libère une région C-terminale de 76 acides aminés hydrophobe et riche en résidus cystéines, l'halocine C8 et une protéine N-terminale HalI (Sun et al. 2005). HalI est une protéine d'immunité qui protège la souche productrice contre son propre agent antimicrobien, comme cela a été observé pour les bactériocines (Sun et al. 2005). Pour la mise en évidence de la fonction d'immunité de cette protéine, deux types d'expériences ont été effectués. *In vivo*, par expression hétérologue de HalI chez *Haloarcula hispanica*, une résistance de *Har. hispanica* à l'halocine C8 a été observée. *In vitro*, la protéine recombinante HalI a été mélangée avec un surnageant de culture de *Natrinema* sp AS7092, ce qui a empêché l'inhibition des souches sensibles (Sun et al. 2005).

D'après la figure 22, le gène *halC8* est entouré par cinq cadres de lectures ouverts, qui sont des gènes putatifs. Le gène *halU* qui code une protéine transmembranaire de fonction inconnue, le gène *halR*, qui serait un gène codant un régulateur de l'expression de HalC8, les gènes *halT1*, *halT2* et *halT3* qui seraient impliqués dans l'export de l'halocine C8 à l'extérieur de la cellule, en utilisant un système de transporteur ABC (Figure 22) (Besse et al. 2015). Ce groupe de gènes est impliqué dans la biosynthèse des halocines chez les archées (Mei et al. 2006).

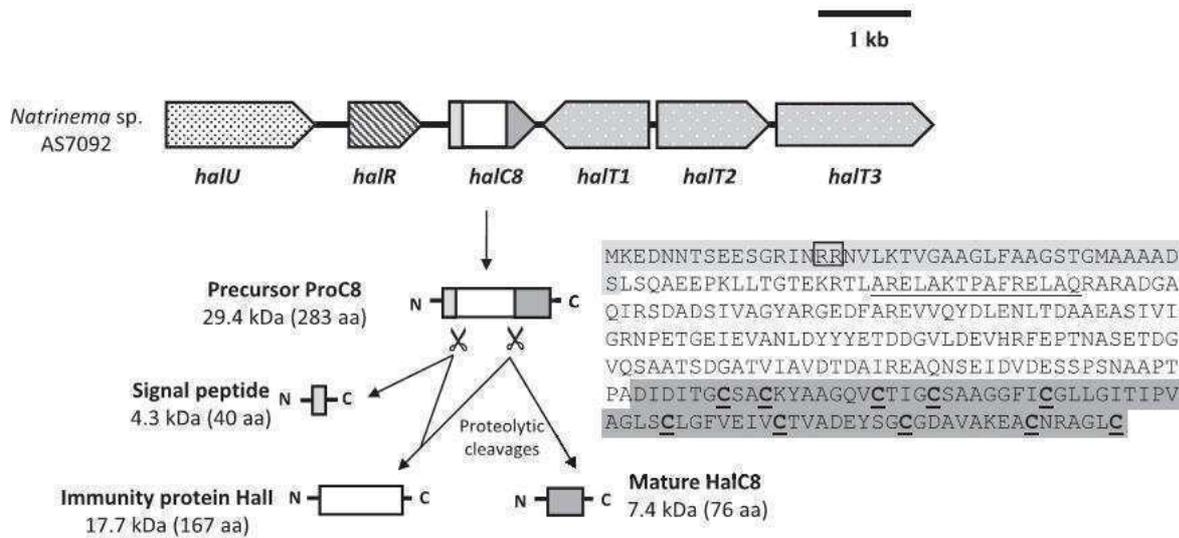


Figure 22. Locus génétique de l'halocine C8 montrant le gène *halC8* impliqué dans la biosynthèse de l'halocine, les gènes putatifs *halU*, *halR*, *halT1* à *halT3*, et la voie de maturation de l'halocine C8. Les cadres de lecture ouverts sont indiqués par des flèches. Le gène codant le précurseur ProC8 avec la partie halocine mature en gris foncé, la partie protéine d'immunité en blanc et la partie peptide signal en gris clair. Les gènes putatifs codant une protéine de régulation HalR figurent en blanc avec des rayures, les gènes codant des protéines impliquées dans l'export de l'halocine, *halT1*, *halT2*, *halT3* figurent en gris clair avec des points blancs, tandis que *halU* qui code une protéine de fonction inconnue, figure en blanc avec des points noirs. Le précurseur ProC8 comprend un signal Tat dont les 2 arginines sont entourées. Le peptide signal putatif est surligné en gris clair. La séquence de l'halocine mature est surlignée en gris foncé; la région hélice-boucle-hélice essentielle à la fonction d'immunité de Hall est soulignée (Besse et al. 2015).

Une autre halocine peptidique, l'halocine A4, appelée aussi halocine U1 est produite par une souche d'archée halophile non caractérisée TuA4, isolée d'une saline en Tunisie (Haseltine et al. 2001). Elle possède un large spectre d'activité capable d'inhiber deux souches d'archées haloalcalophiles, *Natronobacterium gregoryi* et *Nab. magadii* (Kamadulski et Shand, non publié) et des souches d'archées hyperthermophiles des genres *Sulfolobus* et *Salfataricus* (Haseltine et al. 2001). Cette halocine a été purifiée à partir de surnageant concentré de la culture productrice par chromatographie d'exclusion et CLHP en phase inverse. La masse moléculaire de cette halocine déterminée par spectrométrie de masse est de 7435 Da. C'est un peptide à la fois acide (point isoélectrique, pI : 4,14) et hydrophobe (Ducan 2004, Shand et Leyva 2007). D'après Shand et Leyva (2008), la séquence en acides aminés de HalA4 a été déterminée par séquençage d'Edman, par contre le gène *halA4* n'a pas été identifié. Cependant, la comparaison des deux halocines C8 et A4, révèle que ces deux peptides antimicrobiens présentent la même masse moléculaire de 7,4 kDa. De plus, leurs séquences en acides aminés montrent une identité de 75%, ce qui suggère que ces 2 halocines

sont peut être identiques ou résultent tout simplement d'une variante du gène *halC8* (Figure 23) (Besse et al. 2015).

```
HalC8  DIDITGCSACKYAAGQVCTIGCSAAGGFICGLLGITIPVAGLSCLGF-VEIVCTV-ADEYSGCGDAV-AKEACNRAGLC
HalA4  DIDITGCSACKYAAGQVCTIGCSAAGGFICGLLGITIPVAGLSLGGFFVIT-CTTSADYYSIP-DSNAAK
```

Figure 23. Alignement des séquences en acides aminés des halocines C8 et A4. Les acides aminés identiques sont en caractères gras (Besse et al. 2015).

c. Halocine H4/ H1

L'halocine H4 est la première halocine protéique caractérisée. Elle est produite par une souche d'archée halophile *Hfx. mediterranei* R4 (ATCC 33500), isolée dans la saline d'Alicante en Espagne (Rodriguez-Valera et al. 1982, Meseguer et Rodriguez-Valera 1985, Meseguer et Rodriguez-Valera 1986). L'halocine H4 a été purifiée à partir de surnageant de la culture productrice filtré et concentré, puis par chromatographie sur colonne de gel filtration. La masse moléculaire de la fraction purifiée, déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE est de 34,9 kDa (Meseguer et Rodriguez-Valera, 1985). Le gène codant l'halocine H4 est situé sur le mégaplasme pHM300. L'halocine H4 est produite sous forme d'un précurseur, constitué d'une région N-terminale de 46 acides aminés, fortement cationique comportant un signal Tat (Besse et al. 2015) et une région C-terminale de 311 acides aminés correspondant à l'halocine mature de 34,9 kDa (figure 24) (Meseguer et Rodriguez-Valera 1985, Cheung et al. 1997). L'halocine H4, comporte un fort taux d'acides aminés chargés négativement, un faible taux de lysine, un taux élevé de résidus proline, glycine, valine, thréonine et seulement 32 acides aminés hydrophobes (Figure 24). Ce sont des caractéristiques de protéines halophiles (Paul et al. 2008a, Anwar et Chauhan 2012).

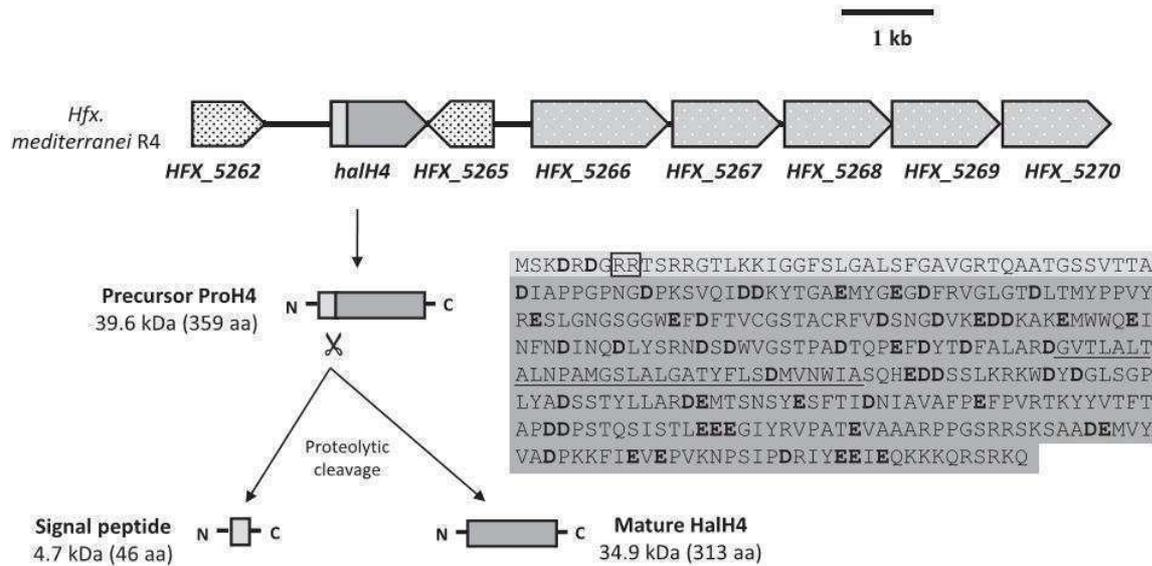


Figure 24. Locus génétique de l'halocine H4 montrant le gène *halH4* impliqué dans la biosynthèse de l'halocine et la voie de maturation de l'halocine. Les cadres de lecture ouverts sont indiqués par des flèches. La partie du gène *halH4* qui code le précurseur de l'halocine H4, ProH4, correspondant au peptide mature est en gris foncé, et celle correspondant au peptide signal en gris clair. Les gènes codant des protéines assurant l'export de l'halocine mature, *HFX_5266*, *HFX_5267*, *HFX_5268*, *HFX_5269*, *HFX_5270* figurent en gris clair avec des points blancs. Les gènes codant des protéines de fonction inconnue, *HFX_5262*, *HFX_5265* figurent en blanc avec des points noirs. Dans le précurseur ProH4, les 2 arginines de la séquence signal Tat sont encadrés et le peptide signal putatif est surligné en gris clair. La séquence de l'halocine mature est surlignée en gris foncé, les résidus chargés négativement sont indiqués en gras et la séquence de la région centrale hydrophobe est soulignée (Besse et al. 2015).

Cette halocine possède un spectre d'activité étroit dirigé contre des souches d'archées halophiles, comme *Hbt. salinarum* (Rodriguez-Valera et al. 1982, Cheung et al. 1997). Contrairement aux halocines S8 et C8, l'activité de l'halocine H4 dépend de la concentration en sel et est totalement inhibée en présence de faibles concentrations ou en absence de sel (Meseguer et Rodriguez-Valera 1985). L'halocine H4 est sensible aux protéases, résiste à une température de 51°C, mais son activité disparaît totalement après traitement à 95°C. L'activité optimale est produite lors de la transition entre les phases exponentielle et stationnaire de croissance (Meseguer et Rodriguez-Valera 1985, Cheung et al. 1997).

L'halocine H1 est une protéine de 31 kDa, synthétisée par la souche *Hfx. mediterranei* M2a (anciennement *Hfx. Mediterranei* Xai3) isolée de la saline de Santa Pola à Alicante en Espagne (Rodriguez-Valera et al. 1982, Platas et al. 1996, 2002). La masse moléculaire de l'halocine H1 a été déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE, par contre sa séquence en acides aminés et la séquence nucléotidique codant le gène *halH1* sont

encore inconnus (Besse et al. 2015). Ce peptide est thermolabile, ne supporte pas des températures supérieures à 50 °C et son activité dépend de la concentration en sel et nécessite un minimum de 50 g.L⁻¹ de NaCl (Platas et al. 2002, Besse et al. 2015). L'activité optimale de la production de l'halocine H1 est détectée pendant la phase mi-exponentielle (Platas et al. 2002). Cette halocine inhibe les archées de l'espèce *Hbt. Salinarum*. La comparaison des caractéristiques des deux halocines H1 et H4, montre des similarités en ce qui concerne les souches productrices, les milieux d'isolement, la masse moléculaire, la sensibilité au NaCl et à la température. Ces caractéristiques et l'absence d'inhibition croisée entre les deux souches, sont en faveur d'une forte identité de séquence entre les deux halocines (Rodriguez-Valera et al. 1981, Platas et al. 2002, Besse et al. 2015).

d. Halocine H6

L'halocine H6, anciennement nommée halocine H7, a été tout d'abord décrite comme une protéine ayant une masse moléculaire de 32 kDa déterminée par électrophorèse sur gel de ployacrylamide SDS-PAGE. En fait ce peptide a une masse moléculaire de 3 kDa et pourrait être sécrété avec une protéine porteuse (Meseguer et al. 1995, Torreblanca et al. 1989, Shand et Leyva, 2007). Cette halocine, a été purifiée à partir d'une souche d'archée halophile *Hfx. gibbonsii* M2.39, isolée de la saline d'Alicante en Espagne, (Rodriguez-Valera et al. 1982, Torreblanca et al. 1989, Meseguer et al. 1995). L'halocine H6 a un spectre d'activité étroit et inhibe la croissance de la souche productrice de l'halocine H4 *Hfx. mediterranei* R4 (Alberola et al. 1998, Besse et al. 2015). Plusieurs travaux ont démontré que l'halocine H6 conserve son activité inhibitrice dans l'eau distillée ce qui montre que l'activité de ce peptide est indépendante de la concentration en sel (Torreblanca et al. 1989). Cette halocine est sensible à l'action de la pronase, mais résiste à la trypsine. De plus, l'halocine H6 est fortement thermorésistante: elle reste totalement active après 10 min de chauffage à 90 °C (Torreblanca et al. 1990). L'activité antimicrobienne de l'halocine H6 atteint son maximum pendant la phase stationnaire de croissance de l'archée productrice, puis diminue progressivement. La production de cette halocine n'est pas détectable après une exposition de la culture à la lumière ou aux rayonnements UV (Torreblanca et al. 1990).

e. Halocine Sech7a

L'halocine Sech7a, est une halocine protéique de 10,7 kDa, purifiée à partir d'une souche d'archée halophile *Hfx. mediterranei* Sech7a, isolée d'une saline en Slovénie (Pašić et

al. 2008). Sa masse moléculaire a été déterminée par spectrométrie de masse et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (Pašić et al. 2008). L'activité optimale de cette halocine a été détectée au début de la phase stationnaire de croissance (Pašić et al. 2008). Cette halocine est caractérisée par une activité stable à la chaleur jusqu'à 80°C, et indépendante de la concentration en sel. De plus, cette activité est stable dans une large gamme de pH entre 3 et 9 et une gamme de NaCl de 6 à 300 g.L⁻¹ (Pašić et al. 2008).

f. Halocine HA1

L'halocine HA1 a été identifiée récemment. Elle est de nature protéique avec une masse moléculaire de 14 kDa. Cette halocine est produite par une souche d'archée halophile *Hfx. larsenii* HA1 isolée du lac salé Pachpadra, au Rajasthan en Inde (Kumar et al. 2016). Cette halocine est stable à une température de 100°C et dans une large gamme de pH comprise entre 2 et 9. L'activité antimicrobienne est sensible au traitement par la protéinase K mais par contre résiste à la trypsine. L'activité de cette halocine n'est pas affectée par les solvants organiques (Kumar et al. 2016). Cette halocine possède un spectre d'activité étroit puisqu'elle est capable d'inhiber uniquement les souches du genre *Hfx. larsenii* HA3, HA4, HA9 et HA10 (Kumar et al. 2016). L'halocine HA1 est incapable d'inhiber les souches bactériennes pathogènes comme *E. coli* NCDC135, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* sp, *Salmonella typhi* ou *Micrococcus luteus* MTCC106 (Kumar et al. 2016).

IV.2.2.3.1. Mécanismes d'action des halocines

Le mode d'action des halocines produites par les souches d'archées halophiles extrêmes a été beaucoup moins étudié que celui des bactériocines et actuellement très peu d'informations sont disponibles sur cette question. Le mode d'action n'est connu que pour les halocines H6/H7, H4 et H1. Ces halocines agissent sur la membrane plasmique des souches sensibles, soit par inhibition du transporteur Na⁺/H⁺ (Meseguer et al. 1995), soit par perturbation de la perméabilité membranaire (Meseguer et Rodriguez-Valera, 1985, O'Connor et Shand 2002).

L'halocine H6 se fixe sur la membrane des souches cibles d'*Hbt. salinarum*, et bloque le transporteur Na⁺/H⁺. (Meseguer et al. 1995). Ce mécanisme utilise le gradient d'ions H⁺ pour échanger 2 H⁺ de l'extérieur de la cellule contre un Na⁺ à l'intérieur de la cellule, ce qui contribue à maintenir la concentration intracellulaire de Na⁺ à des niveaux compatibles avec

la vie cellulaire. Le blocage du transporteur Na^+/H^+ par l'halocine H6 conduit à l'augmentation des concentrations du Na^+ intracellulaire et à la diminution de la concentration en protons H^+ , ce qui provoque des variations de pH du milieu intracellulaire, du potentiel transmembranaire et de la force protomotrice (Meseguer et al. 1995). Par son action sur le transporteur Na^+/H^+ , l'halocine H6 entraîne une modification de la morphologie des cellules sensibles qui deviennent sphériques et gonflent suite à l'entrée massive de l'eau stimulée par l'accumulation des ions Na^+ , jusqu'à la lyse cellulaire (Lequerica et al. 2006). Cette halocine laisse des fantômes de cellules vides, dans lesquels les enveloppes semblent rester intactes (Figure 25). Torreblanca et al. 1989, ont étudié l'effet de l'halocine H6 sur la morphologie cellulaire de la souche *Halobacterium*. Les résultats observés par microscopie électronique après les traitements durant 5 et 24 h de la souche sensible par l'halocine H6 à 640 UA.mL^{-1} montre que la membrane reste intacte (Figure 25) (Torreblanca et al. 1989). L'activité de l'halocine H6 a été quantifiée dans le surnageant de la culture productrice par la méthode de double dilution ; elle est exprimée en UA.mL^{-1} , qui est l'inverse de la dilution du dernier puits qui ne présente aucune zone d'inhibition de la souche cible divisé par le volume de surnageant déposé dans le puits et multiplié par mille (Torreblanca et al. 1989). L'augmentation des doses d'halocines H6 induit un effet plus rapide (Lequerica et al. 2006). Ainsi, l'halocine H6 entraîne la dégradation des sphéroplastes des archées qui sont dépourvus de parois cellulaires (Torreblanca et al. 1989).

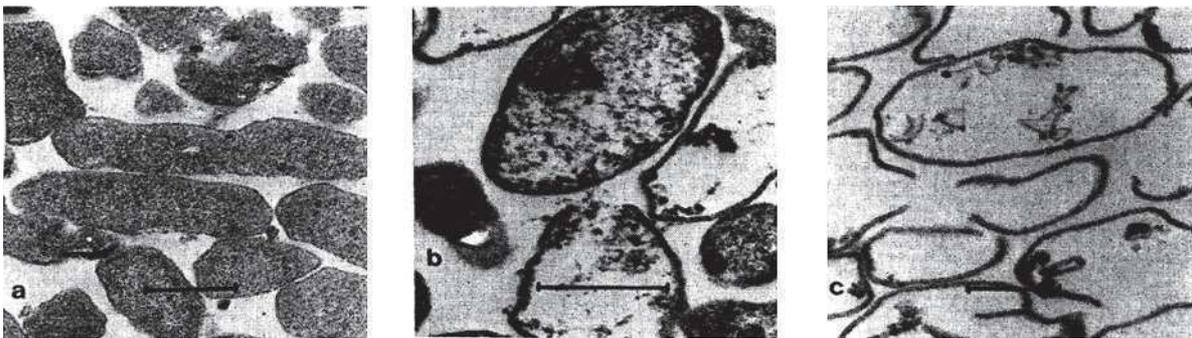


Figure 25. Effet de l'halocine H6 sur la morphologie cellulaire d'*Halobacterium* observé en microscopie électronique. **a** : Cellules d'*Halobacterium* non traitées, **b** : après 5 h de traitement par 640 UA.mL^{-1} d'halocine H6, **c** : après 24 h de traitement par l'halocine H6. Barre : $0,5 \mu\text{m}$, UA : unités arbitraires (Torreblanca et al. 1989).

L'halocine H4 semble agir sur la cellule cible en affectant l'état d'équilibre du flux protonique (O'Connor et Shand 2000), tandis que l'halocine H1 perturberait la perméabilité membranaire de la cellule cible (O'Connor et Shand 2002).

Li et al. (2003) ont étudié l'effet de l'halocine C8 sur la cible *Hrr. saccharovororum*, dans le but de déterminer le mode d'action de cette halocine. Cette étude a montré que l'halocine C8 a un effet sur la membrane cellulaire et surtout sur sa perméabilité. Suite au traitement des cellules cibles par l'halocine C8, un gonflement des cellules est observé, puis la paroi cellulaire se rétrécit, le cytoplasme est libéré à l'extérieur et finalement les cellules sont complètement lysées (Li et al. 2003) (Figure 26). Cet effet bactéricide suggère que l'halocine C8 agit sur la paroi cellulaire de la souche cible (Li et al. 2003, Besse et al. 2015).

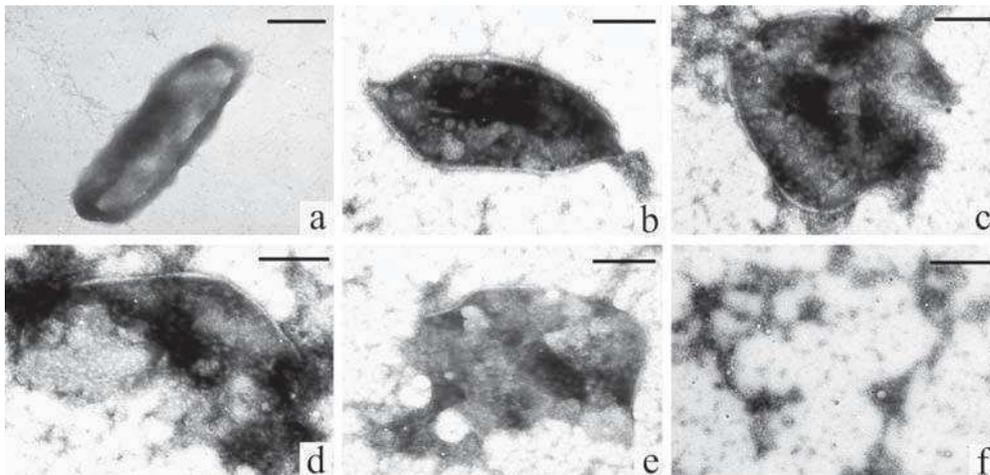


Figure 26. Images de microscopie électronique de cellules d'*Halorubrum saccharovororum* traitées avec l'halocine C8. **a** : absence de traitement des cellules, **b** : après 5 h d'exposition des cellules à l'halocine C8, **c** : après 12 h de traitement, **d**, **e** : après 24 h de traitement par l'halocine C8, et **f** : après 48 h de traitement (Li et al. 2003).

IV.2.2.3.2 Rôle écologique des halocines

Seules quelques études ont été menées pour comprendre le rôle écologique des halocines dans les interactions microbiennes en milieux hypersalins (Oren 1994). L'implication de ces molécules dans la dominance des archées halophiles dans les salines, les lacs salins et les saumures n'a pas encore été confirmée et les résultats sont encore souvent contradictoires. Les premières études ont montré que la production d'halocines était fréquemment observée parmi les souches d'archées halophiles (Messeguer et al. 1986, Torreblanca et al. 1994). Cependant, Kis-Papo et Oren ont montré que, bien que l'excrétion d'halocine soit un phénomène très répandu parmi les archées de la classe des *Halobacteria*, il semblerait que la contribution de ces halocines aux compétitions entre archées dans ces environnements hypersalins soit négligeable (Kis-Papo et Oren 2000). Lorsqu'il y a compétition soit pour l'espace, soit pour les nutriments, les micro-organismes produisent des

substances antimicrobiennes qui inhibent la croissance d'espèces phylogénétiquement proches (Riley et Wertz 2002). Des études ont suggéré que des conditions de carence nutritionnelle stimulent la production d'halocine par la souche productrice (Smith et Dworkin 1994, Kerkar 2004). Par conséquent, ces peptides antimicrobiens pourraient jouer un rôle dans la dynamique des communautés d'archées halophiles et le contrôle de la biodiversité des micro-organismes observée dans ses environnements hypersalins. Shand et Leyva (2007), ont suggéré que la présence d'agents antimicrobiens dans l'environnement peut à fois réduire et augmenter la diversité des espèces par la lyse cellulaire dans le premier cas ou par la disponibilité des nutriments dans le deuxième cas (Lenski et Riley 2002, Kirkup et Riley 2004).

Une étude plus récente sur les interactions entre archées et bactéries halophiles provenant d'origine géographique diverses, a montré qu'au moins un tiers des souches testées produisent une halocine. Parmi les 144 interactions observées entre micro-organismes, plus de 80% sont détectées entre micro-organismes provenant de genres différents. Par ailleurs des inhibitions ont été observées entre le domaine des archées et celui des bactéries. En particulier des souches d'archées des genres *Haloferax*, *Halorubrum* et *Halogramum* sont actives contre des bactéries des genres *Halomonas*, *Pontibacillus*, *Salinivibrio* et *Salicola*, tandis que des souches du genre *Salicola* sont actives contre des archées du genre *Halorubrum*. La production d'halocine pourrait ainsi augmenter la diversité microbienne et les halocines pourraient donner aux souches productrices un avantage transitoire vis à vis des compétiteurs (Atanasova et al. 2013)

IV.2.2.3.3 Intérêts des halocines

Tout comme les bactériocines, les halocines sont des antimicrobiens peptidiques qui peuvent être utilisés, notamment dans les industries du cuir. Une étude a mentionné que les halocines peuvent être utilisées dans le contrôle de l'altération des peaux au cours des procédés industriels de production du cuir (Birbir et al. 2004). En effet, le sel des environnements hypersalins sont utilisés pour la préservation de la peau. La présence dans ce sel d'une population dense d'halophiles influence directement la qualité de la peau et abaisse de ce fait la valeur du cuir. Les halocines, ou des souches productrices d'halocines, pourraient ainsi être utilisées pour réguler les populations de micro-organismes attaquant la peau pendant sa conservation, son stockage et son transport (Birbir et al. 2004, Bitlisli et al. 2004).

Parmi les halocines, l'halocine H6 est la seule qui présente un intérêt en médecine humaine (Alberola et al. 1998, Lequerica et al. 2006). Des études récentes ont montré que le dysfonctionnement du transporteur Na^+/H^+ chez les eucaryotes est responsable de plusieurs maladies graves comme le cancer ou les maladies cardio-vasculaires (Donowitz et al. 2013). Comme nous l'avons vu précédemment, en raison de son mode d'action, l'halocine H6 pourrait être utilisée dans l'inhibition du transporteur Na^+/H^+ dans différents types de cellules de mammifères. Le traitement des animaux par l'halocine H6 dans un modèle d'infarctus du chien protège le myocarde contre les effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion (Lequerica et al. 2006). De plus, l'halocine entraîne une réduction importante des extrasystoles ventriculaires ectopiques et la diminution de l'infarctus (Alberola et al. 1998, Lequerica et al. 2006, Shand et Leyva 2007). L'halocine H6 représente ainsi un candidat important pour le traitement de l'insuffisance cardiaque, mais d'autres études seront nécessaires pour identifier d'autres applications pharmaceutiques possibles.

Avec l'émergence des infections par des bactéries pathogènes multirésistantes, la recherche de nouveaux agents antimicrobiens capables d'inhiber ces microbes est une urgence. Des études ont montré que certaines halocines pouvaient présenter une activité contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, ...) (Platas et al. 2002, Li et al. 2003, Shand et Leyva 2008). Cependant, des études complémentaires devront être menées pour confirmer leur utilisation potentielle contre des bactéries pathogènes de l'homme.

Matériels et méthodes

A. Matériels

I. Site d'échantillonnage : la saline de Sfax

Le site d'échantillonnage de nombreuses souches utilisées dans cette étude est la saline de Sfax en Tunisie. C'est un milieu extrême hypersalin, localisée dans la zone centrale de la côte Est de la Tunisie. La saline est s'étend sur une superficie totale de 1500 hectares. Elle est divisée en six séries d'étangs le long de 12 km de côtes (Figure 4, p. 9). Ces étangs sont peu profonds (de 20 à 70 cm de profondeur) et présentent une salinité comprise entre 40 et 400 g.L⁻¹. Le processus de fonctionnement de la saline de Sfax commence par le stockage de l'eau de mer dans 17 étangs primaires pour augmenter la salinité de l'eau de mer par évaporation. Quand la salinité atteint une valeur proche de 75 g.L⁻¹, l'eau de mer se déplace dans une section interne de cinq étangs en parallèle où elle est maintenue jusqu'à ce que la concentration en sel atteigne 130 g.L⁻¹. Après cette étape, l'eau de mer est distribuée dans les bassins de pré-cristallisation pour atteindre une concentration en sels de 300 g.L⁻¹. Au stade final, l'eau de mer arrive dans les étangs de cristallisation où le sel est précipité et la concentration en sels atteint son maximum à plus de 400 g.L⁻¹ (Trigui et al. 2011c). Des échantillons ont été collectés en mars 2007 par mes collègues du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de Sfax, dans une table salante TS18 (390 g.L⁻¹ de sels totaux, 34° 43'N 10° 44' E) et dans une station du partènement extérieur M1 (200 g.L⁻¹ de sels totaux, 34° 43' N 10° 44' E) de la saline de Sfax (figure 27). Les deux bassins TS18 et M1 ont été choisis pour l'échantillonnage car ils possèdent une forte concentration en sels et notre principal objectif est d'isoler et de travailler avec des souches halophiles extrêmes. Les échantillons ont été prélevés à partir de quelques centimètres sous la surface de l'eau avec une bouteille Van Dorn, alors que le sédiment a été recueilli par un carottage superficiel de 10 cm et les échantillons ont été stockés à 4°C jusqu'au traitement au laboratoire. Ces échantillons ont servi pour la constitution de la collection de souches de procaryotes, bactéries et archées halophiles de l'unité Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques Environnementaux (UBEA: UR/11ES72) de la Faculté des Sciences de Sfax en Tunisie.



Figure 27. Localisation de la saline de Sfax et des deux étangs d'échantillonnages TS18 et M1. La barre d'échelle correspond à 500 m (Google Earth).

II. Souches utilisées

II.1 Souches environnementales de procaryotes halophiles

Dans le cadre de cette étude, une première collection de 35 souches de procaryotes halophiles provenant d'échantillons collectés dans la saline de Sfax (Tunisie) à partir de deux bassins d'échantillonnages TS18 et M1 a été utilisée. Ces souches ont été isolées sur des milieux de culture modifiés DSC-97 (Trigui et al, 2011b) et R2A (BD DifcoTM) (Trigui et al, 2011b) additionnés de 200 g.L⁻¹ NaCl. Pour l'isolement, plusieurs dilutions des échantillons de 1/10 ont été effectuées. Puis 100 µL de chaque échantillon dilué ont été étalés sur les milieux gélosés DSC-97 et R2A et incubés à 37°C pendant 15 à 20 jours. Après la période d'incubation, un isolat représentatif avec un morphotype dominant a été sélectionné en se basant sur la morphologie, la pigmentation, la taille et la forme des cellules. Les isolats ont été purifiés par la suite au moins cinq fois sur des boîtes fraîches des milieux DSC-97 et R2A jusqu'à l'obtention d'une colonie bien pure. Finalement, les isolats ont été maintenus au froid à -80°C pour une conservation à long terme, sous forme des suspensions additionnés de

glycérol (40% m/v). La dénomination des souches isolées de la saline de Sfax est composée de 3 lettres et un chiffre : la première lettre fait référence à la nature de l'échantillon (E : eau et S : sédiment), la deuxième au bassin d'isolement (T : Table de cristallisation, TS18 et S1 : bassin de non cristallisation, M1 : bassin du partènement extérieur), la troisième au milieu d'isolement D= DSC-97 et R= R2A. Certaines de ces souches ont été identifiées dans des études antérieures comme étant des archées halophiles du genre *Halorubrum* (souches ETD1, ETD2 et ETD6), *Haloferax* (souches ES1D6 et ES1R10) ou une bactérie halophile du genre *Pseudomonas* (souche ES1D1). Une deuxième collection de souches halophiles environnementales a été utilisée au cours de ce travail, et provient de la collection de l'Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes du Muséum national d'Histoire naturelle à Paris. L'ensemble de ces souches est présenté dans le tableau 3.

Certaines souches d'archées halophiles de l'unité MCAM ont été utilisées aussi comme des références ou des contrôles positifs dans les tests d'amplifications par PCR de gènes codant les halocines. Ces souches sont *Natrinema* sp. SWI15 (Imadalou-Idres et al. 2013, Besse et al. 2015) et *Natrinema pellirubrum* DSM15624 comme souches productrices de l'halocine C8, *Haloferax mediterranei* DSM 1411 (Cheung et al. 1997) comme productrice de l'halocine H4 (Tableau 3)

II.2 Souches bactériennes non halophiles

Des bactéries non halophiles, ont également été testées dans ce travail comme souches cibles lors de la détermination du spectre d'activité des peptides antimicrobiens produits par les souches d'archées halophiles. Ce sont des bactéries à Gram positif : *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* ; ou à Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Tableau 4). D'autres souches d'*E. coli* comme *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21, *E. coli* Rosetta, *E. coli* Origami et *E. coli* JM110 ont été utilisées lors du clonage des gènes codant l'ARNr 16S pour l'identification phylogénétique des souches isolées de la saline de Sfax et dans le clonage des gènes codant les halocines (Tableau 4). Deux autres souches ont servi pour l'extraction des vecteurs d'expression et pour les clonages, comme la souche *E. coli* XL1 Blue utilisée pour l'extraction du plasmide pTA963 et la souche *E. coli* DH5 α utilisée pour l'extraction du plasmide pET28b (Tableau 4).

Tableau 3. Souches de procaryotes halophiles utilisées au cours de cette étude.

<i>Souche</i>	<i>Origine</i>	<i>Conditions de culture</i>	<i>Utilisation</i>
Archées halophiles			
<i>Halorubrum</i> sp. ETD1	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
<i>Halorubrum</i> sp. ETD2	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
Non identifiée ETD3	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
Non identifiée ETD5	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
<i>Halorubrum</i> sp. ETD6	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
Non identifiée ETD8	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
Non identifiée ETD19	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
Non identifiée ETD34	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
Non identifiée ETR7	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
Non identifiée ETR14	Eau de TS18, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
<i>Haloferax</i> sp. ES1D6	Eau de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
Non identifiée ES1D29	Eau de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
<i>Haloferax</i> sp. ES1R10	Eau de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
Non identifiée SS1R12	Sédiment de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
Non identifiée SS1R14	Sédiment de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
Non identifiée SS1R17	Sédiment de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
Non identifiée SS1R21	Sédiment de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	P
<i>Halobacterium salinarum</i> DSM3754	Peau salé de vache	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Haloarcula argentinensis</i> DSM12282	Salinas Chica, Argentine	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Haloarcula hispanica</i> DSM4426	Saline, Espagne	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Haloarcula japonica</i> DSM6131	Sédiment de saline, Japon	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Haloarcula</i> sp. SW15	Saline d'Ichekaben, Algérie	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM5511	Sol salé, Turkmenistan	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Haloferax volcanii</i> DSM3757	Mer Morte, Israël, Jordanie, Palestine	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Natrinema altunense</i> JCM12890	Lac salé de Xinjiang, Chine	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Natrinema gari</i> JCM14663	Sauce anchois, Thaïlande	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Halorubrum saccharovororum</i> DSM1137	Saline San Francisco, Californie	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Halobacterium</i> .sp JCM11081		M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Natrinema</i> sp. SW115	Saline Ichekaben, Algérie	M372, 37°C, 160 rpm	R
<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM15624	Cuir salé	M372, 37°C, 160 rpm	R
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM1411	Saline, Alicante, Espagne	M372, 37°C, 160 rpm	R, C
<i>Haloferax volcanii</i> H98	Institut de Génétique, nottingham, UK	YPC ou Casa, 37°C, 160 rpm	Cl
Bactéries halophiles			
<i>Pseudomonas halophila</i> ES1D1	Eau de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
Non identifiée ES1R9	Eau de M1, Saline de Sfax	SW25, 37°C, 160 rpm	C
<i>Salinibacter ruber</i> DSM13855	Saline, Espagne	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Lentibacillus halophilis</i> DSM19123	Sauce de poisson, Thaïlande	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Nesterenkonia halophila</i> DSM16378	Sol, Xinjiang, Chine	TSB+10% NaCl, 37°C, 160 rpm	C
<i>Halomonas sabkhae</i> DSM19122	Sebkha Ezzemoul, Algérie	MB+8% NaCl, 37°C, 160 rpm	C
<i>Salinicoccus siamensis</i> DSM21576	Crevette fermentée, Thaïlande	M372, 37°C, 160 rpm	C
<i>Oceanobacillus kapialis</i> DSM23158	Crevette fermentée, Thaïlande	M372+10% NaCl, 37°C, 160 rpm	C

C : souche cible dans les tests antimicrobiens ; Cl : souche utilisée pour le clonage ; P : souche productrice d'activité antimicrobienne ; R : souche de référence pour la production d'halocines.

Tableau 4. Souches bactériennes non halophiles, Origine et conditions de culture et leur utilisation.

<i>Souche</i>	<i>Origine (collection)</i>	<i>Conditions de culture</i>	<i>Utilisation</i>
<i>Micrococcus luteus</i> CIP53.45	Institut Pasteur, Paris	LB, 37°C, 160 rpm	C
<i>Staphylococcus aureus</i>	IBMC, Strasbourg	LB, 37°C, 160 rpm	C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	IBMC, Strasbourg	LB, 37°C, 160 rpm	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Institut Pasteur, Paris	Mueller Hinton, 37°C, 160 rpm	C
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	MNHN, Paris	LB Amp, 37°C, 160 rpm	Cl
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	MNHN, Paris	LB, 37°C, 160 rpm	Cl
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	MNHN, Paris	LB, 37°C, 160 rpm	Cl
<i>Escherichia coli</i> JM110	MNHN, Paris	LB, 37°C, 160 rpm	Cl
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	MNHN, Paris	LB, 37°C, 160 rpm	Cl
<i>Escherichia coli</i> Origami	MNHN, Paris	LB, 37°C, 160 rpm	Cl
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	MNHN, Paris	LB, Kan 50 μ g/ml, 160 rpm	Cl

C : souche cible dans les tests antimicrobiens ; Cl : souche utilisée pour le clonage

II.3 Champignons halophiles

En plus des souches de procaryotes halophiles, deux champignons halophiles, *Penicillium coryphilum* LCP5424 et *Eurotium rubrum* LCP6453, ont été testés pour leur sensibilité aux agents antimicrobiens produites par des souches d'archées halophiles.

III. Milieux de culture

III.1 Milieux de culture liquide

Les souches de procaryotes halophiles ont été cultivées dans deux milieux de culture spécifiques SW25 et M372 (DSMZ) dont la composition figure dans le tableau 5. Le milieu SW 25 a été choisi par la suite pour les cultures, les tests antimicrobiens et les tests de caractérisation. Le pH des milieux a été ajusté à 7,2 soit par du KOH 2M soit par de l'HCl 1M. La stérilisation des milieux a été effectuée par autoclavage à 120°C pendant 20 min. D'autres milieux de culture LB, YPC, Casa ont été utilisés spécifiquement pour cultiver les souches bactériennes non halophiles comme *E. coli* et la souche d'archée halophile *Hfx. volcanii* H98 lors des clonages (Tableau 5). Un autre milieu spécifique MSA a été utilisé pour la culture des champignons. Souvent ces milieux sont additionnés par des antibiotiques ou d'autres produits pour la sélection des clones transformés, ces produits figurent dans le tableau 6.

Tableau 5. Composition des milieux de culture utilisés dans la présente étude.

<i>Milieu</i>	<i>Composition</i>	<i>Ingrédient (g.L-1)</i>
SW25 (Sea water medium)	NaBr (<i>Sigma-Aldrich</i>)	0,65
	NaHCO ₃ (<i>Sigma-Aldrich</i>)	0,167
	CaCl ₂ .2H ₂ O (<i>Sigma-Aldrich</i>)	0,95
	MgCl ₂ .6H ₂ O (<i>Sigma-Aldrich</i>)	34,567
	MgSO ₄ .7H ₂ O (<i>Pancreac</i>)	49,492
	KCl (<i>Sigma-Aldrich</i>)	5
	NaCl (<i>Biosolve</i>)	195
	Extrait de levure (<i>BD</i>)	5
M372	Casaminoacides (<i>BD</i>)	5
	Na-glutamate (<i>Sigma-Aldrich</i>)	1
	Na ₃ -Citrate (<i>Aldrich</i>)	3
	MgSO ₄ .7H ₂ O (<i>Pancreac</i>)	20
	FeCl ₂ .4H ₂ O (<i>Sigma-Aldrich</i>)	36.10 ⁻³
	MnCl ₂ .4H ₂ O (<i>Sigma-Aldrich</i>)	0.36.10 ⁻³
	KCl (<i>Sigma-Aldrich</i>)	2
	NaCl (<i>Biosolve</i>)	200
	Extrait de levure (<i>BD</i>)	1
SW 30%	NaCl (<i>Biosolve</i>)	240
	MgCl ₂ .6H ₂ O (<i>Sigma-Aldrich</i>)	30
	MgSO ₄ .7H ₂ O (<i>Pancreac</i>)	35
	KCl (<i>Sigma-Aldrich</i>)	7
Milieu ajusté à un pH 7,5 par 20 ml de Tris-HCl 1M		
YPC	Extrait de levure (<i>Difco</i>)	5,88
	Peptone (<i>Oxoid</i>)	1
	Casaminoacides (<i>BD</i>)	1
Milieu ajusté à un pH 7,5 par 2,3 ml de KOH (1M)		
Casa	Casaminoacides (<i>BD</i>)	5
Milieu ajusté à un pH 7,5 avec 1,7 ml de KOH (1M)		
TSB (Tryptic Soy Broth)	Tryptone (<i>Oxoid</i>)	17
	Soytone (<i>Oxoid</i>)	3
	Glucose (<i>Sigma-Aldrich</i>)	2,5
	NaCl (<i>Biosolve</i>)	100
	K ₂ HPO ₄	2,5
MB (Bennett medium)	Glucose (<i>Sigma-Aldrich</i>)	10
	Extrait de levure (<i>BD</i>)	2
	Peptone (<i>Oxoid</i>)	2
	Extrait de viande (<i>BD</i>)	1
	NaCl (<i>Biosolve</i>)	80
LB (Luria Bertani)	Tryptone (<i>Oxoid</i>)	10
	Extrait de levure (<i>Difco</i>)	5
	NaCl (<i>Biosolve</i>)	10
MSA medium	Malt	20
	NaCl (<i>Biosolve</i>)	75

Tableau 6. Produits ajoutés dans les milieux de cultures.

<i>Milieu</i>	<i>Réactifs ajoutés</i>	<i>Utilisation</i>
LB	Ampicilline (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + X-gal (80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IPTG (0,5 M)	Sélection des clones transformés d' <i>E. coli</i> DH5 α avec le plasmide p-GEMT
LB	Ampicilline (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Sélection des clones transformés d' <i>E. coli</i> JM110 et <i>Hfx. volcanii</i> H98 avec le plasmide pTA963
LB	Kanamycine (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Sélection des clones transformés d' <i>E. coli</i> BL21 avec le plasmide pET28b
Casa	Thiamine (1mg.mL ⁻¹) + biotine (1mg.mL ⁻¹)	Sélection des clones transformés d' <i>Hfx. volcanii</i> H98 avec le plasmide pT963
YPC	Thymidine (4mg.mL ⁻¹) + Novobiocine (1 mg.mL ⁻¹)	Sélection des clones transformés d' <i>Hfx. volcanii</i> H98 avec le plasmide pT963

III.2 Milieux de culture solide

Les milieux de culture solides ont été obtenus par addition d'agar (BD.Difco) à une concentration de 15 g.L⁻¹ pour les géloses dures et 7 g.L⁻¹ pour les géloses molles. Ces milieux solides ont été utilisés pour le repiquage des souches conservées à -80°C. Les boîtes ensemencées ont été utilisées par la suite pour des cultures, des tests antimicrobiens ou des tests de croissance. Les milieux de culture solides SW 25 et M372 ont été utilisés pour le test d'activité antimicrobienne des isolats halophiles. Par contre, les deux milieux solides TSB, MB et MSA ont été utilisés pour le test d'activité antimicrobienne des isolats bactériens non halophiles et les champignons. D'autres milieux solides LB ont été utilisés pour la sélection des colonies transformées d'*E. coli*, tandis que les milieux YPC et Casa ont été utilisés pour la sélection des colonies transformées d'*Hfx. volcanii* H98.

B. Méthodes microbiologiques

I. Repiquage et mise en culture des souches

Les précultures des souches productrices et des souches cibles ont été réalisées soit à partir des souches conservées à - 80°C ou soit à partir des boîtes solides avec des colonies bien isolées conservées à une température ambiante ou à 4°C. Une ose à partir du tube Eppendorf ou une colonie bien isolée sur boîte ont été prélevés à l'aide d'une anse stérile et utilisés pour repiquer les milieux de cultures spécifiques. Après incubation pendant 4 jours à 37 °C à une agitation de 200 rpm, la préculture a été utilisée pour ensemençer une culture. Des cultures des souches environnementales productrices ou cibles halophiles et des champignons ont été réalisées dans 50 mL du milieu SW25, M372, TSB, MSA ou MB dans des erlenmeyers, ensemençées par 200 µL de la préculture cultivée dans les mêmes conditions et incubées pendant 4 à 5 jours à 37°C. Pour les souches cibles non halophiles les cultures ont été effectuées dans le milieu LB, pendant 24 h à 37°C, sous agitation de 200 rpm.

II. Tests d'activité antimicrobienne contre des souches de procaryotes halophiles, non halophiles et contre des champignons

Les tests d'activités antimicrobiennes des surnageants, des culots cellulaires ou des cultures des souches productrices contre des souches de procaryotes halophiles, non halophiles et les champignons, ont été réalisés sur milieux solides par la méthode de diffusion en puits. Les tests antimicrobiens consistent à introduire 2 mL de la culture de la souche cible halophile prélevée en phase stationnaire après une période de 3 à 4 jours de croissance qui dépend de la souche cultivée, dans 20 mL de gélose molle, SW25 ou M372, maintenue à l'état liquide à 45°C (Figure 28).

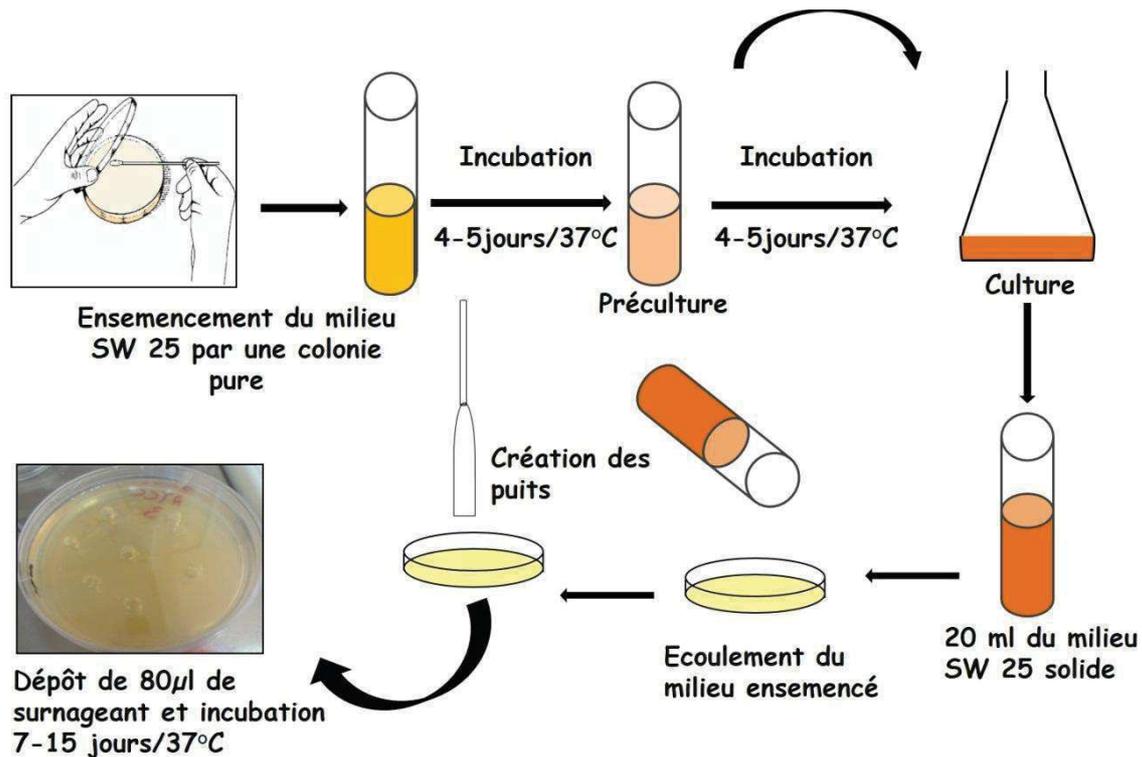


Figure 28. Schéma présentant les étapes des tests antimicrobiens effectués contre les souches de procaryotes halophiles par la méthode de diffusion en puits.

Pour les souches cibles non halophiles, les cultures ont été prélevées à une densité optique à 600 nm entre 0,2 et 0,4. Ensuite, la croissance de ces souches a été bloquée par incubation des cultures pendant 10 min dans la glace. Une première couche de gélose dure de 10 mL a été coulée dans une boîte de Pétri. Après solidification, une suspension de la culture bactérienne a été mélangée à la gélose molle, le volume de la culture bactérienne sensible à ajouter à 10 mL de la gélose molle est calculé selon la formule $30/A_{600}$. Pour les champignons, quelques spores ont été mélangées avec la gélose molle et coulées dans une boîte de Pétri. Dans les 2 cas, après homogénéisation, les mélanges ont été coulés dans les boîtes de Pétri. Après solidification, des puits de 0,5 cm de diamètre ont été creusés stérilement dans la gélose. Dans chacun de ces puits, 80 µL de surnageant de la culture productrice, du culot cellulaire ou de la culture centrifugée à 8000 g durant 10 min, ont été déposés dans les puits (Figure 28). En ce qui concerne les bactéries non halophiles cibles, le surnageant de la souche productrice halophile a été traité avant le dépôt dans les puits pour diminuer la concentration de sel par une dialyse avec une membrane de 3,5 kDa (Spectra-Por[®]3, MWCO 3,5 kDa) contre l'eau MilliQ[®] (Millipore) additionnée de 10% NaCl (m/v). Les boîtes ont été placées dans un réfrigérateur à 4°C pendant 2 h pour permettre aux

substances actives de diffuser dans la gélose. Des contrôles positifs ont été utilisés pour les tests antimicrobiens contre les bactéries avec les antibiotiques kanamycine ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et chloramphénicol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et un contrôle négatif avec le milieu SW additionné de 200 g.L^{-1} NaCl dialysé. Par la suite, les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant une période de 7 à 15 jours pour les souches cibles halophiles et durant une nuit pour les souches cibles non halophiles. La production des halocines a été détectée par la formation des zones d'inhibition de la croissance de la souche cible observée sous forme d'un halo clair autour des puits. Les diamètres des halos d'inhibition, mesurés manuellement après la période d'incubation sont exprimés en mm. Les tests antimicrobiens en milieu solide nous ont permis d'identifier les souches productrices des agents antimicrobiens, de déterminer le spectre d'activité de ces substances et d'isoler les fractions actives obtenues au cours de la purification des agents antimicrobiens.

III. Caractérisation des souches halophiles productrices d'agents antimicrobiens

Des caractérisations phénotypiques des souches halophiles productrices des agents antimicrobiens ont été effectuées à l'aide de plusieurs tests. Tout d'abord, la coloration Gram a été effectuée pour distinguer les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif en fonction de la composition de leur paroi, selon le protocole de Dussault (1955). Par la suite, des tests de réduction de nitrates, de nitrites et de production d'uréase ont été réalisés et l'activité a été déterminée comme décrit par Gerhardt et al. 1994. Les différentes sources de carbone (glucose, maltose, saccharose, xylose et glycérol) ont été testées par l'ajout d'une concentration de 0,1% (m/v) au milieu de culture SW 25 modifié où l'extrait de levure a été réduit à 0,05% (m/v) et du NaCl a été ajouté à 200 g.L^{-1} . Les cultures ont étéensemencées dans ces milieux par une colonie pure et incubées pendant 7 à 15 jours. La fermentation des sucres par les souches halophiles est se traduit par le changement de la coloration du milieu qui vire du rouge au jaune (Arahal et al. 1996).

Le test d'activité enzymatique, de la protéase de la souche ES1R9, a été effectué dans le milieu SW 25 additionné par 20% (m/v) de lait écrémé. La souche a étéensemencée par une strie centrale sur la gélose et incubée pendant deux semaines. L'activité protéolytique a été déterminée en observant la formation de zones claires/opaques autour de la culture

ensemencée. Cette souche a été utilisée pour le traitement de surnageant de la culture productrice des agents antimicrobiens pour l'identification de la nature de ces composés.

En plus de la caractérisation phénotypique, l'étude de l'effet de différents facteurs physicochimiques sur la croissance des souches halophiles productrices des agents antimicrobiens a été également effectuée par l'étude de l'effet de différentes concentrations en NaCl dans le milieu de culture. Des cultures ont été effectuées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu SW 25 et différentes concentrations en NaCl (50, 100, 150, 200, 250, et 300 g.L⁻¹). Ces cultures ont été ensemencées par 200 µL de la préculture prélevée en phase stationnaire de croissance avec une densité optique finale à 600 nm de 0,1 et incubées à 37°C sous une agitation de 160 rpm. Des prélèvements réguliers ont été effectués et la croissance a été suivie en mesurant la DO à 600 nm pendant une semaine. Le taux de la croissance μ (h⁻¹) a été calculé pendant la phase exponentielle selon l'équation suivante $\mu = (\ln DO_2 - \ln DO_1) / (t_2 - t_1)$ sachant que le DO_2 et DO_1 sont respectivement les densités optiques à 600 nm mesurées au temps t_2 et t_1 .

IV. Etude de la stabilité de l'activité antimicrobienne des souches d'archées halophiles

IV.1 Dénaturation thermique

Dans le but d'étudier la stabilité à la chaleur de l'activité antimicrobienne des souches productrices halophiles, 1 mL de la culture de chaque souche productrice a été prélevé en phase stationnaire de croissance et centrifugé à 8000 g pendant 10 min. Le surnageant récupéré ou la culture ont été exposés à différentes températures (37, 50, 60, 70 et 80°C) dans un bain-marie pendant 15 min et sans agitation. Après refroidissement rapide dans de la glace, 80 µL de surnageant traité ou de la culture ont été testés contre les souches sensibles par la méthode de diffusion en puits sur gélose comme détaillé précédemment dans le paragraphe B. II.

IV.2 Variation du pH

Dans le but de déterminer l'effet de la variation de pH sur l'activité antimicrobienne, 5 mL de la culture d'archée halophile productrice ont été prélevés pendant la phase stationnaire de croissance et centrifugés pendant 10 min à 8000 g. Le surnageant récupéré ou la culture ont été ajustés par la suite à différentes valeurs de pH comprises entre 2 et 10, à l'aide de deux solutions stériles de HCl 1 M ou de NaOH 1 M. Après l'incubation du surnageant ou de la

culture pendant 2 h à 37°C dans une étuve sans agitation, le pH a été réajusté à 7,2 et l'activité antimicrobienne résiduelle a été déterminée par la méthode de diffusion en puits sur gélose comme décrit précédemment dans le paragraphe B. II.

IV.3 Enzymes protéolytiques

Pour identifier la nature de agents antimicrobiens produits par les souches halophiles sélectionnées, nous avons exposé le surnageant ou les cultures productrices à la protéase halophile contenue dans le surnageant de la souche ES1R9. L'activité protéase a été révélée comme précédemment décrit dans le paragraphe B.III. Cinq cent µL de surnageant ou de la culture productrice récupérés après centrifugation pendant 10 min à 8000 g, ont été soumis à un traitement par le surnageant de la souche ES1R9 productrice de protéase halophile en utilisant différents volumes de surnageant contenant la protéase (50, 100 et 200 µL). Après une période de traitement de 2 h à 45°C, l'activité antimicrobienne résiduelle a été testée comme décrit précédemment par la méthode de diffusion en puits. Finalement, les zones d'inhibition en présence d'activité protéolytique ont été déterminées et comparées avec des contrôles n'ayant pas subi de traitement protéolytique.

V. Optimisation de la production des agents antimicrobiens

V.1 Effet de la nature de la source de carbone, d'azote et de certains éléments minéraux

Dans le but rechercher de nouvelles sources d'éléments nutritifs pouvant améliorer la production des agents antimicrobiens par les souches d'archées halophiles ETD5, ETD8 et SS1R12, nous avons testé l'effet de différentes sources de carbone (glucose, sucrose, arabinose, maltose, fructose, dextrose, saccharose, glycérol, extrait de levure) et d'azote (acides casaminés, peptone, tryptone, caséine, nitrate de potassium, urée) ainsi que quelques éléments minéraux (chlorure de zinc ($ZnCl_2$), phosphate de potassium (KH_2PO_4), chlorure de manganèse ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), sulfate de fer ($Fe_2 \cdot (SO_4)_3$) et sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2 \cdot SO_4$)). Ces éléments ont été additionnés à une concentration finale de 1 % (m/v) à la composition de base du milieu de culture SW 25 modifiée avec 0,05% de l'extrait de levure (m/v). Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL du milieu SW 25 inoculé avec 200 µL de préculture prélevée en phase stationnaire de croissance. Ces cultures ont été incubées durant 4 jours à 37°C et sous une agitation de 200 rpm. L'effet de différentes sources de carbone, azote ou de sels minéraux a été évalué par des tests antimicrobiens sur

gélose comme décrit dans le paragraphe B. II. Pour estimer l'erreur moyenne standard (SEM) et l'incertitude dans les mesures, les tests ont été répétés séparément quatre fois.

V.2 Effet de la concentration en NaCl

L'importance de la concentration en NaCl sur la croissance et la production d'agents antimicrobiens par les souches d'archées halophiles ETD5, ETD8 et SS1R12 a également été testée. Pour cela, des cultures dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu SW ont été réalisées et en présence de NaCl (50, 100, 150, 200, 250, 300 et 350 g.L⁻¹). Après 4 jours d'incubation à 37°C et sous une agitation à 200 rpm, les cultures ont été récupérées et l'activité antimicrobienne a été évaluée par des tests antimicrobiens sur milieu gélosé comme décrit précédemment. Les tests ont été répétés quatre fois séparément.

V.3 Effet des conditions physicochimiques

La production des substances antimicrobiennes est souvent influencée non seulement par les éléments nutritifs, mais aussi par les conditions physicochimiques de croissance. Pour déterminer les conditions optimales de la production de ces substances antimicrobiennes par les trois souches productrices halophiles ETD5, ETD8 et SS1R12, nous avons testé l'effet de la température, du pH et de l'agitation.

V.3.1 Effet de la température

La température optimale de croissance des souches d'archées halophiles a été identifiée dans des études antérieures à 37°C. Par contre la production optimale d'agents antimicrobiens peut varier selon leur nature et leurs caractéristiques. De ce fait, des cultures ont été effectuées dans 50 mL du milieu SW 25 contenant 0,05% extrait de levure, avec 1% dextrose et 1% tryptone pour la souche ETD5, avec 1% arabinose et 1% tryptone pour la souche pour la souche ETD8 et avec 1% fructose et 1% caséine pour la souche SS1R12. Ces cultures ont été inoculées par 200 µL d'une préculture de chaque souche. Les cultures ont été incubées pendant 4 jours à différentes températures (27, 37, 40 et 45°C), sous une agitation de 200 rpm. La croissance a été suivie durant cette période par la mesure des DO à 600 nm durant chaque prélèvement. L'effet de différentes températures a été évalué par des tests antimicrobiens sur gélose répétés 4 fois et les tests ont été reproduits 4 fois.

V.3.2 Effet du pH

L'effet de pH a été testé sur la production des peptides antimicrobiens et la croissance des souches halophiles productrices ETD5, ETD8 et SS1R12. Dans ce contexte, des cultures ont été cultivées préparées dans 50 mL du milieu SW 25, ajusté à différents pH (5, 6, 7 et 8)

par des solutions stériles KOH (2M) ou HCl (1M), additionné par 0,05% d'extrait de levure (m/v), 1% de dextrose (m/v) et 1% de tryptone (m/v) pour la souche ETD5, avec 1% d'arabinose (m/v) et 1% de tryptone (m/v) pour la souche ETD8 et à 1% de fructose (m/v) et 1% de caséine (m/v) pour la souche SS1R12. Ces cultures ont été incubées pendant 4 jours à 37°C sous une agitation de 200 rpm et la croissance a été suivie pendant cette période par la mesure de la DO à 600 nm. Les tests d'activité ont été réalisés comme détaillé précédemment et répétés 4 fois.

V.3.3 Effet de l'agitation

Afin d'optimiser la meilleure agitation pour la production d'agents antimicrobiens par les souches halophiles ETD5, ETD8 et SS1R12, des cultures ont été réalisées dans 50 mL du milieu SW 25ensemencés par 200 µL de préculture de la souche productrice. Ces cultures ont été incubées sous différentes agitations de 100, 150, 200, 250 et 300 rpm, en gardant les autres paramètres constants, pendant 5 jours à 37°C et la croissance a été suivie pendant cette période par la mesure de DO à 600nm. L'effet de l'agitation a été évalué par des tests antimicrobiens et les tests ont été répétés 4 fois.

VI. Effet de la phase de croissance

Dans le but de déterminer le moment où la production d'agents antimicrobiens est optimale, nous avons suivi la croissance et la production d'antimicrobiens des souches halophiles ETD5, ETD8 et SS1R12 pendant une semaine. Des cultures ont été réalisées pour les 3 souches en ajoutant 200 g.L⁻¹ de NaCl dans le milieu SW 25 pour la souche ETD5 et SS1R12 et 150 g.L⁻¹ de NaCl pour la souche ETD8. Ces cultures ont été inoculées par 200 µL d'une préculture prélevée pendant la phase stationnaire de croissance et incubées à 37°C sous une agitation de 200 rpm. Des prélèvements de 1 mL ont été effectués régulièrement pour la mesure de la croissance (DO à 600 nm) et pour le test d'activité. Les tests antimicrobiens ont été réalisés sur un milieu solide et répétés 3 fois séparément.

VII. Détection de la présence de virus

VII.1 En milieu liquide

Pour s'assurer que l'activité antimicrobienne sur les souches cibles est uniquement due à la production d'agents antimicrobiens de nature peptidique ou protéique, et non à des particules virales, nous avons cherché la présence des virus dans la zone d'inhibition des souches cibles. Pour cela, un fragment de gélose (environ 2 mm) d'une boîte de test antimicrobien, découpé dans la zone d'inhibition de la souche cible, a été introduit dans des

cultures des souches ETR14, ETD3 et SS1R17. Ces cultures de 50 mL ont été effectuées dans le milieu SW 25 dans des erlenmeyers de 250 mL qui ont étéensemencées par 200 μ L d'une préculture en présence de fragment de gélose, pendant 6 jours à 37°C et sous une agitation de 200 rpm. Parallèlement, des contrôles négatifs pour les trois souches ont été réalisés sans fragments de gélose dans les mêmes conditions. Des prélèvements réguliers de 1 mL de la culture ont été effectués pour la mesure de la croissance à une DO à 600 nm. En plus, un prélèvement de 1 mL de la culture a été réalisé pour le test de l'activité antimicrobienne dans le surnageant des souches sensibles, prélevé pendant la phase exponentielle ou au début de la phase stationnaire de croissance. Finalement, des tests antimicrobiens ont été réalisés comme précédemment décrit.

VII.2 En milieu solide : test des plaques

La détection des virus a été réalisée par le test des plaques. Des précultures ont été réalisées dans 5 mL de milieu SW 25 pendant 3 à 4 jours. Des cultures des souches productrices d'agents antimicrobiens ETD5, ETD8 et SS1R12, ont été effectuées dans 50 mL de milieu SW 25, inoculés par 200 μ L de préculture, incubés durant 4 jours à 37°C, sous une agitation de 200 rpm. Ces cultures ont été centrifugées à 8 000 g pendant 10 min, les surnageants des cultures productrices des trois souches prélevées ont été filtrés par des filtres de 0,22 μ m (Millipore). Des dilutions des surnageants de ces cultures ont été préparés (2x, 5x et 10x) dans du milieu stérile SW 25. Une couche de gélose dure en milieu SW 25 a été coulée dans une boîte de Pétri. Après solidification, 10 mL d'une gélose molle ont étéensemencés par 150 μ L de la souche cible mélangés avec 100 μ L de différents surnageants dilués ou non dilués. Ensuite, la gélose molle a été coulée sur la première couche solide de milieu SW 25 et incubée pendant 7 à 15 jours à 37°C. L'activité virale a été détectée par la présence de plages de lyse dans la gélose et les halos d'inhibition ont été mesurés en mm.

C. Méthodes moléculaires

I. Extraction des acides nucléiques

L'ADN génomique des souches à identifier a été extrait à partir du culot cellulaire d'une culture de 40 mL en phase stationnaire. Ce culot a été remis en suspension dans 1,8 mL du tampon SET (20% de saccharose, 50 mM d'EDTA, 50 mM de Tris, pH 7,6). Vingt μ L de lysozyme à 20 mg.mL⁻¹ (Biosolve) ont été additionnés pour la lyse de la paroi, et incubés pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, 20 μ L de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10% ont été ajoutés au mélange suivi d'une incubation pendant 1 h sous agitation et à

température ambiante. Les protéines associées à l'ADN ont été ensuite hydrolysées en incubant la suspension bactérienne avec 50 μL de protéinase K à 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (AppliChem) pendant 2h à 55°C. Après centrifugation, le lysat a été dialysé intensivement avec des membranes de dialyse (Spectra-Por[®]3, MWCO 3,5 kDa), contre 5 L d'eau MilliQ[®] (Millipore) pendant une nuit. Le dialysat a été centrifugé à 8000 g pendant 15 min à 5°C et le surnageant a été récupéré. Puis 5 mL de chloroforme (Sigma) ont été ajoutés, pour l'extraction de l'ADN. La phase supérieure a été récupérée puis centrifugée à 8000 g pendant 5 min et le surnageant clarifié a été transféré dans un nouveau tube puis l'ADN a été précipité par l'ajout d'un volume d'isopropanol (Sambrook et al. 1989), puis rinçage par 1 mL d'éthanol à 70% et centrifugation pendant 10 min à 8000 g. Le culot contenant l'ADN a été séché à l'air ambiant pendant 1 h, puis remis en suspension dans 1 mL de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7 et stocké à 4°C

L'extraction d'ARN à partir des souches halophiles productrices des peptides antimicrobiens a été effectuée pour tester l'expression pendant la phase stationnaire de croissance des gènes codant les halocines. L'extraction de l'ARN a été réalisée à partir du culot cellulaire de 100 mL des cultures des souches ETD5, ETD8, et SS1R12 en utilisant le réactif Trizol[®] (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher). Les étapes d'extraction ont été suivies comme décrit dans la procédure du fabricant. L'ARN total a été conservé à -80°C. Un traitement de l'ARN par la DNase a été réalisé pour éliminer toute contamination par de l'ADN génomique. Le mélange de digestion est constitué par 6 μL d'ARN (5 μg), 1 μL du tampon 10x, 1 μL de DNase (1 U/ μL) (Promega) et 2 μL d'eau « RNase free » (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher). L'eau "RNase free", est une eau pure dépourvue d'ARNase. Elle a été préparée à partir de l'eau MilliQ[®] stérile additionnée par un additif chimique de 1% de diéthylpyrocarboate (DEPC) (Sigma-Aldrich). Après incubation pendant 3 h à 37°C, 1 μL de la solution « DNase STOP » (Promega) a été ajoutée au mélange pour arrêter la réaction et incubé à 65°C pendant 10 min. L'ARN total extrait (10 μg) a été purifié à l'aide des kits spécifiques « PureLink[®] RNA Mini Kit » (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher) puis stocké à -80°C après dosage. En plus, l'intégrité de l'ARNr 16S a été vérifiée par le dépôt de 5 μL d'ARN sur gel d'agarose de 1% (m/v) dans le tampon 1x Tris acétate EDTA (TAE) RNase free. Les détails expérimentaux de la préparation de gel d'agarose, de la visualisation sous UV et la migration seront décrits dans le paragraphe C.III. Les acides nucléiques (ADN et ARN) utilisés lors de ces études ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoVue Plus (GE Healthcare) avec une mesure des absorbances à $A_{230\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}}$, $A_{280\text{nm}}$ et $A_{320\text{nm}}$ proportionnelles à la concentration, exprimée en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

L'appareil calcule les rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} qui permet de savoir si les échantillons sont purs ou contaminés par des protéines ou solvants. Les échantillons sont considérés comme contaminés si ce rapport supérieur à 2 ou inférieur à 1,65.

II. Rétrotranscription

La transcription inverse consiste à synthétiser de l'ADNc à partir de l'ARN en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse, RT). Le mélange réactionnel est constitué de 1 μL d'amorces aléatoires ($25 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Promega), 1 μL de dNTP Mix (0,5 mM) (Promega), 12 μL d'eau « RNase free » et de 10 μg d'ARN. Ensuite, ce mélange a été incubé à 65°C pendant 5 min et incubé par la suite pendant 30 s dans la glace. Après une brève centrifugation, 4 μL de tampon « first strand » (Invitrogen, ThermoFisher) 5x et 2 μL DTT (0,1M), ont été ajoutés puis mélangés délicatement et incubés durant 2 min à 25°C . Finalement, 1 μL de RT (10U) SuperscriptII[®] reverse transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher), a été ajouté au mélange et l'incubation a été poursuivie pendant 10 min à 25°C . Enfin, la réaction a été arrêtée par une incubation de 15 min à 70°C .

III. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaine

Les ADN génomiques extraits à partir des souches halophiles étudiées dans ce travail, ont été amplifiées par réaction de polymérisation en chaine (PCR) avec des amorces spécifiques des gènes codant les ARNr 16S des archées ou des eubactéries, dans le but d'identifier les souches isolées (Vetriani et al.1999). Des amplifications d'ADN génomique ou d'ADNc ont été effectuées avec les amorces spécifiques des gènes codant les halocines C8, H4, S8 et R1 pour la recherche des gènes codant les halocines chez ETD5, ETD8 et SS1R12. D'autres amorces spécifiques pour amplifier les gènes codant les halocines S8 ont été choisies pour l'expression de gène *hals8*, de l'halocine complète et du précurseur chez *E. coli* DH5 α et chez *Hfx. volcanii* H98. Ces amorces ont été choisies à partir de l'analyse de gène codant le précurseur de l'halocine S8, chez l'archée halophile non caractérisée S8a à partir de laquelle a été initialement isolée HalS8, disponible dans la base de données Genbank (AF276080.1). De même, les amorces pour l'amplification du gène codant l'halocine R1 ont été choisies à partir de l'analyse de la séquence du mégaplasmide 2 (283 kb) de la souche productrice *Halobacterium. sp.* GN101 disponible dans Genbank (EU080936.1) (Besse et al. 2015). Ces amorces ont été analysées par un logiciel Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), qui nous a permis d'identifier la température de fusion (T_m), la probabilité de formation de structure en épingles à cheveux, les dimères et les hétérodimères

de ces amorces. D'autres amorces oligonucléotidiques pour amplifier les gènes codant les halocines C8 et H4 ont été également testées, les amorces de l'halocine C8 ont été choisies à partir de l'analyse de précurseur de l'halocine C8 de la souche *Natrinema* sp. SWI15 (GenBank : KF516080.1), tandis que celles d'HalH4 ont été choisies à partir de séquence de plasmide pHM300 de la souche *Hfx. mediterranei* DSM1411 (GenBank : CP001870.1). Après analyse de la séquence de mégaplasme 2 de la souche *Halobacterium*. sp. GN101, présentant le gène *halS8*, des séquences d'insertions IS ont été identifiées autour du gène *halS8*. Pour cela des amorces des gènes codant les IS ont été choisies à partir de ces séquences dans le but de rechercher des éléments transposables ou IS chez la souche ETD5. L'ensemble des amorces oligonucléotiques utilisées dans les PCR sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7. Amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude, pour l'amplification des gènes codant l'ARNr 16S, les halocines C8, S8, H4 et R1 et les IS.

N°	Nom d'oligo	Gène	Séquence 5' --->3'	Tm (°C)	Spécificité
189	Eubac27F	<i>ARN 16S</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	57,3	eubactéries
190	Eubac 1492R	<i>ARN 16S</i>	GGTTACCTTGTTACGACT	52,4	eubactéries
191	Arch21F	<i>ARN 16S</i>	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	62,4	archées
192	Arch958R	<i>ARN 16S</i>	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	56,7	archées
193	S-D-Arch-0025-a-S-17	<i>ARN 16S</i>	CTGGTTGATCCTGCCAG	52,9	archées
199	S-*-Univ-1517-a-A-21	<i>ARN 16S</i>	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	56,1	universel archées/eubactéries
287	C8-9	<i>HalC8</i>	CCGACGGGGTGCAGTCC	62,4	Amplification fragment 327 pb de l'halocine C8
288	C8-10	<i>HalC8</i>	CGTCACCGCAACCGCTGT	60,5	Amplification fragment 327 pb de l'halocine C8
351	C8-IG1	<i>HalC8</i>	ACGCTGTGCGAGTAGGAGTT	60,1	régions intergéniques
352	C8-IG2	<i>HalC8</i>	GAGACGACGTTTCGAGGAATC	59,8	régions intergéniques
404	halS8-F1	<i>HalS8</i>	GCTTCAGCTGTCCGATTTTC	54,3	Gène codant précurseur halocine S8
405	halS8-R1	<i>HalS8</i>	CTTCAAGTATCGCGGACACA	54,9	Gène codant précurseur halocine S8
406	halS8-F2	<i>HalS8</i>	TCAGAGCGGAGATCTTGTTACG	56,3	Gène codant précurseur halocine S8
407	halS8-R2	<i>HalS8</i>	TGCCGAAACAGACGACTAAGA G	56,7	Gène codant précurseur halocine S8
408	408-halR1-F1	<i>HalR1</i>	GCGGTCATHCTCATHTTYAAT	51	Oligo dégénérés halocine R1
409	409-halR1-F2	<i>HalR1</i>	CTCCARTCRAATATHAATATH	43,6	Oligo dégénérés halocine R1
410	410-halR1-R1	<i>HalR1</i>	CCYCCYGAGACTGGYGG	59,3	Oligo dégénérés halocine R1
411	halH4-F1	<i>halH4</i>	CAGTCTCGGAGCGCTTAGTT	56,9	Gène codant l'halocine H4
412	halH4-R1	<i>HalH4</i>	CGGGATACTTGGGTTCTTCA	54,2	Gène codant l'halocine H4
413	halH4-F2	<i>HalH4</i>	TGCTCTGAATTTAAGTATGCAA	50,3	Gène codant l'halocine H4
414	halH4-R2	<i>HalH4</i>	GTAGAGGCACCGCTACAGAA	56,5	Gène codant l'halocine H4
415	halS8-F3	<i>HalS8</i>	AACTGGAGAGCGTCTGTTT	53,9	Gènes encadrant halS8
416	halS8-R3	<i>HalS8</i>	ACACGTCGTGAACTGGAGAT	56	Gènes encadrant halS8
459	halS8-F6	<i>HalS8</i>	AAAGACAGGGTATTCGGTGTGC	60,3	Gène codant halS8
460	halS8-F7	<i>HalS8</i>	CGATAGTTCAACCCCGAAT	57,3	Gène codant halS8
461	halS8-R5	<i>HalS8</i>	TGCTCATTCGACGTGCTACT	57,3	Gène codant halS8
432	halS8-R6	<i>HalS8</i>	CAGGTCAACATCCTCCAAGG	59,4	Gène codant halS8
433	IShalS8-F1	<i>IShalS8</i>	TGAGTGGTTGAGATCGTTTCG	57,3	Gène codant IS
434	IShalS8-F2	<i>IShalS8</i>	TCGGAATAGTGTCGAACGTG	57,3	Gène codant IS
456	halS8-F4	<i>HalS8</i>	CGCATATGAGTGACTGTAATAT AAACAG	60,7	Gène codant halS8
457	halS8-R4	<i>HalS8</i>	GAATTCAAGGACTGGACCTC C	62,1	Gène codant halS8
458	halS8-F5	<i>HalS8</i>	CGTCATGAGTGACTGTAATATA AACAG	60,4	Gène codant halS8
475	halS8-F	<i>HalS8</i>	CGCATATGTCCGATAAAGACA GC	60,6	Gène codant halS8
476	halS8-R	<i>HalS8</i>	GAATTCACCAGAAGCTAGTCC ATTCAT	61,9	Gène codant halS8
477	halS8-F	<i>HalS8</i>	ACATGTCCGATAAAGACAGCA	55,9	Gène codant halS8

Le mélange réactionnel (25 μL) de la PCR contient 1 μL de la matrice d'ADN génomique (0,1 μg), 1 μL de chaque amorce R et F (0,4 μM de chaque amorce), 2,5 μL de tampon MgCl_2 (10x), 1 μL de désoxynucléotides (dNTP) en solution (10 μM concentration finale de chaque) (Promega), et 0,25 μL de la Taq polymérase (1,25 U) (Promega). Le cycle de température de chaque PCR varie selon la taille des oligonucléotides et selon la température d'hybridation spécifique pour chaque type d'amorce. Pour les PCR d'amplification des gènes d'ARNr 16S et des gènes halocines H4 et C8, nous avons utilisé le programme selon le cycle suivant : [5 min à 95°C puis 30 cycles (phase de dénaturation à 95°C pendant 30 s, phase d'hybridation à 55°C pendant 30s, phase d'élongation à 72°C pendant 2 min), puis 7 min à 72°C]. Pour les PCR d'amplification des gènes des halocines S8 et R1 et les gènes des IS, nous avons utilisé le programme suivant : [5 min à 95°C puis 30 cycles (phase de dénaturation à 95°C pendant 1 min, phase d'hybridation à 55°C pendant 1 min, phase d'élongation à 72°C pendant 1 min 30s), puis 7 min à 72°C]. Pour chaque réaction, un contrôle négatif avec de l'eau MilliQ[®] (Millipore) pour vérifier que le mélange de PCR dépourvu d'une contamination avec l'ADN et un contrôle positif avec les amorces oligonucléotidiques des gènes codant l'ARNr 16S, pour vérifier que l'ADN amplifié est celui de la souche d'archée halophile utilisée, ont été réalisées. De plus, un contrôle positif a été utilisé avec l'ADN de la souche *Hfx. mediterranei* DSM1411 productrice de l'halocine H4 (Cheung et al. 1997), et de la souche *Natrinema* sp. SWI15, qui possède le gène codant l'halocine C8 (Imadalou-Idres et al. 2013). Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Veriti (AB Applied Biosystems) ou GenePro[™] (Bioer technology).

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation des acides nucléiques (ADN et ARN) en fonction de leur taille sous l'effet d'un champ électrique. Un gel d'agarose (Qbiogene) à 1% (m/v) a été préparé dans un tampon TAE 1x (Tris 40 mM, acide acétique 0,001% (v/v) et EDTA 0,001% (v/v), à pH 8), additionné de Gel-Red[®] (Biotium, VWR) à 0,0005% (v/v). Cinq μL de produit de PCR ont été mélangés avec 5 μL le tampon de charge (VWR - Omega bio-tek) 10x et ont été déposés sur ce gel. La migration électrophorétique s'effectue sous un voltage de 90 V durant 1 h dans 300 mL de tampon TAE 1x, à l'aide d'un générateur Power Universal[®] (Bio-rad). Pour l'électrophorèse sur gel d'agarose des ARN, le tampon utilisé a été préparé dans l'eau RNase free. Le marqueur de poids moléculaire « ExactLadder[®] DNA PreMix 2log » (Ozyme) a été utilisé à raison de 1 μg par puits. L'observation des bandes d'ADN amplifiés par PCR est révélée sous UV par la visualisation des bandes fluorescentes à l'aide d'un système d'imagerie Ebox Vx2 (Vilber Lourmat) couplé

à une imprimante (Sony). Après visualisation des ADN amplifiés par PCR, les produits de PCR ont été purifiés par l'utilisation d'un kit spécifique « GeneClean Turbo » (MP Biomedicals). Les ADN ont été dosés comme décrit précédemment dans le paragraphe C.I.

IV. Clonages des gènes

Les clonages des gènes codant les ARNr 16S et des gènes codant les halocines S8 et S14 produites par les souches ETD5 et ETD8 et l'halocine H4 produite par la souche SS1R12 ont été effectués chez *E. coli* DH5 α . D'autres types de clonages ont été réalisés dans le but de surproduire l'halocine S8 synthétisée par la souche d'archée halophile ETD5 afin d'obtenir des quantités suffisantes pour la suite du travail par expression hétérologue chez la bactérie *E. coli* DH5 α , ainsi que chez une archée halophile *Hfx. volcanii* H98 (souche DS70 Δ *pyrE2*, Δ *hdrb*) (Bitan-Banin et al. 2003, Allers et al. 2004). Bien que, l'étape de maturation protéolytique de l'halocine S8 soit inconnue, nous avons choisi d'exprimer le gène *halS8* de 111 pb de l'halocine mature (36 acides aminés) telle qu'elle a été définie par Price et Shand (2000) (Figure 29a), celui codant pour une forme plus longue de l'halocine S8 de 246 pb (81 acides aminés) (d'après notre hypothèse figure 29 b) et le gène codant le précurseur de l'halocine S8 (ProS8) de 963 pb (311 acides aminés) (Figure 29 a,b).

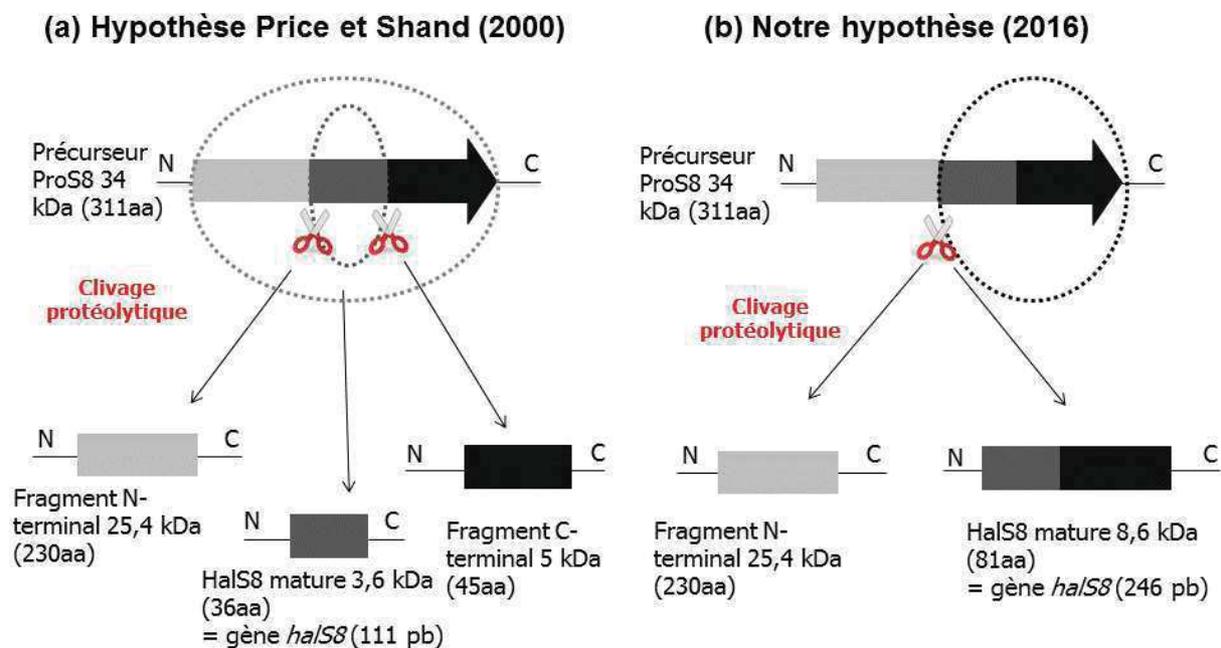


Figure 29. Schéma des deux hypothèses de la maturation protéolytique de l'halocine S8, (a) : hypothèse Price et Shand, 2000, (b) : notre hypothèse, 2016.

IV.1 Choix des vecteurs

Pour le clonage des gènes codant l'ARNr 16S et les inserts d'ADN des halocines S8 et H4 chez *E. coli* DH5 α , nous avons utilisé le plasmide pGEM[®]-T (Promega) (Figure 30). Pour l'expression de l'halocine S8 chez *E. coli* nous avons choisi le vecteur d'expression pET28b. Ce vecteur d'expression contient un promoteur T7, une séquence codant une étiquette histidine 6x(CAC) N-terminale et une séquence une séquence Arg-Gly dont la liaison peptidique est clivée spécifiquement par la thrombine, ce qui permet d'éliminer l'étiquette histidine après purification de la protéine étiquetée. Ce plasmide présente des sites de restrictions comme *HindIII*, *NdeI*, *EcoRI* et *BamHI* et un gène *KanR*, qui confère une résistance à la kanamycine (Figure 31). La sélection des souches transformées par ce plasmide est réalisée par addition de la kanamycine dans le milieu LB. Le plasmide pET28b a été extrait et purifié à partir du culot bactérien de la souche portant le plasmide pET28b *E. coli* DH5 α à l'aide des kits spécifiques « Ultraclean[®] Plasmid Miniprep Kit » (MO BIO, Laboratories, Inc). Les étapes d'extraction ont été réalisées selon la procédure décrite par le fabricant. Pour l'expression de l'halocine S8 chez une souche d'archée halophile *Hfx. volcanii* H98, nous avons utilisé le vecteur navette pTA963. Cette souche d'archée halophile est utilisée comme une souche modèle pour l'expression hétérologue et la purification de protéines halophiles chez les archées (Allers et al. 2011). Cette souche d'*Haloferax* se développe en milieu minimum, avec une température optimale de 45°C et en présence de 2,5 M de NaCl (Allers et al. 2011). Le vecteur d'expression pTA963 utilise le promoteur *p.tnaA* qui assure une forte expression du gène *tna* lors de l'ajout de tryptophane impliqué dans la régulation de la transcription et la synthèse des acides aminés (Large et al. 2007, Allers et al. 2010). Ce vecteur possède également 6 séquences répétées codant une étiquette histidine (CAC) ainsi des sites de restrictions : *NdeI*, *PciI*, *EcoRI* et *BamHI*. De plus, il présente deux origines de réplifications : une origine de répllication *colE1* pour se répliquer chez *E. coli* DH5 α et une origine de répllication PHV2, pour se répliquer et se transformer avec les inserts chez *Hfx. volcanii* H98 et possède un gène de résistance à l'ampicilline (Figure 32). Ce plasmide porte également les gènes *pyrE2* et *hdrB*, ce qui permettra de sélectionner les plasmides transformants sur un milieu dépourvu en uracile et thymidine (voir ci-dessous). Plusieurs étapes de clonages ont été nécessaires pour l'expression hétérologue chez *Hfx. volcanii* de l'halocine S8. Après la préparation des constructions génétiques chez une souche d'*E. coli* DH5 α , les souches transformées avec le vecteur navette pTA963, ont été sélectionnées sur un milieu LB contenant de l'ampicilline grâce au gène de résistance *AmpR*, qui confère aux

souches modifiées une résistance à cet antibiotique. La deuxième étape de transformation consiste à transférer le vecteur pTA963 recombinant extrait à partir d'une colonie transformée d'*E. coli* DH5 α chez une bactérie *E. coli* JM110. En effet, la souche *E. coli* JM110 a été choisie car elle a un phénotype dam et possède une mutation au niveau du gène codant la déoxyadénosine méthylase, une enzyme qui ajoute un groupement méthyle à l'adénine de la séquence 5'-GATC-3' de l'ADN nouvellement synthétisé. Cette souche ne permettra pas la méthylation de l'ADN néosynthétisé et par conséquent empêche la dégradation des ADN et la perte des plasmides et augmente l'efficacité de la transformation chez *Hfx. volcanii* H98. Les colonies transformées ont été sélectionnées par la suite sur le milieu LB contenant de l'ampicilline. La dernière étape, est la transformation des plasmides recombinants pTA963 chez *Hfx. volcanii* H98, ces souches transformées sont incapables de synthétiser de l'uracile et de la thymine, car elles sont mutées au niveau des gènes *pyrE2* et *hdrB*. Le gène *pyrE2*, code l'orotate phosphoribosyl transférase impliquée dans la biosynthèse de l'uracile, et le gène *hdrB*, code la sous-unité β de l'hétérodisulfide réductase impliquée dans la biosynthèse de la thymine (Bitan-Banin et al. 2003, Allers et al. 2004). La sélection des transformants avec des plasmides contenant les gènes *pyrE2* et *hdrB* s'a été effectuée sur un milieu dépourvu d'uracile et de thymine, et seulement les colonies transformées pourront se multiplier sur ce type de milieu. Le vecteur pTA963 a été extrait et purifié à partir de la culture bactérienne *E. coli* XL1-Blue à l'aide des kits spécifiques «Ultraclean[®] Plasmid Midiprep Kit » (MO BIO, Laboratories, Inc).

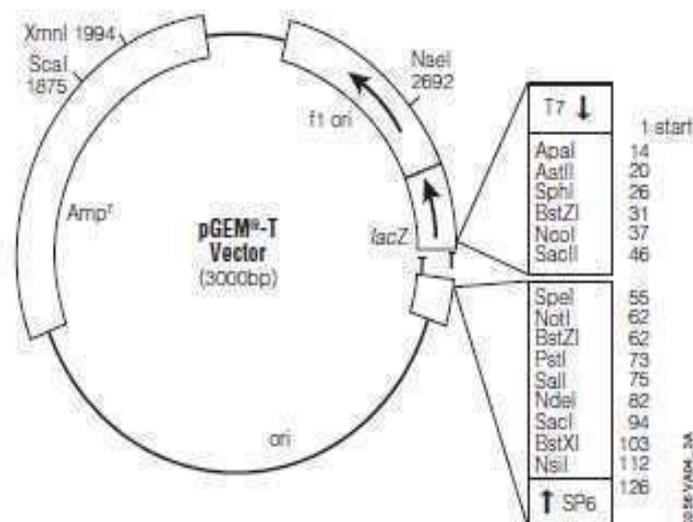


Figure 30. Carte du vecteur pGEM[®]-T utilisé dans les clonages.

IV.2 Digestion des vecteurs et des inserts

Pour les clonages chez *E. coli* DH5 α et *Hfx. volcanii* H98, nous avons choisi des enzymes de restriction (Fermentas, ThermoFisher Scientific ou New England Biolabs) pour la digestion des vecteurs pET28b et pTA963 et les inserts. Les clonages chez *E. coli* DH5 α ont été effectués uniquement en présence de l'étiquette poly-histidine N-terminale. Pour le clonage du gène codant les différentes formes d'halocine S8 (Cf. figure 29) et le précurseur ProS8, nous avons utilisé les enzymes *NdeI-EcoRI*, pour la digestion de vecteur et en même temps des inserts présentant des sites de restrictions sur le plasmide (Figure 31). Selon ces enzymes nous avons dessiné les amorces des inserts en ajoutant les sites de coupure de l'enzyme *EcoRI* au début de l'amorce F et de l'enzyme *NdeI* au début de l'amorce R, pour générer des extrémités compatibles avec les extrémités de plasmide digéré.

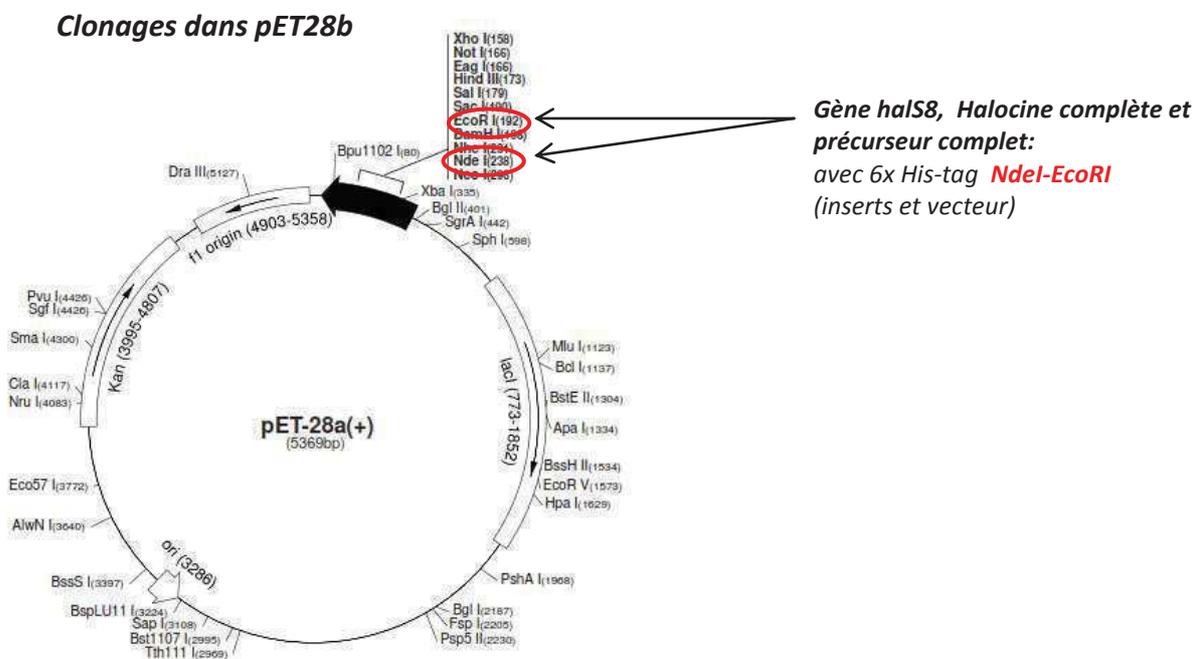
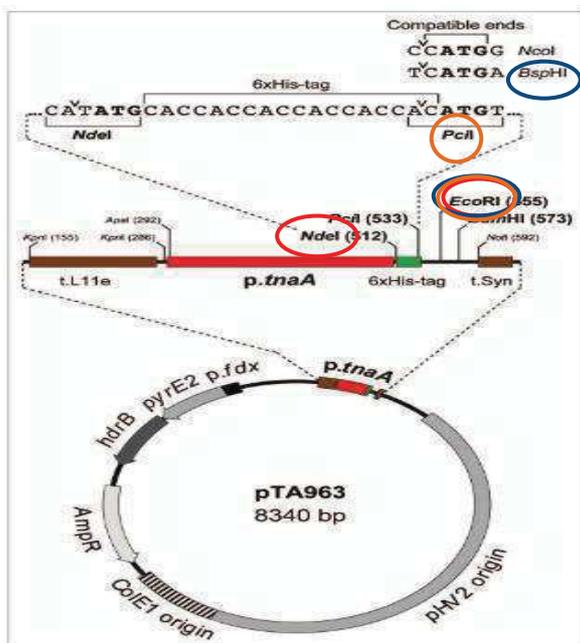


Figure 31. Carte du vecteur pET28b, présentant les enzymes de restriction choisis pour l'expression hétérologue de l'halocine S8 chez *E. coli* DH5 α . Les enzymes de restriction *NdeI-EcoRI* (indiqués en cercles rouges).

Les clonages chez *Hfx. volcanii* H98 ont été effectués en présence et en absence de l'étiquette poly-histidine N-terminale dans le but de comparer les deux résultats. Dans ce cas la sélection des enzymes a été choisie selon la disponibilité des sites de restriction de ces enzymes sur le plasmide et leur site en fonction de la présence de l'étiquette d'histidine N-terminale. Pour le clonage du gène codant les différentes formes de l'halocine S8, ou du précurseur complet sans étiquette histidine, nous avons choisi les enzymes *NdeI-EcoRI*, car

selon la figure 32, *NdeI* est placé juste avant la séquence de l'étiquette d'histidine alors que *EcoRI* est placé après l'étiquette ce qui permet d'enlever le bout d'histidine. Pour le clonage de gène *hals8* et l'halocine complète avec l'étiquette d'histidine N-terminale, nous avons choisi les enzymes *PciI-EcoRI* pour la digestion de vecteur pTA963 car les deux enzymes sont placés après la séquence de l'étiquette histidine (Figure 32), alors que pour la digestion des inserts d'autres enzymes ont été choisies, *EcoRI-BspHI*, pour générer des extrémités compatibles avec le *PciI*, qui coupe après l'adénine et génère une séquence **CATGT**, et pour *BspHI* coupe après la thymine et génère une séquence **CATGA** (figure 32). Pour le clonage de précurseur complet avec la séquence d'étiquette histidine, le même couple d'enzyme a été choisi pour le vecteur et les inserts *PciI-EcoRI*, à cause de la présence de la séquence **ATGT** dans le site de coupure de *PciI* et dans la séquence de l'amorce 477 dessinée (Tableau 7 page 88) (Figure 32). La digestion a été réalisée selon les conditions recommandées par le fournisseur en présence de tampon spécifique à chaque enzyme de restriction. Les mélanges de digestion ont été incubés par la suite toute la nuit à 37°C. Finalement, les fragments digérés ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,1% (m/v) pour vérifier les résultats de digestion. Les produits digérés ont été purifiés en utilisant le kit GeneClean Turbo® (MPBio, France).



Clonages dans pTA963

1/ Gène *hals8*:

sans 6x His-tag **NdeI-EcoRI** (inserts et vecteur)

avec 6x His-tag **PciI-EcoRI** (vecteur)

EcoRI-BspHI (inserts)

2/ Halocine complète:

Sans 6x His-tag **NdeI-EcoRI** (inserts et vecteur)

avec 6x His-tag **EcoRI-BspHI** (inserts)

PciI-EcoRI (vecteur)

3/Précurseur complet:

Sans 6x His-tag **NdeI-EcoRI** (inserts et vecteur)

Avec 6x His-tag **PciI-EcoRI** (inserts et vecteur)

Figure 32. Carte du vecteur navette pTA963 présentant les enzymes de restrictions choisies, utilisés pour l'expression hétérologue de l'halocine S8 chez *Hfx. volcanii* H98. Les enzymes de restriction *NdeI-EcoRI* (indiqués en cercles rouges), *PciI-EcoRI* (indiqués en cercles marrons), *EcoRI-BspHI* (indiqués en cercles bleu).

IV.3 Ligation

La réaction de ligation a été réalisée après purification des produits de PCR et des produits digérés. Des ligations ont été effectuées entre les inserts d'ADN et le plasmide pGEM[®]-T (Promega) et entre les produits digérés et les plasmides pET28b et pTA963. Pour la ligation, la masse de l'insert nécessaire, qui dépend de sa taille et aussi de la quantité de plasmide utilisée, a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Masse de l'insert (ng)} = \frac{\text{Masse du vecteur (ng)} \times \text{taille de l'insert (kb)}}{\text{Taille du vecteur (kb)}} \times \frac{[\text{insert}]}{[\text{vecteur}]}$$

Le mélange de ligation est constitué par 50 ng des vecteurs pGEM[®]-T, pET28b ou pTA963, 3 U de ligase du phage T4 (Promega), 1 µL du tampon de ligation 10x (Promega), et x µL de l'insert d'ADN, dont la masse a été mesuré selon la formule précédente et le volume final a été complété à 10 µL par l'eau MilliQ[®] (Millipore). Le mélange a été incubé à 4°C pendant une nuit.

IV.4 Préparation des cellules compétentes

La préparation des cellules compétentes d'*E. coli* DH5α, *E. coli* BL21 et *E. coli* JM110, a été effectuée selon les étapes suivantes : une préculture a été réalisée dans 5 mL du milieu LB durant une nuit à 37°C et sous une agitation de 200 rpm. Une culture a été réalisée dans 50 mL du même milieu inoculé par 200 µL de la préculture et incubée pendant 2 à 3 h jusqu'à une croissance à une DO à 600 nm entre 0,2 et 0,3. Cette culture a été placée pendant 15 min dans la glace pour arrêter la croissance et centrifugée pendant 15 min à 4 000 g à 4°C. Le culot bactérien obtenu a été incubé dans 50 mL de CaCl₂ 0,1 M froid pendant 30 min dans la glace, dans le but de perméabiliser la paroi cellulaire. Finalement, l'ensemble a été centrifugé pendant 15 min à 4000 g à 4°C et resuspendu dans 0,5 mL de CaCl₂ à 0,1 M et les cellules compétentes ont été ensuite incubées pendant la nuit à 4°C. Pour la conservation des cellules compétentes à -80°C plus d'une nuit, on ajoute 10% de glycérol froid. Alors que, la préparation des cellules compétentes d'*Hfx. volcanii* H98 a été effectuée différemment selon les étapes suivantes : une préculture de 10 mL de la souche *Hfx. volcanii* H98 a été effectuée dans le milieu YPC et incubée pendant une semaine à 45°C. Ensuite, la préculture a été centrifugée à température ambiante pendant 10 min à 4000 rpm dans un tube à Eppendorf à fond rond. Le culot a été remis en suspension dans 2 mL d'une solution de sphéroplastes tamponnée (Buffered spheroplasting solution) (Tableau 8) et transféré dans un nouveau tube

Eppendorf. Le mélange a été centrifugé par la suite à température ambiante pendant 8 min à 4000 g. Le culot a ensuite été remis en suspension dans 600 μL de la solution de sphéroplastes tamponnée (tableau 8).

IV.5 Transformation

Cinquante μL de cellules compétentes d'*E. coli* DH5 α ont été transformés avec 10 à 100 ng d'ADN (3 μL de produit de ligation) et incubées durant 10 min dans la glace. Un choc thermique du mélange a été réalisé à 42°C pendant 40 à 50 s pour la fragilisation de la membrane cellulaire et l'insertion des plasmides à l'intérieur des cellules compétentes, puis incubation du mélange dans la glace pendant 2 min. Les bactéries ont été cultivées dans 950 μL du milieu LB à 37°C pendant 2 h, sous une agitation de 200 rpm. La culture a ensuite été centrifugée à 2000 g pendant 8 min et le culot a été récupéré dans 100 μL de milieu LB. Enfin, 100 μL de la suspension bactérienne ont été étalés sur le milieu sélectif (LB, ampicilline 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-galactoside (X-Gal) 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,5 mM), et incubés à 37°C pendant une nuit. Des bactéries non transformées, utilisées comme contrôle négatif, ont été étalées sur les mêmes milieux sélectifs. D'autres bactéries transformées avec 10 à 100 ng de plasmide vide ont été utilisées comme contrôle de compétence des bactéries, selon le même protocole de transformation.

Pour l'expression hétérologue chez *E. coli*, la transformation des plasmides pET28b s'effectue en deux étapes. La première consiste à transférer les plasmides dans des cellules compétentes d'*E. coli* DH5 α préparé de la même façon mais le milieu de culture sélectif des colonies transformées, LB additionné uniquement de kanamycine à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La seconde étape de transformation, consiste à transférer les plasmides pET28b recombinants extraits à partir d'une colonie transformée *E. coli* DH5 α , chez *E. coli* BL21. Les colonies d'*E. coli* BL21 transformées ont été sélectionnées sur le même milieu LB sélectif. En ce qui concerne l'expression hétérologue chez *Hfx. volcanii* H98, la manipulation s'effectue en plusieurs étapes, et nécessite la formation de sphéroplastes. Après la préparation des constructions chez *E. coli* DH5 α . La deuxième étape de transformation consiste à transférer les vecteurs pTA963 recombinants extraits à partir d'une colonie transformée d'*E. coli* DH5 α chez une bactérie *E. coli* JM110. La dernière étape de transformation consiste à transférer les plasmides pTA963 extraits des souches *E. coli* JM110 transformées dans des cellules compétentes d'*Hfx. volcanii* H98. Dans ce cas-là, 200 μL de ces cellules compétentes ont été mélangés avec 20 μL d'EDTA 0,5 M à pH 8 et incubés pendant 10 min à température ambiante. En même temps, le

mélange d'ADN a été préparé avec 1 à 2 µg d'ADN dam- (plasmide pur d'*E. coli* JM110), 15 µL de la solution de sphéroplast non tamponnée et 5 µL d'EDTA 0,5 M pH 8. Le mélange d'ADN a été ajouté aux sphéroplast et incubée pendant 5 min. Par la suite, 250 µL d'une solution de polyéthylène glycol (PEG) (Sigma, Aldrich) à 60% ont été additionnés au mélange et incubés pendant 30 min à température ambiante. Enfin, 1,5 mL de la solution de dilution des sphéroplast (Tableau 8) ont été additionnés au mélange et centrifugés pendant 8 min à 4000 g. Le culot a été récupéré ensuite dans 1 mL de la solution de régénération (tableau 8). Après 1 h 30 min d'incubation à 45°C sans agitation, la solution a été centrifugée à température ambiante pendant 8 min à 4000 g et le culot a été resuspendu dans 1 mL de milieu YPC. Finalement, 100 µL des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} ont été étalées sur des milieux solides YPC additionné de thymidine (4 mg.mL⁻¹) et de novobiocine (1 mg.mL⁻¹) ou sur un milieu Casa additionné par la thiamine (1 mg.mL⁻¹) et la biotine (1 mg.mL⁻¹). Les boîtes ont été incubées à 45°C pendant une à deux semaines. Après cette incubation, des colonies transformées d'*Hfx. volcanii* H98 ont été sélectionnées et repiquées sur les mêmes milieux solides. La confirmation de la présence des gènes clonés chez *E. coli* BL21 ou chez *Hfx. volcanii* H98 a été réalisée par l'amplification par PCR avec de l'ADN des clones transformés. Dans les plasmides pET28b et pTA963 recombinants, les inserts ont été extraits à partir des cultures des colonies transformées d'*E. coli* BL21 et *Hfx. volcanii* H98 purifiés à l'aide des kits spécifiques «Ultraclean® Plasmid Midiprep Kit» (MO BIO, Laboratories, Inc).

Tableau 8. Solutions pour la transformation chez *Hfx. volcanii* H98.

Solution	Composition
Sphéroplast tamponnée	NaCl 58,4 g.L ⁻¹ KCl 2 g.L ⁻¹ Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 Sucrose 15% (m/v) H ₂ O 250 mL
Sphéroplast non tamponnée	NaCl 58,4 g.L ⁻¹ KCl 2 g.L ⁻¹ Sucrose 15% (m/v) H ₂ O 100 mL
Dilution des sphéroplast	SW 30% (76 mL) Sucrose 15% (m/v) CaCl ₂ 0,3 g.L ⁻¹ H ₂ O (100 mL)
Régénération	SW 30% (150 mL) YPC 25 mL Sucrose 15% (m/v) CaCl ₂ 0,3 g.L ⁻¹ H ₂ O 250 mL

IV.6 Sélection des clones transformés

La sélection des clones d'*E. coli* DH5 α transformés a été réalisée par la méthode blanc/bleu qui permet la visualisation des deux types de colonies, des colonies blanches avec des vecteurs recombinants avec les inserts d'ADN et des colonies bleues avec des vecteurs vides. Après la période d'incubation des bactéries transformées, les clones blancs ont été sélectionnés et isolés sur d'autres boîtes contenant le même milieu sélectif et incubés pendant une nuit à 37°C. Pour l'expression chez *E. coli*, les colonies transformées d'*E. coli* DH5 α sélectionnées ont été réisolées sur le milieu sélectif LB additionné de kanamycine à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de même pour les colonies d'*E. coli* BL21. Chez *Hfx. volcanii* H98 les colonies transformées d'*E. coli* DH5 α ont été sélectionnées et isolées sur le milieu sélectif LB additionné de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour l'expression chez *Hfx. volcanii* H98, les colonies transformées d'*E. coli* JM110 ont été sélectionnées et isolées sur le milieu sélectif LB additionné d'ampicilline à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les colonies transformées d'*Hfx. volcanii* H98 ont été sélectionnées sur des milieux solides YPC additionné de thymidine (4 mg.mL^{-1}) et de novobiocine (1 mg.mL^{-1}) ou sur un milieu Casa additionné par la thiamine (1 mg.mL^{-1}) et la biotine (1 mg.mL^{-1}). Afin de vérifier la présence des inserts d'ADN dans les clones, une amplification par PCR a été effectuée.

IV.7 Purification des plasmides recombinants

Les plasmides pGEM[®]-T porteurs des gènes *hals8*, *halH4* et des gènes d'ARNr 16S ont été extraits à partir des cultures d'*E. coli* DH5 α transformées de 50 mLensemencés la nuit. Alors que le vecteurs pET28b contenant les halocines S8 a été extrait à partir des cultures d'*E. coli* DH5 α et *E. coli* BL21 transformées incubées pendant une nuit à 37°C et le vecteur pTA963 à partir des cultures *E. coli* DH5 α incubée pendant 1 nuit et *Hfx. volcanii* H98 transformée incubée à 45°C pendant 4 jours. Ces plasmides ont été purifiés par la suite à l'aide des kits spécifiques « Ultraclean[®] Plasmid Midiprep Kit » (MOBIO, Laboratories, Inc). La vérification de la pureté des plasmides et la détermination de leur concentration ont été réalisées comme décrit en C.I.1.

V. Séquençage des gènes

Les séquençages des gènes *hals8*, de l'halocine complète et du précurseur de la souche ETD5 et le gène *hals8* de la souche ETD5 et ETD8, du gène *halH4* de la souche SS1R12, et des gènes d'ARNr 16S ont été réalisées par la société Eurofins MWG Operon Genomics

(Allemagne). Les séquences obtenues ont été analysées et comparées à la base de données Genbank en utilisant l'algorithme BlastN (Altschul et al 1990).

VI. Recherche bioinformatique et alignements multiples

La recherche des séquences en acides aminés ou nucléotidiques similaires aux séquences des gènes *hals8* et des gènes *halH4* a été effectuée par Blast (TBlastN ou BlastX) sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En plus, des alignements multiples des séquences obtenues des halocines S8 des souches ETD5, ETD8 et de l'halocine H4 de la souche SS1R12, avec les séquences similaires trouvées dans la base de données ont été également réalisés à l'aide du logiciel Multalin (Corpet 1988) (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Les alignements des séquences protéiques ont été réalisés avec la matrice Blosom62 et les alignements nucléotidiques avec la matrice ADN. De plus, les séquences nucléotidiques des gènes d'ARNr 16S, ainsi que les séquences des gènes *hals8* et *halH4* obtenues dans cette étude ont été déposés dans la base de données GenBank avec les numéros d'accès suivants : KT783468 de la séquence de gène *hals8* partielle et KR611165 de la séquence de gène *hals8* complète de la souche ETD5, KR611166 de la séquence de gène *hals8* partielle de la souche ETD8, et KR611167 de la séquence partielle de gène *halH4* de la souche SS1R12.

VII. Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées sur le site Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr>) (Dereeper *et al.* 2008). Les arbres ont été construits à partir des séquences des gènes codant l'ARNr 16S déterminées lors de cette étude et comparées aux séquences ayant donné les meilleurs résultats par BlastN (Altschul *et al.* 1997). L'alignement multiple des séquences nucléotidiques a été réalisé à l'aide du programme Clustal W (Thompson *et al.* 1994), puis optimisé par le programme Gblocks (Castresana 2000). Les arbres ont été construits à l'aide de la méthode des distances BioNJ (Gascuel 1997) en utilisant le modèle de Kimura à 2 paramètres (Kimura 1980). La robustesse de l'arbre a été estimée par 1000 étapes de ré-échantillonnage (bootstrap). L'arbre phylogénétique a été visualisé à l'aide du programme TreeDyn (Chevenet *et al.* 2006), et enraciné à l'aide de la séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Salicola* sp. ES1R3 provenant de la saline de Sfax qui a été choisi comme groupe externe.

D. Méthodes d'études des protéines, de purification et de caractérisation des halocines

I. Expression des protéines

Le processus d'expression des protéines chez *E. coli* BL21 consiste en préculture d'une colonie transformée d'*E. coli* BL21 dans 5 mL du milieu LB contenant de la kanamycine ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), à 37°C . Après une nuit d'incubation, une culture a été réalisée dans 50 mL du même milieu inoculé par 500 μL de la préculture et incubé à 37°C sous une agitation de 200 rpm pendant environ 4 h jusqu'à une densité optique DO à 600 nm de 0,6. Par la suite, 2,5 mL de la culture non induite ont été prélevés et incubés pendant 5 min dans la glace. Ensuite, 500 μL de la culture non induite ont été conservés à -80°C et les 2 mL restants ont été centrifugés, le culot cellulaire et le surnageant ont été conservés à -80°C . Pendant ce temps, 1 mM d'IPTG a été ajouté à la culture pour induire l'expression des protéines.

Pour l'expression des protéines chez *Hfx. volcanii* H98, des cultures des deux colonies transformées d'*Hfx. volcanii* H98 avec le vecteur pTA963 présentant l'étiquette histidine ou sans étiquette histidine ont été effectuées dans 50 mL du milieu Casa inoculés par 500 μL de la préculture et incubées à 45°C pendant 30 h, le temps choisi pour l'induction des protéines pendant la phase exponentielle de la croissance. Par la suite, 2,5 mL de la culture non induite ont été prélevés et conservés à -80°C . De plus, 5 mM de tryptophane ont été ajoutés aux cultures pour l'induction de l'expression des protéines. L'expression des protéines chez *Hfx. volcanii* dépend fortement de la présence de tryptophane car le promoteur tryptophanase p.tnaA est sous le contrôle de gène *tna*, induit par l'ajout de tryptophane ce qui permet l'expression et la régulation des protéines (Large et al. 2007, Allers et al. 2010). Des prélèvements successifs de 2,5 mL de la culture d'*E. coli* BL21 après 1 h, 2 h et 3 h d'induction et à partir de la culture *Hfx. volcanii* H98 après 2h, 3h, une et deux nuits ont été effectués. 2 mL de la culture ont été centrifugés à 8000 g pendant 10 min et 0,5 mL de la culture ont été gardés à -80°C avec les culots cellulaires.

I.1 Optimisation de l'expression des protéines chez *E. coli*

Dans le but d'optimiser les conditions d'expression des protéines chez *E. coli* BL21, nous avons commencé par tester différents temps d'induction par l'ajout d'IPTG, après 1 h, 2 h et 1 nuit. Différentes températures ont été testées (15, 20, 28 et 37°C), pour l'optimisation de l'expression des protéines. Autrement, à 37°C on peut augmenter la formation des corps d'inclusion, tandis que la diminution de la température permet de diminuer la croissance des

cellules et par la suite la synthèse des protéines, ce qui augmente la possibilité de la formation des protéines solubles et actives. En plus de test de différentes températures nous avons utilisé différentes concentrations d'IPTG (1, 1,5 et 2 mM) pour l'induction de l'expression des protéines.

Beaucoup des protéines nécessitent la formation de ponts disulfures pour un repliement fonctionnel. Le cytoplasme d'*E. coli* n'est pas un environnement particulièrement favorable à la formation de ces ponts disulfure. En revanche, les souches d'*E. coli* Origami B (DE3) (Novagen, Merck Millipore) et RosettaTM (DE3) plysS (Novagen, Merck Millipore), sont des souches porteuses de mutations au niveau des gènes codant la thiorédoxine réductase et la glutathion réductase, ce qui favorisent la formation des ponts disulfure dans le cytoplasme et augmentent la solubilité et l'activité des protéines. Pour cette raison, nous avons transformé les plasmides pET28b recombinants à partir d'*E. coli* BL21, chez *E. coli* Origami B (DE3) et RosettaTM (DE3) plysS. Afin de vérifier les résultats des clonages par amplification par PCR avec les ADN des clones d'*E. coli* Rosetta et Origami transformées, les protéines ont été exprimées avec une température d'expression à 20°C et des temps d'induction de 2 h et 24 h.

I.2 Optimisation de l'expression des protéines chez *Hfx. volcanii* H98

Dans le but d'optimiser le taux d'expression des protéines chez *Hfx. volcanii* H98, nous avons testé différentes concentrations de tryptophane responsable de l'induction de l'expression de ces protéines. L'induction de l'expression des protéines par le tryptophane est très rapide et efficace, il augmente plus de 50 fois le niveau de transcription de gène *tna* dans une période d'incubation de 5 min (Large et al. 2007). Tandis que des concentrations de tryptophane supérieures à 5 mM ou en cas d'absence de tryptophane, provoque la lyse cellulaire ou la formation des corps d'inclusion (Large et al. 2007). Des cultures ont été préparées dans 50 mL du milieu Casaensemencés par 200 µL de la préculture d'*Hfx. volcanii* H98, avec différentes concentrations de tryptophane (1, 2, et 5 mM) et incubées pendant 30 h à 45°C. En plus de la concentration de tryptophane, nous avons testé différentes températures d'induction de l'expression des protéines à 37 et 45°C. Un contrôle positif a été réalisé avec la culture d'*Hfx. volcanii* H98 non transformée pour comparer les résultats obtenus sur gel SDS-PAGE.

II. Extraction et dosages des protéines

Pour l'extraction des protéines des cultures induites et non induites chez *E. coli* et chez *Hfx. volcanii* H98 et les cultures des souches ETD5, ETD8, ETD3 et *E. coli* DH5 α , les culots cellulaires ont été remis en suspension dans 2 mL du tampon de lyse (Tris-HCl à 25 mM, EDTA à 2 mM, à pH 7,6). Les mélanges obtenus avec les cultures qui ont été conservées à -80°C ont été incubés avec 0,25 mg.mL⁻¹ de lysozyme (Sigma-Aldrich) pendant 20 min à température ambiante. A l'aide d'un sonicateur (BRANSON Digital Sonicator), les parois cellulaires ont été détruites par des séquences d'ultrasons (8 fois pendant 15 s dans la glace, à 30% d'amplitude). Les débris cellulaires ont été centrifugés pendant 10 min à 10 000 g pour la séparation entre une fraction soluble et une fraction insoluble du culot cellulaire. Finalement, les fractions préparées ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). La concentration d'acrylamide est de 17% (m/v) pour l'analyse de l'halocine S8 de 36 résidus et l'halocine de 82 résidus et de 12% (m/v) pour le précurseur ProS8 de 311 résidus. Les gels sont ensuite colorés au nitrate d'argent, au blueSafe ou au bleu de Coomassie G-250 (les détails expérimentaux seront expliqués dans les paragraphes V et VII). La présence ou l'absence de l'activité antimicrobienne des fractions solubles des protéines exprimées chez *E.coli* BL21 ont été testées directement sur un milieu gélosé ensemencé par la souche cible d'archée halophile ETR14.

La méthode de dosage des protéines de Bradford est une technique colorimétrique basée sur le changement de couleur du réactif de Bradford (bleu de Coomassie) après la liaison avec les peptides ou les protéines. Le réactif se lie essentiellement à des acides aminés basiques comme l'arginine. Les fractions des protéines extraites ont été dosées à l'aide de cette méthode et le dosage a été effectué en suivant les instructions du kit « Protein quantification assay according to Bradford » (Carl Roth). Afin de réaliser une gamme étalon avec la sérum albumine bovine (BSA), un volume de réactif de Bradford dilué 5x a été ajouté aux dilutions de 0,2 à 1 mg.mL⁻¹. Après une incubation de 20 min, l'absorbance à 595 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (WPA, Biochrom[®] Ltd). L'échantillon à doser a été préparé comme la BSA et sa concentration a été déterminée en se référant à la gamme étalon.

III. Effet de différents composants sur l'activité antimicrobienne

III.1 Effet de détergents

Pour tester l'effet de détergents sur l'activité antimicrobienne de la souche ETD5, différents composants ont été utilisés, SDS, Triton-100 X et Tween 20. Ce test a été réalisé comme suivant : le surnageant de la culture productrice, prélevé pendant la phase stationnaire de croissance, a été traité par des concentrations des agents tensioactifs allant de 1‰ à 1% et incubé à 37°C pendant 1 h. Après la période de traitement, l'activité antimicrobienne a été évaluée comme décrit précédemment dans le paragraphe B.II avec l'utilisation d'un contrôle positif avec du surnageant non traité. Les résultats ont été observés après deux semaines d'incubation à 37°C.

III.2 Effet du NaCl

Pour étudier la dépendance de l'activité des peptides antimicrobiennes aux sels, une dialyse du surnageant d'une culture productrice ETD5 a été réalisée. Cette technique consiste à éliminer les sels de surnageant à travers une membrane de dialyse. Dix mL de la culture ont été prélevés au début de la phase stationnaire de croissance et centrifugés pendant 15 min à 8000 g. Le surnageant a été ensuite dialysé à l'aide d'une membrane de dialyse avec un seuil de coupure de 1 kDa (Spectra/Por[®] 6, MWCO 1 kDa), contre 3 L de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7. Après dialyse sous une agitation douce pendant toute la nuit, l'activité de dialysat obtenu a été testée par la méthode de diffusion en puits sur milieu solide SW 20%, contre la souche ETR14. Par ailleurs, dans le but de savoir si le dessalage peut dénaturer complètement l'activité des agents antimicrobiens synthétisé par ETD5 et à quelle concentration de NaCl ce peptide peut retrouver son activité, nous avons testé l'effet de différentes concentrations de NaCl sur le même surnageant dialysé. Ce surnageant a été mélangé avec une solution mère de 5 M NaCl pour obtenir des concentrations finales de NaCl s'étendent de 0,5 à 4 M. Finalement, un test d'activité antimicrobienne des échantillons traités a été effectué comme précédemment par la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé contre la souche ETR14.

III.3 Effet des enzymes

Dans le but de vérifier la nature protéique ou peptidique des halocines produites par la souche d'archée halophile ETD5, nous avons testé l'effet des enzymes protéolytiques sur le surnageant de la culture productrice dialysé par des membranes de 3,5 kDa (Spectra-Por[®]3, MWCO 3,5 kDa) contre de l'eau MilliQ contenant du NaCl 100 g.L⁻¹. De ce fait, ces

échantillons ont été traités par 20 ng.µL⁻¹ de chymotrypsine (Sigma-Aldrich), de thermolysine (Sigma-Aldrich) et d'endoprotéinase GluC (Sigma-Aldrich), dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8 pendant la nuit à 37°C. L'activité antimicrobienne résiduelle a été déterminée comme décrit précédemment dans le paragraphe B.II et un contrôle positif a été utilisé avec une fraction non traitée.

III.4 Effet du seuil de filtration

Pour l'estimation de la masse moléculaire de l'halocine S8 produite par ETD5, nous avons testé des filtres avec différents seuils de coupure. Tout d'abord, les filtres ont été traités avant l'utilisation par 2 mL d'une solution de BSA 1‰ et lavés par la suite par le tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Dix mL de surnageant de la culture productrice ont été filtrés à l'aide des filtres de 3, 10, 30 et 50 kDa (Vivaspin, Sigma-Aldrich). Plusieurs lavages ont été effectués par le tampon Tris-HCl 10 mM pH 7, afin d'éliminer toute trace des peptides accrochés à la membrane. Enfin, des tests d'activité antimicrobienne des filtrats et des retentats ont été réalisés selon la méthode décrite dans le paragraphe B.II.

IV. Techniques de chromatographie

Les antimicrobiens peptidiques ou protéiques sont souvent libérés dans le surnageant de la culture productrice, au cours de la transition de la phase stationnaire ou à la phase mi-exponentielle de croissance (Shand et Leyva 2007). L'extraction et la purification de ces molécules actives nécessitent l'utilisation de plusieurs techniques de chromatographies : filtration sur gel, d'échange d'ions, d'affinité et CLHP en phase inverse. Nous avons utilisé ces différentes techniques dans le but de purifier le(s) peptides antimicrobiens ou halocines produites par la souche d'archée halophile ETD5.

IV.1 Préparation et traitement de l'échantillon

Dans le but de déterminer un protocole de purification des halocines produites par la souche ETD5, plusieurs échantillons ont été préparés et traités différemment selon la méthode de chromatographie. De plus, l'activité antimicrobienne de l'échantillon traité a été testée à chaque étape de purification, pour déterminer les fractions actives. Une culture de 0,5 à 2 L a été réalisée dans le milieu SW à 200 g.L⁻¹ NaCl, pendant 4 jours à 37°C et sous une agitation de 200 rpm. La culture a été prélevée pendant la phase stationnaire de croissance, et centrifugée à 8 000 g pendant 45 min. Le surnageant obtenu a été filtré sur une membrane de 0,22 µm (Sartorius). Cet échantillon a été utilisé pour les tests de purification par séparation en phase solide sur SepPak[®] C₁₈ et sur une colonne octyle C₈. Ce surnageant a été concentré

125 fois à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration de 3 kDa (Amicon[®] Ultra Millipore) pour la purification sur une colonne de gel filtration G25. Pour la purification sur la colonne de Phényle Sepharose le surnageant récupéré a été dialysé à l'aide d'une membrane de 3,5 kDa (Spectra-Por[®]3, MWCO 3,5 kDa) contre de l'eau MilliQ[®] (Millipore) contenant 100 g.L⁻¹ NaCl pour diminuer la concentration de sel, pendant la nuit sous une agitation douce à 4°C. Le dialysat obtenu a été concentré par la suite à l'aide d'un Rotavapor[®], à 50°C et 60 mPa pendant 2 h jusqu'à un volume final de 500 mL. L'échantillon a été filtré sur des filtres de 0,22 µm (Sartorius).

IV.2 Chromatographie

Durant toutes les étapes de chromatographie, l'activité antimicrobienne des différentes fractions collectées sera évaluée contre la souche d'archée halophile ETR14 en utilisant la méthode de diffusion en puits sur gélose.

IV.2.1 Phase inverse SepPak[®] C18

Cette méthode consiste à séparer les constituants de la culture dont lesquelles les molécules hydrophobes restent liés à la colonne de silice greffée par des chaînes C18 et les molécules hydrophiles passent dans le filtrat. Le protocole est comme suit : le surnageant préparé précédemment a été déposé sur une cartouche SepPak[®] C18 (WatersCorp) connectée à une pompe péristaltique et qui a été préalablement régénérée avec 120 mL d'éthanol à 100% (v/v), lavée et équilibrée avec 200 mL de l'eau MilliQ[®] (Millipore) contenant 0,1% (v/v) d'acide formique (AF). Des éluations des fractions ont été réalisées avec différentes concentrations 10, 20, 40, 60, 80 et 100% (v/v) d'acétonitrile (ACN).

IV.2.2 Phase inverse Octyle C8

Une autre technique testée pour la purification des halocines, produites par la souche d'archée halophile ETD5 est la chromatographie sur colonne Octyle C8. Cette colonne permet de séparer les molécules selon les interactions hydrophobes. De ce fait, 500 mL de surnageant ont été surchargés sur une colonne Octyle C8 (176,62X2,5 cm, 40-61µm) (Octyle-C8-Silica, Sigma-Aldrich), préalablement équilibrée par le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 3,5 M, pH 8,5 et lavée par le tampon Tris-HCl 25 mM, à pH 8,5 pour éliminer le maximum de NaCl et les contaminants. Par la suite, les fractions ont été éluées par différentes concentrations d'acétonitrile (ACN) 20, 40, 60 et 80 % (v/v) avec un débit de 1 mL.min.

IV.2.3 Phényle Sepharose

Dans cette étape, nous avons utilisé le système de chromatographie liquide AKTApurifier FPLC (Fast protein liquid chromatography) (GE Healthcare). La colonne de Phényle Sepharose a été préparée dans une colonne XK 16/26 (GE Healthcare) avec 100 mL de phase composée des billes d'agarose à 6% modifiées par des groupes aromatiques de phényle liés par des éthers. Cette colonne a été régénérée avec 80% d'acétonitrile, puis lavée avec l'eau MilliQ[®] (Millipore) et équilibrée avec 150 mL de tampon Tris-HCl 25 mM, 3,4 M NaCl, à pH 8. Ensuite, les 500 mL de l'échantillon ont été injectés sur la colonne, qui a été lavée par la suite jusqu'à une DO stable à 214 et à 280 nm, pour éliminer le maximum de sels et des contaminants avec le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8. Différents types de gradients ont été testés pour l'élution des fractions, soit un gradient croissant linéaire d'ACN de 0 à 80 % soit un gradient croissant en palier avec les différentes concentrations d'ACN (20, 60, 70, et 80 %) à un débit de 1 mL.min⁻¹. En fin de chromatographie, la colonne a été lavée par le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8. Les peptides ont été détectés par mesure des longueurs d'ondes à 214 et 280 nm et les fractions (1 mL par fraction) ont été collectées automatiquement.

IV.2.4 Filtration sur gel

Cette technique consiste à séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire à travers un gel poreux, dans lequel les grosses molécules sont exclues en premier et les petites molécules sont éluées en dernier. Nous avons choisi de travailler avec une colonne de Sephadex[®] G25 (211,95X3,5, 20-50µm) (Sigma-Aldrich), en raison du domaine de fractionnement compris entre 1 et 25 kDa et qui s'adapte bien avec les peptides de petite taille. Deux mL de la fraction active ont été déposés sur la colonne de Sephadex[®] G25, qui a été équilibrée préalablement avec le tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, à pH 7,5. Les fractions ont été éluées par du tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ et récupérées automatiquement par un collecteur de fractions. L'absorbance des fractions éluées a été mesurée à un DO à 220 nm par un spectrophotomètre (WPA, Biochrom[®] Ltd). Les fractions qui présentent un seul pic ont été recueillies ensemble et concentrées à l'aide d'un Speedvac[®] (Savant).

Cinq cent µL de l'échantillon actif purifié par la colonne de Phényle Sepharose ont été injectés sur la colonne de filtration sur gel, Superose[™] 6 10/300 GL (GE Healthcare) qui sépare les peptides de 5 à 5 000 kDa, préalablement lavée par 50 mL d'eau MilliQ[®]

(Millipore) et équilibrée par le tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Les fractions ont été et éluées pendant 30 min avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹. Des protéines de calibration (GE Healthcare, Life Sciences) ont été injectées pour la détermination de la masse moléculaire des peptides détectés dans l'échantillon. Les protéines utilisées : mélange A : T : thyroglobuline (Mr 669 000), Ald : aldolase (Mr 158 000), CA : anhydrase carbonique (Mr 29 000), Apr : aprotinine (Mr 6500) ; mélange B : ferritine (Mr 440 000), O : ovalbumine (Mr 44 000), R : ribonucléase (Mr 13 700), B : bleu Dextran (Mr 2000). Les fractions éluées sont concentrées à l'aide d'un Speedvac[®] (Savant).

IV.2.5 Echangeuse d'anions MonoQ

Pour la purification par échangeuse d'anions, 1 mL de la fraction active purifiée par la colonne de Phényle Seharose a été chargé sur une colonne MonoQ HR 5/5 (GE Healthcare), préalablement lavée par 5 mL du tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8 (tampon A) et équilibrée par 10 mL du tampon Tris-HCl 25 mM, 1,5 M NaCl, pH 8 (tampon B). La colonne a ensuite été lavée par 5 mL du tampon A avant l'injection de l'échantillon. Les fractions ont été collectées par la suite automatiquement avec un débit de 0,25 mL.min⁻¹ et un gradient croissant par palier de NaCl (10 min à 25 mM, 10 min à 150 mM, 20 min à 150 mM, 10 min à 300 mM, 20 min à 300 mM, 10 min à 500 mM, 20 min à 500 mM) a été utilisé. Les peptides ont été détectés à un DO 214 et 280 nm. Les fractions collectées ont été concentrées à l'aide d'un SpeedVac[®] (Savant).

IV.2.6 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse

Les fractions actives purifiées par la colonne Octyle C8 et par la colonne de filtration sur gel Sephadex[®] G25 ont été concentrées à l'aide d'un Speedvac[®] jusqu'à un volume de 100 µL puis injectées sur une colonne C18 (Phenomenex, 250X4,6 mm, 5µm). Les échantillons ont été élués selon le programme suivant : 10 min par l'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) dans H₂O 100% puis par un gradient linéaire croissant d'ACN de 0 à 100 % pendant 30 min puis un lavage de la colonne pendant 5 min par l'eau TFA 0,1% (v/v) avec un débit d'1 mL.mn⁻¹. Les pics ont été détectés à 220 nm sur une chaîne de CLHP PerkinElmer Série 200 et collectés manuellement.

Cent µL des fractions actives purifiées par la colonne de Phényle Sepharose ont été injectés sur une colonne en phase inverse C4 (Interchrom, 250X4,6 mm, 5µm), préalablement lavée pendant 10 min par l'eau avec AF 0,1% (v/v), 10 min par l'ACN à 0,08% AF puis 10 min par l'eau MilliQ[®] (Millipore) 0,1% (v/v) AF. Les échantillons ont été élués par un gradient croissant d'ACN de 0 à 100% pendant 40 min, à un débit de 1 mL.mn⁻¹. Finalement,

la colonne a été lavée pendant 10 min par l'eau MilliQ[®] (Millipore) 0,1% (v/v) AF. Les pics ont été détectés à 227 et 280 nm sur une chaîne CLHP (Waters 1525 Binary CLHP Pump) et collectés manuellement. Les fractions ont été séchées dans un Speedvac[®].

V. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une technique de séparation des peptides et des protéines purifiés en fonction de leur masse moléculaire. Deux types d'électrophorèses sur gel ont été préparés, en condition dénaturante ou en condition native.

V.1 En condition dénaturante SDS-PAGE

Cette technique consiste à préparer deux gels, un gel de séparation ou gel inférieur et un gel de concentration ou gel supérieur. Le gel de polyacrylamide SDS Tris-tricine à 17% est constitué par le gel de séparation (7 mL) comportant : 2,975 mL d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide 30 % (v/v), Tris 3 M, 0,1 % SDS (m/v), 75 µL de persulfate d'ammonium 10% (m/v), 3 µL de TEMED, pH 8,5. Ce gel est surmonté d'un gel de concentration (2 mL) composé par 0,195 mL d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide 30 % (v/v), Tris 3 M, SDS 0,007% (m/v), 20 µL de persulfate d'ammonium 10% (m/v), 2 µL, TEMED, pH 8,45. Le gel de polyacrylamide SDS Tris-glycine à 12% est constitué par deux gels, le gel de séparation comportant 1,5 M Tris, 2,25 mL d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide 30% (v/v), 0,1% SDS (m/v), 100 µL persulfate d'ammonium 10% (m/v), 20 µL TEMED, 5,13 mL H₂O pH 8,8. Ce gel est surmonté d'un gel de concentration 1 M Tris, 0,375 mL d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide 30% (v/v), 0,07% SDS (m/v), 20 µL persulfate d'ammonium 10% (m/v), 4 µL TEMED, 2,75 mL H₂O, pH 6,8. La dénaturation des protéines a été effectuée par l'incubation de 20 µL de l'échantillon purifié avec 5 µL du tampon de charge (tampon Laemmli) (Tris 80 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1% (m/v), dithiothréitol (DTT) 40 mM, glycérol 7% (v/v), bleu de bromophénol 0,1% (m/v), pH 8,8), à 90°C pendant 5 min. La migration a été réalisée pendant 1 h à 100V à l'aide d'un générateur Pharmacia, dans un tampon Tris-tricine (Tris 0,1 M, tricine 0,1 M, SDS 0,1% (m/v) pH 8,25) pour le premier gel SDS-PAGE Tris-tricine et dans un tampon Tris-glycine (Tris-HCl 0,2 M, glycine 143 g.L⁻¹, pH 8,9) pour le gel SDS-PAGE Tris-glycine. Trois marqueurs de masses moléculaires ont été utilisés à raison de 5 µL par puits : PageRuler Low range Unstained Protein Ladder (3,4-100 kDa) (Fermentas) Low range Rainbow[™] Molecular Weight Markers (3,5-38 kDa) (GE Healthcare) et Color Marker Ultra-low range (1,060-26,600 Da) (Sigma-Aldrich).

V.2 En condition native

L'électrophorèse sur gel en condition native consiste aussi en la préparation des deux gels de séparation et de concentration. Le gel natif a été préparé à une concentration de 12% selon le protocole suivant : le gel de séparation, préparé en premier, est constitué par 1,5 M Tris, 2,25 mL d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide 30% (v/v), 100 µL persulfate d'ammonium 10% (m/v), 20 µL TEMED, 5,13 mL H₂O pH 8,8. Après solidification du gel de séparation, on prépare le gel de concentration, constitué par: 1 M Tris, 0,375 mL d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide 30% (v/v), 20 µL persulfate d'ammonium 10% (m/v), 4 µL TEMED, 2,75 mL H₂O, pH 6,8. Les protéines ont été mélangées directement avec 5 µL du tampon de charge 5x (0,2% bleu de bromophénol m/v), 20% de glycérol (v/v), Tris-HCl 10mM, pH 6,8) et déposées dans les puits de gel. La migration a été réalisée pendant 1 h à 90 V à l'aide d'un générateur Pharmacia, dans un tampon Tris-glycine 10x (Tris-HCl 30 g.L⁻¹, glycine 143 g.L⁻¹).

VI. Détection sur gel

VI.1 Coloration au bleu de Coomassie G250

Après migration, le gel de SDS-PAGE ou gel natif a été incubé dans une solution de coloration avec 40% d'éthanol absolu (v/v), 7% d'acide acétique (v/v) et 0,0025% de bleu de Coomassie G250 (m/v) (Sigma-Aldrich) durant la nuit sous une agitation douce. Après coloration, le gel a été plongé dans une solution de décoloration (40% d'éthanol (v/v), 7% d'acide acétique (v/v)) pendant 45 min pour mieux observer les bandes. Le gel a été ensuite rincé dans de l'eau MilliQ[®] (Millipore) plusieurs fois afin d'observer les résultats à l'aide d'un système Fusion-FX7 (Viber Lourmat).

VI.2 Coloration au bleu Safe

Une autre coloration de gel SDS-PAGE a été réalisée par l'utilisation du bleu Safe (LabSafe[™] Gel Blue, G-Biosciences). Après migration des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide tris-tricine (17%), le gel a été rincé par l'eau MilliQ[®] (Millipore) et recouvert par 50 mL d'une solution de bleu Safe, et incubé pendant une période entre 15 min à 2 h. Le gel a été décoloré par immersion dans de l'eau MilliQ[®] (Millipore) pendant 30 min et les bandes ont été observées à l'aide d'un système Fusion-FX7 (Viber Lourmat).

VI.3 Coloration au nitrate d'argent

Dans la plupart des cas, le gel SDS-PAGE a été coloré aussi au nitrate d'argent, qui est une technique plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie et permet la révélation des peptides de faible masse moléculaire. Le protocole de la coloration a été appliqué selon les étapes suivantes : le gel a été incubé dans une solution de fixation constitué par 40% d'éthanol (v/v) et 7% d'acide acétique (v/v) pendant 1 h. Puis le gel a été lavé par l'eau MilliQ® (Millipore) deux fois pendant 5 min et incubé pendant 1 min dans la solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) à 0,02 % (m/v). Le gel a été rincé 2 fois 20 s par l'eau MilliQ® (Millipore) et incubé dans la solution de nitrate d'argent à 0,1% (m/v). Après la coloration, le gel a été rincé par l'eau MilliQ® (Millipore) et par un petit volume de la solution de développement (sodium carbonate 3%, thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,0004%). Le gel a été ensuite incubé dans 30 mL de la solution de développement et 15µL de formaldéhyde ont été ajoutés rapidement pour la révélation des bandes. Lorsque la révélation est correcte 1,5 mL d'acide citrique 2,3 M ont été ajoutés pendant 10 min pour arrêter la révélation. Finalement, le gel a été rincé par l'eau MilliQ® (Millipore) pendant 10 min.

VI.4 Gel overlay

Après détection des bandes protéiques par la coloration au nitrate d'argent, un gel SDS-PAGE non coloré a été préparé de la même manière en parallèle pour la détermination de la masse moléculaire de la protéine active. Après migration, le gel a été soumis à un test antimicrobien contre la souche cible ETR14. Pour cela, le gel non coloré a été traité pendant 1 h par une solution de fixation d'isopropanol 15% (v/v), et d'acide acétique 10% (v/v) et lavé pendant la nuit avec l'eau MilliQ® (Millipore) plusieurs fois. Le gel a été déposé sur une gélose dure SW additionnée de 200 g.L⁻¹ NaCl (7 mL), coulée dans une boîte de Pétri. Ensuite, le gel a été recouvert par 7 mL d'une gélose molle de SW additionnée de 200 g.L⁻¹ NaCl,ensemencée avec 100 µL de la souche cible ETR14 et incubé pendant 4 à 5 jours à 37°C. L'activité a été révélée par l'observation d'une zone d'inhibition au niveau des bandes et la masse de la protéine active a été estimée grâce au marqueur de poids moléculaire coloré : Low range Rainbow™ Molecular Weight Markers (GE Healthcare).

VI.5 Test d'activité superoxide dismutase

L'activité SOD a été révélée sur un gel d'électrophorèse dans des conditions natives, contenant de la riboflavine et le nitro-bleu de tétrazolium (NBT) (Beauchamp et Fridovich

1971, Weyder et Cullen 2010). La riboflavine réduit l'oxygène en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui réduit le NBT et donne un précipité bleu, l'activité SOD est déterminée par la présence d'un halo jaune, qui inhibe la réduction du NBT. Le gel natif à 12% a été préparé comme décrit dans le paragraphe C.V.2 et migré pendant une période de 3 h de pré-électrophorèse à 90 V, pour éliminer le TEMED et le persulfate d'ammonium, dans un tampon de migration à 10% (Tris-HCl 30 g.L⁻¹, glycine 143 g.L⁻¹, pH 8). Les protéines totales extraites du culot cellulaire des souches testées, ETD3 et *E. coli* DH5 α sont utilisés comme contrôles positifs produisant une SOD (Trigui et al. 2011c). Cent ng de protéines extraites des souches ETD5 et ETD8 et des souches contrôles ont été migrés selon le protocole décrit dans le paragraphe D.V.2. Après migration, le gel a été coloré par une solution I contenant 20 mg de NBT à 98% (Sigma-Aldrich), dans le tampon phosphate de sodium 50 mM, 10% NaCl (m/v), à pH 7,8, pendant 15 min et à l'obscurité. La solution de NBT a été vidée et une solution II contenant 132 μ L de TEMED, 0,14 M de rivo flavine (Sigma-Aldrich) dans le même tampon a été ajoutée et le gel a été incubé pendant 15 min à l'obscurité. Enfin, le gel a été incubé dans une solution III de révélation composée de 20 mL du tampon phosphate 50 mM avec 100 μ M d'EDTA et exposé à la lumière d'une lampe à fluorescente de paillasse qui induit l'activité SOD. Le gel devient alors bleu à l'exception de la zone contenant la SOD qui reste transparente.

VII. Analyse de la séquence en acides aminés

VII.1 Extraction des peptides à partir du gel

Dans le but de déterminer la masse moléculaire des peptides antimicrobiens et la séquence en acides aminés par la spectrométrie de masse, nous avons extrait et digéré les peptides à partir des bandes sur gel. Après une migration en SDS-PAGE à 17% et coloration au bleu Safe et au nitrate d'argent, les bandes d'intérêt ont été découpées à l'aide d'un scalpel stérile et lavées 2 fois par une solution I constituée de 500 μ L du tampon carbonate d'ammonium 50 mM sous une agitation de 950 rpm pendant 10 à 30 min. Par la suite, la bande a été lavée par une solution II constituée de 50 % ACN et 50 % du tampon carbonate d'ammonium 50 mM sous une agitation de 950 rpm pendant 10 à 30 min. Les morceaux de gels ont été déshydratés avec 100 μ L d'ACN pendant 10 à 15 min et enfin les gels ont été séchés dans un Speedvac[®] (Savant) pendant 10 min. Pour les bandes colorées au nitrate d'argent, une solution de H₂O₂ à 7% a été ajoutée par la suite pendant 15 min pour enlever le reste de nitrate d'argent. Ces bandes ont été lavées par la suite une autre fois par l'eau MilliQ[®] (Millipore), l'ACN et l'eau MilliQ[®] (Millipore), puis séchées.

VII.1.1 Réduction et alkylation des ponts disulfures

Les halocines de faible masse moléculaire contiennent généralement des cystéines susceptibles de former des ponts disulfures. Pour déterminer la séquence de ces halocines, il est donc nécessaire de réduire les ponts disulfures et d'alkyler les cystéines avant de déterminer les séquences en acides aminés. Après deux étapes de lavages successifs des bandes avec les solutions I et II décrit dans le paragraphe précédent VII.1, la première étape de traitement des peptides consiste en la réduction. Cent μL de DTT 10 mM (Sigma) ont été ajoutés, suivi d'une incubation pendant 1 h à 57°C sous agitation. Puis la solution a été éliminée et 100 μL d'iodoacétamide à 55 mM (Sigma) ont été ajoutés au fragment de gel, ce qui permet l'alkylation des cystéines contenues dans les peptides et empêche la formation de nouveaux ponts disulfure. L'incubation se poursuit pendant 1 h à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation. Par la suite, les mêmes étapes de lavages des bandes avec les solutions I et II et la désyhydratation par l'ACN ont été effectuées comme décrit précédemment dans le paragraphe VII.1.

VII.1.2 Digestion enzymatique

Pour la digestion enzymatique des peptides purifiés, plusieurs enzymes ont été testés, la chymotrypsine (20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), l'endoprotéinase Glu-C (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), l'endoprotéinase Asp-N (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) et la thermolysine (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). La digestion enzymatique des peptides a été réalisée dans un tampon carbonate d'ammonium 50 mM pH 7,8. La solution a été incubée pendant une nuit à 37°C sous une agitation douce. En ce qui concerne les peptides colorés au nitrate d'argent après l'ajout de l'enzyme, les bandes ont été incubées pendant 45 min dans la glace puis la solution a été enlevée et 100 μL de carbonate d'ammonium 50 mM ont été ajoutés au morceau de gel puis incubées à 37°C durant la nuit. La dernière étape d'extraction des peptides est la récupération de la solution d'hydrolyse ou des peptides digérés. Le gel a été lavé par 50 μL AF 0,1% (v/v) sous une agitation de 950 rpm pendant 10 min. La solution de lavage composée de 50 μL d'une solution 50% d'ACN et 50% AF 0,1% (v/v) a été ajoutée à la solution d'hydrolyse puis le gel a été lavé sous agitation de 950 rpm pendant 10 min. Enfin, le gel a été lavé avec 50 μL d'ACN pendant 10 min puis le volume a été réduit jusqu'à 20 μL dans un Speedvac[®] (Savant). Les enzymes utilisées dans cette partie proviennent de Sigma-Aldrich.

VII.1.3 Transfert des protéines sur des membranes en polyvinylidène difluorure (PVDF)

Dans le but de séquencer selon la méthode d'Edman, les peptides de 8 et 14 kDa observés en électrophorèse, les bandes d'intérêt ont été découpées sur le gel après coloration par le bleu Safe. Ces bandes ont été lavées par l'eau MilliQ[®] (Millipore), broyées et ensuite séchées par Speedvac[®] (Savant). Cent μL d'un tampon de transfert contenant 100 mM de Tris-HCl, 0,1% SDS, 100 mM NaCl, pH 8 ont été additionnés à ces bandes et incubés à 37°C pendant une nuit sous une agitation de 400 rpm. La membrane en PVDF a été incubée pendant 60 s avec 100% méthanol qui permet l'activation des groupements chimiques et l'interaction de cette membrane avec les protéines. Par la suite, cette membrane a été rincée par l'eau MilliQ[®] (Millipore) et placée dans la solution de transfert et incubée pendant 24 h à 37°C. La membrane a été rincée par 10% de méthanol et séchée à l'air libre. Les peptides digérés ont été transférés sur des membranes PVDF activées et incubés pendant 24 h à 37°C. Les membranes PVDF ont été séchées à l'air ambiant et gardées au congélateur à -20°C.

VII.2 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier les molécules d'intérêt par la mesure de leur masse et aussi de déterminer leur structure chimique. En outre, les molécules à analyser sont vaporisées puis ionisées dans la source de l'appareil qui donne un mélange d'ions. Ces ions sont séparés selon leur rapport masse sur charge (m/z) par l'analyseur. Le spectre de masse est obtenu par le traitement du signal émis par le détecteur. Dans cette étude nous avons utilisé trois techniques d'analyse par spectrométrie de masse. Les analyses de détermination de la masse moléculaire des peptides antimicrobiens ont été réalisées soit sur un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) à un détecteur à temps de vol (TOF), soit sur appareil MALDI TOF-TOF. La masse moléculaire et la séquence des peptides digérés ont été réalisées en spectrométrie de masse en mode tandem MS-MS qui couple un appareil de chromatographie liquide à un spectromètre de masse (LC-MS). Ces analyses ont été réalisées sur la plate-forme de spectrométrie de masse bioorganique du Muséum national d'Histoire naturelle, à Paris en France.

VII.2.1 MALDI-TOF

L'analyse par MALDI-TOF comporte trois étapes essentielles, le transfert de l'énergie du laser à la matrice, puis la désorption de l'analyte avec les cristaux de matrice et finalement l'ionisation de l'analyte par transfert des protons. Cette technique de désorption laser permettant de travailler sur une grande gamme de masse avec une bonne précision de mesure de masse, une préparation simple, une relative tolérance aux milieux tamponnés, aux sels et à de nombreux tensioactifs. La fraction purifiée de l'halocine S8 a été analysée sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager-DE-PRO (Applied Biosystems). Les échantillons ont été co-cristallisés avec une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinamique (HCCA) par le dépôt d'une goutte sur une plaque MALDI métallique (inox). Un mélange de calibration (calibrant mixture 3) (Applied Biosystems) a été utilisé pour la calibration du spectromètre. Ce mélange contient de l'insuline bovine (5734,59 Da), de la thiorédoxine d'*E. coli* (11674,48 Da) et de l'apomyoglobine de cheval (16952,56 Da). Un volume de 1 μ L de la matrice HCCA préparé dans 500 μ L d'une solution (70% AF à 1% (v/v), 30% ACN) a été déposé sur la plaque puis 0,5 μ L de calibrant a été mélangé avec la matrice. De même, 1 μ L d'échantillon dilué dans 100 μ L de la même solution a été déposé et mélangé avec la matrice puis les dépôts ont été séchés à température ambiante. L'échantillon a été ionisé puis accéléré sous une tension de 25 000 V. Les mesures ont été réalisées en mode linéaire avec une détection des ions en mode positif et un temps de latence de 205 nsec sous 100 acquisitions. La gamme de masse mesurée est comprise entre 5 000 et 20 000 Da.

VII.2.2 LC MS-MS

Cette technique a également été utilisée pour la détermination de la masse moléculaire des peptides purifiés. Dix μ L des peptides réduits, alkylés et digérés par une enzyme protéolytique (chymotrypsine, AspN ou GluC) ont été analysés par la technique de LC-MS-MS sur un système micro-CLHP Dionex U3000 connecté à la qQ-TOF spectromètre de masse Q-Star Pulsar (Applied Biosystems). La séparation des pics a été réalisée sur une colonne C18 microcolonne Uptisphere 5WTF (150x1mm ; 5 μ , Interchim), à l'aide d'un gradient de 0 à 60% d'ACN dans 0,1% TFA (v/v) avec un débit de 40 μ L.min⁻¹. La longueur d'onde de détection a été réglée à 226 nm et la source d'ionisation nanoélectrospray a été exploitée en mode positif avec une tension de nébulisation de 100 eV.

VII.3 Séquençage des peptides par la dégradation d'Edman

Cette technique permet d'obtenir la séquence en acides aminés de peptides ou protéines en identifiant le résidu N-terminal à chaque cycle. La fonction amine de l'acide aminé en position N-terminale de la chaîne peptidique est d'abord traitée à pH alcalin par le phénylthiocyanate, appelé aussi réactif d'Edman. Le dérivé phénylthiocarbamyle de la protéine ou du peptide ainsi obtenu est traité en milieu acide anhydre, ce qui permet le clivage de la liaison peptidique du premier acide aminé en position N-terminale. Après réarrangement du dérivé anilinothiazolinone-acide aminé instable en phénylthiohydantoïne-acide aminé, ce dérivé a été identifié par CLHP. La dégradation se poursuit en répétant plusieurs fois ce cycle de réactions. Le séquençage N-terminal des peptides transférés sur la membrane PVDF ou des peptides digérés en solution a été effectué sur un séquenceur automatique Procise 492 (Applied Biosystems) sur la plate-forme de microséquençage de la faculté des Sciences de Sfax, en Tunisie.

Avant-Propos

Au début de mes travaux de recherche pendant mon mastère, j'ai travaillé sur une collection de 35 souches de micro-organismes prélevés dans la saline de Sfax, dans le but d'un criblage de souches d'archées halophiles productrices de peptides antimicrobiens. Ce travail représente la première étude sur le potentiel des souches d'archées halophiles isolées de la saline de Sfax en Tunisie, à produire des peptides antimicrobiens. Les résultats préliminaires encourageants, nous ont permis de continuer la recherche sur le même sujet dans le cadre de ma thèse en co-tutelle entre l'unité Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques de la Faculté des Sciences de Sfax (UR11ES72) et l'unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245 CNRS-MNHN) du Muséum national d'Histoire naturelle à Paris. Les objectifs de ma thèse portent sur la caractérisation moléculaire et phénotypique des souches actives isolées à partir de deux étangs de la saline de Sfax et l'optimisation de la production d'activité antimicrobienne chez les trois souches présentant le plus large spectre d'activité et une activité la plus importante ETD5, ETD8 et SS1R12. J'ai ensuite identifié et caractérisé les gènes codant les halocines chez ces 3 souches. Enfin, j'ai entrepris la purification et la caractérisation structurale des halocines produites par la souche ETD5.

Chapitre I : Production de agents antimicrobiens par des souches de procaryotes halophiles

La recherche et la caractérisation de nouvelles biomolécules actives s'orientent actuellement vers les micro-organismes provenant des milieux extrêmes où des conditions environnementales non conventionnelles dominent. Dans ces conditions extrêmes, les micro-organismes sont capables de s'adapter et d'orienter leur métabolisme cellulaire vers la production de molécules originales. Les salines sont des environnements hypersalins de choix pour la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes produites par les micro-organismes en raison des compétitions existant dans ces environnements. Dans ce premier chapitre, nous avons criblé une collection de souches conservées à l'UR11ES72 de la Faculté des Sciences de Sfax, afin de sélectionner, d'identifier et de caractériser des souches productrices d'agents antimicrobiens. Nous avons par la suite, optimisé les conditions de croissance et de production de ces composés chez les isolats halophiles les plus performants.

I. Criblage de souches de procaryotes halophiles productrices d'agents antimicrobiens

Trente-cinq souches de procaryotes halophiles, isolées à partir de deux bassins, la table salante TS18 (salinité de 390 g.L⁻¹) et la station M1 (salinité de 200 g.L⁻¹) de la saline de Sfax, ont été criblées pour leurs capacités à produire des agents antimicrobiens ciblant les micro-organismes halophiles. Les résultats des tests d'antagonisme des 35 souches prises deux à deux, nous ont permis d'identifier 11 isolats actifs (Tableau 9). Parmi ces isolats, 7 souches nommées ETD2, ETD6, ETR14, ES1D1, ES1R9, SS1R17 et SS1R21 présentent une activité antimicrobienne contre une seule souche cible avec des diamètres des halos d'inhibition compris entre 8 et 20 mm (Tableau 9). Par contre, les 4 autres souches halophiles ETD5, ETD8, SS1R12 et SS1R14 sont capables d'inhiber respectivement la croissance de 13, 8, 5 et 3 isolats. La souche ETD5 est la plus active car elle présente un diamètre de halo d'inhibition atteignant 35 mm contre la souche cible ETR14 (Tableau 9). On observe qu'aucune souche productrice n'est inhibée par son propre agent antimicrobien. De plus, les deux souches ETD5 et ETD8, présentant le plus large spectre d'activité, sont insensibles aux agents antimicrobiens produits par toutes les autres souches.

Tableau 9. Interactions antagonistes entre les isolats de micro-organismes halophiles.

Souches productrices	Souches cibles														
	ETD1	ETD2	ETD3	ETD6	ETD19	ETD34	ETR7	ETR14	ES1D1	ES1D6	ES1D29	ES1R10	SS1R14	SS1R17	SS1R21
ETD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
ETD5	+	++	++	+++	++	-	++	+++	+	+	+	+	-	++	+
ETD6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ETD8	+	-	-	-	+	-	++	+	-	-	+	-	+	+	+
ETR14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ES1R9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SS1R12	-	+	+	-	-	++	-	-	-	-	++	+	-	-	-
SS1R14	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
SS1R17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SS1R21	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-

Diamètres (en mm) des halos d'inhibition (HI) : +++ = $HI \geq 30$; ++: $15 \leq HI < 30$; +: $8 \leq HI < 15$; - : aucune inhibition

Toutes les souches isolées dans cette étude ont été testées entre elles, deux par deux (deux répliquats). Ce tableau ne comprend que les souches productrices pour lesquelles au moins une souche cible est sensible. Les souches ETD5, ETD8, ES1R9 et SS1R12 qui ne sont sensibles à aucune souches productrices, ne figurent pas dans ce tableau dans la liste des souches cibles.

II. Caractérisation des souches productrices d'agents antimicrobiens

II.1 Caractérisation phylogénétique des souches halophiles

Afin de caractériser les souches productrices d'agents antimicrobiens et les souches cibles, des analyses moléculaires par amplification des gènes codant l'ARNr 16S des archées et des bactéries ont été effectuées sur l'ADN génomique avec des amorces universelles. Parmi les 19 souches, 6 avaient déjà été identifiées lors d'une précédente étude (Trigui et al. 2011c). Il s'agit des souches ETD1, ETD2 et ETD6 identifiées comme *Halorubrum* sp., des souches ES1D6 et ES1R10 identifiées comme *Haloferax* sp. et de la souche ES1D1 identifiée comme *Pseudomonas halophila* (Tableau 10). Pour les 13 souches restantes, les séquences nucléotidiques ont été analysées et comparées à la base de données GenBank en utilisant l'algorithme BlastN (Altschul et al. 1997). Le résultat des identifications et le numéro d'accèsion des 19 souches dans GenBank figure dans le tableau 10.

La majorité des isolats identifiés (17/19) appartient au domaine des archées et seulement deux souches appartiennent au domaine des bactéries. Parmi les archées les souches du genre *Halorubrum* dominent aussi bien dans la table de cristallisation du sel TS18 (salinité de 390 g.L⁻¹) que dans la station M1 de plus faible salinité (200 g.L⁻¹). Les trois nouveaux ordres récemment décrits dans la classe des *Halobacteria* (Gupta et al. 2015) sont tous représentés dans la saline de Sfax, néanmoins l'ordre des *Haloferacales* (*Haloferax*, *Halorubrum*) domine largement devant les *Halobacteriales* (*Halobacterium*) et les *Natrialbales* (*Haloterrigena*). En revanche, les deux bactéries ont été isolées à partir de la station M1 dont la salinité est moins élevée. Il s'agit des souches ES1D1 et ES1R9 identifiées respectivement comme *P. halophila* et *Salicola* sp. En outre, les 11 souches productrices d'agents antimicrobiens se répartissent entre la table de cristallisation TS18 avec 5 souches et la station M1 avec 6 souches. Les souches ETD5 et ETD8 présentant les halos d'inhibition les plus importants et le plus large spectre d'activité antimicrobienne (Tableau 9) ont été affiliées à l'espèce *Halobacterium salinarum*, tandis que la souche SS1R12 qui présente un spectre d'activité plus restreint (Tableau 9) est une *Haloterrigena thermotolerans*.

Tableau 10. Souches halophiles identifiées et utilisées dans ce travail. Les souches présentant une activité antimicrobienne sont soulignées.

Souche	Origine de l'échantillon	Identification (n° accession des gènes d'ARNr 16S)
ETD1	Eau TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (HQ589030) ^a
ETD2	Eau TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (HQ179134) ^a
ETD3	Eau TS18	<i>Halorubrum chaoviator</i> (JX982772)
ETD5	Eau TS18	<i>Halobacterium salinarum</i> (JX982770)
ETD6	Eau TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (GU724599) ^a
ETD8	Eau TS18	<i>Halobacterium salinarum</i> (JX982771)
ETD19	Eau TS18	<i>Halobacterium salinarum</i> (KR611163)
ETD34	Eau TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (KR611162)
ETR7	Eau TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (KR611164)
ETR14	Eau TS18	<i>Halorubrum chaoviator</i> (KP827650)
ES1D1	Eau M1	<i>Pseudomonas halophila</i> (HQ179135) ^a
ES1D6	Eau M1	<i>Haloferax</i> sp. (HQ589031) ^a
ES1D29	Eau M1	<i>Halorubrum</i> sp. (JX982777)
ES1R9	Eau M1	<i>Salicola</i> sp. (KT440879)
ES1R10	Eau M1	<i>Haloferax</i> sp. (HQ589032) ^a
SS1R12	Sédiment M1	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> (JX982773)
SS1R14	Sédiment M1	<i>Halorubrum tebenquichense</i> (JX982774)
SS1R17	Sédiment M1	<i>Halorubrum chaoviator</i> (JX982775)
SS1R21	Sediment M1	<i>Halorubrum tebenquichense</i> (JX982776)

^aTrigui et al. 2011c

II.2. Relations phylogénétiques des souches d'archées

Les relations phylogénétiques entre les souches isolées de la saline de Sfax ont été étudiées par la méthode des distances « neighbour joining ». L'arbre a été construit à partir des séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr 16S. Les séquences obtenues pour les souches isolées de la saline de Sfax (~ 1440 pb) ont été comparées à celles obtenues lors de l'identification individuelle de chaque souche par BlastN. Nous n'avons pas pu introduire dans cette étude les séquences des souches ETD1, ETD2, ETD6, ES1D6 et ES1R10 (Tableau 10) préalablement déterminées par Trigui et al. (Trigui et al. 2011c), car elles sont beaucoup plus courtes (~ 900pb). L'arbre a été enraciné en utilisant comme groupe externe *Salicola* sp. ES1R3, une souche non décrite dans cette étude mais qui provient également de la saline de Sfax. On observe dans la figure 33, que les séquences se regroupent en 3 clades, celui des *Halorubrum*, celui des *Haloterrigena/Natrinema* et celui d'*Halobacterium salinarum*. En ce qui concerne la souche SS1R12, son affiliation sur la base de la séquence nucléotidique du gène codant l'ARNr 16S n'était pas très concluante, puisque cette souche pouvait être affiliée

aussi bien à *Htg. thermotolerans* qu'à *Natrinema pellirubrum*. Les 2 genres *Natrinema* et *Haloterrigena* ont été défini il y a une quinzaine d'année sur la base des séquences codant l'ARNr 16S (McGenity et al 1998, Ventosa et al. 1999). Cependant ces 2 genres sont très proches phylogénétiquement et il faut souvent utiliser d'autres marqueurs pour les différencier (Minegishi et al. 2010b). C'est pourquoi nous avons amplifié et cloné pour la souche SS1R12 mais également pour les souches de références *Htg. thermotolerans* DSM 11552 et *Nnm. pellirubrum* DSM 15624 le gène *rpoB* codant la sous unité B de l'ARN polymérase. La comparaison des séquences obtenues a permis d'affiler SS1R12 à *Htg. thermotolerans*.

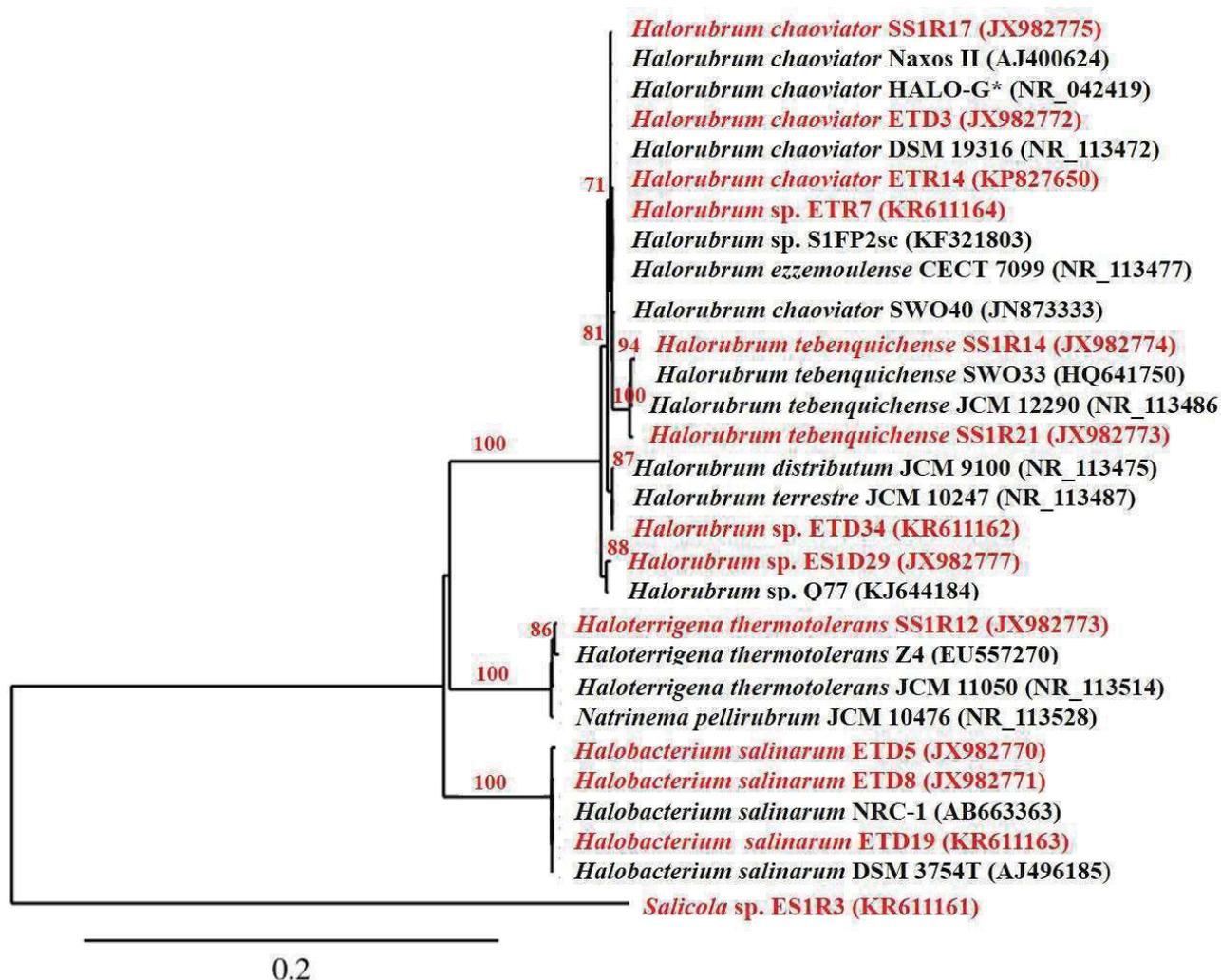


Figure 33. Arbre phylogénétique des souches isolées de la saline de Sfax basé sur la séquence nucléotidique du gène codant l'ARNr 16S. L'arbre consensus a été construit par une répétition de 1000 échantillonnages et la proportion de bootstrap supérieure à 70% est indiquée en rouge au-dessus des branches. L'échelle indique le nombre de substitutions par site. Les souches provenant de la saline de Sfax sont indiquées en rouge, celles ayant servi à l'identification des souches sont indiquées en noir.

II.3 Caractérisation phénotypique et enzymatique des souches productrices

En plus de la caractérisation moléculaire des souches sélectionnées, nous avons procédé à une caractérisation phénotypique et enzymatique des 11 souches présentant une activité antimicrobienne. Les résultats obtenus par coloration de Gram, indiquent que toutes les souches testées sont à Gram négatif à l'exception de la souche ETD2 qui est à Gram positif (Tableau 11). De plus, la majorité des souches sont capables de réduire le nitrate, alors qu'une seule souche *Halorubrum tebenquichense* SS1R14 est également capable de réduire le nitrite (Tableau 11). En outre, la plupart des souches sont capables de dégrader le glucose et le glycérol et de l'utiliser en tant que source de carbone pour leur croissance, tandis que seulement trois souches sont capables de croître uniquement sur du saccharose.

Tableau 11. Caractérisation phénotypique des 11 souches présentant une activité antimicrobienne.

Souche productrice	Gram	Nitrate réductase	Nitrite réductase	Seule source de carbone				
				Xylose	Glucose	Saccharose	Maltose	Glycérol
<i>Halorubrum</i> sp. ETD2	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Halorubrum</i> sp. ETD6	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>P. halophila</i> ES1D1	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Salicola</i> sp. ES1R9	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R21	-	-	-	+	+	-	+	+

III. Caractérisation préliminaire des agents antimicrobiens

III.1. Localisation cellulaire de l'activité antimicrobienne chez les onze souches productrices

Dans le but de déterminer si l'activité antimicrobienne des 11 souches actives est intracellulaire, associée au culot cellulaire, ou extracellulaire excrétée dans le surnageant, des tests d'activités ont été réalisés sur le surnageant et le culot de cultures en phase stationnaire de croissance. Les résultats montrent que l'activité antimicrobienne des 11 souches testées est présente dans le culot cellulaire, ce qui suggère que cette activité est due aux agents antimicrobiens liés aux cellules (Tableau 12). D'autres part, l'activité antimicrobienne a été également détectée dans le surnageant de seulement 6 souches parmi les 11 souches testées. Ces souches sont : *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, *Htg. thermotolerans*

SS1R12, *P. halophila* ES1D1, *Salicola*. sp. ES1R9 et *Hrr. chaoviator* SS1R17 (Tableau 12). Cela signifie que pour ces 6 souches, des agents antimicrobiens sont sécrétés dans le milieu extracellulaire.

Tableau 12. Localisation de l'activité antimicrobienne chez les souches halophiles productrices.

Souche productrice	Souche cible	Halos d'inhibition	
		culot cellulaire	Surnageant
<i>Halorubrum</i> sp. ETD2	<i>Halorubrum</i> . sp ES1D29	+	-
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5	<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	+++	+++
<i>Halorubrum</i> sp. ETD6	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	+	-
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8	<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	++	++
<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	+	-
<i>P. halophila</i> ES1D1	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	+	+
<i>Salicola</i> sp. ES1R9	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	+	+
<i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	+	++
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	+	-
<i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17	<i>Halorubrum</i> . sp ES1D29	+	+
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R21	<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	+	-

Diamètres (en mm) des halos d'inhibition (HI) : +++= HI ≥ 30; ++: 15 ≤ HI < 30; +: 8 ≤ HI < 15; - : aucune inhibition

III.2. Nature de l'activité antimicrobienne

Dans le but de caractériser la nature des agents antimicrobiens sécrétés, nous avons testé l'effet de la chaleur, du pH et de la protéolyse sur l'activité antimicrobienne détectée dans les surnageants des souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, *Htg. thermotolerans* SS1R12, *P. halophila* ES1D1, *Salicola*. sp. ES1R9 et *Hrr. chaoviator* SS1R17 et l'activité détectée dans les cultures des souches *Halorubrum* sp. ETD2, *Halorubrum* sp. ETD6, *Hrr. chaoviator* ETR14, *Hrr. tebenquichense* SS1R14, et *Hrr. tebenquichense* SS1R21. De ce fait, le surnageant d'une culture bactérienne halophile de *Salicola* sp. ES1R9 a été utilisé comme source de protéase halophile. Les résultats montrent que l'incubation du surnageant ou de la culture pendant 2 h à différents pH dans une gamme allant de 2 à 10, n'a globalement aucun effet sur l'activité antimicrobienne des trois souches testées (Tableau 14).

De plus, les résultats du traitement par la chaleur des 11 souches halophiles étudiées soit à partir de surnageant ou de la culture montrent que pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Halorubrum* sp. ETD2, *Hbt. salinarum* ETD8, *Salicola*. sp. ES1R9, *Htg. thermotolerans* SS1R12, *Hrr. tebenquichense* SS1R14 et *Hrr. chaoviator* SS1R17, l'activité antimicrobienne est stable jusqu'à une température de 80°C. Tandis que pour les souches *Halorubrum* sp. ETD6, *Hrr. chaoviator* ETR14, *P. halophila* ES1D1, *Hrr. tebenquichense* SS1R21, l'activité antimicrobienne ne résiste pas à une température de 80°C. Ces résultats indiquent que les

agents antimicrobiens synthétisés par les 2 souches d'archées halophiles extrêmes *Hbt. salinarum* sont moyennement thermostables. En outre, les 2 souches d'*Hbt. salinarum* montrent que l'activité antimicrobienne est sensible au traitement pendant 2 h à 45°C par la protéase halophile de *Salicola* sp. ES1R9. La nature de ces composés a été identifiée par l'utilisation d'une protéase halophile provenant de la souche ES1R9 isolée lors de notre étude pour traiter le surnageant de culture de la souche productrice de l'activité. Nous n'avons pas utilisé des enzymes protéolytiques classiques, comme dans la plupart des études précédentes (Torreblanca et al. 1994, O'Connor et Shand 2002) car ces enzymes ne fonctionnent pas efficacement à des forces ioniques élevées. En effet, on observe alors une inhibition totale de l'activité antimicrobienne des 2 souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 (Tableau 13). Ces résultats suggèrent fortement la nature peptidique ou protéique des agents antimicrobiens produits par les 2 souches d'*Halobacterium*. Par contre pour la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, l'activité antimicrobienne ne diminue que partiellement par l'action de la protéase halophile ce qui suggère la présence d'une multiplicité d'agents antimicrobiens dont certains seraient de nature protéique (Tableau 13). En revanche pour le reste des 11 souches testées, l'activité antimicrobienne n'a pas été affectée par le traitement par la protéase halophile ce qui suggère que le principe actif de ces souches est de nature non protéique.

Tableau 13. Effet de la chaleur et de la protéase halophile sur les halos d'inhibition induits sur les souches cibles par les isolats sélectionnés.

Souche productrice	Souche cible	Halos d'inhibition (mm)			
		Contrôle, 37°C	70°C	80°C	37°C +, protéase
<i>Halorubrum</i> sp. ETD2	<i>Halorubrum. sp</i> ES1D29	15	15	15	10
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5	<i>Hrr.chaoviator</i> ETR14	26	24	8	-
<i>Halorubrum</i> sp. ETD6	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	7	0	0	7
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8	<i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17	15	15	8	-
<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	13	0	0	10
<i>P. halophila</i> ES1D1	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	11	0	0	8
<i>Salicola</i> sp. ES1R9	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	16	13	9	14
<i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	11	12	9	7
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	12	11	12	10
<i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17	<i>Halorubrum. sp</i> ES1D29	17	12	10	15
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R21	<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	13	12	0	10

*Les valeurs des halos d'inhibition (mm) sont les valeurs moyennes de trois expériences. Le surnageant non traité de la souche productrice est utilisé comme témoin. -: Aucun halo d'inhibition.

Tableau 14. Effet du pH sur l'activité antimicrobienne des 11 souches de procaryotes halophiles productrices d'agents antimicrobiens.

Souche productrice	Souche cible	Halos d'inhibition (mm)
		pH (2 à 10)
<i>Halorubrum</i> sp. ETD2	<i>Halorubrum</i> . sp ES1D29	13-17
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5	<i>Hrr.chaoviator</i> ETR14	22-35
<i>Halorubrum</i> sp. ETD6	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	6-8
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8	<i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17	15-20
<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	8-13
<i>P. halophila</i> ES1D1	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	8-11
<i>Salicola</i> sp. ES1R9	<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	12-17
<i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	10-13
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R14	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	8-12
<i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17	<i>Halorubrum</i> . sp ES1D29	9-15
<i>Hrr. tebenquichense</i> SS1R21	<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	10-13

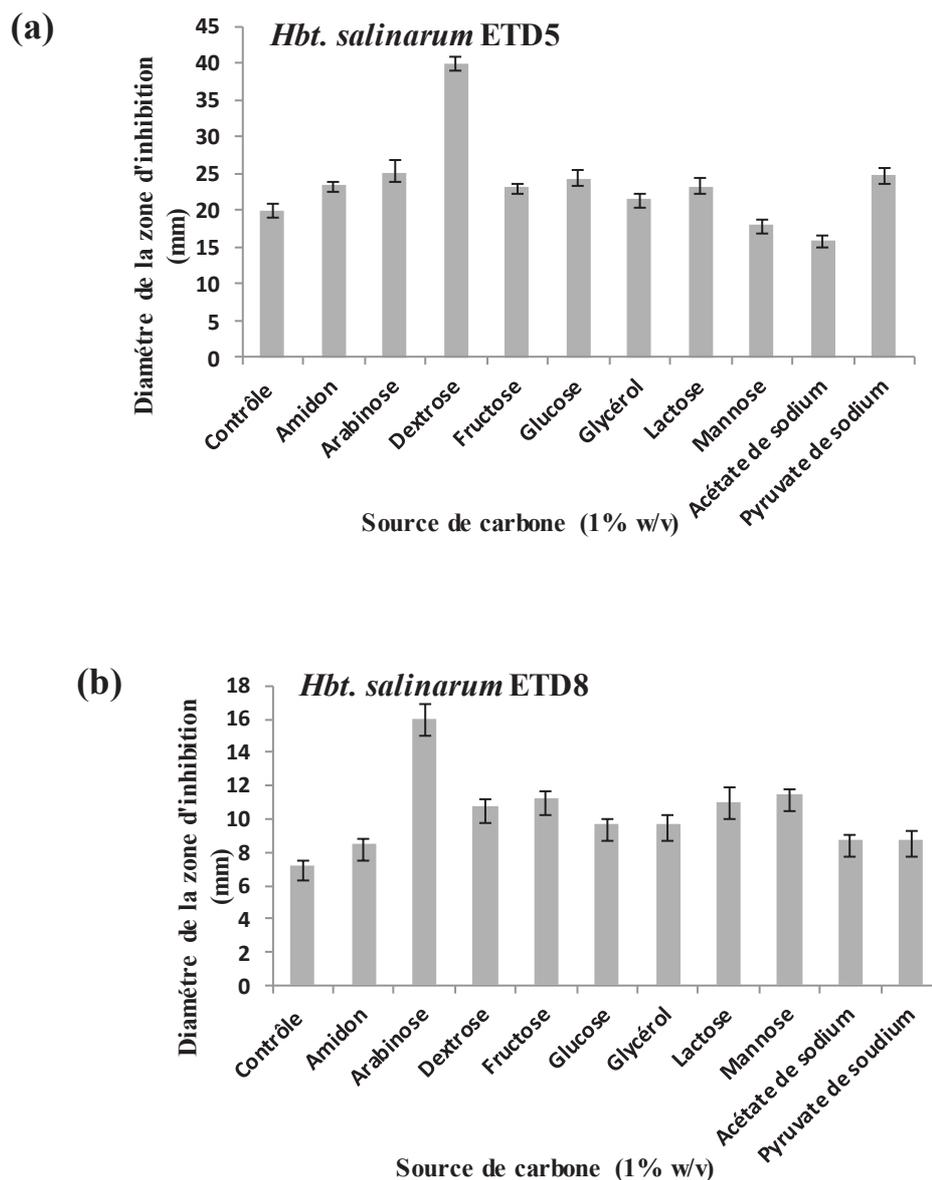
Parmi les 11 souches productrices, nous avons choisi pour la suite de l'étude, 3 souches présentant un large spectre d'activité (Tableau 9, page 118) et dont l'activité antimicrobienne excrétée dans le surnageant était la plus élevée (Tableau 12, page 123). Il s'agit des souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12.

IV. Optimisation de la production des peptides antimicrobiens chez les souches ETD5, ETD8 et SS1R12

IV.1 Effet de la source de carbone

Dans le but d'améliorer la production des agents antimicrobiens par les souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12, différentes sources de carbone (amidon, arabinose, dextrose, fructose, glucose, glycérol, lactose, mannose, maltose, xylose, acétate de sodium, pyruvate de sodium) ont été testées à une concentration finale de 1% (m/v) dans le milieu SW 25 modifié où l'extrait de levure a été réduit à 0,05% (m/v). L'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure des halos des zones d'inhibition contre les souches cibles les plus sensibles. Le contrôle représente le résultat obtenu sans addition d'une source de carbone supplémentaire. Nos résultats présentés dans la figure 34a montrent que le halo d'inhibition produit par la souche *Hbt. salinarum* ETD5 testée contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14, est doublé en présence de dextrose. Par contre, aucune amélioration significative n'a été observée pour les autres sources de carbone testées (Figure 34a). Cependant, pour la seconde souche d'*Hbt. salinarum* ETD8, l'activité antimicrobienne a été testée contre la cible *Hrr. chaoviator* SS1R17, le halo d'inhibition est doublé par l'addition d'arabinose, alors que pour les autres sources de carbone, les halos augmentent de

façon moins importante (Figure 34b). Enfin, pour la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, l'activité antimicrobienne a été testée contre la cible *Hrr. chaoviator* ETD3, et le halo d'inhibition est presque doublé par l'addition de fructose. Les autres sources de carbone à l'exception du maltose entraînent une augmentation des halos moins importante que celle observée avec le fructose (Figure 34c).



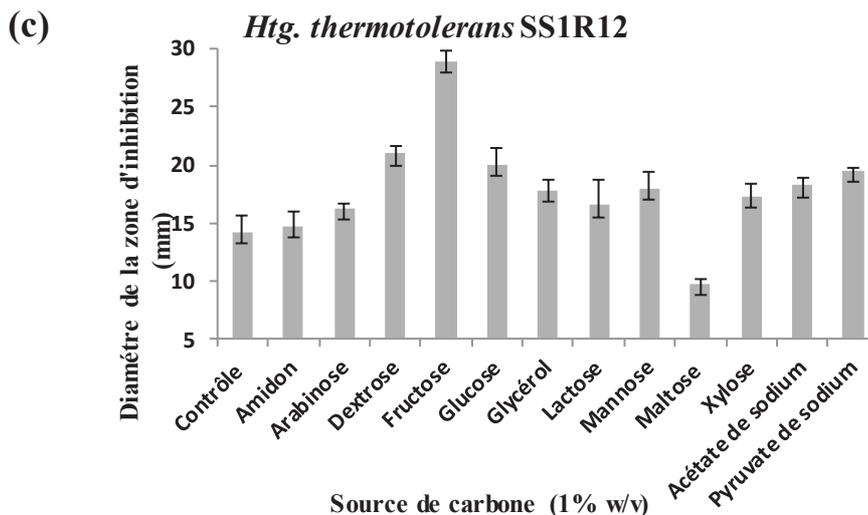


Figure 34. Effet de la nature de la source de carbone sur l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition (mm) pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c).

IV.2 Effet de la source d'azote

L'effet de différentes sources d'azote (acides casaminés, caséine, peptone, tryptone, urée, chlorure d'ammonium, et nitrate de potassium) sur l'activité antimicrobienne a également été évalué à une concentration finale de 1% (m/v) dans le milieu SW25 modifié où l'extrait de levure a été réduit à 0,05% (m/v). Les résultats montrent que pour la souche *Hbt. salinarum* ETD5, le halo d'inhibition augmente efficacement en présence de tryptone (Figure 35a). Chez la souche *Hbt. salinarum* ETD8, l'activité antimicrobienne est améliorée par les différentes sources d'azote, à l'exception des acides casaminés et du nitrate de potassium. Cependant le halo d'inhibition augmente moyennement en présence de tryptone (Figure 35b). Pour la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, le halo d'inhibition augmente significativement par addition de caséine, tandis que les autres sources d'azote ne présentent pas d'effet sur le niveau de production de l'activité antimicrobienne.

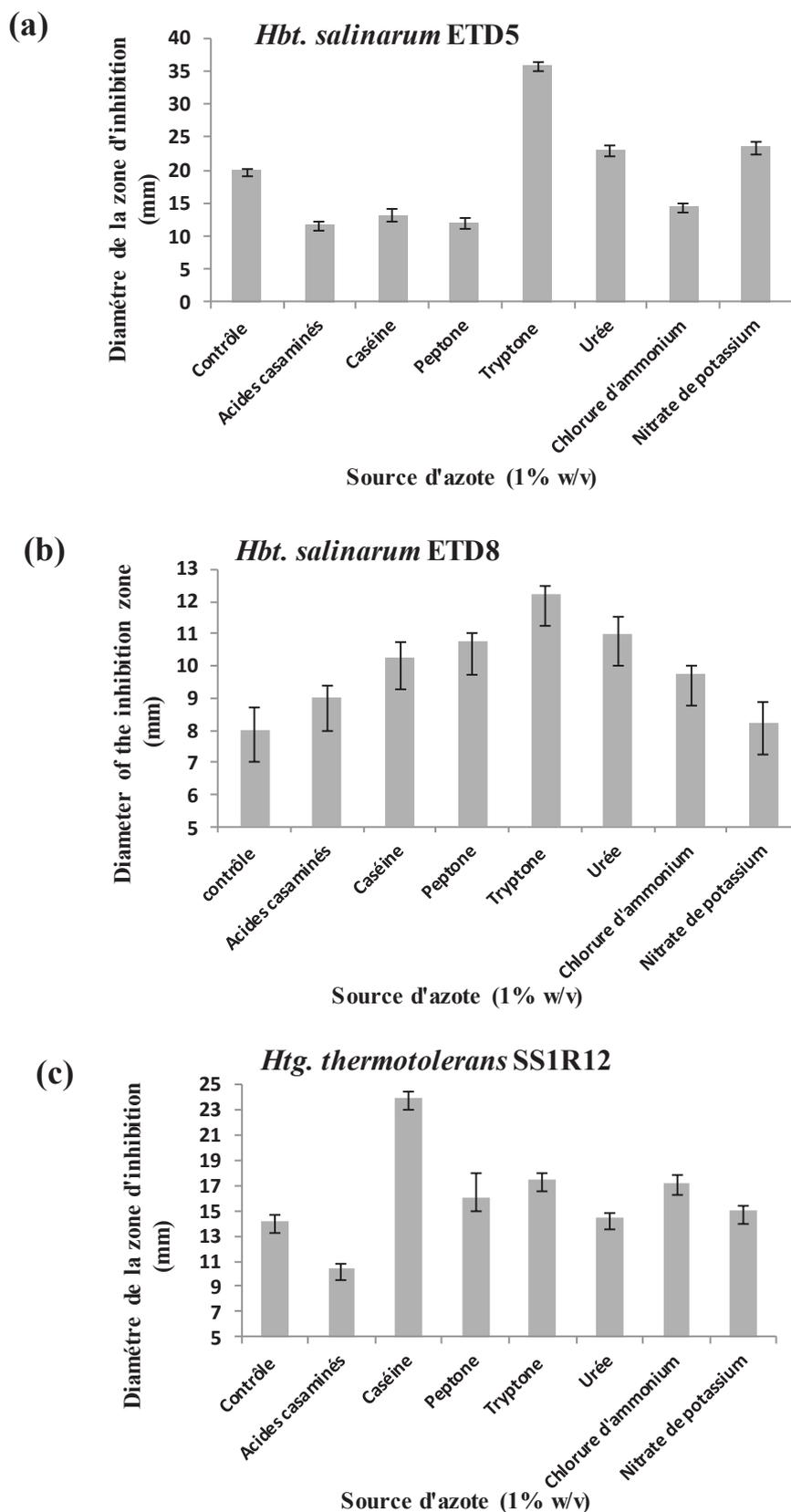
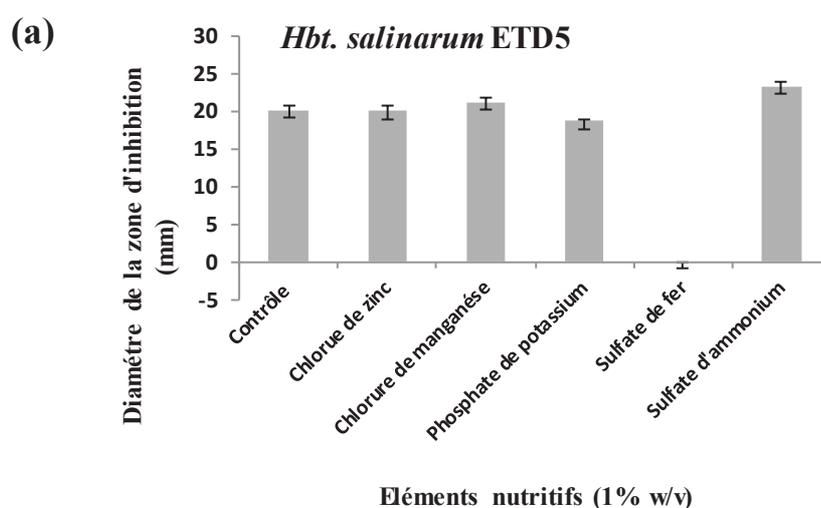


Figure 35. Effet de différentes sources d'azote sur l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition (mm) pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c).

D'après ces résultats obtenus en faisant varier les sources de carbone et d'azote, on peut dire que l'effet obtenu est plus important pour la source de carbone puisque on a observé un doublement des halos d'inhibition. Cependant, on observe que ce doublement est obtenu avec des sources de carbone différentes, le dextrose pour *Hbt. salinarum* ETD5, l'arabinose pour *Hbt. salinarum* ETD8, et le fructose pour *Htg. thermotolerans* SS1R12. D'autre part, la tryptone et la caséine ont un effet significatif sur la production des agents antimicrobiens respectivement pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Htg. thermotolerans* SSR12. Chez *Hbt. salinarum* ETD8 l'effet des différentes sources d'azote est moins significatif.

IV.3 Effet d'autres éléments nutritifs

D'autres éléments nutritifs comme le chlorure de zinc ($ZnCl_2$), le phosphate de potassium (KH_2PO_4), le chlorure de manganèse ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), le sulfate de fer ($Fe_2(SO_4)_3$) et le sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) ont été testés, à une concentration finale de 1% (m/v) dans le milieu SW25 avec 0,05% (m/v) d'extrait de levure, pour l'amélioration de la production des peptides antimicrobiens par les souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12. Les résultats illustrés dans la figure 36, révèlent que l'activité antimicrobienne de la souche *Hbt. salinarum* ETD5, n'a pas été affectée par l'addition de ces différents éléments (Figure 36a). Par contre, le chlorure de zinc à une concentration de 1% (m/v) augmente significativement l'activité antimicrobienne des souches *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Figures 36b et 36c).



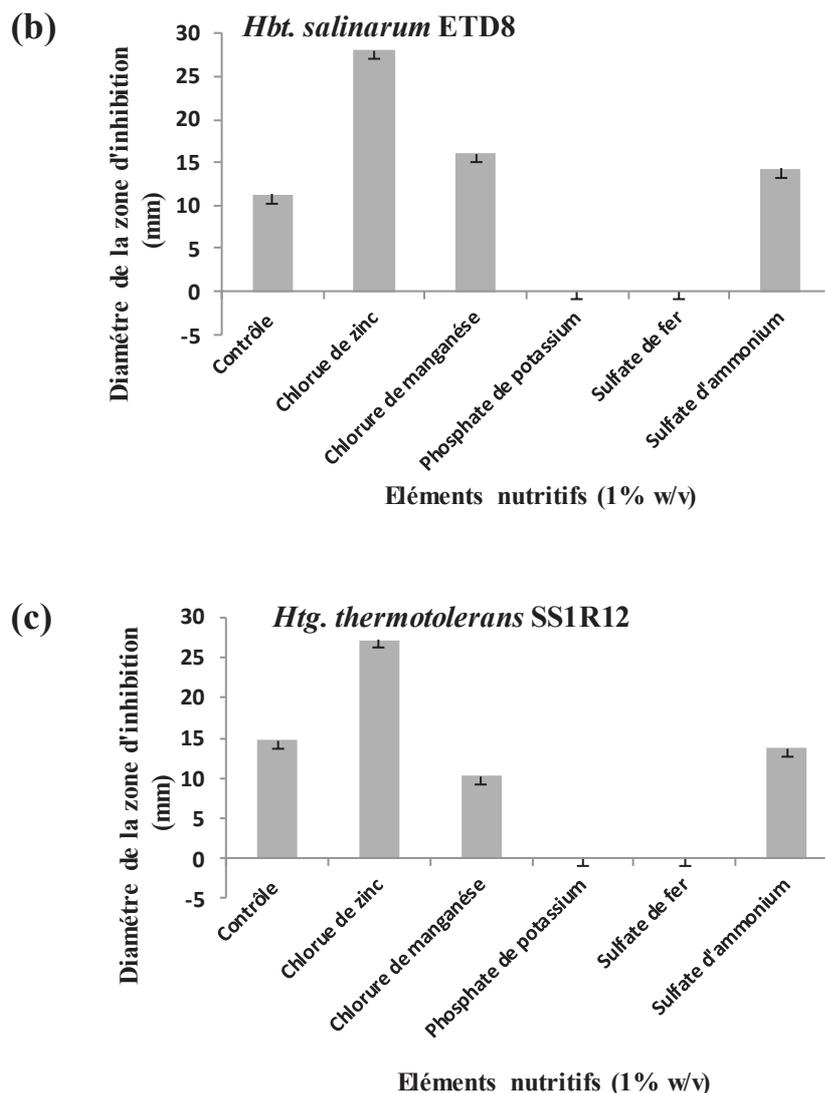
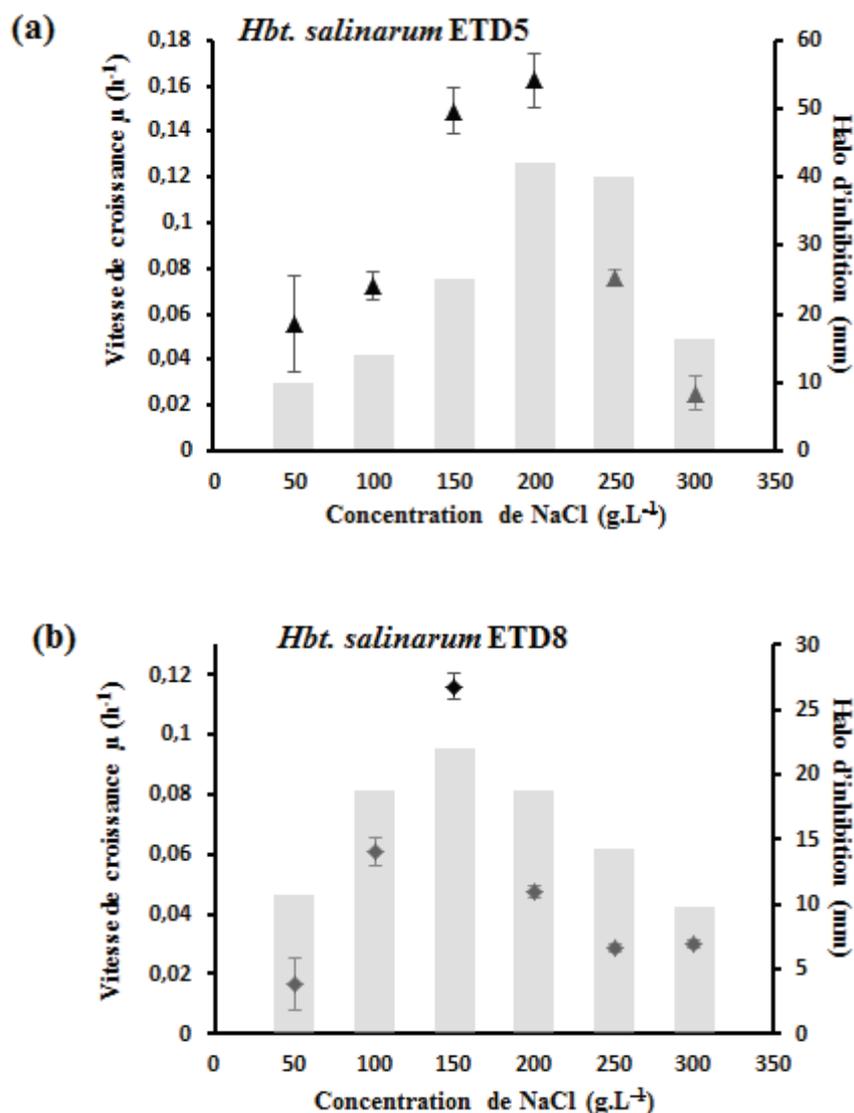


Figure 36. Effet de différents éléments nutritifs sur l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition (mm) pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c).

IV.4 Effet de différentes concentrations en NaCl

L'effet de la concentration en NaCl dans une gamme de concentrations allant de 50 à 350 g.L⁻¹, sur la croissance et l'activité des substances antimicrobiennes des souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 a été évalué. Le taux de croissance μ (h⁻¹) a été déterminé en phase exponentielle de croissance, où la vitesse de division cellulaire est constante et atteint son maximum. Les halos d'inhibition des surnageants de culture ont été déterminés pendant la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance, pendant laquelle la production des agents antimicrobiens

est fréquemment maximale. Les résultats (Figure 37), montrent que les trois souches sont capables de croître dans une gamme de NaCl comprise entre 50 et 300 g.L⁻¹, avec un optimum situé à 200 g.L⁻¹ pour *Hbt. salinarum* ETD5 (Figure 37.a) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Figure 37.c) et de 150 g.L⁻¹ pour *Hbt. salinarum* ETD8 (Figure 37.b). Il est important de remarquer que ces optimums de croissance correspondent aussi aux valeurs les plus élevées des halos d'inhibition.



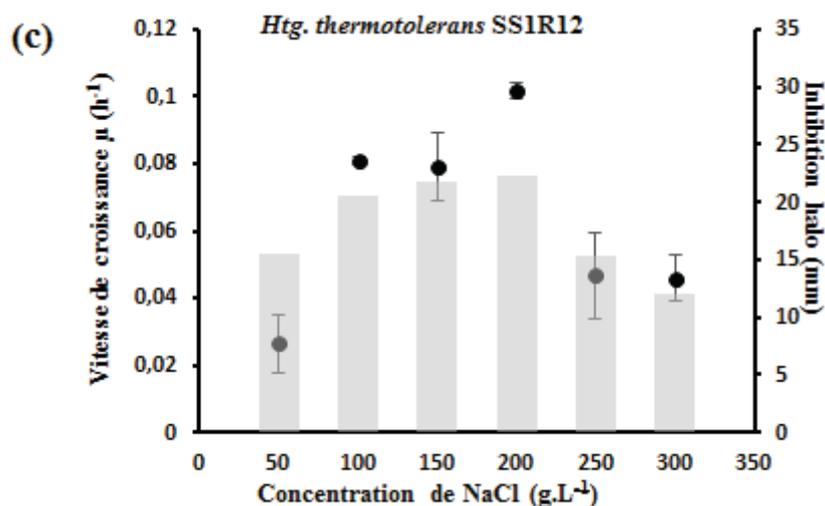
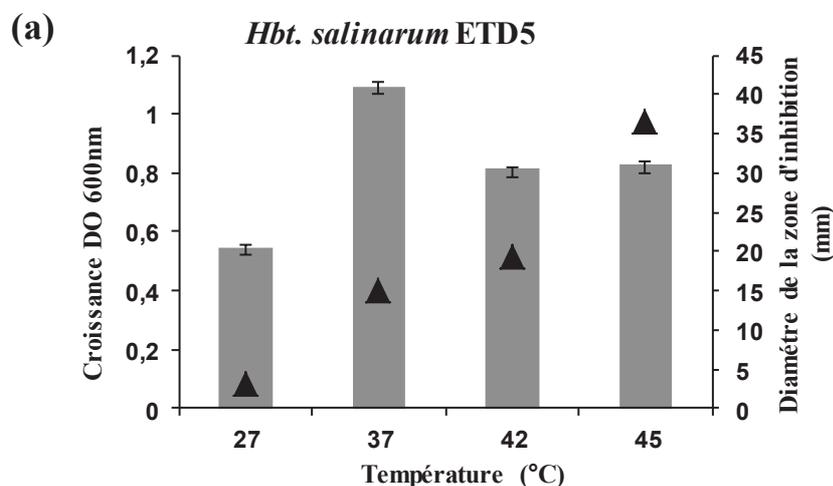


Figure 37. Effet de différentes concentrations en NaCl sur la croissance (\blacktriangle , \blacklozenge , \bullet) et l'activité antimicrobienne mesurée par les halos d'inhibition (mm) (barres en gris clair) pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c).

IV.5 Effet des conditions physico-chimiques de culture

IV.5.1 Effet de la température

L'effet de différentes températures (27°C, 37°C, 42°C et 45°C) sur la croissance et l'activité antimicrobienne a été testé dans le milieu SW 25 additionné de 0,05% d'extrait de levure 1% de dextrose et 1% de tryptone pour la souche *Hbt. salinarum* ETD5, de 1% d'arabinose et 1% de tryptone pour *Hbt. salinarum* ETD8 et de 1% de fructose et 1% de caséine pour *Htg. thermotolerans* SS1R12. Les résultats présentés dans la figure 38, montrent que pour *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8, si la croissance est optimale à une température de 45°C, le halo d'inhibition est maximum à 37°C (Figures 38a et 38b). En revanche, la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12 est capable de croître et de produire le maximum d'activité antimicrobienne à la même température optimale de 37°C (Figure 38.c).



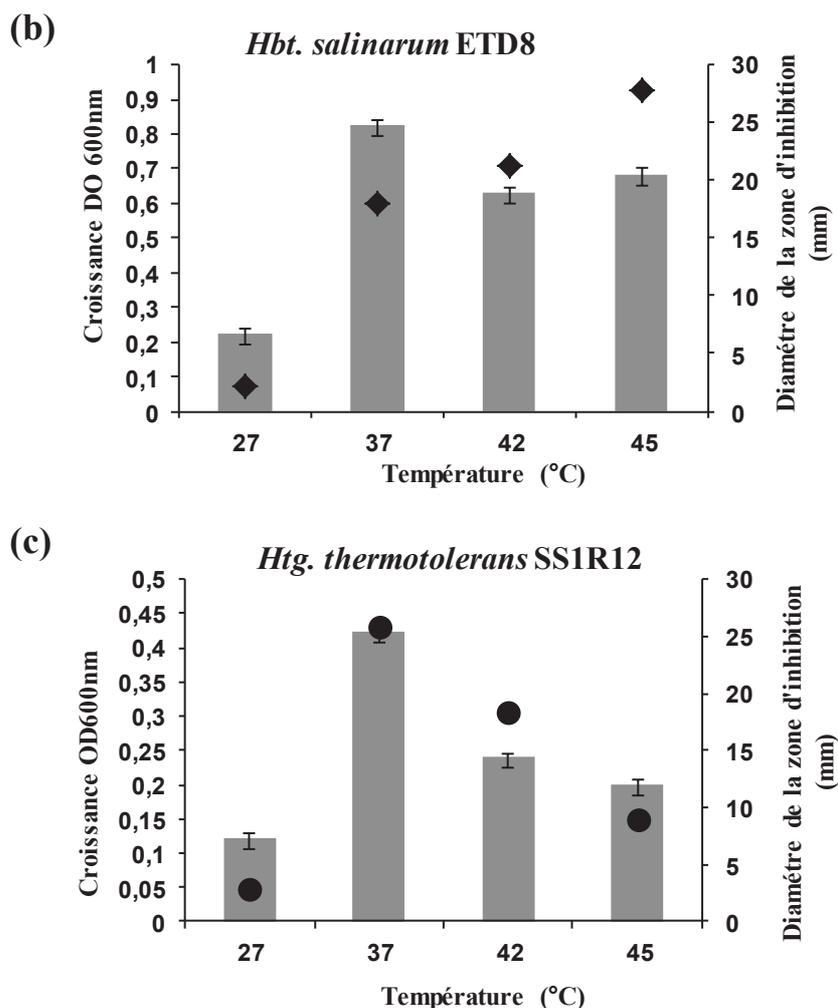


Figure 38. Effet de la température sur la croissance (\blacktriangle , \blacklozenge , \bullet) et l'activité antimicrobienne (barres en gris) pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c). L'activité antimicrobienne a été mesurée par les halos d'inhibition (mm).

IV.5.2 Effet du pH

L'effet du pH du milieu de culture sur la croissance et l'activité antimicrobienne a été étudié en exposant les trois souches testées à une gamme de pH comprise entre 5 et 8 et cultivées dans le milieu SW 25 additionné de 0,05% d'extrait de levure, de 1% de dextrose et 1% de tryptone pour la souche *Hbt. salinarum* ETD5, de 1% d'arabinose et 1% de tryptone pour *Hbt. salinarum* ETD8, et de 1% de fructose et 1% de caséine *Htg. thermotolerans* SS1R12. Les résultats présentés dans la figure 39, montrent que le pH optimal de croissance pour *Hbt. salinarum* ETD5 est de 7, alors que l'activité antimicrobienne devient maximale à un pH légèrement supérieur (pH 8) (Figure 39.a). La croissance et l'activité antimicrobienne maximale de la souche *Hbt. salinarum* ETD8, elles ont été observées à pH 7 (Figure 39.b), alors que *Htg. thermotolerans* SS1R12 dispose d'une croissance optimale à pH 7 et une activité antimicrobienne maximale à un pH faiblement acide (pH 6) (Figure 39.c).

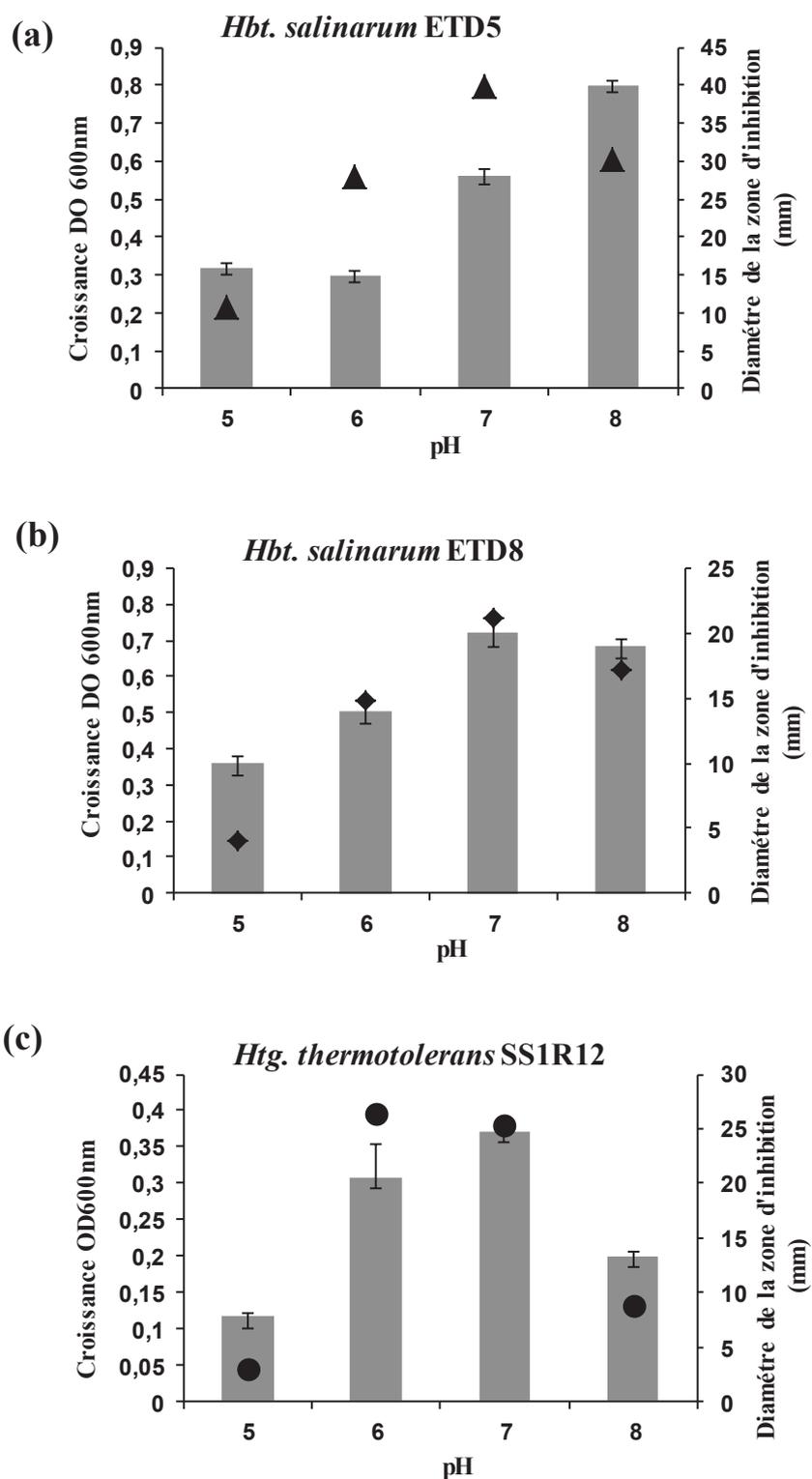
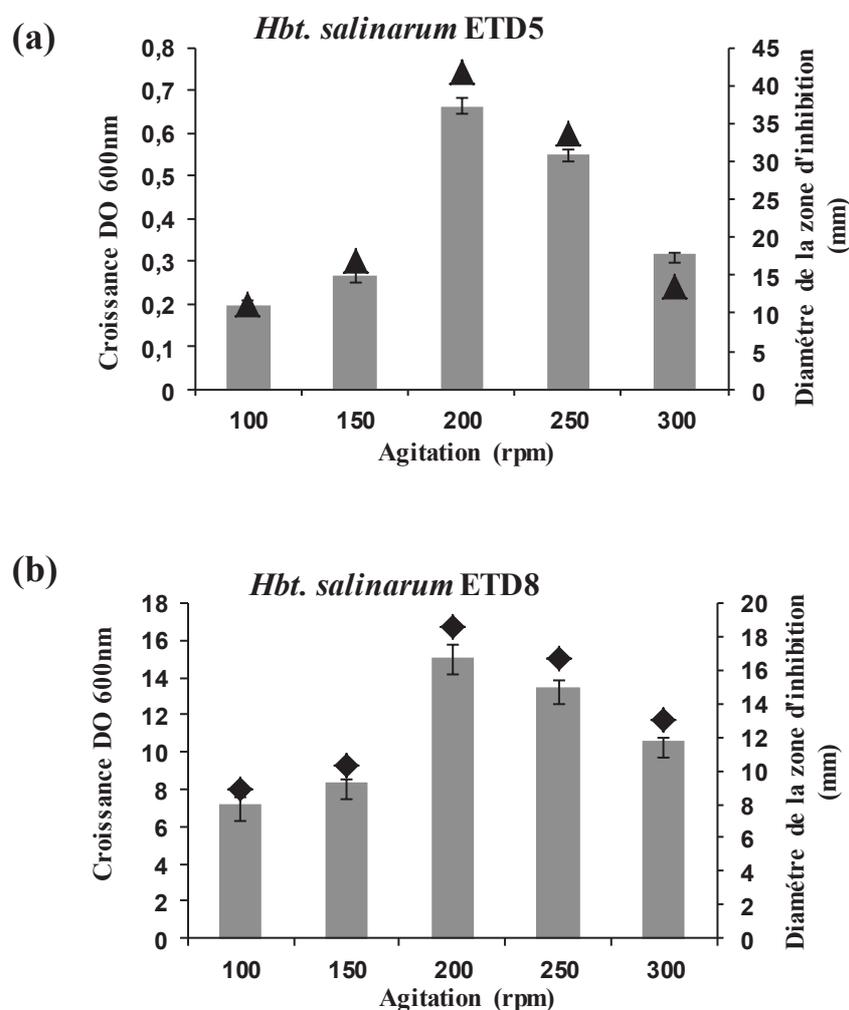


Figure 39. Effet de la variation du pH sur la croissance (▲, ◆, ●) et l'activité antimicrobienne (barres en gris) pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c). L'activité antimicrobienne a été mesurée par les halos d'inhibition (mm).

IV.5.3 Effet de l'agitation

L'agitation du milieu peut être un facteur important pour la croissance et la production des biomolécules actives par les souches aéro-anaérobies facultatives comme les archées halophiles. Pour tester ce facteur, différentes vitesses d'agitation de 100, 150, 200 et 250 rpm ont été imposées aux cultures des souches d'*Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12. Les résultats observés (Figure 40), montrent que les agitations optimales pour la croissance des souches d'*Hbt. salinarum* ETD5 (Figure 40.a) et *Hbt. salinarum* ETD8 (Figure 40.b) sont respectivement de 200 et 300 rpm, alors que l'activité antimicrobienne est maximale à 200 rpm pour les deux souches. *Htg. thermotolerans* SS1R12 pousse à pour agitation optimale de 250 rpm alors que son activité antimicrobienne est maximale à 200 rpm (Figure 40.c).



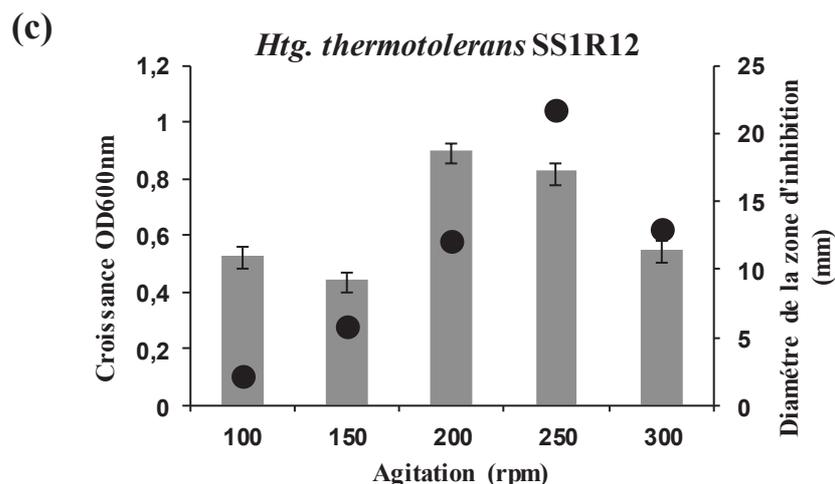


Figure 40. Effet de l'agitation sur la croissance (▲, ◆, ●) et l'activité antimicrobienne chez les souches *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c). L'activité antimicrobienne a été mesurée par les halos d'inhibition (mm) et présentée avec des barres grises.

V. Cinétiques de croissance et de production des agents antimicrobiens des souches ETD5, ETD8 et SS1R12

Dans le but de déterminer la phase de croissance optimale pour la production de peptides antimicrobiens, les souches d'*Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 ont été cultivées dans les conditions de culture optimales utilisant du milieu SW 25, supplémenté de 200 g.L⁻¹ de NaCl pour les souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 et 150 g.L⁻¹ de NaCl pour la souche *Hbt. salinarum* ETD8. Des prélèvements réguliers ont été effectués pendant une semaine pour suivre la croissance à une densité optique de 600 nm et l'activité antimicrobienne évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition exprimées en mm (Figure 41). L'activité antimicrobienne maximale a été détectée à la fin de la phase de croissance exponentielle après 70 h d'incubation pour *Hbt. salinarum* ETD5 (Figure 41a) et 78 h pour *Hbt. salinarum* ETD8 (Figure 41b). Pour *Htg. thermotolerans* SS1R12, cette activité est maximale durant la phase mi-exponentielle de croissance après 46 h d'incubation (Figure 41c).

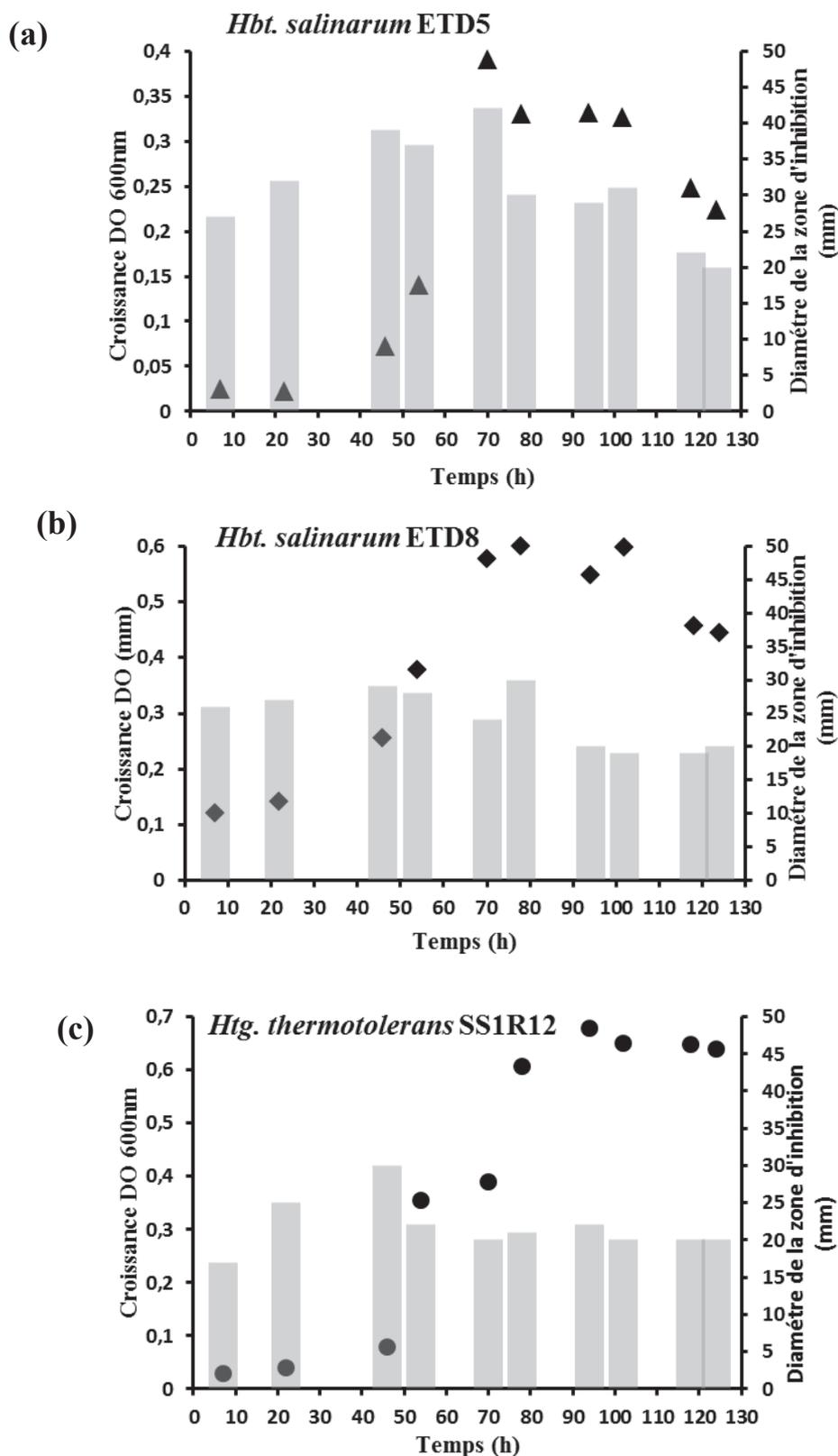


Figure 41. Courbes de variation de la croissance des souches *Hbt. salinarum* ETD5 (▲), *Hbt. salinarum* ETD8 (◆) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (●) et de leur activité antimicrobienne (mm) (barres grises) dans le surnageant de culture en fonction du temps. Les souches cibles sont respectivement *Hrr. chaoviator* ETR14 (a), *Hrr. chaoviator* SS1R17 (b) et *Hrr. chaoviator* ETD3 (c). L'activité antimicrobienne du surnageant est évaluée par le diamètre des halos d'inhibition mesurés en mm.

VI. Spectre d'activité des agents antimicrobiens synthétisés par *Halobacterium salinarum* ETD5

Dans le but d'examiner le spectre d'activité des agents antimicrobiens synthétisés par *Hbt. salinarum* ETD5 à une vaste gamme de souches de référence halophiles du domaine des *Archaea* et des *Bacteria* isolées de différents biotopes hypersalins, et de souches non halophiles à Gram positif et à Gram négatif potentiellement pathogènes, des tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés comme décrit précédemment. Le choix d'*Hbt. salinarum* ETD5 est basé sur son activité importante et son spectre large, comme nous l'avons vu dans le tableau 9. Au début de cette étude nous avons montré que la souche d'*Hbt. salinarum* ETD5 était active contre de nombreuses archées du genre *Halorubrum* présentes dans la saline de Sfax. *Hbt. salinarum* ETD5 montre également une activité contre une bactérie halophile *P. halophila*. Les tests antimicrobiens ont été réalisés en utilisant du surnageant de la culture productrice pour les souches cibles halophiles et du surnageant dialysé contre de l'eau milliQ® à 10% de NaCl, après sa récupération en fin de phase exponentielle de croissance, pour les souches cibles non halophiles. En effet une forte concentration en NaCl induit déjà un halo d'inhibition pour les souches cibles halophiles. Les résultats montrent que *Hbt. salinarum* ETD5 est capable d'inhiber plusieurs souches d'archées de différents genres (tableau 15) : *Halobacterium salinarum* DSM 12282, *Haloarcula hispanica* DSM 4426, *Natrinema pellirubrum* DSM 15624, *Haloarcula sp.* SWI15 et *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511. De plus, des bactéries halophiles comme *Salinibacter ruber* DSM13855 et *Lentibacillus halophilus* DSM 19123 sont également sensibles (tableau 15). Concernant les bactéries pathogènes non halophiles, une faible activité a été observée exclusivement contre *Pseudomonas aeruginosa* (tableau 15). D'autres tests antimicrobiens ont été également effectués contre les champignons halophiles *Penicillium coryphilum* LCP5424 et *Eurotium rubrum* LCP6453, mais aucune activité des agents antimicrobiens synthétisés par *Hbt. salinarum* ETD5 n'a été détectée contre ces champignons.

Tableau 15. Spectre d'activité du surnageant d'*Hbt. salinarum* ETD5 contre des souches d'archées et bactéries halophiles et de bactéries non halophiles à Gram positif et à Gram négatif.

Souches cibles	Activité antimicrobienne
Archées halophiles	
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM 1411	-
<i>Halobacterium salinarum</i> DSMZ 3754	+
<i>Haloarcula argentinensis</i> DSMZ 12282	+
<i>Haloarculahispanica</i> DSM 4426	++
<i>Haloarcula japonica</i> DSM 6131	-
<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624	++
<i>Haloarcula</i> sp. SW115	+
<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	++
<i>Haloferax volcanii</i> DSM 3757	-
<i>Natrinema altunense</i> JCM 12890	-
<i>Natrinema gari</i> JCM 14663	-
<i>Halorubrum saccharovororum</i> DSM 1137	-
<i>Halobacterium</i> sp. NRC1 JCM 11081	+++
Bactéries halophiles	
<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855	+
<i>Lentibacillus halophilis</i> DSM 19123	+
<i>Nesterenkonia halophila</i> DSM 16378	-
<i>Halomonas sabkhae</i> DSM 19122	-
<i>Salinicoccus siamensis</i> DSM 21576	-
<i>Oceanobacillus kapialis</i> DSM 23158	-
Bactéries Gram+ et Gram-	
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	+

*Halo d'inhibition en mm (HI): +: HI ≤10, ++: 10 < HI ≤ 20, +++: HI >20, -: absence de zone d'inhibition.

VII. Tests d'activité antimicrobienne due à des virus halophiles

Dans le but de vérifier que l'activité antimicrobienne du surnageant résulte de l'activité d'agents antimicrobiens et non d'une activité lytique due à des particules virales, nous avons recherché la présence de ces particules virales dans les zones d'inhibition produites par les souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 sur les souches cibles. Pour cela, des fragments de gélose, prélevés dans la zone d'inhibition, ont été introduits dans des cultures des souches cibles, *Hrr. chaoviator* ETR14, *Hrr. chaoviator* SS1R17 et *Hrr. chaoviator* ETD3, et la croissance a été comparée par rapport à un contrôle avec des cultures sans fragments de gélose. Nos résultats montrent que pour les trois souches sensibles, la croissance n'a pas été affectée par la présence des fragments de gélose, ce qui exclut la présence de virus et leur implication dans la formation des zones d'inhibition (figure 42). Pour confirmer ces résultats nous avons testé l'activité antimicrobienne des produits de surnageants de cultures cibles contre les mêmes souches cibles, car en cas de présence de particules virales répliquées, des zones d'inhibition pourraient être observées. Les résultats

des tests antimicrobiens ne montrent aucune zone d'inhibition après une période d'incubation de deux semaines, ce qui suggère que l'activité antimicrobienne produite par un composé de nature protéique est la seule responsable des zones d'inhibition observées pour les souches cibles.

En plus de ce travail, un test en milieu solide a été réalisé sur un milieu gélosé car l'activité lytique de certains virus peut ne pas être détectée en milieu liquide, par contre après plusieurs dilutions, l'activité lytique sera détectable par l'apparition de zones d'inhibition sur la gélose. Les résultats pour les trois souches productrices *Hbt. salinarum* ETD5, ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 respectivement contre les souches cibles *Hrr. chaoviator* ETR14, *Hrr. chaoviator* SS1R17 et *Hrr. chaoviator* ETD3, montrent qu'aucune zone d'inhibition n'est visible, ce qui confirme l'absence d'une activité lytique.

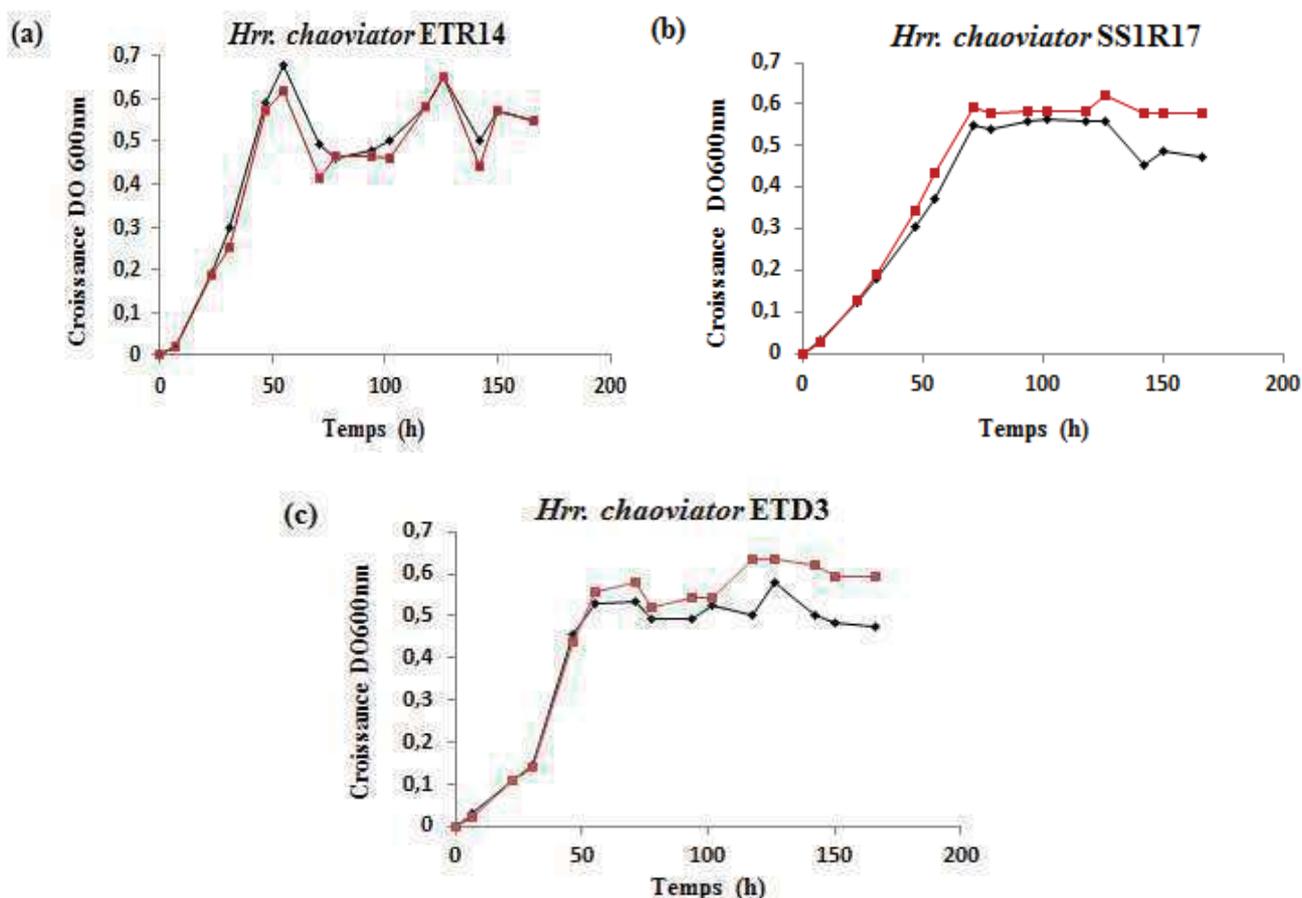


Figure 42. Cinétiques de croissance de trois souches cibles d'archées halophiles *Hrr. chaoviator* ETR14 (a), *Hrr. chaoviator* SS1R17 (b) et *Hrr. chaoviator* ETD3 (c) en absence (noir) et en présence (rouge) d'un fragment de gélose prélevé de la zone d'inhibition des souches productrices *Hbt. salinarum* ETD5 (a), *Hbt. salinarum* ETD8 (b) et *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c).

Conclusions

Dans ce premier chapitre, 11 souches productrices d'agents antimicrobiens ont été sélectionnées. La plupart de ces souches sont des archées halophiles des genres *Halorubrum*, *Halobacterium*, *Haloferax* et *Haloterrigena*.

La caractérisation préliminaire des agents antimicrobiens a montré que seulement six souches nommées *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, *Htg. thermotolerans* SS1R12, *P. halophila* ES1D1, *Salicola. sp* ES1R9 et *Hrr. chaoviator* SS1R17 présentent une activité antimicrobienne extracellulaire dans le surnageant de culture. Parmi ces souches, seulement *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12, produisent des agents antimicrobiens de nature protéique ou peptidique. Ces souches ont été choisies pour des études d'optimisation du milieu et des conditions de culture. Nos résultats montrent que les conditions optimales de croissance et de production des agents antimicrobiens pour les trois souches sont :

- *Hbt. salinarum* ETD5 : croissance en milieu SW 25 contenant 1% (m/v) de dextrose, 1% (m/v) de tryptone, 200 g.L⁻¹ de NaCl, à 37°C, à pH 8, avec une agitation de 200 rpm et une récupération du surnageant après 70 h de culture.
- *Hbt. salinarum* ETD8 : croissance en milieu SW 25 en présence de 1% (m/v) d'arabinose, 1% (m/v) de tryptone, 1% (m/v) de ZnCl₂, 150 g.L⁻¹ de NaCl, à 37°C, à pH 7, avec une agitation de 200 rpm et une récupération du surnageant après 70 h de culture.
- *Htg. thermotolerans* SS1R12 : croissance en milieu SW 25 en présence de 1% (m/v) de fructose, 1% (m/v) de caséine, 1% (m/v) de ZnCl₂, 200 g.L⁻¹g/l de NaCl, à 37°C, à pH 7, à une agitation de 200 rpm et une récupération du surnageant après 48 h de culture.

Comme nous l'avons vu dans la partie Bibliographie, les halocines sont des peptides antimicrobiens peu étudiés et en particulier la séquence peptidique ou nucléotidique n'est connue que pour trois d'entre elles, les halocines C8, H4 et S8. De plus, le mode d'action n'a été déterminé que pour l'halocine H6. L'une des solutions au problème de la résistance bactérienne en santé humaine, pourrait être la recherche des nouveaux peptides antimicrobiens, bactériocines, halocines ou eucaryocines, à condition bien sûr d'identifier leur mode d'action et que ces composés soient actifs contre des bactéries pathogènes comme les souches de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* par exemple. Dans la deuxième partie de ma thèse,

notre intérêt s'est porté vers l'identification et la caractérisation des gènes des halocines produites par les trois souches d'archées halophiles sélectionnées *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12.

Chapitre II : Identification et caractérisation des gènes codant des halocines produites par les archées halophiles *Halobacterium salinarum* ETD5 et ETD8, et *Haloterrigena thermotolerans* SS1R12

I. Identification des gènes codant des halocines

Comme le montrent les expériences précédentes, les souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 sont susceptibles de produire un composé antimicrobien de nature protéique sécrété dans le surnageant de culture. Seules les séquences en nucléotides de 3 gènes codant des précurseurs d'halocines sont connues (Besse et al. 2015). Il s'agit de l'halocine C8 (*halC8*), l'halocine H4 (*halH4*) et l'halocine S8 (*halS8*). Pour déterminer si l'activité antimicrobienne produite par les 3 souches sélectionnées, *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 pourrait être due à la présence d'une halocine connue, des expériences de PCR en utilisant des amorces spécifiques des gènes codant les halocines C8, H4 et S8, ont été effectuées. Les résultats d'amplification par PCR, montrent des fragments d'ADN amplifiés avec une taille attendue de 799 pb avec les amorces spécifiques du gène *halS8* pour les deux souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 (Figure 43a). Pour la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, les résultats d'amplification par PCR montrent la présence d'un fragment de la taille attendue de 1000 pb, a été amplifié avec des amorces spécifiques du gène *halH4* (Figure 43b). Ces résultats suggèrent que les deux souches du même genre *Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8 possèdent le gène impliqué dans la synthèse de l'halocine S8, alors que la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12 posséderait le gène impliqué dans la synthèse de l'halocine H4.

Par ailleurs, nous n'avons pas obtenu d'amplicons lorsque l'on utilise des amorces spécifiques du gène *halC8*, chez aucune des 3 souches sélectionnées.

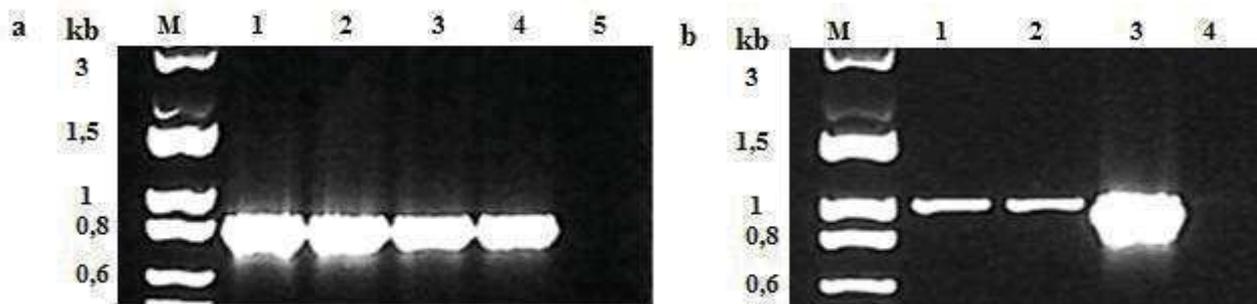


Figure 43. Amplification des gènes codant les halocines avec des amorces spécifiques *halS8-F1* et *halS8-R1* chez *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 (a) et avec des amorces *halH4* spécifiques *halH4-F1* et *halH4-R1* chez *Htg. thermotolerans* SS1R12 (b).

(a) M : Marqueur Exact Ladder[®] DNA PreMix 2 Log (Ozyme), 1-2 : *Hbt. salinarum* ETD5, 3-4 : *Hbt. salinarum* ETD8, 5 : contrôle négatif sans ADN

(b) M : Marqueur Exact Ladder[®] DNA PreMix 2 Log (Ozyme), 1-2 : *Htg. thermotolerans* SS1R12, 3 : *Hfx. mediterranei* DSM 1411, 4 : contrôle négatif sans ADN.

II. Détermination de la séquence nucléotidique et alignement multiple des séquences en acides aminés

Afin de déterminer la séquence en nucléotides des gènes codant les halocines S8 et H4, les gènes *halS8* et *halH4* des souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12, ont été clonés après amplification par PCR et séquencés comme décrit dans la partie Matériels et méthodes. L'analyse des séquences en acides aminés déduites des séquences nucléotidiques ont confirmé que les souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 contenaient bien le gène *halS8*. Les séquences en acides aminés du précurseur de l'halocine S8 pour *Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8 est presque identique à celle de la souche S8a, chez qui a servi à identifier pour la 1^{ère} fois l'halocine S8 (Price et Shand, 2000) (Figure 44). Sur 311 résidus, on observe seulement une substitution localisée en position 185 (Ile chez ETD5 et ETD8, Val chez S8a). Chez la souche *Hbt. salinarum* ETD8, une substitution supplémentaire est observée en position 140 (Ala chez S8a et ETD5, Gly chez ETD8). Par ailleurs, la séquence en acides aminés du précurseur de l'halocine S8 chez la souche d'*Halobacterium* sp. GN101 est identique à celle de la souche d'*Hbt. salinarum* ETD5 (Figure 44). Les résultats obtenus suggèrent que le gène *halS8* est très conservé dans le génome des souches d'archées halophiles, en particulier chez le genre *Halobacterium*. Comme cela avait été observé précédemment, on constate chez *Hbt. salinarum* ETD5 le codon stop conduirait à un peptide de 8,6 kDa, alors que Price et Shand (2000) ont décrit une halocine S8 de 36 acides aminés (3,6 kDa) avec un clivage protéolytique en région C-terminale. Pour la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, la séquence partielle en acides aminés de l'halocine H4 (Figure 45) est identique à celle de la souche d' *Hfx. mediterranei* R4,

souche chez laquelle l'halocine H4 a été la 1^{ère} fois isolée (Cheung et al. 1997). Ces résultats suggèrent que le gène *halH4* pourrait être retrouvé dans le génome des souches d'archées halophiles de différents genres, *Haloferax* et *Haloterrigena*.

	1						60
Souche S8a		MSDKDSINRR NVLRKIGGIG VASAVGFSGL ASGESLSDE KQDVIDTIYK SQRVEQIKKK					
<i>Halobacterium</i> sp. GN101		MSDKDSINRR NVLRKIGGIG VASAVGFSGL ASGESLSDE KQDVIDTIYK SQRVEQIKKK					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5		MSDKDSINRR NVLRKIGGIG VASAVGFSGL ASGESLSDE KQDVIDTIYK SQRVEQIKKK					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8		ASAVGFSGL ASGESLSDE KQDVIDTIYK SQRVEQIKKK					
	61						120
Souche S8a		FGGVNIEPKK VQSVTTNQSG DLVTAKLSVS DGDLYSSVK DTTVIVQFDR SASEIGESWP					
<i>Halobacterium</i> sp. GN101		FGGVNIEPKK VQSVTTNQSG DLVTAKLSVS DGDLYSSVK DTTVIVQFDR SASEIGESWP					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5		FGGVNIEPKK VQSVTTNQSG DLVTAKLSVS DGDLYSSVK DTTVIVQFDR SASEIGESWP					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8		FGGVNIEPKK VQSVTTNQSG DLVTAKLSVS DGDLYSSVK DTTVIVQFDR SASEIGESWP					
	121						180
Souche S8a		KNTEAFIKST SSGVDLLRTA TDEEIKDVTE GVNTSEIESA DAVNIFIDPE SQTYYMEKYD					
<i>Halobacterium</i> sp. GN101		KNTEAFIKST SSGVDLLRTA TDEEIKDVTE GVNTSEIESA DAVNIFIDPE SQTYYMEKYD					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5		KNTEAFIKST SSGVDLLRTA TDEEIKDVTE GVNTSEIESA DAVNIFIDPE SQTYYMEKYD					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8		KNTEAFIKST SSGVDLLRTA TDEEIKDVTE GVNTSEIESA DAVNIFIDPE SQTYYMEKYD					
	181						240
Souche S8a		FNNKILEMFE LATGGTSSGK ISPTREDQNH EYNVREHKVF NSEKQNIQLQ SDCNINSNTA					
<i>Halobacterium</i> sp. GN101		FNNKILEMFE LATGGTSSGK ISPTREDQNH EYNVREHKVF NSEKQNIQLQ SDCNINSNTA					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5		FNNKILEMFE LATGGTSSGK ISPTREDQNH EYNVREHKVF NSEKQNIQLQ SDCNINSNTA					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8		FNNKILEMFE LATGGTSSGK ISPTREDQNH EYNVREHKVF NSEKQNIQLQ SDCNINSNTA					
	241						300
Souche S8a		ADVILCFNQV GSCALCSPTL VGGPVPTVAC LLVVCFGTPN AVSAILEEVD NSCFNLIKDV					
<i>Halobacterium</i> sp. GN101		ADVILCFNQV GSCALCSPTL VGGPVPTVAC LLVVCFGTPN AVSAILEEVD NSCFNLIKDV					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5		ADVILCFNQV GSCALCSPTL VGGPVPTVAC LLVVCFGTPN AVSAILEEVD NSCFNLIKDV					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8		ADVILCFNQV GSCALCSPTL VGGPVPTVAC LLVVCFGTPN AVSAILEEVD NSCFNLIKDV					
	301						311
Souche S8a		ISCWDEWTSF W					
<i>Halobacterium</i> sp. GN101		ISCWDEWTSF W					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5		ISCWDEWTSF W					
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8						

Figure 44. Alignements des séquences en acides aminés des précurseurs de l'halocine S8a : souche d'archée halophile non caractérisée S8a (Genbank n° Q9HHA8, Price et Shand 2000), *Halobacterium* sp. GN 101 (Genbank no ° EU080936, Besse et al 2015), *Hbt. salinarum* ETD5 (Genbank no ° ALM55672, cette étude) et *Hbt. salinarum* ETD8 (GenBank n° ALF625661, cette étude). Les substitutions d'acides aminés sont surlignées en gris clair. La séquence de l'halocine S8 mature suivant Price et Shand est soulignée.

```

1                                     60
Hfx. mediterranei R4      MSKDRDRGRRT SRRGTLKKIG GFSLGALSFG AVGRTQAATG SSVTTADIAP PGPNGDPKSV
Htg. thermotolerans SS1R12      SLGALSFG AVGRTQAATG SSVTTADIAP PGPNGDPKSV

61                                     120
Hfx. mediterranei R4      QIDDKYTGAE MYGEGDFRVG LGTDLTMYPP VYRESLGNGS GGWEFDFTVG GSTACRFVDS
Htg. thermotolerans SS1R12 QIDDKYTGAE MYGEGDFRVG LGTDLTMYPP VYRESLGNGS GGWEFDFTVG GSTACRFVDS

121                                    180
Hfx. mediterranei R4      NGDVKEDDKA KEMWWQEINF NDINQDLYSR NDSDWVGSTP ADTQPEFDYT DFFALARDGVT
Htg. thermotolerans SS1R12 NGDVKEDDKA KEMWWQEINF NDINQDLYSR NDSDWVGSTP ADTQPEFDYT EFALARDGVT

181                                    240
Hfx. mediterranei R4      LALTALNPAM GSLALGATYF LSDMVNWIAS QHEDDSSLKR KWDYDGLSGP LYADSSTYLL
Htg. thermotolerans SS1R12 LALTALNPAM GSLALGATYF LSDMVNWIAS QHEDDSSLKR KWDYDGLSGP LYADSSTYLL

241                                    300
Hfx. mediterranei R4      ARDEMTSNSY ESFTIDNIAV AFPEFPVVRTK YYVTFTAPDD PSTQSISTLE EEGIYRVPAT
Htg. thermotolerans SS1R12 ARDEMTSNSY ESFTIDNIAV AFPEFPVVRTK YYVTFTAPDD PSTQSISTLE EEGIYRVPAT

301                                    360
Hfx. mediterranei R4      EVAAARPPGS RRSKSADEM VYVADPKKFI EVEPVKNPSI PDRIYEEIEQ KKKQSRKQ
Htg. thermotolerans SS1R12 EVAAARPPGS RRSKSADEM VYVADPKKFI EVEPVKNPSI P.....

```

Figure 45. Alignements des séquences en acides aminés déduites du gène *halH4* de la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Genbank no ° ALF62562, cette étude) et *Hfx. mediterranei* R4 (Genbank no ° AAB58316, Cheung et al. 1997). La substitution en acide aminé est surlignée en gris clair.

III. Etude de la transcription des gènes *halS8* et *halH4* par RT-PCR

La corrélation possible entre l'expression des gènes codant les halocines identifiés dans chacune des trois souches et les activités antimicrobiennes de nature protéique, a été vérifiée par une analyse transcriptionnelle. En effet la présence seule du gène codant une halocine chez nos souches d'archées, n'est pas suffisante, il faut vérifier que celui-ci est exprimé. Après croissance des trois souches d'archées halophiles jusqu'en phase exponentielle, les ARNm ont été extraits et soumis à des expériences de RT-PCR, détaillées dans la partie expérimentale, avec des amorces spécifiques des gènes *halS8* pour *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 (Figure 46a), et *halH4* pour *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Figure 46b). Les résultats d'amplification des fragments d'ADNc avec les gènes *halS8* des souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 montrent que le gène *halS8* est exprimé et transcrit à la fin de la phase de croissance exponentielle (Figure 46a, puits 1 et 6). Pour *Htg. thermotolerans* SS1R12 aucune transcription de gène *halH4* n'a été détectée (Figure 46b, puits 1). Pour les trois souches, l'ARN extrait s'est avéré dépourvu de contamination par l'ADN génomique (Figure 46a, puits 4 et 9; Figure 46b, puits 4), et l'ADNc a permis une amplification du gène codant l'ARNr 16S (Figure 46a, puits 3 et 8 : Figure 46b, puits 12). Ces résultats suggèrent que l'activité antimicrobienne observée pour les deux souches *Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8 est bien liée à l'expression du gène codant l'halocine S8 identifiée dans ces souches. En revanche, dans le cas de la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, aucun transcrit n'a pu être détecté dans les cellules en phase exponentielle de croissance, ce qui suggère que pour cette souche, des composés de différentes natures, une halocine inconnue ou d'autres métabolites non peptidiques, sont responsables de l'activité antimicrobienne.

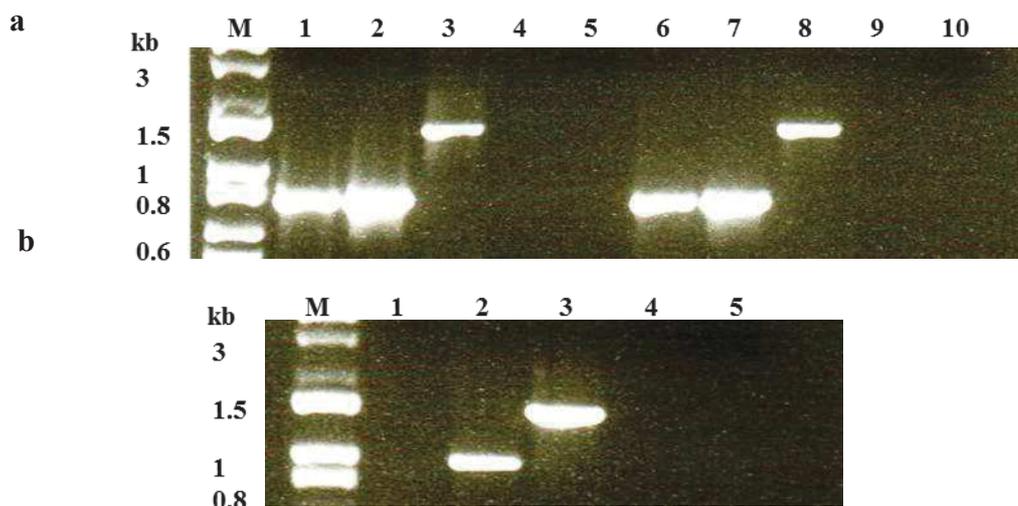


Figure 46. Analyse transcriptionnelle des gènes codant l'halocine S8 chez *Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8 (a) et codant l'halocine H4 chez *Htg. thermotolerans* SS1R12 (b).

(a) **M** : Marker Exact Ladder[®] DNA PreMix 2 Log (Ozyme), **1-5** : *Hbt. salinarum* ETD5, **6-10** : *Hbt. salinarum* ETD8, **1 et 6** : ADNc amplifié avec des amorces spécifiques halS8 halS8-F1 et halS8-R1 (404 et 405), **2 et 7** : l'ADN génomique amplifié avec des amorces spécifiques halS8 halS8-F1 et halS8-R1 (404 et 405), **3-8** : ADNc amplifiés avec ADN 16S spécifiques archéobactéries amorces S-D-Arch-0025-aS-17 et S- * Univ-1517-aA-21 (193 et 199), **4 et 9** : ARN amplifié avec des amorces halS8 spécifiques halS8-F1 et halS8-R1 (404 et 405), **5 et 10** : eau "RNase free" amplifiée avec des amorces halS8 spécifiques halS8-F1 et halS8-R1 (404 et 405).

(b) **M** : Marker Exact Ladder[®] DNA PreMix 2 Log (Ozyme), **1** : ADNc amplifié avec des amorces halH4 spécifiques halH41 et halH4-R1 (411 et 412), **2** : ADN génomique amplifié avec des amorces halH4 spécifiques halH41 et halH4-R1 (411 et 412), **3** : ADNc amplifié avec ADN16S spécifiques archées amorces S-D-Arc-0025-aS-17 et S- * Univ-1517-aA-21193 et 199, **4** : ARN amplifié avec des amorces halH4 spécifiques halH41 et halH4-R1 : 411 et 412, **5** : eau "RNase free" amplifiée avec des amorces spécifiques halH4 halH41 et halH4-R1 (411 et 412).

IV. Transposons ou séquences d'insertion

La séquence complète du mégaplasme 2 de la souche *Halobacterium* sp. GN101 de 283 kb (GenBank n° EU080936) a été analysée car nous y avons retrouvé la présence du gène *halS8*. Les résultats d'analyse de cette séquence disponible dans la base de données GenBank montrent l'identification de séquences d'insertion ou IS240 qui se trouvent en amont du gène *halS8* codant l'halocine S8. Pour vérifier si ces séquences sont présentes aussi chez la souche *Hbt. salinarum* ETD5 puisqu'elle a aussi le gène *halS8*, des amorces oligonucléotidiques spécifiques des IS ont été choisies à partir de la séquence du mégaplasme 2 de la souche *Hbt.* sp. GN101. Pour cela une amplification par PCR entre l'IS et le gène *halS8* a été effectuée. Les résultats montrent des fragments d'ADN amplifiés avec les tailles attendues de 1500 pb et 800 pb avec les amorces des gènes codant l'IS pour la souche *Hbt. salinarum*

ETD5 (Figure 47). Ces résultats montrent la présence de gènes codant l'IS240 en amont du gène *halS8* dans le génome d'*Hbt. salinarum* ETD5, comme démontré dans le génome d'*Halobacterium* sp. GN101. Par conséquent, la présence de ces gènes d'insertion peut expliquer la différence entre le début de la séquence nucléotidique du gène codant le précurseur de l'halocine S8 des deux souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Halobacterium* sp. GN101, avec celui de la souche de référence haloarchaeon S8a (Figure 48). De plus, ces résultats confirment que les gènes de biosynthèse des halocines chez les souches *Halobacterium* sp. GN101 et *Hbt. salinarum* ETD5, sont associés à des éléments génétiques mobiles qui sont capables d'échange génétique entre les espèces, par l'intermédiaire d'un transfert horizontal de gène.

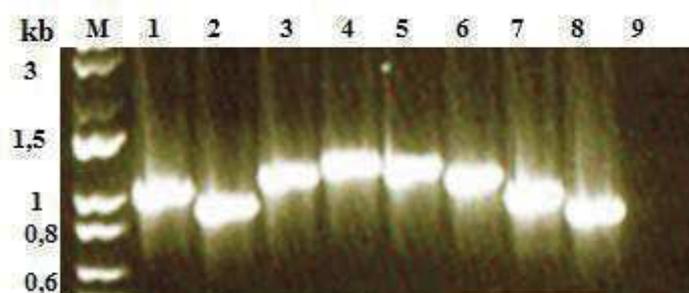


Figure 47. Amplification des gènes de la souche *Hbt. salinarum* ETD5 avec des amorces spécifiques des transposons IS. **M** : Marqueur Exact Ladder[®] DNA PreMix 2 Log (Ozyme), **1** : amorces (405-459), **2** : amorces 405-460, **3** : amorces 405-433, **4** : amorces 405-434, **5** : amorces 407-434, **6** : amorces 407-433, **7** : amorces 407-459 : **8** : amorces 407-460, **9** : contrôle négatif sans ADN.

Conclusions

Les travaux décrits dans le deuxième chapitre de cette thèse ont été orientés vers l'identification et la caractérisation des gènes codant les halocines produites par les trois souches d'archées halophiles sélectionnées, *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12.

Les résultats obtenus par amplifications par PCR avec des amorces spécifiques des gènes connus *halC8*, *halH4* et *halS8*, montrent que les deux souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 possèdent le gène *halS8*, tandis que la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, possède le gène *halH4*. L'alignement des séquences en acides aminés obtenues chez les souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 montre que cette séquence est très proche de celle du précurseur de l'halocine S8 provenant de l'haloarchaeon S8a et celle identifiée chez la souche d' *Halobacterium*. sp. GN101. Les quatre séquences sont identiques à l'exception de deux substitutions parmi les 311 acides aminés. Ces résultats prouvent que le gène *halS8* est conservé dans le genre *Halobacterium*. De plus, les résultats d'analyses transcriptionnelles montrent que les gènes *halS8* des deux souches *Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8 sont exprimés pendant la phase exponentielle de croissance et que l'activité antimicrobienne détectée chez ces deux souches est due à la présence de ces gènes codant l'halocine S8. De plus, les résultats de comparaison de la séquence nucléotidique du génome de la souche *Halobacterium*. sp GN101 avec la séquence nucléotidique du gène *halS8* de la souche *Hbt. salinarum* ETD5, montrent la présence d'éléments transposables IS qui peuvent participer au transfert des informations génétiques d'une souche à une autre.

Par contre, le gène *halH4* que nous avons identifié chez la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12 n'est pas exprimé.

Chapitre III : Production, purification et caractérisation des peptides antimicrobiens produits par *Halobacterium salinarum* ETD5

Il est très important aujourd'hui, pour augmenter la chance de découvrir de nouvelles molécules, d'orienter les nouvelles études vers la découverte de nouveaux peptides antimicrobiens issus de milieux extrêmes peu explorés. Cependant les techniques de purification, d'extraction et de caractérisation structurale sont très laborieuses, délicates et coûteuses. De plus, la détermination de la structure des peptides antimicrobiens, de leur spectre d'activité et de leur mode d'action nécessite de disposer d'une grande quantité de ces peptides avec un haut degré de pureté. Dans ce troisième chapitre, nous avons tenté de purifier et de caractériser les peptides antimicrobiens produits par la souche *Hbt. salinarum* ETD5. Pour ce faire, deux stratégies ont été envisagées, pour produire de quantités suffisantes de ces peptides. La première stratégie a consisté en une expression hétérologue des gènes codant l'halocine S8 chez *E. coli* et chez *Hfx. volcanii* H98. La seconde stratégie a consisté à produire et purifier les peptides antimicrobiens à partir de grands volumes de culture de la souche ETD5 chez laquelle le gène codant l'halocine S8 a été identifié (chapitre II).

Dans un premier paragraphe je décrirai les résultats obtenus sur l'effet de différents facteurs sur l'activité antimicrobienne, puis j'exposerai les résultats obtenus par les deux approches pour l'isolement des halocines.

I. Effet de différents facteurs sur l'activité antimicrobienne

I.1. Détergents

De nombreux peptides antimicrobiens hydrophobes ont tendance à former des agrégats ou à adhérer sur des supports (verre, filtre, ...). Nous avons donc examiné l'effet de différents détergents sur l'activité antimicrobienne. Pour cela, le surnageant de la culture productrice *Hbt. salinarum* ETD5, prélevé au début de la phase stationnaire de croissance, a été traité par des détergents à une concentration allant de 1‰ à 1%. La sensibilité de l'activité antimicrobienne aux agents a été évaluée par la mesure des halos d'inhibition en mm (Tableau 16). Les résultats des tests d'activité contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14 après une période d'incubation de 2 semaines montrent une diminution significative de l'activité antimicrobienne après traitement par le Tween 20 ou le Triton X100 (Tableau 16). On constate de plus que le SDS seul perturbe la croissance de la souche cible et produit lui-même

un halo d'inhibition, il est donc impossible d'observer l'effet du SDS sur l'activité antimicrobienne. Ainsi, les résultats obtenus avec les détergents ne sont pas favorables à une utilisation de molécules tensioactives pour favoriser la purification des halocines.

Tableau 16. Effet des détergents sur l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens au niveau des surnageants de la souche *Hbt. salinarum* ETD5. Les halos d'inhibition sont mesurés en mm. Le contrôle positif correspond aux halos du surnageant sans traitement. Pour chaque détergent, la première ligne correspond aux halos obtenus avec le détergent seul, la seconde ligne correspondant aux halos observés après traitement par le détergent.

Détergents (concentration)	1‰	2‰	3‰	4‰	5‰	6‰	7‰	8‰	9‰	1%
Surnageant	32	30	28	27	25	24	20	21	18	17
Tween 20 (seul)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Traitement	12	12	12	15	13	14	13	16	13	12
Triton X100 (seul)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Traitement	13	14	14	15	15	12	11	12	12	13
SDS (seul)	25	25	25	22	20	27	22	25	27	27
Traitement	16	15	16	17	19	17	18	20	20	20

I.2. Sels

Afin d'évaluer l'influence de différentes concentrations en NaCl sur la stabilité de l'activité des agents antimicrobiens, des aliquotes de surnageant de culture ont été dialysées contre l'eau MilliQ à l'aide de membranes de dialyse avec un seuil de coupure de 1 kDa puis mélangés avec différents volumes d'une solution de NaCl 5 M pour obtenir des concentrations finales de NaCl s'étendant de 0,5 à 4 M. Les résultats des tests d'activité (Tableau 17) montrent que l'activité antimicrobienne est significativement diminuée après la dialyse contre l'eau MilliQ, puisque le halo d'inhibition est de 18 mm contre 32 mm pour le surnageant non dialysé. Par contre, avec l'addition de NaCl les agents antimicrobiens reprennent leur activité, avec une activité optimale entre 3 et 3,5 M de NaCl (Tableau 17).

Tableau 17. Effet de différentes concentrations en NaCl sur l'activité des halocines dans le surnageant dialysé de la souche *Hbt. salinarum* ETD5.

Traitement	Halos d'inhibition (mm)
Surnageant non traité	32
Surnageant dialysé	18
0,5 M NaCl	18
1 M NaCl	20
1,5 M NaCl	24
2 M NaCl	25
2,5 M NaCl	28
3 M NaCl	30
3,5 M NaCl	30
4 M NaCl	27

I.3 Enzymes

Dans l'objectif de vérifier la nature protéique ou peptidique des agents antimicrobiens produits par la souche d'archée halophile extrême *Hbt. salinarum* ETD5, nous avons traité le surnageant de la culture productrice dialysé par des membranes de 3,5 kDa (Spectra-Por®3, MWCO 3,5 kDa) contre de l'eau MilliQ à 10% (m/v) de NaCl, par trois enzymes protéolytiques, chymotrypsine, thermolysine, et endoprotéinase GluC. Les résultats des tests d'activité (Figure 47), montrent l'absence totale d'activité suite au traitement du surnageant par les enzymes protéolytiques ce qui confirme la nature protéique de ces agents antimicrobiens (Figure 49).

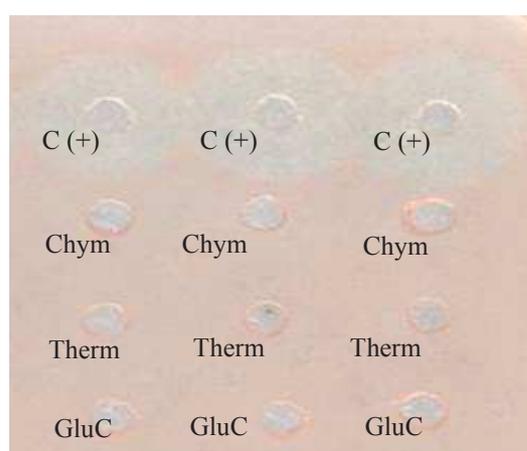


Figure 49. Test antimicrobien contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14, après traitement protéolytique du surnageant de la culture productrice *Hbt. salinarum* ETD5 par la thermolysine, l'endoprotéinase GluC et la chymotrypsine. **C (+)** : contrôle positif avec le surnageant dialysé contre l'eau MilliQ à 10% NaCl; **Chym** : chymotrypsine ; **Therm** : thermolysine ; **GluC** : endoprotéinase GluC.

I.4 Filtrations

Dans le but d'estimer la masse moléculaire des peptides antimicrobiens produits par la souche *Hbt. salinarum* ETD5, des filtres avec différents seuils de coupure 3, 10, 30 et 50 kDa ont été testés. Le surnageant a été filtré à l'aide de ces membranes, puis l'activité antimicrobienne des réténats et des filtrats récupérés a été testée contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Les diamètres des zones d'inhibition (Tableau 18) montrent la présence de l'activité au niveau du réténat de la membrane de 3 kDa, du filtrat et de réténat de la membrane de 10 kDa et dans les filtrats des membranes de 30 et 50 kDa. Ces résultats suggèrent la présence des peptides antimicrobiens actifs avec des masses moléculaires comprises entre 3 kDa et 30 kDa.

Tableau 18. Résultat de traitement du surnageant de culture *Hbt. salinarum* ETD5 contenant les peptides antimicrobiens, sur des membranes de filtration de différents seuils de coupure. Halos d'inhibition exprimés en mm contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14.

Fraction du surnageant traité	Activité (mm)			
	Membranes de filtration			
	3 kDa	10 kDa	30 kDa	50 kDa
Réténat	20	23	0	0
Filtrat	0	12	10	10

II. Production par expression hétérologue de l'halocine S8

II.1 Chez *E. coli*

Nous avons précédemment montré que la souche d'*Hbt. salinarum* ETD5 possédait le gène *halS8* codant le précurseur de l'halocine S8. Afin d'obtenir des quantités significatives de l'halocine S8, nous avons tout d'abord cloné dans des plasmides pET28b les gènes codant différentes formes de l'halocine S8 (halocine S8 de 36 résidus, halocine S8 de 81 résidus, précurseur ProS8 de 311 résidus) (Figure 49). Les trois constructions ont été réalisées car nous n'avons pas une idée claire sur la phase de maturation protéolytique de l'halocine S8, et nous présumons que l'halocine S8 mature chez *Hbt. salinarum* ETD5 pouvait être différente de celle qui a été déjà décrit dans la littérature par Price et Shand (Figure 50) (cf. figure 44, p.146). C'est pourquoi nous avons cloné les gènes codant les différentes formes possibles d'halocine S8. L'objectif était ensuite de purifier, identifier et caractériser les produits de chacun de ces gènes à partir des cellules transformées. Par ailleurs chaque construction a été réalisée avec et sans étiquette histidine N-terminale. La construction avec l'étiquette permet une purification plus facile des peptides par utilisation de colonnes de Nickel qui fixent le

noyau imidazole des histidines, tandis que la construction sans étiquette permet d'obtenir un peptide sans addition de résidus histidine à l'extrémité N-terminale.

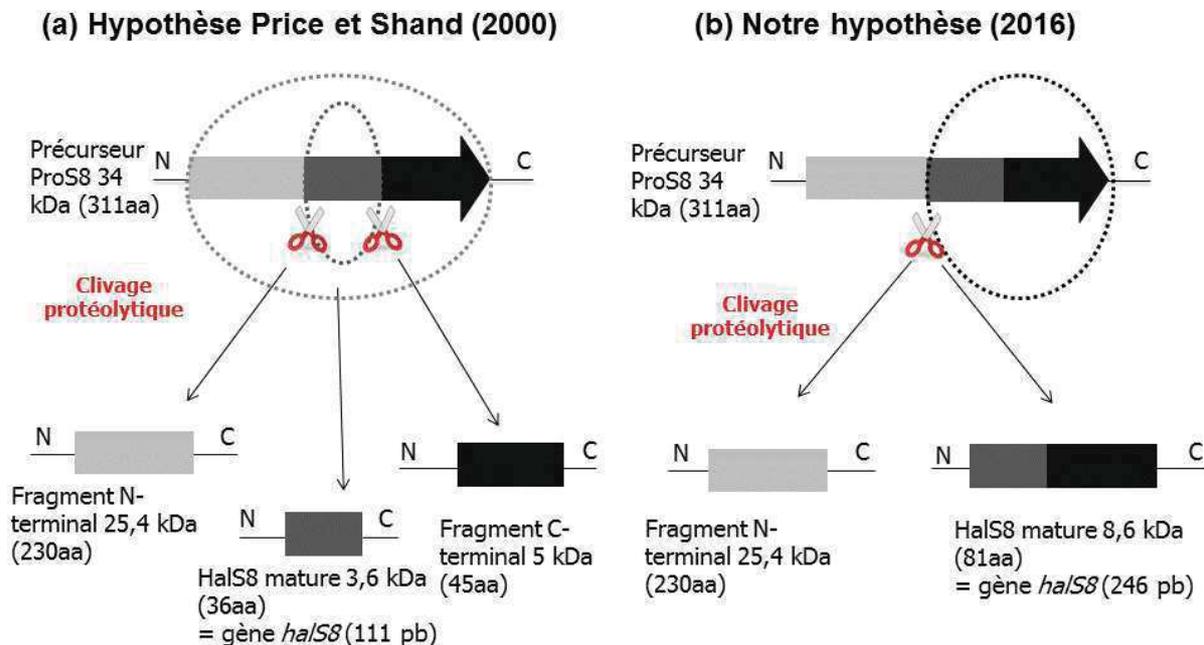


Figure 50. Schéma des deux hypothèses de la maturation protéolytique de l'halocine S8, **(a)** : Price et Shand, 2000, **(b)** : cette étude.

Les résultats d'amplification par PCR des gènes codant les différentes formes de l'halocine S8 avec l'ADNg de la souche *Hbt. salinarum* ETD5 montrent des amplicons avec des tailles attendues de 111 pb (dont le produit serait HalS8 3,6 kDa), 246 pb (dont le produit serait Hal S8 8,6 kDa) et 936 pb (dont le produit serait ProS8). Ces amplicons ont été clonés dans des plasmides pET28b puis les plasmides ont été transformés chez *E. coli* DH5 α et séquencés comme décrit dans la partie Matériels et méthodes. Une fois que les séquences ont été analysées, les plasmides pET28b recombinants ont été transférés chez *E. coli* BL21 (DE3). Cette souche est utilisée pour la transformation des plasmides pET28b et l'expression des protéines d'une bactérie lysogène dérivée d'une souche *E. coli* B, qui contient le prophage IDE3 dont l'un des gènes code l'ARN polymérase du bactériophage T7 sous le contrôle du promoteur lac UV5 inductible par l'IPTG. La transformation de ces souches contenant le promoteur lac UV5 par des vecteurs recombinants pET28b, permet une augmentation de la synthèse des ARNm et par conséquent l'augmentation de la synthèse des protéines d'intérêts (Baneyx et Mujacic 2004). De plus, il a été montré que cette souche améliore la solubilité et la production des protéines hétérologues (Jiang et al. 2016). Les résultats d'amplification par PCR des amorces spécifiques des halocines avec les ADN extraits des clones *E. coli* BL21 transformés confirment la présence des gènes *halS8*.

L'expression des protéines chez *E. coli* BL21 a été induite par l'addition d'IPTG et les résultats ont été observés par SDS-PAGE sur gel à 17% colorés au nitrate d'argent. Les protéines ont été extraites à partir de la culture non induite, et de la culture induite après 1 h, 2 h et 24 h afin de vérifier l'effet de l'induction sur l'expression des protéines recombinantes (Figure 51). Puis les fractions solubles et insolubles de chaque culture ont été récupérées et analysées, pour déterminer si les protéines recombinantes avec l'étiquette histidine étaient bien solubles, actives et excrétées ou si ces protéines étaient insolubles et inactives et pouvaient se trouver dans des corps d'inclusion ou des agrégats (Figure 51). Les résultats d'expression de l'halocine de 3,6 kDa par l'addition de 1 mM d'IPTG à une température de 37°C, ne montrent aucune protéine avec la masse attendue (3,6 kDa) dans toutes les fractions observées sur gel SDS-PAGE (Figure 51a). Nous avons alors essayé d'optimiser les conditions d'expression en commençant par la diminution de la température d'induction à 28°C, ce qui entraîne une diminution de la croissance bactérienne et par conséquent de la synthèse des protéines et favorise la formation des protéines solubles et actives. Les résultats obtenus par analyse SDS-PAGE des fractions montrent un peptide exprimé avec la taille attendue de 3,6 kDa (indiquée par une flèche rouge sur la figure 51b) dans la culture et la fraction soluble du culot cellulaire, induits uniquement après une nuit (Figure 51.b). Par contre, l'intensité de ces bandes est faible par rapport aux autres protéines, ce qui suggère que l'halocine S8 serait exprimée mais en faibles quantités. D'autres températures ont alors été testées à 15 et 20°C. La modulation de la température de culture permet de ralentir le métabolisme cellulaire de la bactérie. Par conséquent le ralentissement de la croissance favorise la diminution du taux de transcription et le taux de traduction permettant à la protéine un meilleur repliement sous forme active (Ruschak et al. 2013). Un autre facteur peut améliorer l'expression, comme la concentration en IPTG (1,5 et 2 mM), qui induit l'expression des protéines dont les gènes sont sous le contrôle du promoteur lac UV5. Les résultats d'optimisation de l'expression des protéines, détectés sur gel SDS-PAGE ne montrent aucune amélioration avec ces différentes conditions.

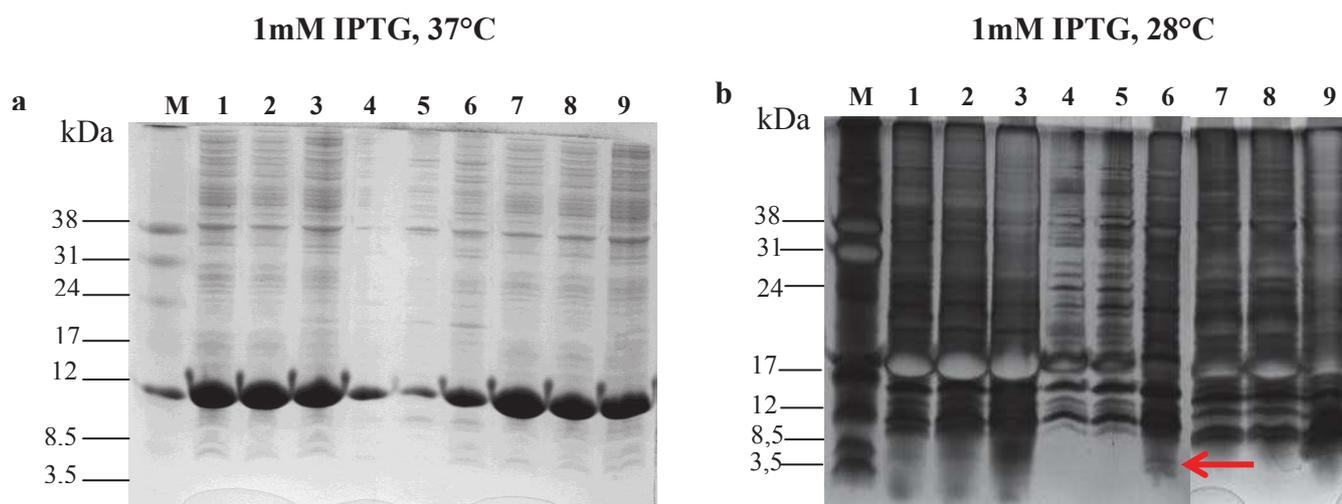


Figure 51. Expression de l'halocine S8 de 3,6 kDa chez *E. coli* BL21, analysée par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide (17%), (a) température de 37°C avec 1 mM IPTG (b), température de 28°C avec 1 mM d'IPTG.

M : Marqueur Low range rainbow molecular weight, **1** : culture d'*E. coli* BL21 non induite, **2** : culture d'*E. coli* BL21 induite après 2 h, **3** : culture d'*E. coli* BL21 induite après 1 nuit, **4** : fraction soluble du culot cellulaire non induite, **5** : fraction soluble du culot cellulaire induite après 2 h, **6** : fraction soluble induite après 1 nuit, **7** : fraction insoluble du culot cellulaire non induite, **8** : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 2 h, **9** : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 1 nuit.

Etant donné que les résultats d'expression de l'halocine S8 chez *E. coli* BL21 n'ont pas été concluants, nous avons exprimé les gènes codant les différentes formes de l'halocine S8 chez 2 autres souches d'*E. coli*, Rosetta et Origami, cette dernière favorisant la formation des ponts disulfure dans le cytoplasme.

La transformation des plasmides recombinants dans des hôtes hétérologues comme *E. coli* Origami B (DE3) et *E. coli* RosettaTM (DE3) pLys favorisent la synthèse des protéines solubles et actives. Ces deux souches sont de type DE3, et donc portent une copie de la T7 polymérase dépendant de l'IPTG, et du gène répresseur *lacI* dans l'ADN chromosomique ce qui permet l'expression des protéines d'intérêts. De plus, ces souches sont modifiées génétiquement, et les gènes *trxB* codant la thiorédoxine réductase et *gor* codant la glutathion réductase, sont inactivés, ce qui favorisent la formation des ponts disulfures dans le cytoplasme et augmentent la solubilité et l'activité des protéines (Bessette et al. 1999, Terpe 2006).

De ce fait, nous avons transformé les vecteurs pET28b recombinants le gène codant l'halocine S8 de 3,6 kDa avec une étiquette histidine chez ces 2 souches. Les résultats

d'expression des protéines à une température de 20°C et à 1 mM d'IPTG, présentés sur le gel SDS-PAGE montrent la présence des bandes de protéines exprimées avec la masse attendue de 3,6 kDa dans la culture et dans la fraction cytoplasmique soluble après 1 nuit d'induction chez *E. coli* Rosetta et *E. coli* Origami et même après 2 h chez *E. coli* Rosetta (Figure 52). Comme le montre la figure 52, ces protéines exprimées présentent une forte intensité par rapport aux autres protéines, ce qui suggère que ces protéines sont les halocines exprimées de 3,6 kDa. Ensuite, des tests antimicrobiens des fractions solubles ont été effectués sur milieu solide contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Les résultats de ce test montrent l'absence d'activité antimicrobienne au niveau des fractions testées. D'après ces résultats, deux hypothèses peuvent être émises. Soit les halocines sont exprimées chez *E. coli* Rosetta et *E. coli* Origami, mais elles sont inactives, car dans un cytoplasme peu salé, leur repliement ne s'effectue pas correctement. Soit les halocines sont présentes en très faible quantité.

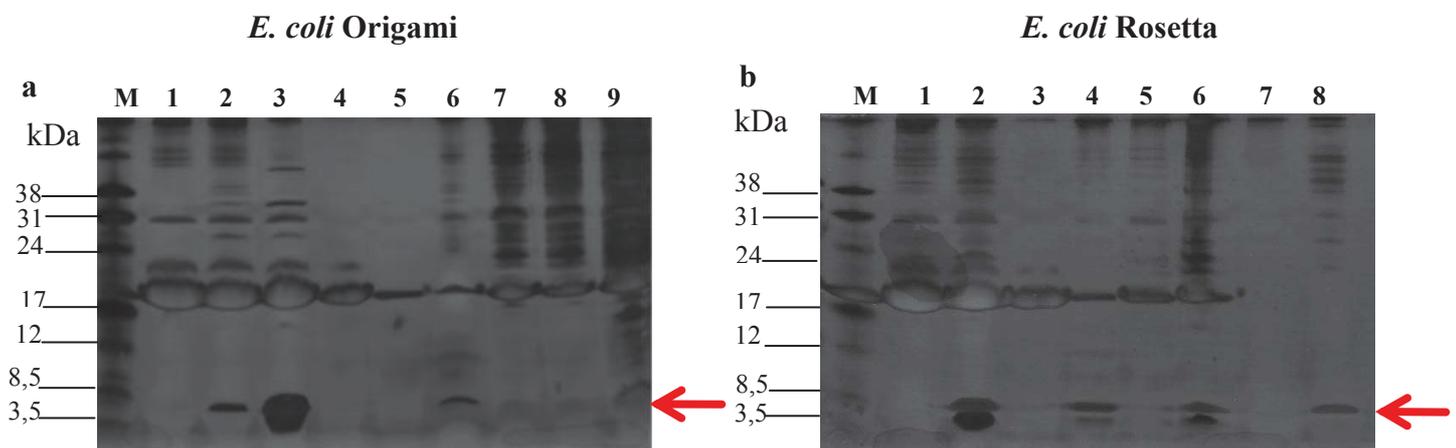


Figure 52. Expression de l'halocine S8 de 3,6 kDa par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide (17%), (a) chez *E. coli* Origami et (b) *E. coli* Rosetta à une température de 20°C avec 1 mM IPTG.

a. M : Marqueur Low Range Rainbow Molecular Weight (Fermentas), 1 : culture d'*E. coli* Origami non induite, 2 : culture d'*E. coli* Origami induite après 2 h, 3 : culture d'*E. coli* Origami induite après 1 nuit, 4 : fraction soluble du culot cellulaire non induite, 5 : fraction soluble du culot cellulaire induite après 2 h, 6 : fraction soluble induite après 1 nuit, 7 : fraction insoluble du culot cellulaire non induite, 8 : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 2 h, 9 : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 1 nuit.

b. M : Marqueur Low Range Rainbow Molecular Weight, 1 : culture d'*E. coli* Rosetta non induite, 2 : culture d'*E. coli* Rosetta induite après 1 nuit, 3 : fraction soluble du culot cellulaire non induite, 4 : fraction soluble du culot cellulaire induite après 1 nuit, 5 : fraction insoluble du culot cellulaire non induite, 6 : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 1 nuit, 7 : surnageant de culture non induit, 8 : surnageant de culture induit après 1 nuit.

Par ailleurs les plasmides recombinants portant les gènes codant l'halocine S8 de 81 résidus et le précurseur ProS8 avec une étiquette histidine N-terminale ont été transformés et

exprimés directement chez *E. coli* Rosetta. Les résultats d'expression observés par SDS-PAGE des différentes fractions préparées, montrent la présence d'un peptide à environ 8 kDa, dans la fraction insoluble induite après 2 h et 1 nuit, ce qui correspond à la masse moléculaire attendue pour l'halocine de 81 résidus. Ces résultats indiquent que le peptide est exprimé mais qu'il est insoluble, et de plus aucune activité n'a été détectée par test antimicrobien. En ce qui concerne le précurseur ProS8, les résultats d'expression chez *E. coli* Rosetta, montrent la présence de bandes de protéines de 32 kDa en accord avec la masse moléculaire attendue. Cependant cette protéine présente la même intensité que les autres protéines et de plus, ces fractions sont inactives contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Ce dernier résultat peut s'expliquer car on ne sait pas si le précurseur ProS8 possède une activité antimicrobienne.

Compte de ces résultats, nous concluons que l'expression chez un hôte hétérologue comme *E. coli* peut poser beaucoup de problèmes, surtout que nous travaillons avec des protéines halophiles qui fonctionnent dans des milieux à forte force ionique et peuvent perdre leur activité dans des conditions de faible force ionique.

Les résultats de l'expression hétérologue des gènes codant les différentes formes de l'halocine S8 chez différentes souches d'*E. coli* n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, nous avons entrepris de produire l'halocine par expression hétérologue chez *Hfx. volcanii*. En effet, il ne faut pas oublier que l'halocine est produite par une archée halophile dont la concentration intracellulaire en sels est élevée. Il est donc probable que la composition du cytoplasme d'*E. coli* ne soit pas favorable au repliement tridimensionnel de l'halocine et à la formation des éventuels ponts disulfure.

II.2 Chez *Hfx. volcanii*

L'expression chez *Hfx. volcanii* est une méthode de production des peptides plus longue mais à priori plus adaptée car c'est une souche d'archée halophile et notre objectif est d'exprimer des peptides halophiles actifs fonctionnant dans des concentrations de sel très élevées. Actuellement l'expression chez une archée halophile n'a été décrite que chez *Hfx. volcanii* et utilise la souche H98 (Allers et al. 2010). Chez cette souche sont inactivés les gènes *pyrE2* codant la phosphoribosyl transférase et *hdrb* codant l'hétérodisulfide réductase, deux enzymes impliquées respectivement, dans la biosynthèse de l'uracile et de la thymidine (Allers et al 2004). L'utilisation de plasmides vecteurs possédant les gènes *pyrE2* et *hdrb* permettra de sélectionner les transformants sur un milieu de culture ne contenant pas d'uracile et de

thymidine (complémentation de l'auxotrophie vis-a-vis de l'uracile et la thymidine). Pour l'expression chez *Hfx. volcanii* H98 nous avons choisi le plasmide navette pTA963, qui présente deux origines de répllication indépendantes permettant son maintien aussi bien chez les archées que chez les bactéries, ainsi que les transformations chez *Haloferax* et *E. coli*. En plus des gènes *pyrE2* et *hdrb*, ce plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permettra la sélection des clones d'*E. coli* recombinants sur un milieu comprenant cet antibiotique. De plus, le promoteur *p.tnA* permet une induction importante de l'expression des gènes clonés par le tryptophane (Allers et al. 2010). Tout d'abord, avant de commencer l'expression des halocines chez *Hfx. volcanii* H98, des tests d'activités antimicrobiennes du surnageant de la culture productrice *Hbt. salinarum* ETD5 ont été effectués contre la souche *Hfx. volcanii* H98, pour s'assurer que cette souche d'expression n'est pas sensible à l'action de l'halocine S8. Les résultats de test d'activité ne montrent aucune activité observée du surnageant d'*Hbt. salinarum* ETD5 contre la souche *Hfx. volcanii* H98. Les gènes codant les différentes formes de l'halocine S8 et le précurseur ProS8 ont été clonés dans des plasmides pTA963 puis les plasmides ont été transférés chez *E. coli* DH5 α . Après vérification de la séquence des plasmides recombinants, ceux-ci ont été transférés dans une seconde souche d'*E. coli* JM110. En effet, cette étape est cruciale car la transformation chez la bactérie *E. coli* JM110 ne permet pas la méthylation de l'ADN nouvellement synthétisé et augmente l'efficacité de la transformation chez *Hfx. volcanii* H98. Enfin les plasmides pTA963 recombinants ont été transférés chez *Hfx. volcanii* H98, comme cela a été décrit dans la partie Matériels et méthodes

Après la transformation des vecteurs pTA963 recombinants les gènes codant les différentes formes de l'halocine S8 et ProS8 chez *Hfx. volcanii* H98, des essais d'expression des protéines ont été réalisés. Par la suite, l'expression des protéines a été effectuée par l'addition de 5 mM de tryptophane, qui induit l'expression des gènes clonés, à une température de 45°C et après 30 h d'incubation, au début de la phase exponentielle de croissance. Les résultats obtenus pour l'expression de l'halocine S8 de 3,6 kDa, avec et sans étiquette histidine, montrent de faibles bandes de protéines à la masse attendue à environ 3,6 kDa sur gel SDS-PAGE (figure 53), dans la fraction insoluble induite après 2 nuits pour les protéines exprimées sans étiquette histidine et dans les fractions insolubles induites après 1 et 2 nuits pour les protéines exprimées avec une étiquette histidine (indiqués par une flèche rouge sur la figure 53). Ces résultats montrent que les protéines sont faiblement exprimées chez *Hfx. volcanii* H98.

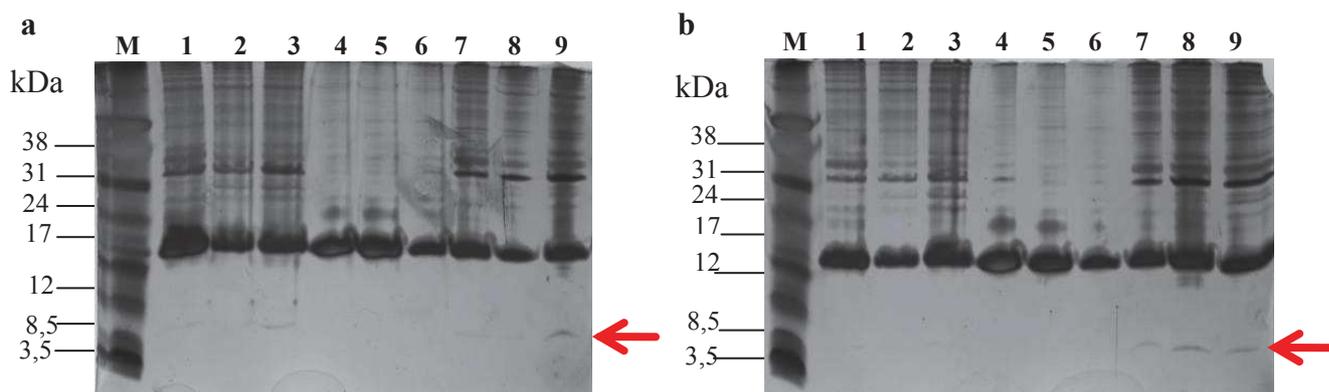


Figure 53. Expression de l'halocine S8 de 3,6 kDa chez *Hfx. volcanii* H98 par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide (17%), (a) sans étiquette histidine et (b) avec étiquette histidine N-terminale dans des conditions à une température de 45°C avec 5 mM de tryptophane.

M : Marqueur Low Range Rainbow Molecular Weight (Fermentas), **1** : culture d'*Hfx. volcanii* H98 non induite, **2** : culture d'*Hfx. volcanii* H98 induite après 1 nuit, **3** : culture d'*Hfx. volcanii* H98 induite après 2 nuits, **4** : fraction soluble du culot cellulaire non induite, **5** : fraction soluble du culot cellulaire induite après 1 nuit, **6** : fraction soluble induite après 2 nuits, **7** : fraction insoluble du culot cellulaire non induite, **8** : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 1 nuit, **9** : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 2 nuits.

Nous avons alors essayé d'optimiser les conditions d'expression par le test de différentes concentrations de tryptophane à 1,5, 2 et 3 mM. D'après certaines études la meilleure concentration pour une induction efficace et rapide de l'expression des protéines par le promoteur *p.tnA* est 5 mM de tryptophane (Large et al. 2007). Puisque nous n'avons pas obtenu des résultats satisfaisants avec cette concentration, nous avons essayé de diminuer la concentration de tryptophane car une concentration supérieure à 5 mM pourrait être toxique pour les cellules. En plus de la variation de la concentration en tryptophane, nous avons diminué la température d'induction à 37°C. En effet, comme chez *E. coli*, la diminution de la température du milieu de culture induit une diminution de la croissance de la souche *Hfx. volcanii* H98 et ralentit le métabolisme cellulaire et par conséquent la synthèse des protéines.

Les résultats ne montrent pas d'amélioration de l'expression avec ces nouvelles conditions. En revanche, les résultats d'expression de l'halocine S8 de 81 résidus avec ou sans étiquette histidine N-terminale montrent la présence des protéines exprimées très intenses à la taille attendue de 8 kDa. Ces protéines sont présentes même dans les cultures et les fractions non induites et surtout dans les protéines exprimées sans étiquette histidine (Figure 54). Cela peut être expliqué par le fait que l'expression des gènes commence avant l'induction par l'addition de tryptophane. En parallèle, un contrôle négatif a été réalisé avec les fractions de la

souche *Hfx. volcanii* H98 non transformée pour vérifier que les protéines obtenues existent déjà dans les cellules non transformées. Les résultats montrent l'absence des bandes à 8 kDa.

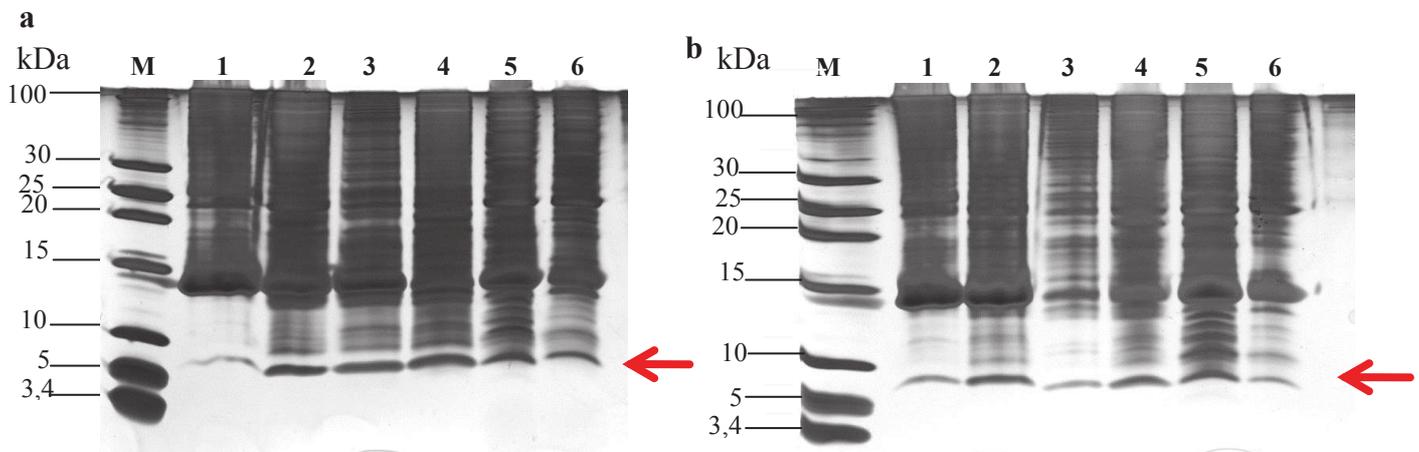


Figure 54. Expression de l'halocine S8 de 8,6 kDa chez *Hfx. volcanii* H98 par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide (17%), (a) sans étiquette histidine et (b) avec étiquette histidine N-terminale à une température de 45°C et avec 5 mM de tryptophane.

M : Marqueur Page Ruler Low range unstained Protein Ladder Molecular Weight (Fermentas), **1** : culture d'*Hfx. volcanii* H98 non induite, **2** : culture d'*Hfx. volcanii* H98 induite après 1 nuit, **3** : fraction soluble du culot cellulaire non induite, **4** : fraction soluble du culot cellulaire induite après 1 nuit, **5** : fraction insoluble du culot cellulaire non induite, **6** : fraction insoluble du culot cellulaire induite après 1 nuit.

En ce qui concerne le précurseur ProS8, nous avons réussi seulement à exprimer le précurseur sans étiquette histidine chez *Hfx. volcanii* H98. Les résultats d'expressions sur gel SDS-PAGE, montrent des bandes avec la masse attendue de 32 kDa. Par contre cette bande n'est pas majoritaire par rapport aux autres bandes, ce qui suggère que le précurseur peut être présent mais n'est pas correctement exprimé. Les résultats des tests d'activité antimicrobienne de toutes les fractions exprimées chez *Hfx. volcanii* H98, contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14, montrent l'absence d'activité (Tableau 19). Par conséquent, les protéines exprimées sont inactives ou la quantité de peptides produits ne serait pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition de la cellule sensible.

D'après les données ainsi obtenues, nous pouvons déduire que les résultats d'expression hétérologue chez *Hfx. volcanii* H98 ne sont pas efficaces dans les conditions expérimentales utilisées. Il serait nécessaire de faire varier d'autres facteurs comme le moment de l'induction par exemple. afin d'améliorer l'expression des protéines halophiles chez *Hfx. volcanii* H98. On pourrait aussi vérifier la présence des protéines exprimées, par des techniques plus sensibles que le test antimicrobien en milieu solide, comme la spectrométrie de masse. En

théorie l'expression de gènes dans des hôtes hétérologues est une méthode de choix pour obtenir des quantités importantes de peptides/protéines. Cependant l'expression dans un hôte non halophile peut induire un repliement anormal, un changement de conformation ou même une inactivation des peptides/protéines. L'expression chez une archée halophile comme *Haloferox* aurait dû permettre de résoudre ces inconvénients, néanmoins dans les conditions que nous avons utilisées, la surexpression de nos différentes formes d'halocine n'a pas été concluante. C'est pourquoi je vais maintenant décrire les différentes étapes utilisées pour la purification des agents antimicrobiens à partir du surnageant de culture d'*Hbt. salinarum* ETD5.

Tableau 19. Bilan récapitulatif des résultats d'expression hétérologue des différentes formes d'halocine S8 chez *Hfx. volcanii* H98 et *E. coli*.

Souches transformées			Halocine 36 aa		Halocine 82 aa		Précurseur		Activité
			+ His tag	-His tag	+His tag	-His tag	+His tag	-His tag	
<i>E. coli</i> Rosetta	Culture	Non induite	-		-		+		-
		Induite 2 h	+		-		+		-
		Induite 1 nuit	+		+		+		-
	Fraction soluble	Non induite	-		-		-		-
		Induite 2 h	-		-		-		-
		Induite 1 nuit	+		-		+		-
	Fraction insoluble	Non induite	-		-		+		-
		Induite 2 h	-		+		+		-
		Induite 1 nuit	+		+		+		-
<i>Hfx. volcanii</i> H98	Culture	Non induite	-	-	+	+		+	
		Induite 1 nuit	-	+	+	+		+	-
		Induite 2 nuits	-	+					
	Fraction soluble	Non induite	-	-	+	+		-	
		Induite 1 nuit	-	-	+	+		+	-
		Induite 2 nuits	-	-					
	Fraction insoluble	Non induite	-	-	+	+		+	
		Induite 1 nuit	+	-	+	+		-	-
		Induite 2 nuits	+	-					

Travail non réalisé ; (+) : présence de la protéine exprimée ; (-) : absence de la protéine exprimée.

III. Purification des peptides antimicrobiens à partir de la culture *Halobacterium salinarum* ETD5

III.1 Essais de purification

Dans le but de produire des quantités suffisantes des peptides antimicrobiens pour réaliser la détermination de leur structure et de leur mode d'action, à partir de la souche productrice *Hbt. salinarum* ETD5, plusieurs techniques de chromatographies ont été testées afin de mettre au point un protocole de purification. Dans le but de purifier les agents antimicrobiens, nous avons travaillé avec des gros volumes (0,5 à 2 L) de culture. Nous avons

vérifié par des tests antimicrobiens, que l'activité antimicrobienne dans ces volumes est presque identique, que l'on utilise un milieu optimisé ou le milieu SW 25 additionné de 200 g.L⁻¹ de NaCl. Pour commencer, différents échantillons de culture de 500 mL, cultivés dans 2 erlenmeyers, ont été préparés en milieu SW avec 200 g.L⁻¹ NaCl. Après filtration des surnageants sur des membranes 0,22 µm, différents échantillons présentant une activité antimicrobienne contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14 ont été soumis à différents types de chromatographie : extraction en phase solide (SPE) sur des cartouches SepPak[®] C18, chromatographie sur colonne Octyle C8, filtration sur gel de Sephadex G25, ou chromatographie sur une colonne de Phényle Sepharose. Les résultats des tests antimicrobiens pour les différents essais de chromatographie (Tableau 20) montrent une perte importante d'activité antimicrobienne pendant la purification et surtout lors du traitement du surnageant par filtration sur membrane 0,22 µm où l'on observe une diminution d'au moins la moitié des halos d'inhibition. Ces pertes peuvent être expliquées par des phénomènes d'adsorption des peptides antimicrobiens sur des supports tels que les membranes de filtration et aussi sur les phases utilisées lors des chromatographies.

Tableau 20. Activité antimicrobienne des différentes fractions après purification par chromatographie du surnageant de culture d'*Hbt. salinarum* ETD5. Les halos d'inhibition sont exprimés en mm contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14.

Chromatographie	Surnageant	Surnageant dialysé (injection)	Fractions éluées (% ACN)								Fraction Sephadex G25
			non concentrées				concentrées				
			20%	40%	60%	80%	20%	40%	60%	80%	
SepPak C18	30	15	0	0	0	16	-	-	-	-	-
Octyl C8	30	15	0	0	0	0	12	15	14	0	-
Phényle Sepharose	32	15	13	7	9	9	37	30	35	16	-
Sephadex G25	40	17	-	-	-	-	-	-	-	-	18

Les résultats de la SPE sur cartouche SepPak[®] C18, montrent seulement une activité au niveau de la fraction éluee à 80% d'ACN, ce qui démontre la nature très hydrophobe des peptides purifiés. Une seule étape de purification ne permet pas d'obtenir un degré de pureté satisfaisant à l'issue des 3 autres chromatographies (colonnes Octyle C8, Phényle Sepharose, ou Séphadex G25) montrant dans tous les cas la nécessité de mettre en œuvre une deuxième étape de purification.

Pour ce faire, ces fractions ont été concentrées à l'aide d'un Rotavapor séparément et soumises à une seconde étape de chromatographie par CLHP sur une colonne C18 (Phenomenex). Les chromatogrammes obtenus à partir des fractions actives purifiées par la

colonne Octyle C8 ne montrent pas de pics bien individualisés et de plus les tests d'activité antimicrobienne des fractions collectées après CLHP ne montrent pas d'activité. Par contre, le chromatogramme obtenu à partir de la fraction purifiée sur la colonne de Sephadex G25, montre des pics bien séparés. Ces pics ont été collectés séparément, concentrés puis testés pour leur activité antimicrobienne. Seules deux fractions correspondant aux pics 6 et 9 ayant un temps de rétention respectivement de 18 min et 22 min sont actives avec des halos d'inhibition dont le diamètre est de 10 mm. Les 2 fractions actives ont été analysées par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide à 17%, et aucune bande n'a été observée. Concernant les fractions issues de la purification sur colonne de Phényle Sepharose, le chromatogramme en CLHP montre la présence de quelques pics actifs à partir des fractions éluées à 60 et 80% ACN. Les fractions actives issues de la colonne de Phényle Sepharose et les fractions actives issues de CLHP ont été concentrées au Speedvac puis analysées par SDS-PAGE avec une coloration au nitrate d'argent. Les résultats d'électrophorèse montrent la présence de plusieurs bandes sur gel avec les fractions actives de Phényle Sepharose, tandis qu'une seule bande a été détectée avec le pic 12 élué en CLHP avec un temps de rétention 35 min. Cette bande présente une masse moléculaire estimée à environ 8 kDa, ce qui pourrait correspondre à la masse moléculaire de l'halocine S8 de 81 résidus. Au vu de ces premiers résultats, nous observons que c'est la chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose qui présente les meilleurs résultats. La chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose sera donc retenue comme première étape dans notre protocole de purification, lors du passage à grande échelle.

Pour confirmer la reproductibilité de la méthode de purification sur colonne de Phényle Sepharose, nous avons utilisé une colonne de 5 mL et les mêmes conditions de préparation de l'échantillon décrites précédemment ont été suivies, avec un gradient linéaire croissant de 0 à 80% d'acétonitrile. Le chromatogramme obtenu avec une détection à 220 nm présente un pic majeur, avec un temps de rétention compris entre 24 et 32 min. Les fractions correspondant à ce pic ont été collectées, concentrées puis testées pour leur activité antimicrobienne (Figure 55). Les résultats des tests antimicrobiens montrent que ces trois fractions F9, F10 et F11, éluées entre 67% et 80% d'ACN sont actives, avec des halos d'inhibition de l'ordre de 27, 25 et 26 mm de diamètre. De plus, les analyses sur gel SDS-PAGE montrent la présence de plusieurs bandes pour la fraction F10 (Figure 56).

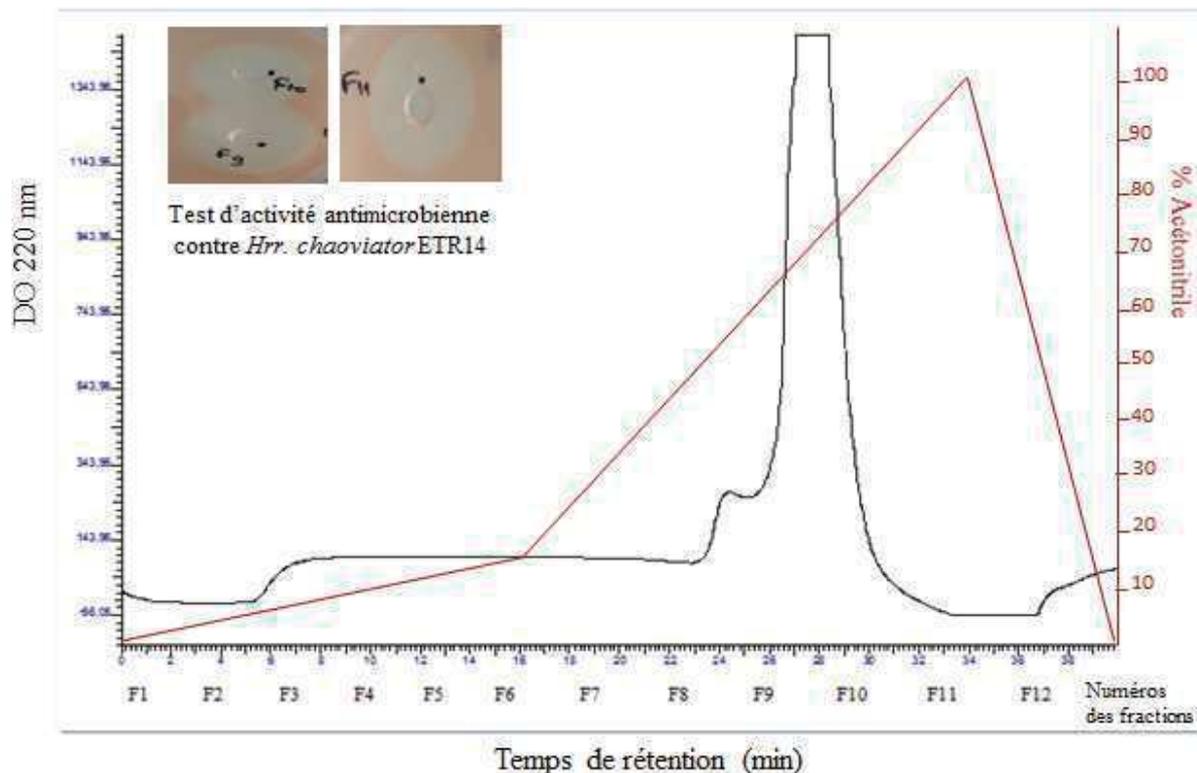


Figure 55. Profil de purification des agents antimicrobiens produits par la souche *Hbt. salinarum* ETD5 par chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose 6 Fast Flow, en utilisant un gradient croissant d'ACN (en rouge) à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ et résultats des tests d'activité antimicrobienne des fractions actives F9, F10 et F11.

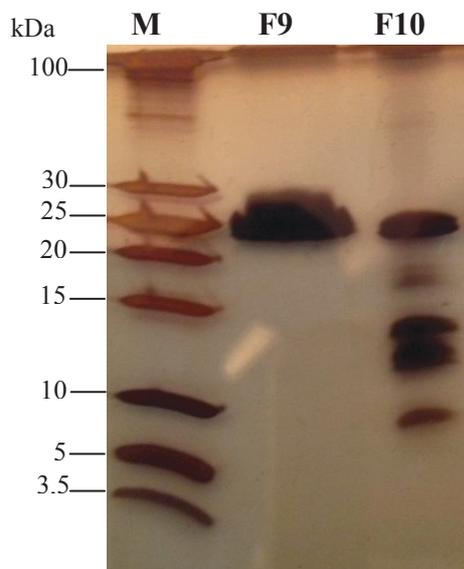


Figure 56. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide Tris-tricine (17% polyacrylamide) des fractions actives F9 et F10, purifiées sur la colonne de Phényle Sepharose, coloration au nitrate d'argent.

M: Marqueur Page Ruler Low Range unstained Protein ladder (Fermentas).

III.2 Protocole de purification

Dans le but de purifier les agents antimicrobiens à partir de la culture productrice d'*Hbt. salinarum* ETD5, nous avons réalisé plusieurs cultures de la souche productrice afin d'appliquer l'étape de chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose à un volume important de surnageant. La seconde étape de purification sera conduite en parallèle avec 3 types de chromatographies : CLHP en phase inverse sur colonne C4, gel filtration sur Superose 6 ou chromatographie échangeuse d'anions sur colonne MonoQ. Le protocole que nous avons utilisé est résumé dans la figure 57.

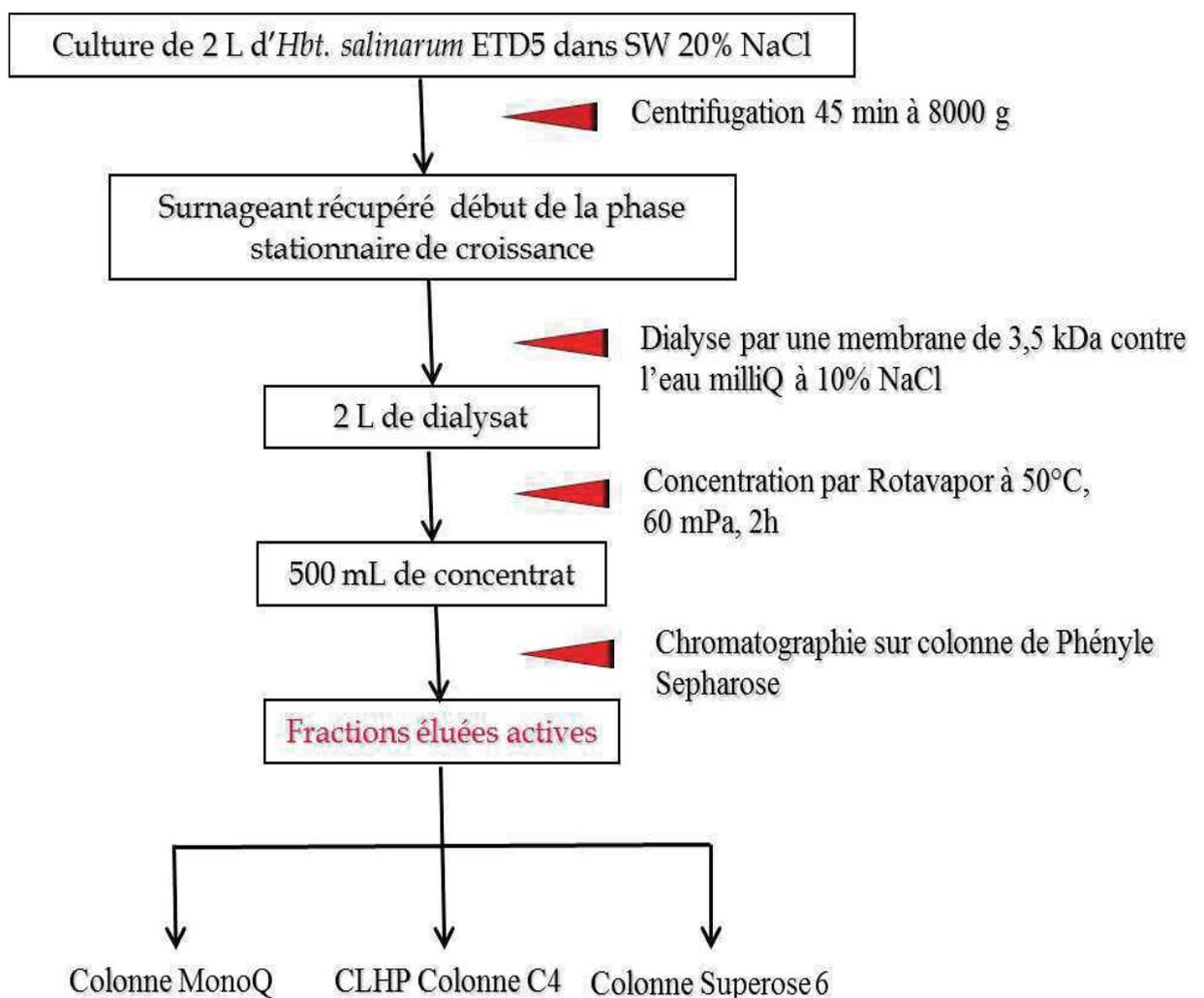


Figure 57. Protocole adopté pour la purification des agents antimicrobiens produits par la souche *Hbt. salinarum* ETD5.

III.2.1 Chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose

Deux litres de surnageant de la culture productrice, ont été préparés en réunissant 8 surnageants de culture de 250 mL, de façon à conserver les mêmes conditions de culture que celles utilisées lors des essais de purification. Le surnageant récupéré a été dialysé contre de l'eau MilliQ contenant 10% de NaCl pour diminuer la concentration en sel, concentré à l'aide d'un Rotavapor, puis filtré par des membranes de 0,22 μm . Les résultats des tests antimicrobiens réalisés sur le surnageant, le surnageant dialysé, le surnageant dialysé concentré et le surnageant dialysé concentré filtré, montrent un fort pouvoir inhibiteur contre la cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Cinq cent mL de l'échantillon actif ont été chargé sur la colonne de Phényle Sepharose de 50 mL connectée à un système de FPLC AKTApurifier. Le chromatogramme enregistré en sortie de colonne montre la présence d'un pic majeur P3 qui est élué entre 60 et 80% d'acétonitrile (figure 58).

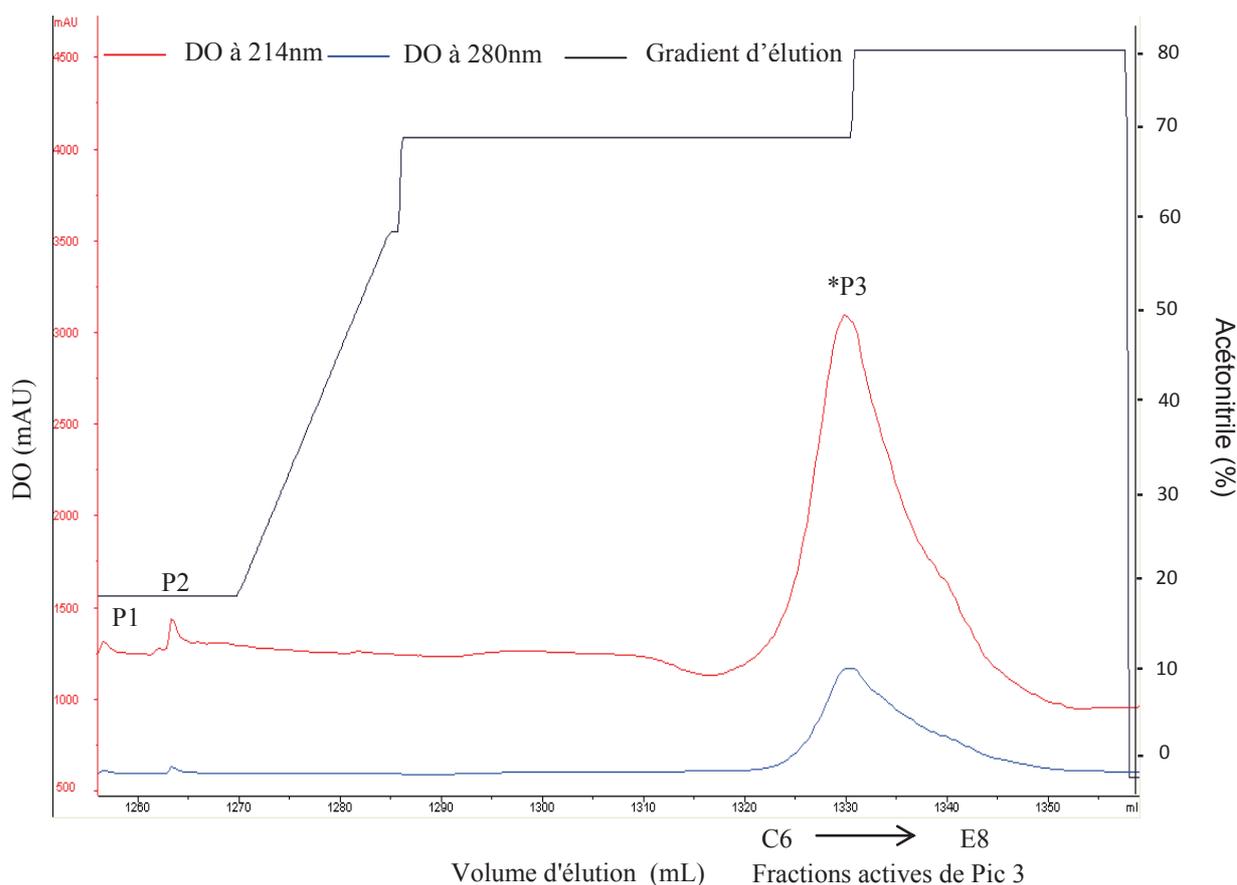


Figure 58. Profil de FPLC montrant la purification des agents antimicrobiens *d'Hbt. salinarum* ETD5 par chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose 6 Fast Flow, en utilisant un gradient croissant d'ACN (en noir) à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (*) : Fractions actives du pic P3.

Les tests d'activité antimicrobienne sur les différentes fractions correspondant au pic P3 (fractions C6 à E8) contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14, montrent la présence d'une activité au niveau de 27 fractions de 1 mL qui correspondent au pic P3 avec des diamètres allant de 8 à 22 mm (Figure 59).

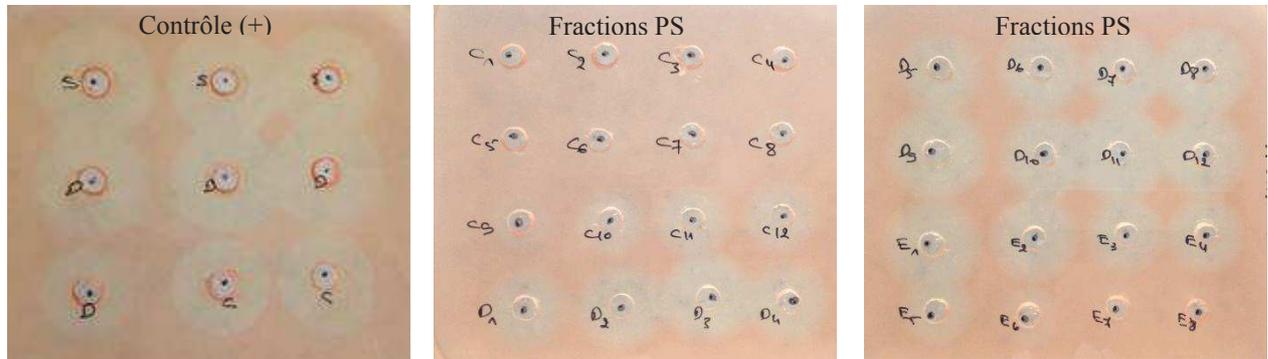


Figure 59. Tests d'activité antimicrobienne contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14 des fractions éluées dans le pic P3 en sortie de la colonne de Phényle Sepharose. Les contrôles positifs correspondent au surnageant (S), au surnageant dialysé (D) et au surnageant concentré (C). FS : fractions issues de la colonne de Phényle Sepharose.

Les fractions actives ont été analysées par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide (17%). Les résultats des gels d'électrophorèse colorés au nitrate d'argent montrent la présence de plusieurs bandes, avec des masses moléculaires à environ 8 kDa et entre 12 et 15 kDa (Figure 60). Ces résultats suggèrent qu'un des peptides antimicrobiens partiellement purifié présente une masse moléculaire estimée par électrophorèse à 8 kDa. Cette masse moléculaire est compatible avec celle de l'halocine S8 de 81 résidus. Par ailleurs on constate l'absence de bande de masse moléculaire de 3,6 kDa correspondant à l'halocine S8 de 36 résidus.

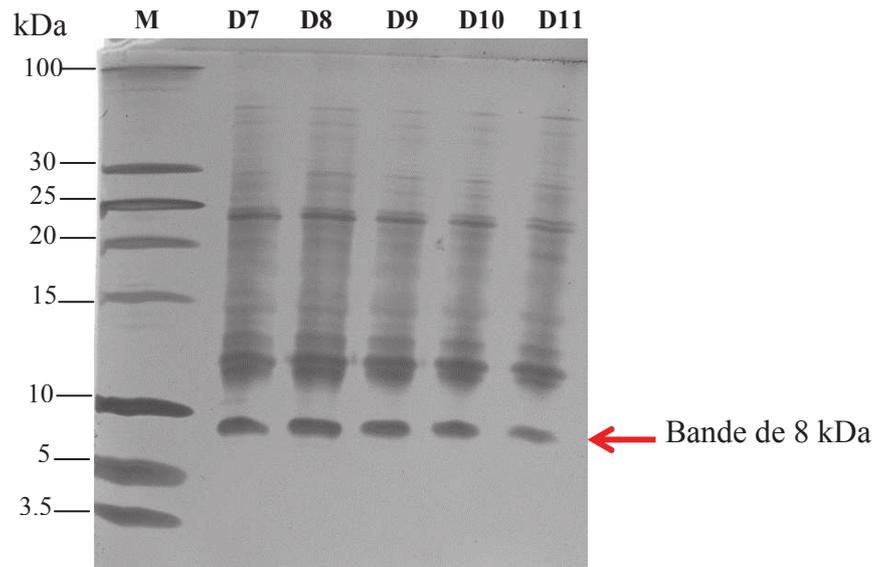


Figure 60. Résultat de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide Tris-tricine (17% polyacrylamide) des fractions actives purifiées sur colonne de Phényle Sepharose, coloré au nitrate d'argent. **M** : Marqueur de poids moléculaire Page Ruler Low Range unstained Protein Ladder (Fermentas). **D7 à D11** : fractions actives du pic P3.

Dans le but de tester l'activité antimicrobienne correspondant aux bandes observées sur gel, les fractions actives de Phényle Sepharose ont été rassemblées et concentrées à l'aide d'un Speedvac, puis soumises à un test d'activité antimicrobienne. Après l'électrophorèse, le gel n'est pas coloré mais il est recouvert par une gélose molleensemencée par la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Les résultats observés en gel overlay, avec un dépôt de 3 μ L de la fraction purifiée montrent deux zones d'inhibition bien séparées, correspondant à des masses moléculaires d'environ 8 et 14 kDa, déterminées grâce aux marqueurs colorés (Figure 61). Ces résultats révèlent la purification de deux molécules antimicrobiennes de 8 et 14 kDa ayant une activité antimicrobienne, que l'on peut attribuer à des halocines.

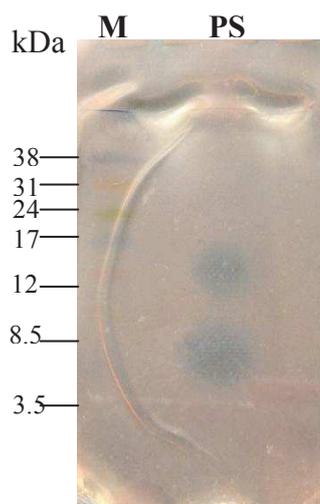


Figure 61. Détection de l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens d'*Hbt. salinarum* ETD5 par gel overlay, gélose molle ensemencée par la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Dépôt des fractions purifiées : 3 μ L. **M** : Marqueur coloré Low range rainbow molecular weight. **PS** : fraction purifiée issue de la chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose.

Le résultat du gel overlay montre clairement que la souche *Hbt. salinarum* ETD5 sécrète dans le surnageant deux peptides antimicrobiens dont les masses moléculaires peuvent être estimée à 8 et 14 kDa. La bande à 8 kDa pourrait correspondre à l'halocine S8 de 81 résidus, tandis que la bande à 14 kDa pourrait être une nouvelle halocine. Nous avons vu que la chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose ne permettait pas de séparer ces deux peptides, c'est pourquoi, nous avons par la suite réalisé une seconde étape de purification en utilisant en parallèle trois méthodes chromatographiques différentes.

III.2.2. Seconde étape de purification des agents antimicrobiens

a. CLHP sur colonne C4

Nous avons tout d'abord réalisé une CLHP qui permet de séparer les molécules selon leur hydrophobie. Cependant, nous avons vu précédemment lors des essais de purification par SepPak C18, que les fractions actives étaient fortement retenues sur la cartouche et n'étaient éluées qu'avec 80% d'ACN. C'est pourquoi, nous avons choisi une colonne C4 qui devrait *a priori* moins retenir nos peptides. Cent μ L de la fraction purifiée issue de la colonne de Phényle Sepharose ont été injectés sur une colonne C4. Le chromatogramme montre la présence de plusieurs pics individualisés avec des temps de rétention compris entre 3 et 25 min (Figure 62).

Les résultats des tests d'activité antimicrobienne pour les fractions correspondant aux différents pics montrent une activité au niveau des 5 pics P2, P3, P4, P6 et P7, avec des halos d'inhibition respectivement de 8, 10, 11, 13 et 12 mm de diamètre. Les fractions ont été séchées à l'aide d'un Speedvac pour éliminer complètement les solvants, puis l'activité antimicrobienne a été testée contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Les solvants utilisés pour l'élution ont été également testés pour vérifier qu'ils n'ont pas eux mêmes d'activité inhibitrice. Seul le pic P6 ayant un temps de rétention de 19 min et qui a été élué à 60% d'ACN, présente une activité antimicrobienne (Figure 62).

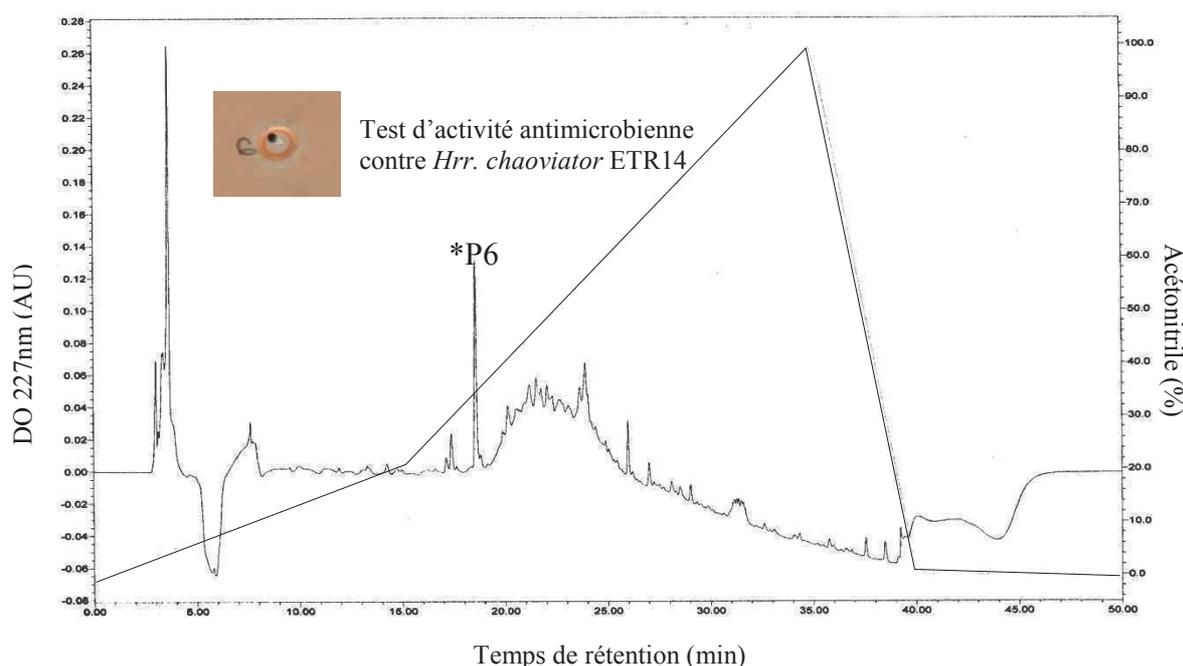


Figure 62. Profil de CLHP montrant la séparation des peptides antimicrobiens d'*Hbt. salinarum* ETD5 sur une colonne C4 avec un débit de 1 mL.min⁻¹ et un gradient d'acétonitrile (en noir). Le test d'activité antimicrobienne en encart montre l'activité associée au pic P6. * : fraction active.

La fraction correspondant au pic P6 a été soumise à un gel SDS-PAGE, mais aucune bande de protéine n'a été détectée. Plusieurs autres injections ont été effectuées sur la même colonne C4 et les fractions P6 ont été rassemblées, puis concentrés au Speedvac et testées. Aucune bande n'a été observée sur gel SDS-PAGE. Cela peut s'expliquer soit parce que les peptides sont restés accrochés sur la colonne en raison de leur caractère hydrophobe, soit parce que les quantités sortant de la colonne sont trop faibles pour être détectées.

b. Filtration sur gel sur colonne de Superose 6

Nous avons également essayé de séparer nos deux agents antimicrobiens en fonction de leur masse moléculaire. Pour cela nous avons réalisé une filtration sur gel en utilisant cette

fois-ci une phase plus résolutive que le Sephadex G25. Nous avons donc utilisé une colonne de SuperoseTM 6 10/300, qui sépare les peptides/protéines selon la masse moléculaire de 5 à 5000 kDa. Après injections de différentes protéines pour calibrer la colonne, 400 µL de la fraction active purifiée sur Phényle Sepharose ont été injectés sur cette colonne sur un système FPLC AKTApurifier et les fractions ont été collectées automatiquement. Le profil chromatographique présente des pics bien développés et bien séparés selon leur masse moléculaire (Figure 63).

Les résultats des tests d'activité montrent la présence d'une activité antimicrobienne uniquement au niveau de deux fractions D3 et D2 du pic P3, avec des halos d'inhibition respectivement de 12 et 10 mm de diamètre. A l'aide de la courbe de calibration que nous avons réalisée avec les marqueurs de masse moléculaire, nous pouvons estimer que le pic P3 a une masse moléculaire d'environ 14 kDa (Figure 63). Ensuite, les fractions actives ont été concentrées dans un Speedvac et analysées par SDS-PAGE avec un gel à 17%. On observe la présence de deux protéines de 8 et 14 kDa au niveau de ces deux fractions actives D2 et D3 (Figure 64a). Cette technique a permis de purifier partiellement les agents antimicrobiens et d'écarter les protéines de masses moléculaires supérieures à 20 kDa. Par contre elle n'a pas permis la séparation des deux molécules actives.

De plus, avec seulement une injection de 100 µL de la fraction purifiée par la colonne de Phényle Sepharose, la séparation sur la colonne de Superose 6 permet d'obtenir un pic 3 avec une fraction D'1 active. En électrophorèse cette fraction D'1 montre seulement 3 bandes autour 14 kDa, ce qui correspond à la masse moléculaire du 2^{ème} peptide précédemment détecté (Figure 64b).

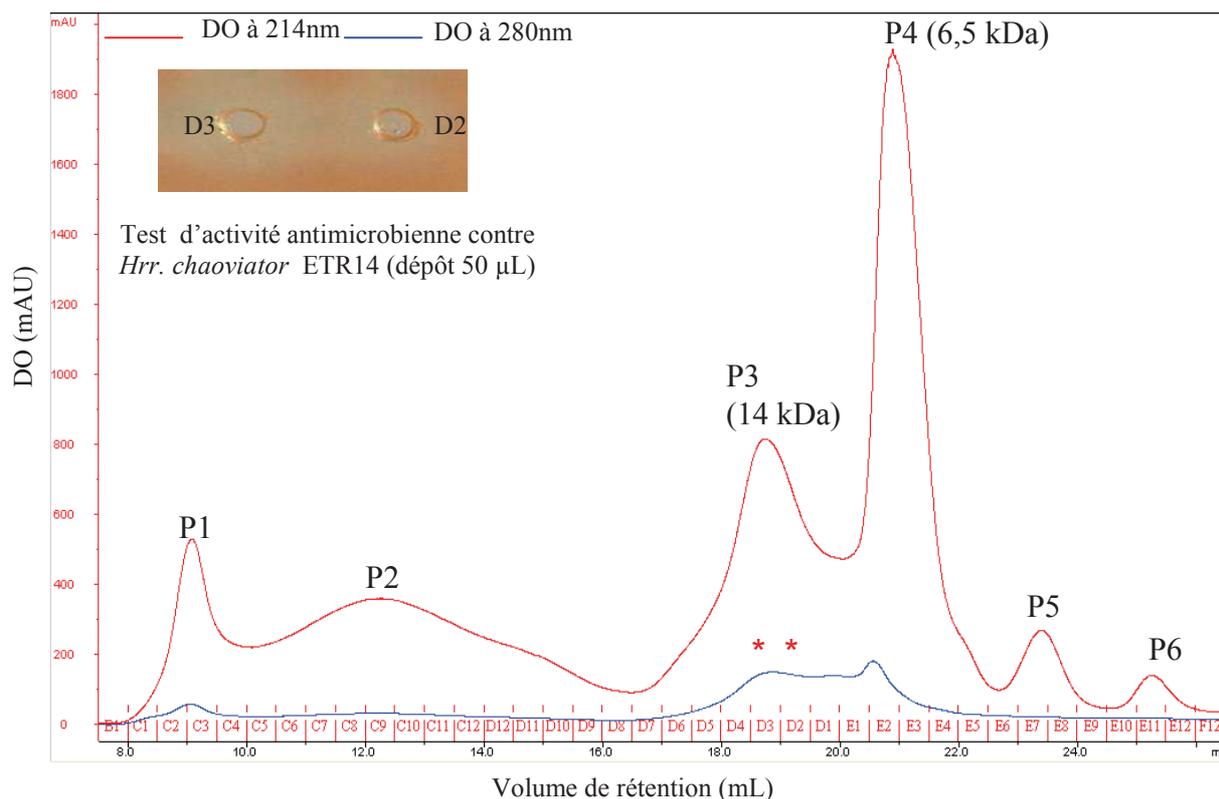


Figure 63. Profil de FPLC montrant la purification des agents antimicrobiens d'*Hbt. salinarum* ETD5 par chromatographie de filtration sur gel sur une colonne de Superose™ 6 10/300, débit 0,5 mL.min⁻¹. Le test d'activité antimicrobienne en encart montre l'activité associée au pic P3. (*) : Fractions actives.

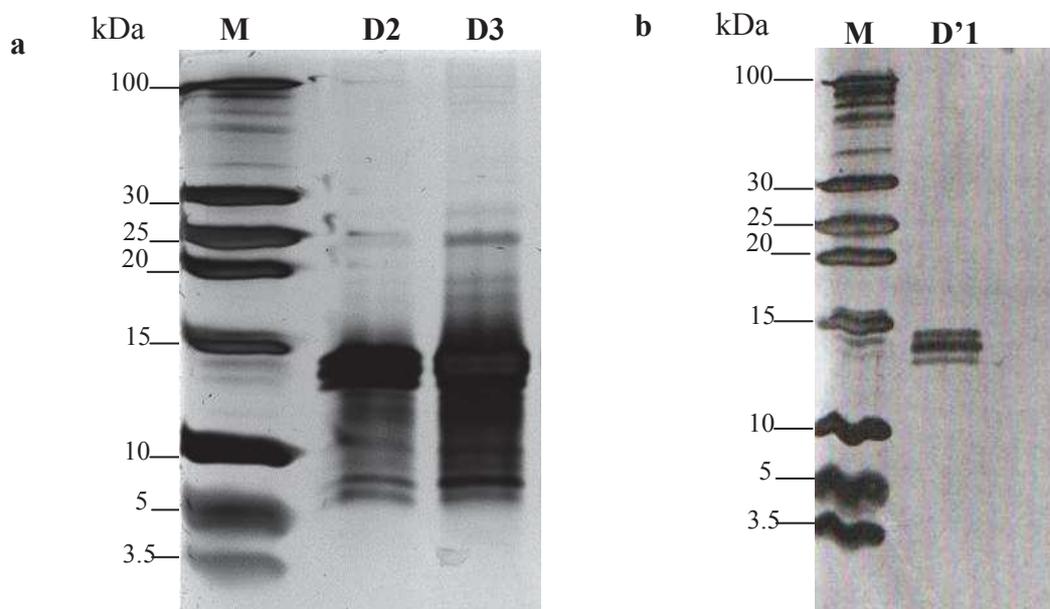


Figure 64. Gel d'électrophorèse Tris-tricine coloré au nitrate d'argent, des fractions actives après chromatographies sur colonne Superose 6. (a): D2 et D3: fractions actives du pic P3 (injection de 400 µL de la fraction active sur Phényle Sepharose). (b) D'1 : fraction active du pic P3 (injection de 100 µL de la fraction active sur Phényle Sepharose).

M : marqueur de poids moléculaire PageRuler Low range unstained Protein Ladder (Fermentas).

c. Chromatographie d'échangeuse d'anions MonoQ

Une troisième méthode de chromatographie, la chromatographie échangeuse d'anions, a été mise en œuvre pour séparer les deux peptides antimicrobiens produits par *Hbt. salinarum* ETD5. Cette technique de chromatographie est souvent efficace surtout pour la purification des peptides antimicrobiens de nature anionique et hydrophobe, ce qui est le cas des halocines. Un mL de la fraction active concentrée après chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose a été injecté sur une colonne MonoQ HR 5/5 par un système de FPLC AKTApurifier équipé d'un collecteur de fraction. Le chromatogramme obtenu montre des pics bien séparés détectés à une DO de 214 nm (figure 65).

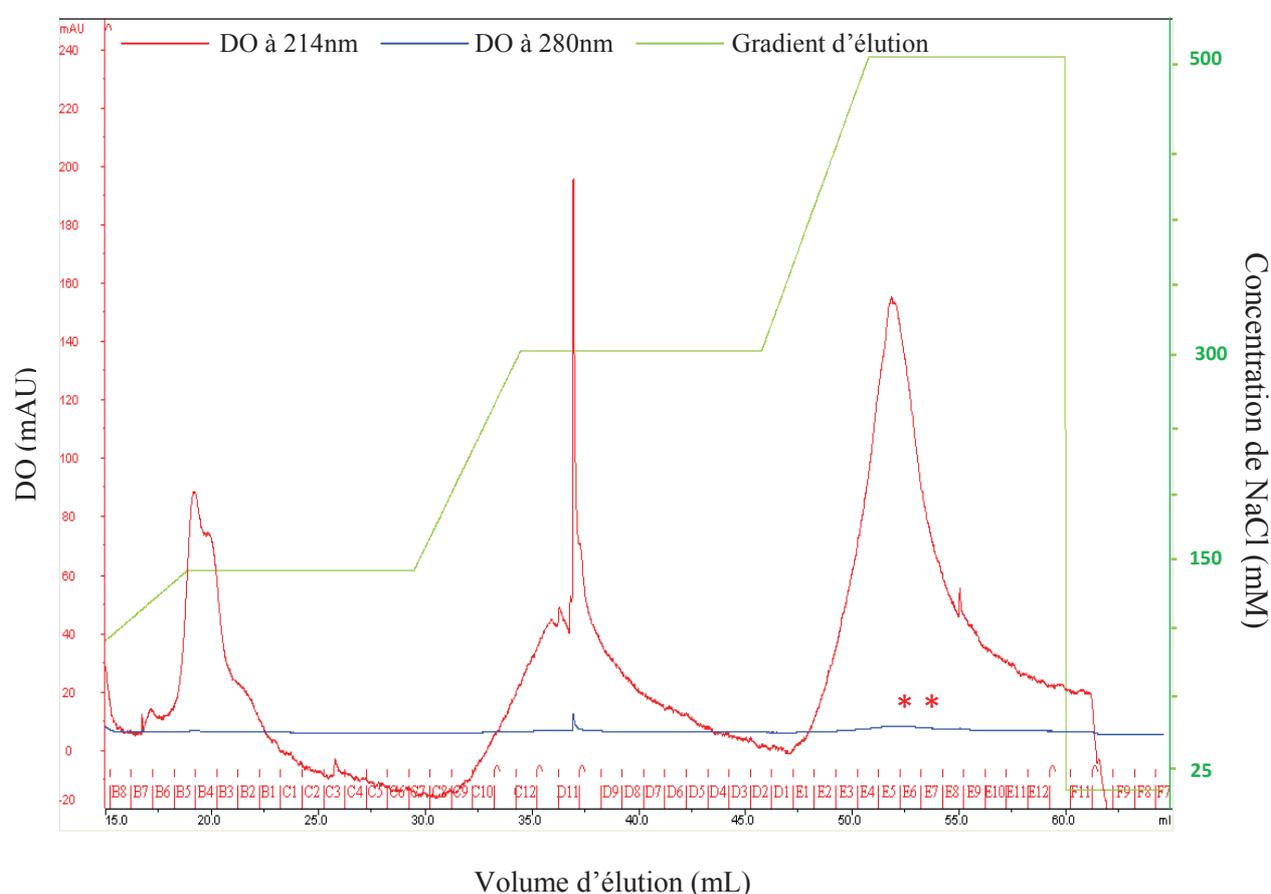


Figure 65. Chromatogramme FPLC montrant la purification des agents antimicrobiens d'*Hbt. salinarum* ETD5 par chromatographie échangeuse d'anions MonoQ, avec un gradient de NaCl (en vert clair) à un débit de $0,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. * : fractions actives.

De plus, les résultats des tests d'activité antimicrobienne des fractions éluées, montrent la présence de l'activité uniquement au niveau de deux fractions E6 et E7. Le gel SDS-PAGE à 17% coloré au nitrate d'argent montre deux bandes dans la fraction E6 avec des masses moléculaires d'environ 8 et 14 kDa et une seule bande dans la fraction E7 avec une masse

moléculaire d'environ 14 kDa (Figure 66). Ainsi nous disposons maintenant de fractions fortement enrichies les deux peptides antimicrobiens, mais nous n'avons pas réussi à séparer complètement ces deux molécules.

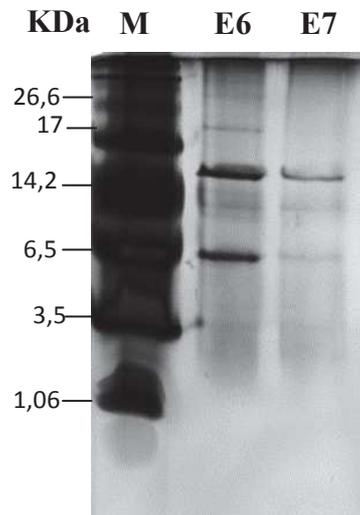


Figure 66. Gel d'électrophorèse Tris-tricine coloré au nitrate d'argent, des fractions purifiées par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne MonoQ. **M** : marqueur de poids moléculaire Color marker ultra-low range (Sigma-Aldrich), **E6 et E7** : fractions éluées par MonoQ.

Suite à ces différentes étapes de chromatographie, nous possédons plusieurs fractions actives contenant deux peptides antimicrobiens de masses moléculaires de 8 et 14 kDa. La figure 67 récapitule les différentes étapes de purification utilisées. Dans la stratégie de purification de nos peptides à partir du surnageant de culture d'*Hbt. salinarum* ETD5, nous avons également rencontré des difficultés, dues au caractère hydrophobe des molécules à purifier et à leur faible quantité dans les surnageant de culture. Néanmoins à partir des différentes fractions actives obtenues après les différentes étapes de purification, nous allons pouvoir obtenir des éléments de séquence en acides aminés qui vont nous permettre de caractériser partiellement les deux agents antimicrobiens.

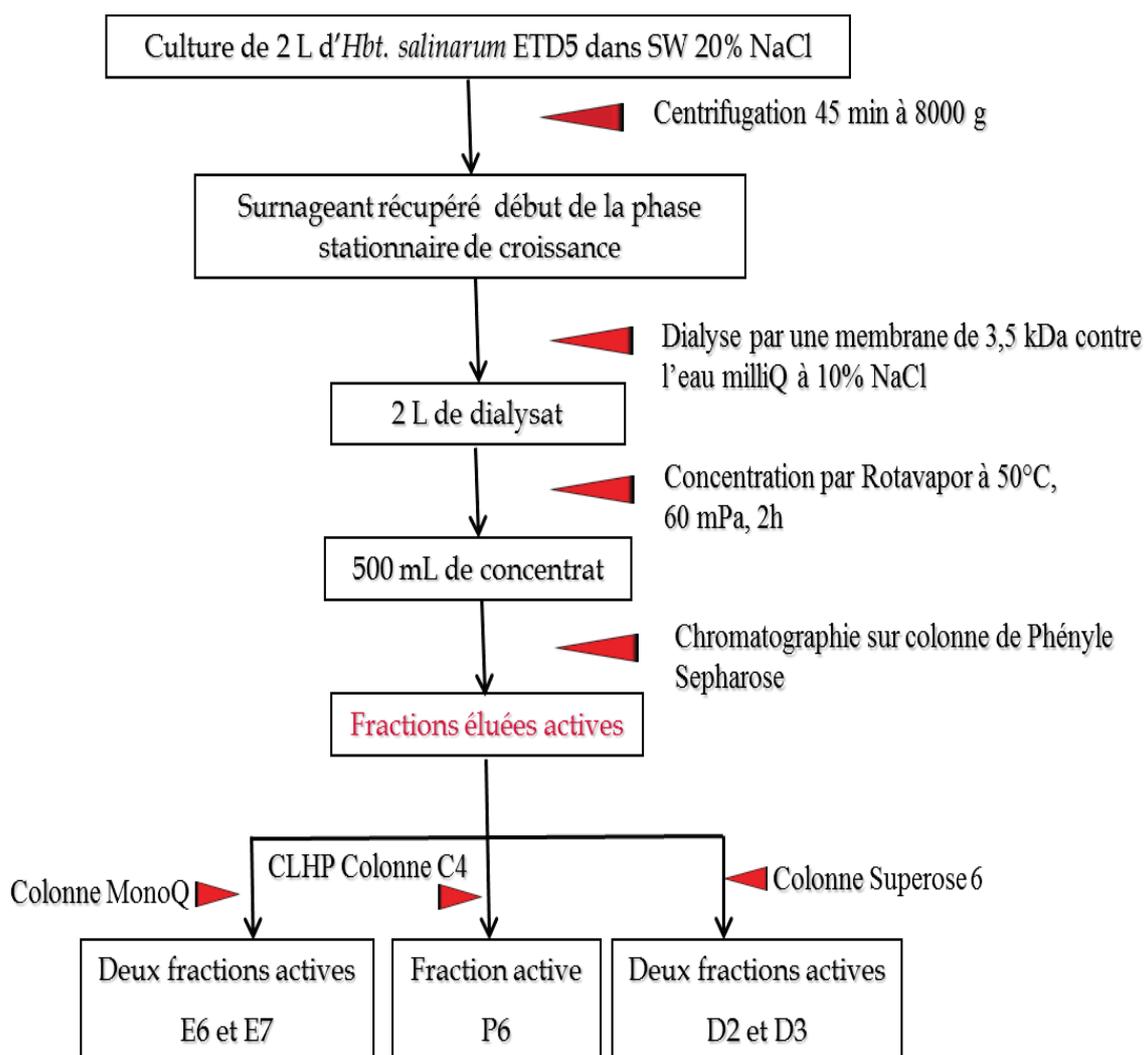


Figure 67. Protocole de purification utilisé pour la séparation des deux peptides antimicrobiens de 8 et 14 kDa produits par la souche *Hbt. salinarum* ETD5.

IV. Caractérisation structurale et fonctionnelle des peptides antimicrobiens

IV.1. Analyse de la séquence N-terminale par dégradation d'Edman

Dans le but de déterminer la séquence en acides aminés N-terminale des deux peptides antimicrobiens de 8 et 14 kDa, les bandes de 8 et 14 kDa provenant de la fraction active purifiée par Phényle Sepharose ont été découpées à partir d'un gel SDS-PAGE coloré au bleu Safe. Les peptides ont été extraits à partir de ces bandes, comme décrit dans la partie matériels et méthodes, et transférés sur une membrane de PVDF, puis séquencés par dégradation d'Edman à l'aide d'un séquenceur automatique. Pour le peptide de 8 kDa nous avons obtenu la séquence des 9 premiers acides aminés de la région N-terminale : Ser-Asp-Cys-Asn-Ile-Asn-**Thr**-Asn-Thr (Figure 68). Cette séquence est identique à celle de la séquence N-

terminale de l'halocine S8 identifiée par Price et Shand (2000), à l'exception d'un acide aminé qui a été identifié comme Thr par dégradation d'Edman dans notre étude et qui avait été attribué Ser dans la séquence déterminée par Edman par Price et Shand. Lors de notre étude, nous avons également obtenu une Ser à cette position dans la séquence en acides aminés de ProS8 obtenue par traduction de la séquence nucléotidique décrite au chapitre II des résultats. Ce résultat montre que la bande de 8 kDa correspond à l'halocine S8.

Séquence obtenue par dégradation d'Edman

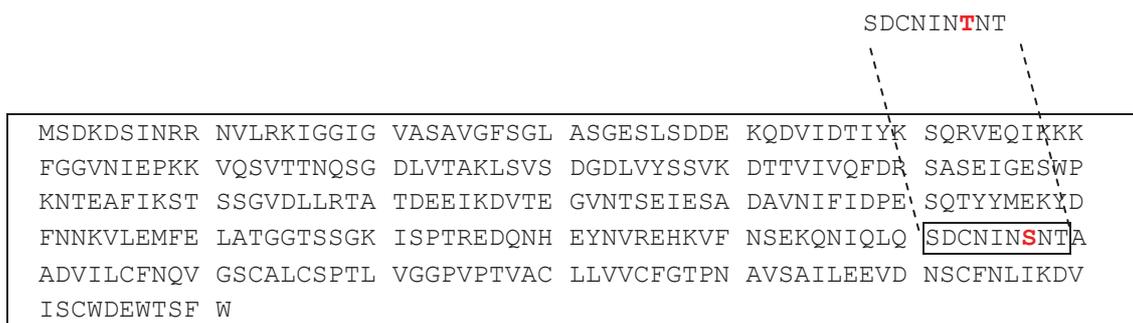


Figure 68. Localisation, dans la séquence du précurseur ProS8, de la séquence obtenue par dégradation d'Edman de la bande de 8 kDa. Le T en rouge : une thréonine a été identifiée par dégradation d'Edman dans notre étude.

Concernant, la protéine de 14 kDa nous avons séquencé les 12 premiers acides aminés de la région N-terminale, dont la séquence est la suivante : Gly-Ala-Leu-Gly-Asp-Val-Gln-X-Asn-Gly-Ile-Ile. La comparaison de cette séquence avec les données de la base GenBank avec les algorithmes BlastP ou TblastN ne montre pas d'homologie avec une protéine connue sur l'ensemble des 12 acides aminés.

IV.2 Spectrométrie de masse

IV.2.1. MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF

La fraction active en sortie de colonne de Phényle Sepharose a été analysée en spectrométrie de masse MALDI-TOF, en mode positif linéaire. Les résultats d'analyses dans une gamme comprise entre 5 000 et 20 000 Da ont permis de mesurer la masse moléculaire de l'halocine S8 à m/z 8513,29 (Figure 69). Ces résultats sont en accord avec les résultats présentés sur gel SDS-PAGE (Cf. figure 61, page 174) où l'on a observé deux bandes actives correspondant à des masses moléculaires de 8 et 14 kDa. Par contre, en théorie la masse moléculaire de l'halocine S8 de 81 résidus, calculée à partir de la séquence en acides aminés (UniProt entrée n° Q9HHA8) est de 8602,83 Da, et la masse mesurée en spectrométrie de masse MALDI-TOF est de 8513,29 Da. On constate donc une différence de 89 Da. Cette différence de masse pourrait s'expliquer par une protéolyse de l'halocine S8 à l'extrémité C-

terminale, car la séquence N-terminale est identique à celle décrite par Price et Shand (2000) ou par une imprécision de la mesure en spectrométrie de masse MALDI.

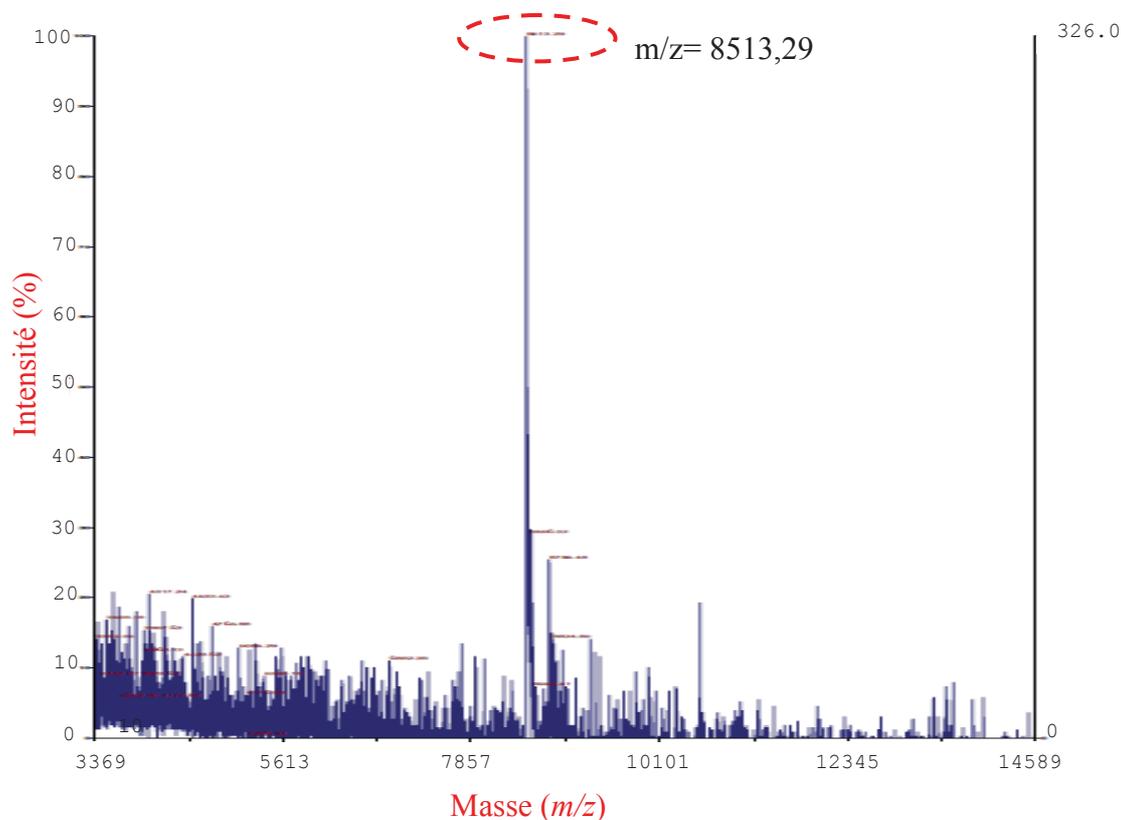


Figure 69. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de l'halocine S8 contenu dans les fractions actives issues de la colonne Phényle Sepharose.

D'après ce résultat la masse moléculaire de l'halocine S8 mature est de 8,6 kDa. On constate donc que l'halocine S8 produite par la souche *Hbt. salinarum* ETD5 subirait une maturation protéolytique post-traductionnelle différente de celle initialement décrite dans la littérature, qui aboutissait à un peptide de 3,6 kDa (Cf figure 50, page 158).

De façon à obtenir une masse moléculaire plus précise de l'halocine S8, nous avons analysé la fraction active en sortie de colonne de Phényle Sepharose par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF. Les données n'ont pas permis de détecter de peptide à partir de la fraction purifiée par Phényle Sepharose. Ce résultat pourrait s'expliquer soit par une trop faible quantité d'halocine S8 contenue dans cette fraction, soit par une mauvaise conservation de l'échantillon à -20°C .

IV.2.2. LC MS-MS

Dans le but de déterminer la séquence en acides aminés de l'halocine S8 et d'identifier la molécule active de 14 kDa, nous avons procédé à une analyse par spectrométrie de masse par la technique de LC MS-MS. Les peptides extraits à partir des bandes sur gel SDS-PAGE avec la fraction purifiée de Phényle Sepharose ont été réduits, alkylés et digérés par la chymotrypsine et analysés par la suite par spectrométrie de masse électrospray (ESI-MS). A l'aide du logiciel MASCOT nous avons identifié la séquence en acides aminés de 2 peptides de l'halocine S8 de 81 acides aminés, VGGPVPTVACL et EEVDNSCF qui sont localisés du côté C-terminal (Figure 70). Les peptides obtenus sont caractéristiques d'une coupure par la chymotrypsine, car on observe un clivage des liaisons peptidiques après des résidus Leu et Phe. Ces résultats confirment que l'halocine S8 active, produite par la souche *Hbt. salinarum* ETD5, correspond à une halocine S8 de 81 résidus, et que cette halocine S8 est plus longue que celle décrite dans la littérature par Price et Shand, qui est un peptide de 36 acides aminés (Cf figure 50, page 158).

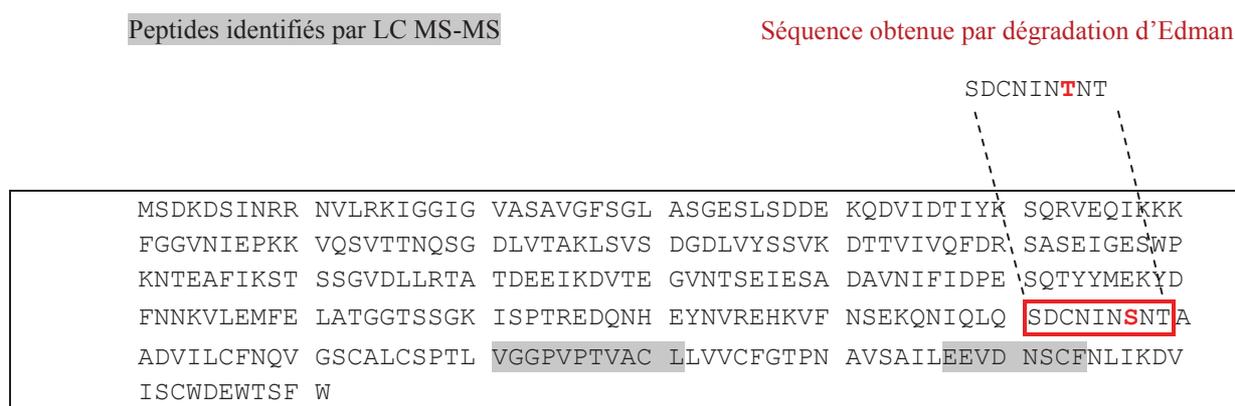


Figure 70. Caractérisation structurale de l'halocine S8 produite par *Hbt. salinarum* ETD5. Localisation dans la séquence du précurseur ProS8 des peptides obtenus par spectrométrie de masse LC MS-MS et par dégradation d'Edman. Le T en rouge : une thréonine a été identifiée par dégradation d'Edman dans notre étude.

Concernant la protéine de 14 kDa, les résultats obtenus à l'aide du logiciel MASCOT ont permis d'identifier la séquence de 3 peptides. La recherche d'homologie dans la base de données GenBank par BlastP a permis de montrer que ces 3 peptides appartenaient à l'enzyme Mn-superoxyde dimutase (SOD) d'*Hbt. salinarum* (GenBank entrée n° AAA72217) de 200 résidus (Figure 71). Comme ce que l'on avait observé pour l'halocine S8, les peptides obtenus sont caractéristiques d'une coupure par la chymotrypsine, car on observe un clivage des liaisons peptidiques après des résidus Leu et Phe. Ce résultat et le résultat

obtenu avec le séquençage d'Edman qui n'avait pas permis d'identifier une protéine connue suggère que la molécule active de 14 kDa pourrait dériver d'un clivage protéolytique de la SOD pendant la phase de maturation ce qui générerait une nouvelle halocine que nous avons nommée HalS14 qui pourrait comprendre 140 acides aminés.

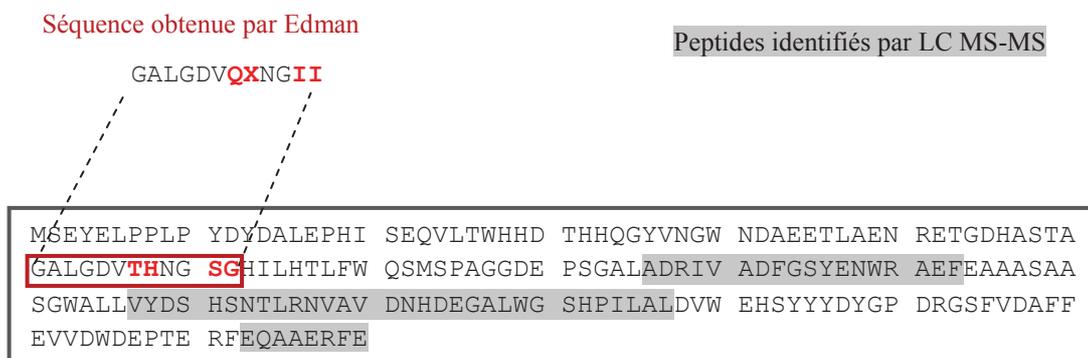


Figure 71. Caractérisation structurale de l'halocine S14 produite par *Hbt. salinarum* ETD5. Localisation dans la séquence de la superoxyde dismutase d'*Hbt. salinarum* NRC-1, des peptides identifiés par spectrométrie de masse LC MS-MS et par dégradation d'Edman. Les résidus en rouge sont différents entre le séquençage d'edman et la séquence de la SOD.

IV.3 Test d'activité SOD

Nous venons d'identifier que l'halocine S14 correspondant au deuxième agent antimicrobien produit par la souche d'*Hbt. salinarum* ETD5 correspondait à une protéine qui pourrait dériver d'un clivage protéolytique de la SOD. Nous avons donc voulu savoir, si cette halocine S14 possédait une activité antioxydante de type SOD. Pour vérifier que la souche productrice ETD5 présente bien d'une activité SOD, nous avons testé l'activité SOD des protéines extraites à partir du culot cellulaire. L'activité SOD a été révélée sur un gel d'électrophorèse à 12% en acrylamide contenant de la riboflavine et du NBT. L'effet de la riboflavine est de transformer l'oxygène en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui réduit par la suite le NBT qui confère une coloration bleue au gel, à l'exception de bandes claires qui mettent en évidence l'activité SOD qui inhibe la réduction du NBT (figure 72). Les résultats d'électrophorèse sur gel natif montrent que les 4 souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, *Hrr. chaoviator* ETD3 et *E. coli* DH5 α disposent d'une activité SOD, les souches *E. coli* DH5 α et *Hrr. chaoviator* ETD3 (Trigui et al. 2011c) ayant servi de contrôle positif pour l'activité SOD (Figure 72). Par contre la fraction active issue de la colonne de phényle Sepharose qui contient une protéine de 14 kDa ne possède pas d'activité SOD.

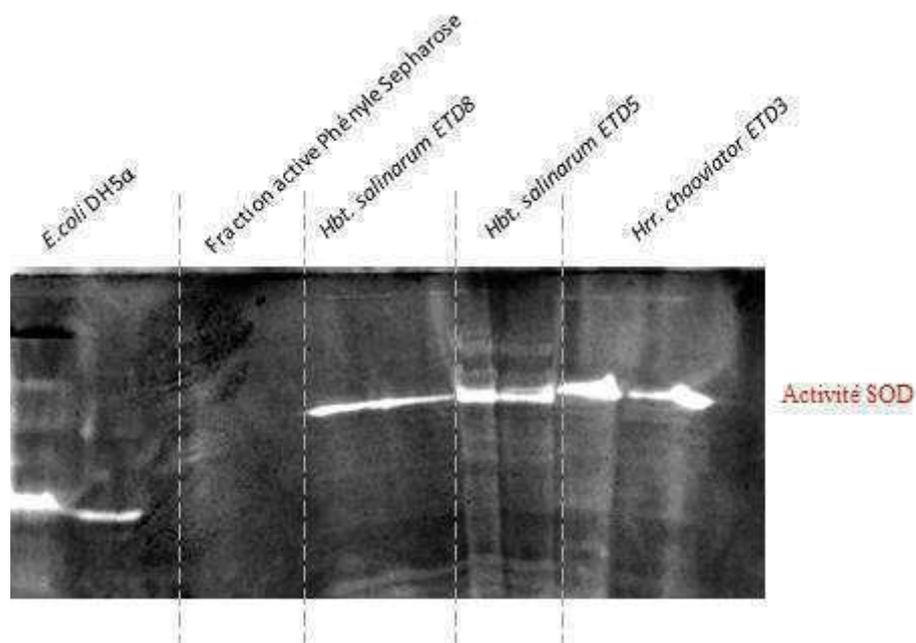


Figure 72. Révélation d'une activité superoxyde dismutase (SOD) sur gel polyacrylamide (12%), dans des conditions natives. La présence des bandes fluorescentes met en évidence l'activité SOD qui inhibe la réduction du NBT. Les souches *E. coli* DH5 α et *Hrr. chaoviator* ETD3 ont été utilisées comme contrôles positifs.

Conclusions

Dans ce troisième chapitre de résultats, notre intérêt s'est porté sur la production de quantités importantes d'halocines suffisantes pour permettre leur caractérisation et la détermination de leur séquence en acides aminés. Pour cette raison, nous avons suivi deux stratégies de purification de peptides antimicrobiens, soit à partir du surnageant de culture de la souche d'archée halophile extrême *Hbt. salinarum* ETD5, soit par surproduction par expression hétérologue chez la bactérie *E.coli* DH5 α ou l'archée halophile *Hfx. volcanii* H98. L'expression hétérologue des gènes codant différentes formes d'halocine S8 n'a pas donné de résultats satisfaisants. D'autres essais auraient été nécessaires pour optimiser la surexpression des peptides/protéines, cependant nous n'avons pas eu le temps d'effectuer ces essais dans le cadre de cette thèse. Les résultats d'optimisation de la production des peptides antimicrobiens par différents méthodes de chromatographie, nous ont permis d'adopter un protocole pour la purification des halocines par les étapes suivantes : une chromatographie sur colonne de Phényle Sepharose, suivie d'une chromatographie soit par filtration sur gel sur colonne Superose 6, soit par échange d'anions sur colonne MonoQ.

Dans la seconde stratégie, les résultats de purification à partir de la culture productrice *Hbt. salinarum* ETD5 nous ont permis d'identifier et de purifier partiellement deux nouvelles halocines à activité antimicrobienne, l'halocine S8 avec une masse moléculaire de 8,6 kDa et l'halocine S14 avec une masse moléculaire approximative de 14 kDa. Ces halocines ont été caractérisés par spectrométrie de masse LC MS-MS, qui confirme que la bande de 8 kDa correspond bien à l'halocine S8, mais dont la séquence diffère de celle préalablement publiée par Price et Shand (2000). L'halocine S8 produite par *Hbt. salinarum* ETD5 est donc un peptide de 81 résidus qui ne présenterait pas de clivage en région C-terminale. Il convient de noter que la maturation de l'halocine S8 chez *Hbt. salinarum* ETD5 serait différente de celle observée chez l'archée halophile S8a (Price et Shand 2000). Pour la deuxième protéine de 14 kDa, les résultats de la dégradation d'Edman et de spectrométrie de masse ont permis de montrer que cette nouvelle halocine S14 possède une séquence en acides aminés qui pourrait correspondre à un fragment de la Mn-superoxyde dismutase d'*Hbt. salinarum*. Cette nouvelle halocine pourrait donc dériver d'un clivage protéolytique d'une SOD durant la maturation. Par contre cette halocine S14 ne possède pas d'activité SOD. Nous avons également mis en évidence que les souches d'*Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8 possédaient bien une SOD intracellulaire.

La souche d'*Hbt. salinarum* ETD5 isolée de la saline de Sfax produit donc deux halocines, ce qui pourrait expliquer d'une part son importante activité observée dans les tests en milieu liquide, mais aussi son activité antimicrobienne contre de nombreuses autres souches isolées de cette saline. C'est le premier exemple d'une souche d'archée produisant deux halocines.

L'ensemble de ce travail fera l'objet d'une troisième publication en cours de préparation. Cette publication portera sur la purification et la caractérisation des deux nouvelles halocines, S8 et S14 produites par une même souche d'archée halophile *Hbt. salinarum* ETD5, issue de la saline de Sfax, en Tunisie.

Publication 3:

Purification and structural characterization of new active antimicrobial peptides halocins produced by *Halobacterium salinarum* ETD5, isolated from hypersaline environments

F. Ghanmi, A. Carré-Mlouka, Z. Zarai, H. Mejdoub, J. Peduzzi, S. Maalej, S. Rebuffat.

Discussion générale et perspectives

De nombreuses questions restent posées sur les mécanismes qui permettent aux archées halophiles de dominer les milieux hypersalins par rapport aux autres populations microbiennes. Les différentes molécules actives sécrétées dans ces milieux, comme les peptides antimicrobiens jouent-ils un rôle dans la biodiversité et les interactions entre les communautés microbiennes dans des milieux hostiles ? Pour cette raison, l'objectif principal de ma thèse était d'identifier, de purifier et de caractériser de nouveaux peptides antimicrobiens produits par les souches d'archées halophiles isolées de la saline de Sfax en Tunisie.

L'ensemble de ce travail nous a permis de mettre en évidence le potentiel antimicrobien des souches d'archées halophiles issues de la saline de Sfax, et de montrer que la saline de Sfax, un milieu hypersalin, est une source de nouveaux peptides antimicrobiens.

L'ensemble des résultats présentés dans les trois chapitres seront discutés en quatre parties.

Distribution et propriétés antagonistes des archées en milieux hypersalins

La production de peptides antimicrobiens est une stratégie de compétition commune aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Kirkup et Riley 2004), qui pourrait être également utilisée par les archées halophiles, pour éliminer leurs concurrents dans les environnements extrêmes hypersalins, en particulier en conditions de carence nutritionnelle. L'étude des interactions antagonistes entre les communautés microbiennes au sein des écosystèmes hypersalins et de la production de peptides antimicrobiens a pour but de comprendre les mécanismes qui permettent à ces micro-organismes de se développer et de dominer les milieux hypersalins. Bien que des études précédentes aient examiné la biodiversité des procaryotes halophiles dans la saline de Sfax (Baati et al. 2008, Trigui et al. 2011a, b, Boujelben et al. 2012, 2014), le potentiel de production d'agents antimicrobiens n'avait jusqu'à présent pas été rapporté. Il a été décrit pour la première fois dans notre étude.

Ces études antérieures avaient montré que la saline de Sfax est un milieu hypersalin riche en archées halophiles affiliées aux genres *Haloquadratum*, *Halorubrum* et *Halobacterium* (Baati et al. 2008, Trigui et al. 2011a, b, Boujelben et al. 2012, 2014). Dans la présente étude, 35 souches de procaryotes halophiles isolées à partir de deux bassins TS18 (390 g.L⁻¹ de salinité) et M1 (200 g.L⁻¹ de salinité), ont été testées pour leur aptitude à exercer une activité antimicrobienne. La plupart des souches étudiées présentant une activité

antimicrobienne sont des archées halophiles affiliées aux genres *Halobacterium*, *Halorubrum* et *Haloterrigena*, appartenant à la classe des *Halobacteria*, et aux familles des *Halorubraceae*, *Halobacteriaceae* et *Natrialbaceae* (Gupta et al. 2015, 2016). Deux isolats bactériens affiliés aux genres *Salicola* et *Pseudomonas* ont également montré une activité antimicrobienne. Ces isolats bactériens proviennent tous les 2 de la station M1 de plus faible salinité. Il est intéressant de noter qu'aucune souche d'*Haloquadratum* n'a été isolée lors de cette étude, alors qu'il s'agit d'un des genres les plus représentés dans les milieux hypersalins, et ceci dans toutes les régions de la planète. Différentes études ont montré qu'une fraction importante des procaryotes habitant les milieux hypersalins ont la capacité à produire des agents antimicrobiens (Rodriguez-Valera et al. 1982, Kis-Papo et Oren. 2000, Atanasova et al. 2013). Parmi ces études, l'une a examiné les interactions antagonistes entre les isolats halophiles provenant de différents sites géographiques distants (Atanasova et al. 2013). Dans cette étude, plusieurs souches d'archées halophiles se sont révélées productrices de peptides antimicrobiens nommés halocines. Ces souches appartiennent aux genres *Halorubrum*, *Haloferax*, *Haloplanus*, *Haloarcula*, *Halogramum*, *Halobacterium*, *Halosarcina* (Atanasova et al. 2013). Par ailleurs, des bactéries halophiles ont été également identifiées comme productrices d'agents antimicrobiens. Ces souches appartiennent aux genres *Halomonas*, *Salinovibrio*, *Pontibacillus* et *Salicola* (Atanasova et al. 2013). Une autre étude publiée récemment, sur les archées halophiles isolées de différents environnements hypersalins en Algérie, a permis de sélectionner 30 souches d'archées halophiles pour leur activité antagoniste (Quadri et al. 2016). Ces souches sont affiliées aux genres *Natrinema*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halopiger* et *Haloferax* (Quadri et al. 2016). Nos résultats sont donc en accord avec ces différentes études, cependant, le genre *Pseudomonas* chez les bactéries n'avait pas été cité comme producteur de peptides antimicrobiens dans les milieux hypersalins. En effet, dans notre étude, nous avons montré qu'une souche bactérienne halophile *P. halophila* ES1D1 isolée d'un environnement hypersalin est capable de produire un agent antimicrobien. Par contre, il est bien connu que des souches de *Pseudomonas* non halophiles, comme *P. aeruginosa*, peuvent produire des agents antimicrobiens de nature peptidique nommées pyocines (Michel-Briand et Baysse, 2002). Plus récemment différentes études ont porté sur la caractérisation de bactériocines produites par des souches de *Pseudomonas putida* (Ghraiiri et al. 2015, Ghequire et al. 2015). Une souche isolée à partir de sources d'eaux chaudes du Nord de la Tunisie, produit un peptide antimicrobien avec une masse moléculaire approximative de 8 kDa, la putadicine T01 qui est active contre des souches de *Pseudomonas* ou des pathogènes comme *E. coli* (Ghraiiri et al. 2015). Une autre étude a montré que des souches de *P. putida*,

isolées de la banane ou du riz, produisent des bactériocines de haute masse moléculaire nommées tailocines (Ghequire et al. 2015). Le séquençage du génome d'une autre souche de *P. putida* BW11M1 a montré que cette souche possède des gènes impliqués dans la biosynthèse de plusieurs antimicrobiens, incluant une bactériocine « lectin-like », une tailocine, un lipopeptide cyclique, la xantholysine et un dérivé d'acide gras, la pseudopyronine (Ghequire et al. 2016). Il semble donc d'après notre étude que des souches halophiles de *Pseudomonas* pourraient être également une source de nouveaux agents antimicrobiens. Nous avons également montré qu'une souche bactérienne *Salicola* sp. ES1R9 produisait un agent antimicrobien, ce résultat est à rapprocher de celui de l'étude d'Atanasova et al. (2013) qui avaient également mise en évidence une souche de *Salicola* productrice d'halocine. Les interactions antimicrobiennes entre les micro-organismes, archées et bactéries halophiles, indiquent que les environnements hypersalins dans le monde présentent des micro-organismes similaires avec une importante activité antimicrobienne (Atanasova et al. 2013).

Tous nos résultats suggèrent le potentiel de production d'agents antimicrobiens par nos souches isolées de la saline de Sfax. Parmi les interactions antagonistes observées dans notre étude, plusieurs antagonismes inter-domaines ont été observés, archées contre bactéries ou bactéries contre archées, ce qui reste un phénomène assez rare. Dans notre étude la souche d'archée halophile *Hbt. salinarum* ETD5 inhibe la bactérie halophile *P. halophila* ES1D1, et au contraire la bactérie halophile *Salicola* sp. ES1R9 inhibe une souche d'archée halophile *Hrr. tebenquichense* SS1R14. Certains cas d'inhibitions inter-domaines ont déjà été également observés. Ainsi, les archées halophiles appartenant aux genres *Halorubrum*, *Haloferax* et *Halogramum* inhibent des bactéries des genres *Halomonas*, *Rhodovibrio*, *Salisaeta* et *Pontibacillus*, et dans l'autre sens une souche de bactérie halophile du genre *Salicola* a été montré capable d'inhiber une archée halophile du genre *Halorubrum saccharovorum* (Atanasova et al. 2013), le même cas que celui observé dans notre étude. Dans le cas d'agents antimicrobiens agissant entre les deux domaines, cela pose la question du mode d'action de ces composés, en particulier au niveau de leur reconnaissance au niveau de la membrane. En effet les lipides constituant la membrane diffèrent fortement entre les bactéries et les archées. Un composé actif contre des micro-organismes appartenant aux deux domaines possède-t-il un mode d'action unique ou plusieurs modes d'actions spécifiques pour chacun des domaines ? On peut aussi se demander si ces agents antimicrobiens produits par les archées pourraient être secrétées associées à des vésicules membranaires comme c'est le cas des sulfolobocines produites par les archées du genre *Sulfolobus* (Prangishvili et al. 2000).

Dans notre étude, la majorité des souches productrices du genre *Halorubrum* possède un spectre d'activité étroit et sont capables d'inhiber une seule souche sensible, conformément aux études antérieures (Atanasova et al. 2013). En revanche, trois souches productrices possèdent un large spectre d'activité. Il s'agit des souches d'*Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12. Ces souches sont capables d'inhiber la croissance de nombreuses archées halophiles sensibles des genres *Halorubrum* et *Haloferax*. Les résultats des tests antimicrobiens de la souche *Hbt. salinarum* ETD5 contre des archées et des bactéries halophiles et non halophiles ont confirmé que la souche possède un large spectre d'activité. Ainsi, nous avons montré que la souche *Hbt. salinarum* ETD5 est capable d'inhiber des souches d'archées halophiles isolées à partir de nombreux environnements hypersalins provenant de diverses origines géographiques. Ces souches sont affiliées aux genres *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Natrinema* et *Haloterrigena* et des bactéries halophiles des genres *Salinibacter* et *Lentibacillus*. Nous avons montré dans cette étude la nature protéique des deux agents antimicrobiens produits par *Hbt. salinarum* ETD5. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne observée ne semble pas due pour partie à la présence de virus halophiles. Le large spectre d'activité dirigé contre les souches cibles est peut-être dû à la production de deux peptides antimicrobiens par la souche *Hbt. salinarum* ETD5. Différentes hypothèses peuvent être envisagées, comme l'existence d'interactions synergiques entre ces substances antimicrobiennes, ou bien le fait que chacun de ces composés possède un spectre d'activité différent, l'un inhibant spécifiquement les archées et le second inhibant les bactéries. La souche *Hbt. salinarum* ETD5 est également capable d'inhiber une bactérie pathogène *P. aeruginosa*, cependant cette souche est incapable d'inhiber les champignons halophiles *Penicillium coryphilum* LCP5424 et *Eurotium rubrum* LCP6453. Ces résultats nous permettent de suggérer la possibilité d'une application des agents antimicrobiens produits par la souche d'archée ETD5 dans l'inhibition des bactéries pathogènes. Une récente étude, en accord avec notre résultat, a montré qu'une souche d'archée halophile de l'espèce *Halogiper djelfamassiliensis* est capable d'inhiber d'autres souches d'archées halophiles des genres *Halorubrum* et *Haloterrigena*, mais aussi une bactérie ou une levure non halophiles, *M. luteus* et *C. albicans* (Quadri et al. 2016).

Dans notre étude, nous avons également montré que les deux autres souches, *Hbt. salinarum* ETD8, et *Htg. thermotolerans* SS1R12 produisaient un composé antimicrobien de nature protéique. La nature de ces agents a été identifiée par l'utilisation d'une protéase halophile provenant de la souche ES1R9 isolée lors de notre étude pour traiter le surnageant

de culture de la souche productrice de l'activité. Nous n'avons pas utilisé des enzymes protéolytiques classiques, comme dans la plupart des études précédentes (Torreblanca et al. 1994, O'Connor et Shand 2002) car ces enzymes ne fonctionnent pas efficacement à des forces ioniques élevées et nous avons tiré parti de la caractérisation dans l'équipe tunisienne d'une souche d'archée productrice de protéase halophile.

L'ensemble de nos résultats confirme l'originalité de notre travail et incite à la détermination du spectre d'activité des halocines purifiées synthétisées par la souche *Hbt. salinarum* ETD5.

Influence des paramètres nutritionnels et environnementaux sur la production des agents antimicrobiens

La production des agents antimicrobiens dépend de la composition des milieux de culture et est aussi influencée par les conditions physicochimiques telles que la température, le pH et l'agitation. Plusieurs travaux antérieurs ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, ou d'autres éléments nutritifs influence énormément la capacité de production des peptides antimicrobiens produits par les halophiles (Pašić et al. 2008, Karthikeyan et al. 2013). Il a été montré que l'halocine Sech 7a est produite de façon optimale à pH 7,0, 42°C, à une concentration de 3 M en NaCl et dans un milieu supplémenté en galactose (Pašić et al. 2008). La production de l'halocine BH10 est maximale à pH 8,0, 45°C, une concentration de 3,4 M en NaCl et dans un milieu supplémenté en glycérol et en extrait de levure (Karthikeyan et al. 2013). L'utilisation du glycérol comme source de carbone par les archées halophiles pourrait s'expliquer par la présence de ce polyol en grandes quantités dans les marais salants. En effet, le glycérol est produit par la prolifération des algues vertes unicellulaires *Dunaliella* considérées comme les plus importantes sources de carbone organique chez les procaryotes hétérotrophes (Bardavid et al. 2008). Le glycérol est utilisé par les espèces de *Dunaliella* comme un soluté compatible servant à équilibrer la pression osmotique intracellulaire pour s'adapter à des concentrations élevées en sel (Chow et al. 2015, Oren 2016). Des études ont montré que la production de glycérol par *Dunaliella* est la clé de la survie à long terme des procaryotes halophiles (Oren 2016). Des archées halophiles ont été isolées à partir de la surface de *Dunaliella*. Parmi les 35 espèces testées, 23 d'entre elles ont été capable de croître en présence de glycérol et/ ou de produire de l'acide à partir du glycérol. Parmi les souches d'archées qui ont la capacité à dégrader le glycérol, on retrouve *Haloferax*, *Haloquadratum*, *Haloarcula* et *Halobacterium* (Oren 2016).

Plusieurs paramètres nutritionnels ont été également testés lors de notre étude pour optimiser la production des agents antimicrobiens par les trois souches d'archées halophiles extrêmes sélectionnées *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12. La production optimale des agents antimicrobiens par les souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 est obtenue dans le milieu SW 25 en ajoutant différentes sources de carbone (dextrose, arabinose, fructose), d'azote (tryptone, caséine) et des concentrations optimales en NaCl comprises entre 150 et 200 g.L⁻¹, comme nous l'avons indiqué dans la partie résultats. En ce qui concerne l'influence du pH, on observe que la production optimale des agents antimicrobiens est obtenue soit à pH 7,0 soit à pH 8,0, des valeurs en accord avec les études précédentes (Pašić et al. 2008, Karthikeyan et al. 2013). Par contre la température optimale est de 37°C, inférieure à celle observée pour les halocines Sech 7a et BH10 (Pašić et al. 2008, Karthikeyan et al. 2013). Ces résultats suggèrent que l'exigence de la production d'agents antimicrobiens est différente pour nos trois souches. Cela peut être expliqué par le fait que la souche *Hbt. salinarum* ETD5 produit deux halocines, tandis que la souche *Hbt. salinarum* ETD8 pourrait produire l'halocine S8, comme cela est suggéré par les résultats de transcription inverse. Par contre pour la troisième souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, l'activité antimicrobienne n'est vraisemblablement pas due à l'halocine H4, puis que nous n'avons pas obtenu de transcription du gène codant cette halocine. Par conséquent, au moins un autre composé antimicrobien, différent de l'halocine H4, est produit par la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12.

Fait intéressant à souligner, l'activité antimicrobienne des deux souches d'archées *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 augmente significativement suite à l'addition de ZnCl₂. Ces résultats ont fait ressortir que ZnCl₂ peut être un métal important pour la production des agents antimicrobiens et cela n'a jamais été signalé dans les études précédentes. Le zinc est un métal jouant le rôle de cofacteur dans de nombreux processus biologiques. Ainsi, presque la moitié des protéines de chaque organisme pourraient être des métalloprotéines (Degtyarenko et al. 2000). Cependant un excès en métaux dans les environnements, dont le zinc, peut s'avérer toxique pour les archées (Kaur et al. 2006). Ces observations indiquent que différents membres d'archées halophiles ont des besoins nutritionnels spéciaux et différents.

Les résultats des tests de l'effet de l'agitation sur la production des peptides antimicrobiens, montrent que l'activité optimale est obtenue entre 200 et 250 rpm pour les trois souches productrices testées. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Pašić et al.

(2008). Généralement, l'oxygène dissous est présent en faible quantité dans le milieu de culture à des concentrations en sel très élevées et les organismes aérobies ont besoin de taux d'oxygène suffisants pour leur métabolisme. Dans notre étude, nous avons également montré que les peptides antimicrobiens sont produits en début de phase stationnaire de croissance par nos deux souches *Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8. Ces observations sont en accord avec ce qui a été décrit précédemment dans de nombreuses publications sur les halocines des archées halophiles, qui suggèrent que les gènes codant les halocines sont exprimées pendant la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de la croissance (Cheung et al. 1997, Price et Shand 2000). Pendant la phase stationnaire de croissance, les membres de la classe des *Halobacteria* doivent résister à de nombreuses conditions environnementales difficiles, telles que l'insuffisance d'oxygène et l'épuisement des nutriments (Lui et al. 2013). Ces modifications de l'environnement induisent l'expression de gènes fonctionnels comme les gènes codant des halocines, et cela est étroitement lié à la physiologie de la souche et améliore la survie de l'archée pendant cette période stable (Lui et al. 2013). Cette stratégie est bien connue aussi pour les peptides antimicrobiens des bactéries pour lesquels les gènes d'expression sont activés lors de la phase de transition et commandés par des mécanismes qui fonctionnent principalement au niveau de l'initiation de la transcription (Marahiel et al. 1993).

Par contre, la production maximale de peptides antimicrobiens par la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12 a été observée pendant la phase mi-exponentielle. Ce résultat est comparable à celui observé avec l'halocine H1, où le gène est exprimé lors de la phase exponentielle de croissance (Platas et al. 1996). En conclusion, ces études améliorent les connaissances sur les paramètres qui influencent la production des peptides antimicrobiens par les trois souches d'archées *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12, isolées de la saline de Sfax. Cependant, d'autres études seraient nécessaires pour mieux comprendre l'influence de différents éléments nutritifs sur l'expression des gènes codant les halocines.

Caractérisation de l'identité des séquences des gènes codant des halocines de différentes origines géographiques

Bien que des études aient mentionné que la production d'halocines est une caractéristique universelle de tous les membres d'archées halophiles, seulement quelques halocines ont été caractérisées et seulement partiellement (Besse et al. 2015). En particulier, la séquence peptidique et nucléotidique des gènes n'est connue que pour trois d'entre elles,

l'halocine C8 (Sun et al. 2005), l'halocine H4 (Cheung et al 1997) et l'halocine S8 (Price et Shand 2000). Notre objectif a tout d'abord été de vérifier si les trois souches *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12 produisaient des halocines déjà connues ou si il s'agissait de nouvelles halocines ou d'autres agents antimicrobiens.

Par amplification PCR avec des amorces spécifiques, nous avons montré que les deux souches *Hbt. salinarum* ETD5 et *Hbt. salinarum* ETD8 possèdent le gène *halS8* impliqué dans la synthèse de l'halocine S8. Cette halocine S8 a été purifiée initialement à partir d'une souche d'archée halophile S8a non caractérisée, qui a été isolée du Grand Lac Salé dans l'Utah aux Etats-Unis (Price et Shand 2000), et la séquence N-terminale de HalS8 mature a été déterminée par séquençage d'Edman (Price et Shand 2000). Le gène *halS8* ayant été également séquencé, Price et Shand ont montré que l'halocine S8 est produite sous forme d'un précurseur de 34 kDa qui subirait une maturation protéolytique à la fois du côté N-terminal et du côté C-terminal, conduisant à un peptide actif de 36 acides aminés (Price et Shand 2000). Une autre souche *Halobacterium* sp. GN101, qui a été isolée de la saline Guerrerro Negro au Mexique, possède également le gène *halS8* (Besse et al. 2015). Les résultats d'alignement des séquences en acides aminés déduites à partir des gènes *halS8* provenant des souches S8a, GN101, ETD5 et ETD8, révèlent seulement deux sites de substitution. Nous avons observé la substitution d'Ala, dans les souches S8a, GN101, et ETD5, par Gly dans la souche ETD5 en position 40 du précurseur ProS8. La seconde substitution correspond à Val dans la souche S8a, par Ile dans les souches GN101, ETD5 et ETD8 en position 185 de ProS8. Il résulte que la séquence en acides aminés déduite du gène codant l'halocine S8 est fortement conservée parmi les souches d'origine géographique différente. De plus, la séquence de l'halocine S8 mature de 36 acides aminés est identique pour ces quatre souches. Il semble donc que l'halocine S8 serait préférentiellement produite par des archées du genre *Halobacterium* et que sa séquence serait identique quelle que soit l'origine géographique de la souche productrice. Fait intéressant, dans l'étude d'Atanasova et al. 2013, une seule souche *Halobacterium* sp. avait été identifiée en tant que souche productrice d'halocine. Nous avons également montré que le gène *halS8* était transcrit pendant la phase stationnaire de croissance chez les deux souches d'*Hbt. salinarum* ETD5 et ETD8. C'est une caractéristique commune à plusieurs halocines, y compris l'halocine S8 (Price et Shand 2000, Besse et al. 2015). Il a été montré que le gène *halS8* est porté par un mégaplasmide dans la souche *Halobacterium* sp. GN101 et qu'il existe des éléments génétiques mobiles à proximité d'*halS8*. Dans notre étude, nous avons vérifié la présence de

ces séquences d'insertion chez *Hbt. salinarum* ETD5. Le gène *halS8* pourrait donc se disperser dans les espèces d'*Halobacterium* par un transfert horizontal de gène. L'halocine S8 est donc à rapprocher de l'halocine C8. En effet cette dernière, initialement isolée d'une souche de *Natrinema* sp. AS7092 provenant d'un lac salé en Chine (Li et al. 2003) a été retrouvée chez de nombreuses souches de *Natrinema* et *Haloterrigena* isolées à partir de différents sites géographiques (Meknaci et al. 2014, Besse et al. 2015, Quadri et al. 2016). Par ailleurs, la comparaison de la séquence en acides aminés de l'halocine S8 avec celle de l'halocine R1 identifiée uniquement par séquençage N-terminal par dégradation d'Edman, montre que ces deux halocines, produites par des souches du même genre *Halobacterium*, sont fortement similaires (O'Connor et al. 2002, Besse et al. 2015).

De nombreuses études complémentaires seraient intéressantes et nécessaires pour déterminer si les gènes spécifiques d'une halocine sont systématiquement portés par des souches appartenant à un genre unique ou par plusieurs genres différents.

En ce qui concerne la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, les résultats d'amplification montrent que cette souche présente dans son génome le gène *halH4* codant l'halocine H4, qui a été initialement isolée de la souche *Hfx. mediterranei* R4, isolée de la saline d'Alicante en Espagne (Rodriguez-Valera et al. 1982, Meseguer et Rodriguez-Valera 1985, 1986). Chez *Haloferax*, le gène *halH4* est situé sur le mégaplasmide pHM300 et l'halocine H4 est produite sous forme d'un précurseur constitué d'une région N-terminale de 46 acides aminés fortement cationique, et d'une région C-terminale de 313 acides aminés correspondant à l'halocine mature. Contrairement à l'halocine S8, l'halocine H4 est donc une protéine de 34,9 kDa (Cheung et al. 1997). La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique chez *Htg. thermotolerans* SS1R12 est identique à celle de l'halocine H4 provenant d'*Haloferax*. Comme pour l'halocine S8, il semble donc qu'il y a une stabilité dans la séquence du gène *halH4*. Cependant, dans le cas de la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, aucun transcrit *halH4* n'a pu être détecté dans les cellules en phase stationnaire de croissance. Il semblerait donc que pour la souche *Htg. thermotolerans* SS1R12, d'autres composés antimicrobiens soient responsables de l'activité antimicrobienne.

Caractérisation des halocines isolées de la saline de Sfax

Les micro-organismes halophiles représentent un réservoir peu exploré de nouvelles biomolécules actives comme les halocines. De plus, ces molécules pourraient jouer un rôle

important dans la communication et les interactions entre les micro-organismes au sein d'un environnement hypersalin. Nous avons donc essayé de purifier les peptides antimicrobiens produits par la souche d'*Hbt. salinarum* ETD5. Nous avons rencontré des difficultés avec les deux stratégies que nous avons utilisées, à savoir l'expression dans un hôte hétérologue, ou la purification à partir du surnageant de culture de la souche sauvage productrice. Après un essai infructueux chez *E. coli*, nous avons choisi d'exprimer le gène *halS8* chez une archée halophile *Hfx. volcanii* dont le cytoplasme riche en sels aurait dû être plus favorable à la biosynthèse d'une halocine. Néanmoins, nous n'avons pas eu le temps dans le cadre de cette thèse d'optimiser les conditions d'expression chez *Haloferax*. Plusieurs études ont été rapportées sur l'expression hétérologue chez *Hfx. volcanii* (Schreier et al. 1999, Ortenberg et Mevarech 2000, Large et al. 2007, De Castro et al. 2008), par contre il s'agissait dans le cadre de notre étude du premier essai d'expression hétérologue d'halocines chez *Hfx. volcanii*.

Très peu d'halocines ont été purifiées jusqu'à maintenant, en partie en raison de la difficulté à purifier des peptides halophiles fortement hydrophobes et qui en plus ne sont présents qu'en faibles quantités dans les surnageants de culture. Nous avons donc essayé de purifier les peptides antimicrobiens à partir des surnageants de culture en utilisant différentes étapes de chromatographie, parmi lesquelles la chromatographie échangeuse d'anions qui est particulièrement adaptée à la séparation des composés halophiles. Nous avons confirmé que les halocines produites par *Hbt. salinarum* étaient fortement hydrophobes car elles restent accrochées sur des colonnes de chromatographie en phase inverse. Nous avons alors pu montrer que la souche *Hbt. salinarum* ETD5 produisait deux halocines de masses moléculaires estimées à 8 et 14 kDa. Par dégradation d'Edman et spectrométrie de masse LC-MS-MS, nous avons pu montrer que cette souche produisait l'halocine S8, comme cela était prévisible en raison de la présence du gène *halS8*. Cependant la séquence en acides aminés que nous avons identifiée pour cette halocine S8 diffère de celle décrite par Price et Shand (2000). En effet chez *Hbt. salinarum* l'halocine S8 est un peptide de 81 acides aminés, alors que le peptide produit par l'archée halophile S8a était décrit comme comportant 36 acides aminés (Price et Shand 2000). La maturation de l'halocine S8 est donc différente chez *Hbt. salinarum* ETD5 puisqu'il n'y a pas de clivage protéolytique du précurseur ProS8 dans la région C-terminale. Il est surprenant d'observer que le précurseur ProS8 puisse être maturé de deux manières différentes suivant la souche productrice et que les deux peptides produits exercent tous deux une activité antimicrobienne. Il conviendrait de rechercher quelle forme

d'halocine S8 est produite par les souches d'*Hbt. salinarum* ETD8 et *Halobacterium* sp. GN101 afin de trancher cette question.

La souche d'*Hbt. salinarum* ETD5 produit également un second composé antimicrobien de nature protéique. Nous avons donc montré l'existence d'une nouvelle halocine, l'halocine S14. C'est la première fois qu'il est montré qu'une même souche produit deux halocines. Par dégradation d'Edman et par spectrométrie de masse LC MS-MS, nous avons observé que cette nouvelle halocine présentait des identités de séquence en acides aminés avec la Mn-superoxyde dismutase d'*Hbt. salinarum*. L'halocine S14 ne présente plus d'activité anti-oxydante mais par contre possède une activité antimicrobienne. Ainsi, il est possible que l'halocine S14 dérive de la superoxyde dismutase par un clivage protéolytique. On serait donc ici dans une situation identique à celle qui est observée chez certains organismes eucaryotes chez qui le clivage protéolytique de différentes protéines comme les histones ou l'hémoglobine conduit à des peptides dotés d'une activité antimicrobienne (Park et al. 1996, Mak et al. 2004, Hunter et al. 2005, Deng et al. 2009). C'est la première fois qu'un tel phénomène est décrit chez les archées, qui constituent un domaine dont les relations phylogénétiques avec les eucaryotes, sont controversées (Williams et al 2013, Forterre 2013, Forterre 2015).

La découverte d'une nouvelle halocine, nous conduit à penser qu'il existe d'autres halocines non encore isolées chez les archées halophiles. De nombreuses interrogations peuvent être formulées après la découverte de l'halocine S14.

- Pourquoi la souche produit-elle deux halocines ?
- Quel rôle peut avoir chacun de ces deux peptides antimicrobiens ?
- Ces peptides agissent-ils individuellement ou en synergie ?
- La production de ces deux peptides par une seule souche d'archée augmente-t-elle le spectre d'activité de cette souche ? Il convient de rappeler que cette souche présente un large spectre d'activité.
- La production de plusieurs peptides est-elle une exception chez cette souche isolée de la saline de Sfax ou bien est-ce que cela peut être un phénomène plus généralisé ?

- La multiplicité de production d'halocines par une même souche peut-elle entraîner un avantage sélectif pour cette souche dans le cadre des compétitions microbiennes ?

Conclusion générale et perspectives

A l'heure actuelle une part importante des recherches scientifiques est consacrée à la découverte de nouveaux agents antimicrobiens naturels qui peuvent être l'objet de diverses applications biotechnologiques. Les travaux de recherche qui s'intéressent aux micro-organismes extrêmophiles ont progressé durant la dernière décennie. Ces études reposent sur la recherche de nouvelles molécules actives pour une compréhension approfondie de la vie au sein de certains milieux hypersalins et l'adaptation de ces micro-organismes aux conditions extrêmes, et pour le potentiel biotechnologique qu'elles représentent. Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des recherches menées sur la compréhension du rôle des peptides antimicrobiens dans les interactions microbiennes entre les procaryotes halophiles dans la saline de Sfax.

L'ensemble des résultats a permis d'identifier les peptides antimicrobiens, ou halocines, produits par deux souches d'archées halophiles issues de la saline de Sfax. Nous avons purifié partiellement deux nouvelles halocines, produites par la même souche d'archée halophile *Hbt. salinarum* ETD5. Ces résultats montrent la présence de peptides antimicrobiens dans la saline de Sfax et peuvent aussi expliquer la dominance de la population productrice au sein des communautés d'archées halophiles dans ces milieux extrêmes.

De toute évidence, nous avons été confrontés à un véritable défi pour la mise au point et la mise en œuvre du protocole de purification, même partielle, d'un peptide très hydrophobe, l'halocine S8 et d'un peptide de 14 kDa dérivé d'une protéine SOD à partir d'une culture halophile renfermant des concentrations en sel très élevées (200 g.L⁻¹ de NaCl). Ces deux peptides, partiellement purifiés dans le cadre de ce travail de thèse, constituent un atout majeur pour de futures études qui s'intéresseront à élucider le mécanisme d'action des deux halocines, en lien étroit avec leurs structures tridimensionnelles qui pourront être identifiées par résonance magnétique nucléaire (RMN) et modélisation moléculaire sous contraintes RMN ou bien par cristallographie aux rayons X. Parmi les pistes à explorer à court terme, nous envisageons de terminer la purification des deux peptides antimicrobiens et déterminer la masse moléculaire précise de l'halocine S14 par spectrométrie de masse. Il deviendra alors possible de caractériser les spectres d'activité des deux halocines S8 et S14 contre des bactéries pathogènes et des champignons et d'étudier leur mode d'action par diverses méthodes biophysiques ou d'imagerie.

Ainsi, l'ensemble des résultats acquis durant ce travail de thèse et les perspectives ouvertes constituent un socle solide pour développer des projets ambitieux reposant sur les deux nouvelles halocines identifiées, qui devraient conduire à terme à une meilleure

compréhension des interactions microbiennes dans les milieux hypersalins et à des débouchés prometteurs.

Résultats complémentaires

I. Quantification de l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens

Dans le but de quantifier l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens produits par la souche *Hbt. salinarum* ETD5 dans le surnageant de culture, dans l'échantillon préparé pour la purification (après dialyse pour diminuer la concentration en NaCl, puis concentration pour avoir une plus grande quantité d'agents antimicrobiens et filtration) et dans la fraction purifiée par Phényle Sepharose, nous avons utilisé la méthode de double dilution en série qui a été décrite par Shand en 2006 (Shand 2006). Cette méthode consiste à préparer, à partir de la solution mère à doser une série de dilutions successives de 2 en 2 dans le milieu SW 25 avec un volume final de 1 mL, dans des tubes stériles. L'activité a été testée comme décrit dans la partie matériels et méthodes par la méthode de diffusion en puits. L'activité antimicrobienne exprimée en UA.mL⁻¹ est l'inverse de la dilution du dernier puits qui ne présente aucun halo d'inhibition divisée par le volume déposé (80 µL) multiplié par mille. Les résultats de quantification de l'activité antimicrobienne montrent que l'activité du surnageant a été évaluée à 3 200 UA.mL⁻¹ (la dernière dilution qui ne présente pas d'activité est 1/256), celle de l'échantillon avant injection à 12 800 UA.mL⁻¹ (la dernière dilution qui ne présente pas d'activité est 1/1024), alors que dans la fraction l'activité est de 409 600 UA.mL⁻¹ (la dernière dilution qui ne présente pas d'activité est 1/32768). Etant donné que nous avons dosé l'activité antimicrobienne dans 1 L de surnageant et que la fraction en sortie de colonne de Phényle Sepharose après concentration faisait 1 mL, nous avons donc une activité totale de 3 200 000 UA dans le surnageant, alors que l'on n'a récupéré que 409 600 UA après la colonne de Phényle Sepharose.

II. Isolement et identification moléculaire de la communauté microbienne dominante dans la saline de Sfax

Dans le but de suivre la dynamique saisonnière des souches productrices de agents antimicrobiens dans la saline de Sfax et de déterminer l'impact des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de ces souches, des échantillons ont été prélevés à différentes périodes de l'année (Tableau 21). Ces échantillons ont été prélevés entre février 2013 et mars 2015, à partir de l'eau et du sédiment des deux bassins d'échantillonnage, soit la table salante TS18 et la station M1, avec des salinités comprises entre 190 et 390 g.L⁻¹. Ces échantillons ont été dilués cinq fois avec une dilution au 10^{ème} à chaque dilution, puis 100 µL de la dilution ont été étalés sur milieu gélosé SW 25, spécifique

pour la croissance des souches d'archées halophiles. Après l'ensemencement, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 15 à 20 jours. Après la période d'incubation, les colonies de différents morphotypes ont été sélectionnées et purifiées sur des nouvelles boîtes en milieu solide SW 25. Ces boîtes ont été conservées par la suite à 4°C. D'autres échantillons ont été prélevés en mars 2016 à partir de quatre bassins d'échantillonnages M1, TS18, AP17 et FC2 avec des salinités comprises entre 90 et 390 g.L⁻¹, dans le but de rechercher la présence de la souche d'*Hbt. salinarum* productrice de l'halocine S8 et de vérifier si des variations saisonnières pouvaient influencer l'expression du gène *halS8*. Pour chaque échantillon 2 L d'eau ont été recueillis à partir de 10 cm en dessous de la surface de l'eau dans des flacons stériles, préalablement rincés par l'eau du bassin à échantillonner. Les paramètres environnementaux ont été déterminés dans les stations. Ainsi, la température (°C) a été mesurée *in situ* à l'aide d'un thermomètre classique, la salinité (g.L⁻¹) a été déterminée grâce à un salinomètre (LAQUAtwin B-721) et le pH dans les bassins a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre de type Tacussel (tableau 21). Les échantillonnages ont été réalisés pendant les périodes de ma présence à Sfax.

Tableau 21. Facteurs environnementaux déterminés des deux stations TS18, M1, AP17 et FC2 de la saline de Sfax.

Echantillonnage	Station M1			Station TS18			Station AP17			Station FC2		
	Salinité (g.L ⁻¹)	Température (°C)	pH	Salinité (g.L ⁻¹)	Température (°C)	pH	Salinité (g.L ⁻¹)	Température (°C)	pH	Salinité (g.L ⁻¹)	Température (°C)	pH
Hivernal (Février 2013)	190	19	8,33	310	22	7,57						
Estival (Aout 2013)	195	26	8,24	340	28	7,34						
Automnal (Septembre 2014)	240	29	8,26	380	30	7,38						
Printanier (Mars 2015)	210	25	8,5	330	27	7,32						
Printanier (Mars 2016)	200	17	8,74	390	20	7,32	90	20	8	150	18	8,52

En gris : non déterminé

Dans le but de rechercher des souches possédant des gènes codant les halocines S8 et H4 que nous avons identifiées chez les souches d'archées halophiles dans la saline de Sfax, *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 et *Htg. thermotolerans* SS1R12, une amplification des ADN génomiques extraits de quelques isolats purifiés avec les amorces spécifiques codant les ARNr 16S des archées et des bactéries a été effectuée. Par la suite ces gènes ont été clonés chez des souches d'*E. coli* DH5α et séquencés. La séquence des gènes codant les ARNr 16S a été analysée à l'aide de l'algorithme BlastN comme précédemment décrit dans la partie matériels et méthodes. Nous avons identifié 16 souches appartenant au

domaine des archées et à la classe des *Halobacteria*. Ces souches sont affiliées au genre *Haloterrigena* et pour la majorité au genre *Halorubrum* (Tableau 22).

Tableau 22. Souches halophiles identifiées, isolées à partir des bassins d'échantillonnages TS18 et M1 de la saline de Sfax.

	Souche	Identification moléculaire (gène ARNr16S)	Origine
<i>Echantillons Hiveraux</i>	M1	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau M1, Saline de Sfax, Tunisie
	M3	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau M1, Saline de Sfax, Tunisie
	TS1	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau TS, Saline de Sfax, Tunisie
	TS2	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau TS, Saline de Sfax, Tunisie
	EM11	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau M1, Saline de Sfax, Tunisie
	EM110	<i>Haloterrigena</i> sp.	Eau M1, Saline de Sfax, Tunisie
<i>Echantillons Estivaux</i>	EM12	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau M1, Saline de Sfax, Tunisie
	EM17	<i>Halorubrum</i> sp. ZM5	Eau M1, Saline de Sfax, Tunisie
	EM18	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau M1, Saline de Sfax, Tunisie
	ETS2	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau TS, Saline de Sfax, Tunisie
	ETS5	<i>Halorubrum</i> sp.	Eau TS, Saline de Sfax, Tunisie
	ETS6	<i>Halorubrum</i> sp. ZM5	Eau TS, Saline de Sfax, Tunisie
	ETS7	<i>Halorubrum</i> sp. 250-7	Eau TS, Saline de Sfax, Tunisie
	SM12	<i>Haloterrigena</i> sp.	Sédiment M1, Saline de Sfax, Tunisie
	SM15	<i>Haloterrigena hispanica</i>	Sédiment M1, Saline de Sfax, Tunisie
	SM11	<i>Halorubrum</i> sp.	Sédiment M1, Saline de Sfax, Tunisie

D'après ces résultats nous avons retrouvé trois souches du genre *Haloterrigena*, genre qui dans notre étude avait été identifié comme producteur de l'halocine H4. De plus, cette souche productrice avait été isolée du même bassin, à partir du sédiment de la station M1. Ce résultat montre qu'il y a persistance dans la saline de Sfax de souches potentiellement productrices d'halocines, et cela quelle que soit la saison. De plus, les souches d'archées halophiles du genre *Halorubrum* qui prédominent dans la saline, produisent comme nous l'avons montré dans cette étude des agens antimicrobiens (Cf. chapitre I des résultats). Ce résultat confirme ceux précédemment observés (Boujelben et al. 2012, Trigui et al. 2011). Par conséquent, on peut envisager l'hypothèse que la production des peptides antimicrobiens, ou halocines, pourrait jouer un rôle important dans la dominance de certains genres d'archées

halophiles productrices, par rapport aux autres populations microbiennes. Des études antérieures ont montré que la production d'halocines est répandue dans la classe des *Halobacteria*, des archées halophiles des genres *Natrinema*, *Halobacterium*, *Halorubrum*, *Haloferax* et *Haloterrigena* (Atanasova et al. 2013, Besse et al. 2015, Quadri et al. 2016, Kumar et al. 2016). Une hypothèse est que les peptides antimicrobiens sont des agents de communication entre les espèces bactériennes qui participent au contrôle de la biodiversité des communautés microbiennes dans les environnements hypersalins.

III. Test de l'activité antimicrobienne des échantillons prélevés dans la saline de Sfax

Dans le but de savoir si les échantillons prélevés à partir des stations M1, TS18, AP17 et FC2 dans la saline de Sfax présentent une activité antimicrobienne, 100 mL de chaque échantillon ont été concentrés 100 fois à l'aide de filtres de 0,45 μm , pour obtenir le maximum de la fraction cellulaire présente dans l'échantillon (Vivaspin, Sigma-Aldrich), puis les filtrats retenus ont été testés par la méthode de diffusion en puits comme décrit dans la partie matériels et méthodes, contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14. Les résultats des tests d'activité montrent la présence d'une activité antimicrobienne au niveau des quatre bassins d'échantillonnage avec des halos d'inhibition compris entre 18 et 25 mm de diamètre (figure 73). Cette activité antimicrobienne peut être due à l'action de peptides antimicrobiens, ou d'autres agents comme les virus. Ces résultats encourageants pourraient confirmer la présence d'agents antimicrobiens excrétés et produits par un nombre important des membres de la population des halophiles, archées et bactéries, au sein des environnements hypersalins.

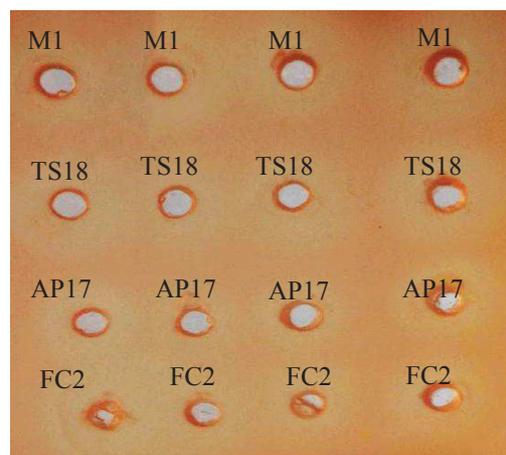


Figure 73. Activité antimicrobienne des échantillons des stations M1, TS18, AP17 et FC2 de la saline de Sfax, contre la souche cible *Hrr. chaoviator* ETR14.

IV. Recherche du gène *halS8* dans l'ADN des échantillons environnementaux

La biomasse microbienne a été recueillie par filtration de 2 L de chacun des échantillons prélevés en mars 2016 à partir des stations M1, TS18, AP17 et FC2, sur des filtres de 0,22 μm (Millipore). L'ADN génomique a été extrait comme décrit dans la partie matériels et méthodes. A cause des faibles quantités d'ADN obtenues à partir des échantillons, des cultures de 5 mLensemencées par 100 μL de chaque échantillon des quatre bassins ont été réalisées dans du milieu SW 25 pendant une semaine à 37°C (DO 600 nm \sim 1) pour obtenir une quantité suffisante de cellules. L'ADN a été extrait à partir de ces cultures et des amplifications par PCR avec les amorces oligonucléotidiques spécifiques codant l'halocine S8 halS8-F1 et halS8-R1 (404-405), halS8-F1 et halS8-R2 (404-407), halS8-F2 et halS8-R1 (406-405), halS8-F2 et halS8-R2 (406-407), halS8-F3 et halS8-R3 (415-416) (tableau 7), ont été effectuées selon les mêmes procédures que celle décrites dans la partie matériels et méthodes. Les résultats obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose montrent la présence de plusieurs bandes d'ADN pour chaque échantillon, avec la présence de fragments d'ADN amplifiés avec les amorces spécifiques du gène *halS8*. Pour les ADN de l'échantillon TS18 amplifiés avec les amorces 404-405 et 404-407, on obtient un fragment avec une taille de 700 à 800 pb, tandis que pour l'ADN de l'échantillon de M1 amplifié avec les amorces 404-407, et l'ADN de l'échantillon FC2 amplifiée avec des amorces 406-405, on obtient respectivement un fragment de 800 pb et un fragment de 600 pb (Figure 74). Ces résultats suggèrent la présence des gènes codant l'halocine S8 dans les échantillons prélevés des stations TS18, M1 et FC2. Cependant, ces gènes *halS8* ont été clonés puis transformés dans *E. coli* DH5 α et séquencés. Les résultats de séquençage ont donné des courtes séquences nucléotidiques. Ces séquences ont été analysées par BlastN, mais les résultats ne sont pas significatifs. D'autres essais d'amplification et de séquençage seraient nécessaires pour vérifier la présence des gènes *halS8* dans ces échantillons, ce qui permettrait de confirmer la présence de peptides antimicrobiens sécrétés dans les environnements hypersalins par les micro-organismes halophiles.

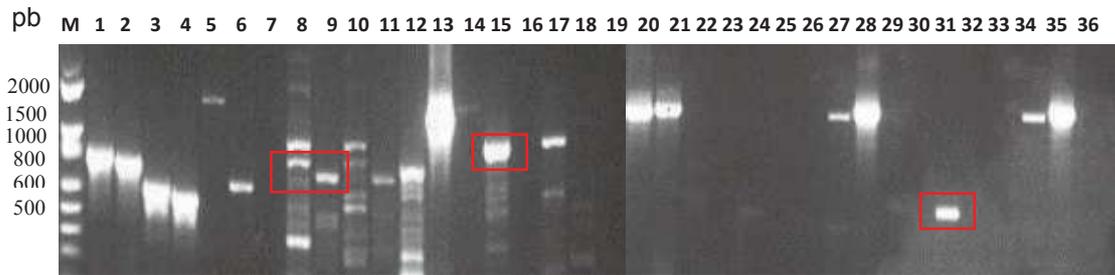


Figure 74. Amplification des gènes codant les halocines avec des amorces spécifiques de l'halocine S8 avec les ADN extraits des échantillons de quatre stations d'échantillonnage de la saline de Sfax, TS18, M1, AP17 et FC2. Les amorces codant l'halocine S8 sont présents dans le tableau 7 dans la partie matériels et méthodes.

M : Marqueur Exact ladder[®] DNA preMix 2 log (Ozyme), **1-6** : *Hbt. salinarum* ETD5, utilisée comme contrôle positif, productrice de l'halocine S8, **7-14** : ADN extrait de la station TS18, **15-21** : ADN extrait de la station M1, **22-28** : ADN extrait de la station de AP17, **29-35** : ADN extrait de la station de FC2. **Puits 1, 15, 22 et 29** : ADN amplifiés avec les amorces halS8-F1 et halS8-R1 (404-405). **Puits 2, 9, 16, 23 et 30** : ADN amplifiés avec les amorces halS8-F1 et halS8-R2 (404-407). **Puits 3, 10, 17, 24, et 31** : ADN amplifiés avec les amorces halS8-F2 et halS8-R1 (406-405). **Puits 4, 11, 18, 25 et 32** : ADN amplifiés avec les amorces halS8-F2 et halS8-R2 (406-407). **Puits 5, 12, 19, 26, et 33** : ADN amplifiés avec les amorces halS8-F3 et halS8-R3 (415-416). **Puits 6, 13, 20, 27 et 34** : ADN amplifiés avec les amorces de l'ARNr16 S des archées S-D-Arch-0025-aS-17 et S- * Univ-1517-aA-21 (193 et 199). **Puits 7, 14, 21, 28 et 35** : ADN amplifiés avec les amorces de l'ARNr 16S des bactéries Eubac 27F et 1492R (189-190). Les bandes encadrées en rouges représentent le gène *halS8*.

Références bibliographiques

- Abel, R. J., Y. Q. Tang, V. Rao, C. H. Dobbs, D. Tran, G. Barany, et M. E. Selsted. 1995. Synthesis and characterization of indolicidin, a tryptophan-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. *Int J Pept Prot Res* **45**:401-409.
- Abken, H. J., M. Tietze, J. Brodersen, S. Baumer, U. Beifuss, et U. Deppenmeier. 1998. Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Go1. *J Bacteriol* **180**:2027-2032.
- Ackermann, H.-W. et D. Prangishvili. 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol* **157**:1843-1849.
- Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, et S. Fredericq. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**:399-451.
- Akolkar, A. V. et A. J. Desai. 2010. Catalytic and thermodynamic characterization of protease from *Halobacterium* sp. SP1. *Res Microbiol* **161**:355-362.
- Alberola, A., I. Meseguer, M. Torreblanca, A. Moya, S. Sancho, B. Polo, B. Soria, et L. Such. 1998. Halocin H7 decreases infarct size and ectopic beats after myocardial reperfusion in dogs. Pages 148P-148P *In Journal of Physiology-London*. Cambridge univ Press 40 20th street, New York, NY 100011-4211 USA.
- Albers, S.-V. et B. H. Meyer. 2011. The archaeal cell envelope. *Nature Rev Microbiol* **9**:414-426.
- Allers, T., H.-P. Ngo, M. Mevarech, et R. G. Lloyd. 2004. Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Appl Environ Microbiol* **70**:943-953.
- Allers, T., S. Barak, S. Liddell, K. Wardell, et M. Mevarech. 2010. Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Appl Environ Microbiol* **76**:1759-1769.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, et D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
- Altschul, S.F, Madden, T.L, Schäffer, A.A, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W et Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST – a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–402.
- Amoozegar, M. A., A. Makhdoumi-Kakhki, S. A. S. Fazeli, R. Azarbaijani, et A. Ventosa. 2012. *Halopenitus persicus* gen. nov., sp. nov., an archaeon from an inland salt lake. *Int J Syst Evol Licrobiol* **62**:1932-1936.
- Amoozegar, M. A. et M. Siroosi. 2015. Hydrolytic Enzymes in Halophilic Bacteria, Properties and Biotechnological Potential. Pages 355-378 *Halophiles*. Springer.
- Andrei, A. Ş., H. L. Banciu, et A. Oren. 2012. Metabolic diversity in Archaea living in saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett.* **330**:1–9.
- Andrei A. Ş., M. S. Robeson II, A. Basica, C. Coman, V. Muntean, A. Ionescu, G. Etiope, M. Alexe, C. I. Silicora, M. Podar et H. L. Banciu. 2016. Contrasting taxonomic stratification of microbial communities in two hypersaline meromitic lakes. *ISME J* **9**:2642-2656.
- Andreu, D., et L. Rivas. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers.* **47**:415-33.
- Antón, J., I. Meseguer, et F. Rodriguez-Valera. 1988. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl Environ Microbiol* **54**:2381-2386.

- Antón, J., E. Llobet-Brossa, F. Rodríguez-Valera, et R. Amann. 1999. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* **1**:517-523.
- Antón, J., R. Rosselló-Mora, F. Rodríguez-Valera, et R. Amann. 2000. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* **66**:3052-3057.
- Antón, J., A. Oren, S. Benlloch, F. Rodríguez-Valera, R. Amann, et R. Rosselló-Mora. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:485-491.
- Antunes, A., M. Taborda, R. Huber, C. Moissl, M. F. Nobre, et M. S. Da Costa. 2008. *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:215-220.
- Anwar, T. et R. S. Chauhan. 2012. Computational analysis of halotolerance genes from halophilic prokaryotes to infer their signature sequences. *Int J Adv Biotechnol Bioinfo* **1**:69-78.
- Arahal, D. R., F. E. Dewhirst, B. J. Paster, B. E. Volcani, et A. Ventosa. 1996. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **62**:3779-3786.
- Arahal, D. R., A. M. Castillo, W. Ludwig, K. H. Schleifer, et A. Ventosa. 2002. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *System Appl Microbiol* **25**:207-211.
- Arahal, D. R. et A. Ventosa. 2006. The family *Halomonadaceae*. Pages 811-835 The prokaryotes. Springer.
- Arnison, P. G., M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, P. D. Cotter, D. J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P. C. Dorrestein, K. D. Entian, M. A. Fischbach, J. S. Garavelli, U. Goransson, C. W. Gruber, D. H. Haft, T. K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A. R. Horswill, M. Jaspars, W. L. Kelly, J. P. Klinman, O. P. Kuipers, A. J. Link, W. Liu, M. A. Marahiel, D. A. Mitchell, G. N. Moll, B. S. Moore, R. Muller, S. K. Nair, I. F. Nes, G. E. Norris, B. M. Olivera, H. Onaka, M. L. Patchett, J. Piel, M. J. Reaney, S. Rebuffat, R. P. Ross, H. G. Sahl, E. W. Schmidt, M. E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L. Smith, T. Stein, R. D. Sussmuth, J. R. Tagg, G. L. Tang, A. W. Truman, J. C. Vederas, C. T. Walsh, J. D. Walton, S. C. Wenzel, J. M. Willey, et W. A. Arahal Van der Donk. 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* **30**:108-160.
- Asgarani, E., H. Funamizu, T. Saito, H. Terato, Y. Ohyama, O. Yamamoto, et H. Ide. 1999. Mechanisms of DNA protection in *Halobacterium salinarium*, an extremely halophilic bacterium. *Microbiol Res* **154**:185-190.
- Ashiuchi, M. et H. Misono. 2002. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:9-14.
- Atanasova N.S., M.K. Pietilä et H.M. Oksanen, 2013. Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier, *Microbiol. Open* **2**:811-825.
- Atanasova, N. S., H. M. Oksanen, et D. H. Bamford. 2015. Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Curr Opin Microbiol* **25**:40-48.
- Atanasova, N. S., D. H. Bamford, et H. M. Oksanen. 2016. Virus-host interplay in high salt environments. *Environ Microbiol Rep.* **8**:431-444.

- Ayadi, H., N. Toumi, O. Abid, K. Medhioub, M. Hammami, T. Sime-Ngando, C. Amblard, et D. Sargos. 2002. Étude qualitative et quantitative des peuplements phyto-et zooplanctoniques dans les bassins de la saline de Sfax, Tunisie. *J Water Sci* **15**:123-135.
- Aziz, M., et Karboune, S. 2016. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables. A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 20:0. doi.org/10.1080/10408398.2016.1194256
- Baati, H., S. Guermazi, R. Amdouni, N. Gharsallah, A. Sghir, et E. Ammar. 2008. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* **12**:505-518.
- Bajpai, B., M. Chaudhary, et J. Saxena. 2015. Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10. *Food Technol Biotechnol* **53**:11-17.
- Baker, M. A., W. L. Maloy, M. Zasloff, et L. S. Jacob. 1993. Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res* **53**:3052-3057.
- Balasubramanian, S., S. Pal, et B. Bagchi. 2002. Hydrogen-bond dynamics near a micellar surface: origin of the universal slow relaxation at complex aqueous interfaces. *Phys Rev Lett* **89**:115505.
- Baliga, N. S., S. J. Bjork, R. Bonneau, M. Pan, C. Iloanusi, M. C. Kottmann, L. Hood, et J. Di Ruggiero. 2004. Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1. *Genome Res* **14**:1025-1035.
- Bandrovskaya, I., Y. D. Shershun, Z. Batori-Tartsi, N. Frolova, O. Korposh, et J. P. Sharkany. 1997. Special photochrome material based on bacteriorhodopsin. Pages 91-94 in *International Conference on Optical Storage*. International Society for Optics and Photonics.
- Baneyx, F. et M. Mujacic. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol* **22**:1399-1408.
- Bardavid, R. E., D. Ionescu, A. Oren, F. A. Rainey, B. J. Hollen, D. R. Bagaley, A. M. Small, et C. McKay. 2007. Selective enrichment, isolation and molecular detection of *Salinibacter* and related extremely halophilic Bacteria from hypersaline environments. *Hydrobiologia* **576**:3-13.
- Bardavid, R. E., P. Khristo, et A. Oren. 2008. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* **12**:5-14.
- Bardavid, R. E. et A. Oren. 2012. Acid-shifted isoelectric point profiles of the proteins in a hypersaline microbial mat: an adaptation to life at high salt concentrations? *Extremophiles* **16**:787-792.
- Bastian, A. et H. Schäfer. 2001. Human α -defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection *in vitro*. *Regul Peptides* **101**:157-161.
- Beauchamp, C. et I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**:276-287.
- Bechinger, B., M. Zasloff, et S. J. Opella. 1993. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci* **2**:2077-2084.
- Bechinger, B., J.-M. Ruysschaert, et E. Goormaghtigh. 1999. Membrane helix orientation from linear dichroism of infrared attenuated total reflection spectra. *Biophys J* **76**:552-563.
- Becker, K. W., F. J. Elling, M. Y. Yoshinaga, A. Söllinger, T. Urich, et K.-U. Hinrichs. 2016. Unusual butane- and pentanetriol-based tetraether lipids in *Methanomassiliicoccus luminyensis*, a representative of the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* **82**: 4505-4516..

- Belguesmia, Y., K. Naghmouchi, N.-E. Chihib, et D. Drider. 2011. Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. Pages 171-195 Prokaryotic antimicrobial peptides. Springer.
- Belin, P., M. Moutiez, S. Lautru, J. Seguin, J.-L. Pernodet, et M. Gondry. 2012. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Nat Prod Rep* **29**:961-979.
- Benz, J. et A. Meinhart. 2014. Antibacterial effector/immunity systems: it's just the tip of the iceberg. *Curr Opin Microbiol* **17**:1-10.
- Berkowitz, B. A., C. L. Bevins, et M. A. Zasloff. 1990. Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. *Biochem Pharmacol* **39**:625-629.
- Bertoldo, C. et G. Antranikian. 2000. Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods Enzymol* **330**:269-289.
- Besse, A., J. Peduzzi, S. Rebuffat, et A. Carre-Mlouka. 2015. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie* **118**:344-355.
- Bessette, P. H., F. Åslund, J. Beckwith, et G. Georgiou. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sc USA* **96**:13703-13708.
- Bettarel, Y., A. Desnues, et E. Rochelle-Newall. 2010. Lytic failure in cross-inoculation assays between phages and prokaryotes from three aquatic sites of contrasting salinity. *FEMS Microbiol Lett* **311**:113-118.
- Bierbaum, G. et H.-G. Sahl. 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol* **10**:2-18.
- Birbir, M., S. Eryilmaz, et A. Ogan. 2004. Prevention of halophilic microbial damage on brine cured hides by extremely halophilic halocin producer strains. *J Soc Leather Technologists Chem* **88**:99-104.
- Bitan-Banin, G., R. Ortenberg, et M. Mevarech. 2003. Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *J Bacteriol* **185**:772-778.
- Bitlisli, B. O., H. A. Karavana, B. Basaran, O. Sari, I. Yasa, et M. Birbir. 2004. The effect of conservation defects on the suede quality of double-face. *J Amn Leather Chem Assoc* **99**:494-501.
- Bochenska, O., M. Rapala-Kozik, N. Wolak, W. Aoki, M. Ueda, et A. Kozik. 2016. The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5. *Acta Biochim Pol* **63**:403-410.
- Bodaker, I., I. Sharon, M. T. Suzuki, R. Feingersch, M. Shmoish, E. Andreishcheva, M. L. Sogin, M. Rosenberg, M. E. Maguire, et S. Belkin. 2010. Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *ISME J* **4**:399-407.
- Bolhuis, H., E. M. Poele, and F. Rodriguez-Valera. 2004. Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. *Environ Microbiol* **6**:1287-1291.
- Bolhuis, H., P. Palm, A. Wende, M. Falb, M. Rampp, F. Rodriguez-Valera, F. Pfeiffer, et D. Oesterhelt. 2006. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC genomics* **7**:1-12.
- Boman, H. G. 1998. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol* **48**:15-25.
- Boone, D. R., I. M. Mathrani, Y. Liu, J. A. Menaia, R. A. Mah et J. E. Boone. 1993. Isolation and characterization of *Methanohalophilus portucalensis* sp. nov. and DNA reassociation study of the genus *Methanohalophilus*. *Int J Syst Bacteriol*. **43**:430-437.
- Boujelben, I., M. Gomariz, M. Martinez-Garcia, F. Santos, A. Pena, C. Lopez, J. Anton, et S. Maalej. 2012a. Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Ant Van Leeuwen*. 101: 845-857.

- Boujelben, I., P. Yarza, C. Almansa, J. Villamor, S. Maalej, J. Antón, et F. Santos. 2012b. Virioplankton community structure in Tunisian solar salterns. *Appl Environ Microbiol* **78**:7429-7437.
- Boujelben, I., M. Martinez-Garcia, J. Van Pelt, et S. Maalej. 2014. Diversity of cultivable halophilic archaea and bacteria from superficial hypersaline sediments of Tunisian solar salterns. *Ant van Leeuwen* **106**:675-692.
- Boutaiba, S., T. Bhatnagar, H. Hacene, D. Mitchell, et J. Baratti. 2006. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *J Molec Cataly-B: Enzym* **41**:21-26.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev Microbiol* **3**:238-250.
- Brown-Peterson, N. J. et M. L. Salin. 1994. Salt stress in a halophilic bacterium: alterations in oxidative metabolism and oxy-intermediate scavenging systems. *Can J Microbiol* **40**:1057-1063.
- Brown-Peterson, N. J., Begonia, G. B., et Salin, M. L. 1995. Alterations in oxidative activity and superoxide dismutase in *Halobacterium halobium* in response to aerobic respiratory inhibitors. *Free Radic Biol Med*. **18**:249-56.
- Bulet, P., R. Stocklin, et L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**:169-184.
- Burton, G. W. et K. Ingold. 1984. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**:569-573.
- Burns D.G., P. H. Janssen, T. Itoh, M. Kamakura, Z. Li, G. Jensen, F. Rodríguez-Valera, H. Bolhuis, et M. L. Dyal-Smith. 2007. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:387-392.
- Burns D.G., P. H. Janssen, T. Itoh, M. Kamakura, A. Echigo, et M. h. Dyal-Smith. 2010. *Halonotius pteroides* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon recovered from a saltern crystallizer. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:1196-1199.
- Calegari-Santos, R., R. A. Diogo, J. D. Fontana, et T. M. B. Bonfim. 2016. Carotenoid production by halophilic archaea under different culture conditions. *Curr Microbiol* **72**:641-651.
- Camacho, R. M., J. C. Mateos, O. González-Reynoso, L. A. Prado, et J. Córdova. 2009. Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**:901-909.
- Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Lloubes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, et D. Cavard. 2007. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:158-229.
- Castelle C. J., K. C. Wrighton, B. C. Thomas, L. A. Hug, C. T. Brown, M. J. Wilkins, K. R. Frischkorn, S. G. Tringe, A. Singh, L. M. Markillie, R. C. Taylor, K. H. Williams, et J. F. Banfield. 2015. Genomic expansion of domain archaea highlights roles of organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr Biol* **25**:690-701.
- Castillo A. M., M. C. Gutiérrez, M. Kamakura, Y. Ma, D. A. Cowan, B. E. Jones, W. D. Grant, et A. Ventosa. 2006a. *Halovivax asiaticus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:765-770.
- Castillo A. M., M. C. Gutiérrez, M. Kamakura, Y. Xue, Y. Ma, D. A. Cowan, B. E. Jones, W. D. Grant, et A. Ventosa. 2006b. *Halostagnicola larsenii* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:1519-1524.

- Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-552.
- Charlesworth, J. C. et B. P. Burns. 2015. Untapped resources: Biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in Archaea. *Archaea* **2015**:282035.
- Chavan, M. A. et M. A. Riley. 2007. Molecular evolution of bacteriocins in Gram-negative bacteria. Pages 19-43 *Bacteriocins*. Springer.
- Chen S., H-C. Liu, J. Zhou, et H. Kiang. 2016. *Haloparvum sedimenti* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Haloferacaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**:2327-2334.
- Cheung, J., K. J. Danna, E. M. O'Connor, L. B. Price, et R. F. Shand. 1997. Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *J Bacteriol* **179**:548-551.
- Chevenet F., C. Brun, A.-L. Bañuls, B. Jacq, R. Christen. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analysis of trees. *BMB Bioinfo* **7**:439.
- Chinchar, V. G., L. Bryan, U. Silphadaung, E. Noga, D. Wade, et L. Rollins-Smith. 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* **323**:268-275.
- Chisté, R. C., A. Z. Mercadante, A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. da Costa Lima, et N. Bragagnolo. 2011. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem* **127**:419-426.
- Cho, B. C., J. S. Park, K. Xu, et J. K. Choi. 2008. Morphology and molecular phylogeny of *Trimyema koreanum* n. sp., a ciliate from the hypersaline water of a solar saltern. *J Eukaryot Microbiol* **55**:417-426.
- Cho, J. H., Sung, B. H., et Kim, S. C. 2009. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim Biophys Acta*. **1788**:1564-1569.
- Chow, Y., W. Y. Tu, D. Wang, D. H. Ng, et Y. K. Lee. 2015. The role of micronutrients and strategies for optimized continual glycerol production from carbon dioxide by *Dunaliella tertiolecta*. *Biotechnology and bioengineering* **112**:2163-2171.
- Chu, H.-L., B.-S. Yip, K.-H. Chen, H.-Y. Yu, Y.-H. Chih, H.-T. Cheng, Y.-T. Chou, et J.-W. Cheng. 2015. Novel antimicrobial peptides with high anticancer activity and selectivity. *PloS one* **10**:1-14.
- Colangelo-Lillis, J., B. A. Wing, et L. G. Whyte. 2016. Low viral predation pressure in cold hypersaline Arctic sediments and limits on lytic replication. *Env Microbiol Rep* **8**: 250-260.
- Colwell, R., C. Litchfield, R. Vreeland, L. Kiefer, et N. Gibbons. 1979. Taxonomic studies of red halophilic bacteria. *Int J System Evol Microbiol* **29**:379-399.
- Compan, I. et D. Touati. 1993. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**:1687-1696.
- Cooper, W. J., R. G. Zika, R. G. Petasne, et J. M. Plane. 1988. Photochemical formation of hydrogen peroxide in natural waters exposed to sunlight. *Environ Sci Technol* **22**:1156-1160.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res.* **22**:10881-10890.
- Corral, P., R. Rafael, C. Sánchez-Porro, M. A. Amoozegar, R. T. Papke, et A. Ventosa. 2016. *Halorubrum halodurans* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**:435-444.
- Cotter, P. D., C. Hill, et R. P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**:777-788.
- Cotter, P. D., R. P. Ross, et C. Hill. 2013. Bacteriocins a viable alternative to antibiotics? *Nature Rev Microbiol* **11**:95-105.

- Cotter, P. D. 2014. An 'Upp'-turn in bacteriocin receptor identification. *Mol Microbiol* **92**:1159-1163.
- Courtenay, E., M. Capp, C. Anderson, et M. Record. 2000. Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of "osmotic stress" experiments in *vitro*. *Biochemistry* **39**:4455-4471.
- Csordas, A. et H. Michl. 1970. Isolation and structure of an hemolytic polypeptide from defensive secretion of European *Bombina* species. *Monatsh Chem* **101**:182-189.
- Cui, H. L., X. Gao, F. Sun, Y. Dong, X. W. Xu, Y. G. Zhou, H. C. Liu, A. Oren, et P. J. Zhou. 2010a. *Halogramum rubrum* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:1366-1371.
- Cui H. L., X. Y. Li, X. Gao, X. W. Xu, Y. G. Zhou, H. C. Liu, A. Oren, et P. J. Zhou. 2010b. *Halopelagius inordinatus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:2089-2093.
- Cui, H. L., X. Gao, X. Yang, et X. W. Xu. 2010c. *Halorussus rarus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from a marine solar saltern. *extremophiles* **14**:493-499.
- Cui, H. L., X. Yang, X. Gao, et X. W. Xu 2011a. *Halobellus clavatus* gen. nov., sp. nov. and *Halorientalis regularis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**:2682-2689.
- Cui H. L., X. Yang, et Y.-Z. Mou. 2011b. *Salinarchaeum laminariae* gen. nov., sp. nov.: a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from salted brown alga *Laminaria*. *Extremophiles* **15**:625-631.
- Cui H. L., X. Gao, X. Yang, et X. W. Xu 2011c. *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**:1617-1621.
- Cui H. L., et X. X. Qiu. 2014. *Salinarubrum litoreum* gen. nov., sp. nov.: a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from Chinese marine solar salterns. *Anton van Leeuwen* **105**:135-141.
- Cui H. L., et W.-J. Zhang. 2014. *Salinigranum rubrum* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Halobacteriaceae* isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**:2029-2033.
- Cui, Y., C. Zhang, Y. Wang, J. Shi, L. Zhang, Z. Ding, X. Qu, et H. Cui. 2012. Class IIA bacteriocins: diversity and new developments. *Int J Mol Sci* **13**:16668-16707.
- Daeschel, M. A., D. S. Jung, et B. T. Watson. 1991. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* **57**:601-603.
- D'Alessandro, C., R. De Castro, M. Giménez, et R. Paggi. 2007. Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett Appl Microbiol* **44**:637-642.
- Dalton, T. P., H. G. Shertzer, et A. Puga. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann Rev Pharmacol Tox* **39**:67-101.
- Dammak, D. F., S. M. Smaoui, F. Ghanmi, I. Boujelben, et S. Maalej. 2016. Characterization of halo-alkaline and thermostable protease from *Halorubrum ezzemoulense* strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia. *J Basic Microbiol*. **56**: 337-346.
- Daniels, L. L. et A. C. Wais. 1990. Ecophysiology of bacteriophage S5100 infecting *Halobacterium cutirubrum*. *Appl Environ Microbiol* **56**:3605-3608.

- Danon A., et W. Stoeckenius. 1974. Phosphorylation in *Halobacterium halobium*. Proc Natl Acad Sci USA **71**:1234-1238.
- DasSarma, S. et P. Arora. 2001. Halophiles. Encyclopedia of Life Science, 2001. Nature publishing group.
- DasSarma, S. et P. DasSarma. 2012. Halophiles. Els.
- DasSarma, S. et P. DasSarma. 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. Curr Opin Microbiol **25**:120-126.
- De Castro, R. E., D. M. Ruiz, M. I. Giménez, M. X. Silveyra, R. A. Paggi, et J. A. Maupin-Furlow. 2008. Gene cloning and heterologous synthesis of a haloalkaliphilic extracellular protease of *Natrialba magadii* (Nep). Extremophiles **12**:677-687.
- Degtyarenko, K. 2000. Bioinorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins. Bioinformatics **16**:851-864.
- De la Haba, R., C. Sánchez-Porro, M. Márquez, et A. Ventosa. 2011. Taxonomy of halophiles. Extremophiles handbook.
- De la Vega, M., A. Sayago, J. Ariza, A. G. Barneto, et R. León. 2016. Characterization of a bacterioruberin-producing *Haloarchaea* isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain. Biotechnol Prog **32**:592-600.
- Del Campo, M. M., R. M. Camacho, J. C. Mateos-Díaz, M. Müller-Santos, J. Córdova, et J. A. Rodríguez. 2015. Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea. Extremophiles **19**:1121-1132.
- Del Gaudio, G., L. Lombardi, G. Maisetta, S. Esin, G. Batoni, M. Sanguinetti, S. Senesi, et A. Tavanti. 2013. Antifungal activity of the noncytotoxic human peptide hepcidin 20 against fluconazole-resistant *Candida glabrata* in human vaginal fluid. Antimicrob Agents Chemother **57**:4314-4321.
- Deng, L., X. Pan, Y. Wang, L. Wang, X. E. Zhou, M. Li, Y. Feng, Q. Wu, B. Wang, et N. Huang. 2009. Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina. Hum Reprod **24**:211-218.
- Dereeper A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J. F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J. M. Claverie et O. Gascuel. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res **36**:W465-469.
- De Smet, K. et R. Contreras. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. Biotechnol Lett **27**:1337-1347.
- Destoumieux-Garzón, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, et E. Bachère. 2001. Crustacean immunity antifungal peptides are generated from the c terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. J Biol Chem **276**:47070-47077.
- Destoumieux-Garzón, D., R. D. Rosa, P. Schmitt, C. Barreto, J. Vidal-Dupiol, G. Mitta, Y. Gueguen, et E. Bachère. 2016. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. Phil. Trans. R. Soc. B **371**:20150300.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, et I. F. Nes. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proc Natl Acad Sci USA **104**:2384-2389.
- Dimarcq, J. L., E. Keppi, B. Dunbar, J. Lambert, J. M. Reichhart, D. Hoffmann, S. M. Rankine, J. E. Fothergill, et J. Hoffmann. 1988. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipterucin A. Eur J Biochem. **171**:17-22.
- Di Meglio L., F. Santos, M. Gomariz, C. Almansa, C. López, J. Antón et D. Necessian. 2016. Seasonal dynamics of extremely halophilic microbial communities in the three Argentinian salterns. FEMS Microbiol Ecol doi.org.gate1.inist.fr/10.1093/femsec/fiw184.

- Dobson, A., P. D. Cotter, R. P. Ross, et C. Hill. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol* **78**:1-6.
- Donowitz, M., C. Ming Tse, et D. Fuster. 2013. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers. *Mol Aspects Med* **34**:236-251.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen, et H. Prevost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:564-582.
- Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, et S. Rebuffat. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* **24**:708-734.
- Dussault, H. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol* **70**:484-485.
- Dyall-Smith, M., S.-L. Tang, et C. Bath. 2003. Haloarchaeal viruses: how diverse are they? *Res Microbiol* **154**:309-313.
- Dyall-Smith, M. 2013. PH1: an archaeovirus of *Haloarcu*la *hispanica* related to SH1 and HHIV-2. *Archaea* **2013**.
- Dym, O., M. Mevarech, et J. Sussman. 1995. Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium. *Science* **267**:1344-1360.
- Ebel, C., W. Altekari, J. Langowski, C. Urbanke, E. Forest, et G. Zaccai. 1995. Solution structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Haloarcu*la *vallismortis*. *Biophys Chem* **54**:219-227.
- Echigo A., H. Minegishi, Y. Shimane, M. Kamekura, T. Itoh, et R. Usami. 2013. *Halomicroarcu*la *pellucida* gen. nov., sp. nov., a non-pigmented, transparent-colony-forming, halophilic archaeon isolated from solar salt. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**:3556-3562.
- Eglert, C., Wanner, G., et Pfeifer, F. 1992. Functional analysis of the gaz vesicle gene cluster of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* defines the vac-region boundary and suggests a regulatory role for the *gvpD* gene or its product. *Mol. Microbiol.* **6**: 3543-3550.
- Elevi Bardavid R., L. Mana, et A. Oren. 2007. *Haloplanus natans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, gas-vacuolate archaeon isolated from Dead Sea-Red Sea water mixtures in experimental outdoor ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:780-783.
- Ellen, A. F., O. V. Rohulya, F. Fusetto, M. Wagner, S.-V. Albers, et A. J. Driessen. 2011. The sulfobolicin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J Bacteriol* **193**:4380-4387.
- Elloumi, J., W. Guerhazi, H. Ayadi, A. Bouain, et L. Aleya. 2009. Abundance and biomass of prokaryotic and eukaryotic microorganisms coupled with environmental factors in an arid multi-pond solar saltern (Sfax, Tunisia). *J Mar Biol Assoc UK* **89**:243-253.
- Falb, M., F. Pfeiffer, P. Palm, K. Rodewald, V. Hickmann, J. Tittor, et D. Oesterhelt. 2005. Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Res* **15**:1336-1343.
- Falcao, L. L., J. O. Silva-Werneck, A. d. R. Ramos, N. F. Martins, E. Bresso, M. A. Rodrigues, M. P. Bemquerer, et L. H. Marcellino. 2016. Antimicrobial properties of two novel peptides derived from *Theobroma cacao* osmotin. *Peptides* **79**:75-82.
- Fendrihan, S., M. Dornmayr-Pfaffenhuemer, F. Gerbl, A. Holzinger, M. Grösbacher, P. Briza, A. Erler, C. Gruber, K. Plätzer, et H. Stan-Lotter. 2012. Spherical particles of halophilic archaea correlate with exposure to low water activity—implications for microbial survival in fluid inclusions of ancient halite. *Geobiology* **10**:424-433.

- Fernandes, J. M., G. Molle, G. D. Kemp, et V. J. Smith. 2004. Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol* **28**:127-138.
- Fernández González, A. B., B. Vera Gargallo, C. Sánchez-Porro Álvarez, R. Ghai, R. T. Papke, F. Rodríguez Valera, et A. Ventosa. 2014. Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Front Microbiol.* 8:1-12.
- Filee, J., P. Siguier, et M. Chandler. 2007. Insertion sequence diversity in archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:121-157.
- Fogaça, A. C., P. I. da Silva, M. T. M. Miranda, A. G. Bianchi, A. Miranda, P. E. Ribolla, et S. Daffre. 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* **274**:25330-25334.
- Forterre, P. 2013. The common ancestor of Archaea and Eukarya was not an archaeon. *Archaea*. articles ID 372396, 1-18.
- Forterre, P. 2015. The universal tree of life: an update. *Front Microbiol* **6**: 1-18.
- Fukai, T. et M. Ushio-Fukai. 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antiox Red Signal* **15**:1583-1606.
- Fukushima, T., T. Mizuki, A. Echigo, A. Inoue, et R. Usami. 2005. Organic solvent tolerance of halophilic alpha-amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles* **9**:85-89.
- Gascuel O. 1997. BioNJ: an improved version of the NJ algorithm bases on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* **14**:685-695.
- Geissmann, T. A. et D. Touati. 2004. Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**:396-405.
- Gerday, C. et N. Glansdorff. 2007. *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press.
- Gerhardt, P. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*. Am Soc for Microbiol, Washington. (Edt) Charles Gerday, Nicolas Glansdorff. 429 pages.
- Gesell, J., M. Zasloff, et S. J. Opella. 1997. Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J Biomol NMR* **9**:127-135.
- Ghai, R., L. Pašić, A. B. Fernández, A.-B. Martín-Cuadrado, C. M. Mizuno, K. D. McMahon, R. T. Papke, R. Stepanauskas, B. Rodríguez-Brito, et F. Rohwer. 2011. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* **1**: 1-10.
- Ghequire, M. G., Y. Dillen, I. Lambrechts, P. Proost, R. Wattiez, et R. De Mot. 2015. Different ancestries of R tailocins in rhizospheric *Pseudomonas* isolates. *Genome Biol Evol* **7**:2810-2828.
- Ghequire, M. G. K., T. swings, J. Michiels, H. Gross et R. De Mot. 2016. Draft genomesquence of *Pseudomonas putida* BW11M1, a banana rhizosphere isolate with a diversified antimicrobial armamentarium. *Genome Announc* **4**:e00251-16.
- Ghraiiri, T., O. B. Braiek, et K. Hani. 2015. Detection and characterization of a bacteriocin, putadycin T01, produced by *Pseudomonas putida* isolated from hot spring water. *APMIS* **123**:260-268.
- Gifford, J. L., Hunter, H. N., et Vogel, H. J. 2005. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci.* **62**:2588-98.
- Gillor, O., B. C. Kirkup, et M. A. Riley. 2004. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv Appl Microbiol* **54**:129-146.

- Giménez, M. I. Studdert, C. A., Sánchez, J. J. et De Castro, R. E. 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles* **4**:181–188.
- Gomariz M, M. Martínez-García, F. Santos, F. Rodriguez, S. Capella-Gutierrez, T. Galbaldón, R. Rosselló-Móra, I. Meseguer, J. Antón. 2015. From community approaches to single-cell genomics: the discovery of ubiquitous hyperhalophilic *Bacteroidetes* generalists. *ISME J* **9**:16-31.
- Goumon, Y., K. Lugardon, B. Kieffer, J.-F. Lefèvre, A. Van Dorsselaer, D. Aunis, et M.-H. Metz-Boutigue. 1998. Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209–237 secreted by stimulated chromaffin cells. *J Biol Chem* **273**:29847-29856.
- Grant, W. D. 2004. Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**:1249-1266.
- Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *CR Soc Biol* **93**:1040-1041.
- Grey, V. L. et P. S. Fitt. 1976. An improved synthetic growth medium for *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Microbiol* **22**:440-442.
- Guixa-Boixareu, N., J. Calderón-Paz, M. Heldal, G. Bratbak, et C. Pedrós-Alió. 1996. Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquat Microb Ecol* **11**:215-227.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami, et B. Chauhan. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Proc Biochem* **38**:1599-1616.
- Gupta, R. S., S. Naushad, et S. Baker. 2015. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**:1050-1069.
- Gupta, R. S., S. Naushad, R. Fabros et M. Adeolu. 2016. A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class *Halobacteria*: proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families, *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam. nov. *Ant van Leewen* **109**:565-587.
- Gutiérrez M.C., A.M. Castillo, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant, et A. Ventosa. 2007. *Halopiger xanaduensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from saline Lake Shangmatala in Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:1402-1407.
- Hampp, N. Thoma, R. Brauchle, C. Kreuzer, F.-H. Maurer, R. et Oesterhelt, 1992. D. In: AIP Conference Proceedings, no.262, pp. 181-190.
- Han, J., Q. Lu, L. Zhou, H. Liu, et H. Xiang. 2009. Identification of the polyhydroxyalkanoate (PHA)-specific acetoacetyl coenzyme A reductase among multiple FabG paralogs in *Haloarcula hispanica* and reconstruction of the PHA biosynthetic pathway in *Haloferax volcanii*. *Appl Environ Microbiol* **75**:6168-6175.
- Han, J., M. A. Jyoti, H.-Y. Song, et W. S. Jang. 2016. Antifungal activity and action mechanism of histatin 5-halocidin hybrid peptides against *Candida* ssp. *PloS one* **11**:e0150196.
- Hancock, R. E. et D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1317-1323.

- Hancock, R. E. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* **1**:156-164.
- Hartmann, R., H. D. Sickinger, et D. Oesterhelt. 1980. Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:3821-3825.
- Haseltine, C., T. Hill, R. Montalvo-Rodriguez, S. K. Kemper, R. F. Shand, et P. Blum. 2001. Secreted euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic crenarchaea. *J Bacteriol* **183**:287-291.
- Hatew, B., T. Delessa, V. Zakin, et N. Gollop. 2011. Antagonistic intestinal microflora produces antimicrobial substance inhibitory to *Pseudomonas* species and other spoilage organisms. *J food sci* **76**:M522-M530.
- Hawkins, M., S. Malla, M. J. Blythe, C. A. Nieduszynski, et T. Allers. 2013. Accelerated growth in the absence of DNA replication origins. *Nature* **503**:544-547.
- Héchar, Y. et H.-G. Sahl. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**:545-557.
- Heng, N. C., P. A. Wescombe, J. P. Burton, R. W. Jack, et J. R. Tagg. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. Pages 45-92 *Bacteriocins*. Springer.
- Hentzer, M., H. Wu, J. B. Andersen, K. Riedel, T. B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M. A. Schembri, Z. Song, et P. Kristoffersen. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* **22**:3803-3815.
- Hezahen E.E., B.J. Tindall, A. Steinbüchel, et B.H.A. Rehm. 2002. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:2271-2280.
- Hozzein, W. N. 2015. Biodiversity of halophilic and halotolerant *Actinobacteria*. pp. 1-28 *Halophiles*. Springer.
- Hsu, M.-F., H.-Y. Fu, C.-J. Cai, H.-P. Yi, C.-S. Yang, et A. H.-J. Wang. 2015. Structural and functional studies of a newly grouped *Haloquadratum walsbyi* bacteriorhodopsin reveal the acid-resistant light-driven proton pumping activity. *J Biol Chem* **290**:29567-29577.
- Hunter, C., P. Davidson, et P. Horton. 2002. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature: Int Week J Sci* **418**:203-206.
- Hunter, H. N., A. R. Demcoe, H. Jenssen, T. J. Gutteberg, et H. J. Vogel. 2005. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3387-3395.
- Imadalou-Idres, N., A. Carré-Mlouka, M. Vandervennet, H. Yahiaoui, J. Peduzzi, et S. Rebuffat. 2013. Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. *J Life Sci* **7**:1057-1069.
- Imlay, J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Ann Rev Microbiol* **57**:395-418.
- Inoue K., T. Itoh, M. Ohkuma, et K. Kogure 2011. *Halomarina oriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a seawater aquarium. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 942-946.
- Itoh T., T. Yamaguchi, P. Zhou, et T. Takashina. 2005. *Natronolimnobius baerhuensis* gen. nov., sp. nov. and *Natronolimnobius innermongolicus* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in Inner Mongolia, China. *Extremophiles* **9**:111-116.
- Jenssen, H., P. Hamill, et R. E. Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **19**:491-511.

- Jiang, H., P. Li, et Q. Gu. 2016. Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Prot Express Purif* **127**:28-34.
- Jonard, L., L. Banh, M. Pressac, J. Just, et M. Bahuau. 2006. Les défensines en physiopathologie humaine. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **21**:342-347.
- Joshi, P. et P. P. Dennis. 1993. Structure, function, and evolution of the family of superoxide dismutase proteins from halophilic archaeobacteria. *J Bacteriol* **175**:1572-1579.
- Jurczak, A., D. Kościelniak, M. Papież, P. Vyhouskaya, et W. Krzyściak. 2015. A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. *Biol Res* **48**:61.
- Kamekura M., Y. Seno, M.L. Holmes, et M. L. Dyall-Smith. 1992. Molecular cloning and sequencing of the gene for a halophilic alkaline serine protease (halolysin) from an unidentified halophilic Archaea strain (172P1) and expression of the gene in *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol* **174**:736-742.
- Kamekura M, et M. L. Dyall-Smith. 1995. Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. *J Gen Appl Microbiol* **41**:333-350.
- Kamekura M., et M. L. Dyall-Smith, V. Usami A. Ventosa, M. Kates. 1997. Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* **47**:853-857.
- Kamekura, M. 1998. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* **2**:289-295.
- Karbalaeei-Heidari, H. R., M. A. Amoozegar, M. Hajighasemi, A. A. Ziaee, et A. Ventosa. 2009. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**:21-27.
- Karthikeyan, P., S. G. Bhat, et M. Chandrasekaran. 2013. Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTS10 isolated from salt pans of South India. *S J Biol Sci* **20**:205-212.
- Kates, M. 1978. The phytanyl ether-linked polar lipids et isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. *Prog Chem Fats Other Lipids* **15**:301-342.
- Kates, M. 1996. Structural analysis of phospholipids and glycolipids in extremely halophilic archaeobacteria. *J Microbiol Met* **25**:113-128.
- Kaur, A., M. Pan, M. Meislin, M. T. Facciotti, R. El-Gewely, et N. S. Baliga. 2006. A systems view of haloarchaeal strategies to withstand stress from transition metals. *Genome Res* **16**:841-854.
- Kaur, A., P. T. Van, C. R. Busch, C. K. Robinson, M. Pan, W. L. Pang, D. J. Reiss, J. DiRuggiero, et N. S. Baliga. 2010. Coordination of frontline defense mechanisms under severe oxidative stress. *Molec Syst Biol* **6**:393.
- Kauri, T., R. Wallace, et D. J. Kushner. 1990. Nutrition of the halophilic archaeobacterium, *Haloferax volcanii*. *System Appl Microbiol* **13**:14-18.
- Kavitha, P., A. Lipton, A. Sarika, et M. Aishwarya. 2011. Growth characteristics and halocin production by a new isolate, *Haloferax volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India). *Res J Biol Sci* **6**:257-262.
- Kerker, S. 2004. Ecology of hypersaline microorganisms. Pages 37-47 *Marine Microbiology*. Chapter 5. National Institute of Oceanography Panaji.

- Kharroub, K., M. Aguilera, T. Quesada, J. A. Morillo, A. Ramos-Cormenzana, A. Boulharouf, et M. Monteoliva-Sanchez. 2006. *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *Int J System Evol Microbiol* **56**:2647-2652.
- Khurshid, Z., S. Najeeb, M. Mali, S. F. Moin, S. Q. Raza, S. Zohaib, F. Sefat, et M. S. Zafar. 2016. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry. *Saudi Pharmaceut J.* 1-7.
- Kim, J.-Y., S. Y. Lee, S.-C. Park, S. Y. Shin, S. J. Choi, Y. Park, et K.-S. Hahm. 2007. Purification and antimicrobial activity studies of the N-terminal fragment of ubiquitin from human amniotic fluid. *Biochim Biophys Acta- Proteins and Proteomics* **1774**:1221-1226.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Molec Evol* **16**:111-120.
- Kimura, Y., D. G. Vassylyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai, et T. Fujiyoshik. 1997. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* **389**: 206-211.
- King, A. M. 2011. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier.
- Kirkup, B. C. et M. A. Riley. 2004. Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock–paper–scissors *in vivo*. *Nature* **428**:412-414.
- Kish, A., G. Kirkali, C. Robinson, R. Rosenblatt, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, et J. DiRuggiero. 2009. Salt shield: intracellular salts provide cellular protection against ionizing radiation in the halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum* NRC-1. *Environ Microbiol* **11**:1066-1078.
- Kis-Papo, T. et A. Oren. 2000. Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds? *Extremophiles* **4**:35-41.
- Kjos, M., I. F. Nes, et D. B. Diep. 2011. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol* **77**:3335-3342.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**:39-85.
- Klein, R., U. Baranyi, N. Rössler, B. Greineder, H. Scholz, et A. Witte. 2002. *Natrialba magadii* virus ϕ Ch1: first complete nucleotide sequence and functional organization of a virus infecting a haloalkaliphilic archaeon. *Molecul Microbiol* **45**:851-863.
- Kleinkauf, H. et H. Von Dohren. 1990. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* **192**:1-15.
- Kobayashi, T., H. Kanai, R. Aono, K. Horikoshi, et T. Kudo. 1994. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the alpha-amylase gene from the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus* sp. strain Ah-36. *J Bacteriol* **176**:5131-5134.
- Konings, W. N., S. V. Albers, S. Koning, et A. J. Driessen. 2002. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Anton van Leeuwen* **81**:61-72.
- Koonin, E. V. et Y. I. Wolf. 2008. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res* **36**:6688-6719.
- Kumar, V., J. Saxena, et S. K. Tiwari. 2016. Description of a halocin-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. *Arch Microbiol* **198**:181-192.
- Kukkaro, P. et D. H. Bamford. 2009. Virus–host interactions in environments with a wide range of ionic strengths. *EnvMicrob Rep* **1**:71-77.
- Kushner, D. 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria. *The biology of halophilic bacteria* 87-103.

- Lai, Y. et R. L. Gallo. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* **30**:131-141.
- Lanyi, J. K. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**:272.
- Lanyi, J. K. et B. Schobert. 1983. Effects of chloride and pH on the chromophore and photochemical cycling of halorhodopsin. *Biochemistry* **22**:2763-2769.
- Lanyi, J. K. 2000. Molecular mechanism of ion transport in bacteriorhodopsin: insights from crystallographic, spectroscopic, kinetic, and mutational studies. *J Phys Chem B* **104**:11441-11448.
- Large, A., C. Stamme, C. Lange, Z. Duan, T. Allers, J. Soppa, et P. A. Lund. 2007. Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Mol microbiol* **66**:1092-1106.
- Larsen, H. 1962. Halophilism. *The bacteria* **4**:297-342.
- Laybourn-Parry, J. et D. A. Pearce. 2007. The biodiversity and ecology of Antarctic lakes: models for evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**:2273-2289.
- Lee, I., W. Seo, G. Kim, M. Kim, C. Park, et Y. Park. 1997. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol* **18**:255-259.
- Lee, S. Y., B. L. Lee, et K. Söderhäll. 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* **278**:7927-7933.
- Lehrer, R., C. Bevins, et T. Ganz. 1999. Defensins and other antimicrobial peptides. *Mucosal Immunol* **89**. 1:527-546.
- Lehrer, R. I. et T. Ganz. 1996. Endogenous vertebrate antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* **797**:228-239.
- Lehrer, R. I. et T. Ganz. 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* **11**:23-27.
- Lehtola, M. J., I. T. Miettinen, M. M. Keinänen, T. K. Kekki, O. Laine, A. Hirvonen, T. Vartiainen, et P. J. Martikainen. 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res* **38**:3769-3779.
- Lele, D. S., S. Talat, S. Kumari, N. Srivastava, et K. J. Kaur. 2015. Understanding the importance of glycosylated threonine and stereospecific action of drosocin, a proline rich antimicrobial peptide. *Eur J Med Chem* **92**:637-647.
- Lenski, R. E. et M. A. Riley. 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:556-558.
- León, M. J., A. B. Fernández, R. Ghai, C. Sánchez-Porro, F. Rodríguez-Valera, et A. Ventosa. 2014. From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **80**:3850-3857.
- Lequerica, J. L., J. E. O'Connor, L. Such, A. Alberola, I. Meseguer, M. Dolz, M. Torreblanca, A. Moya, F. Colom, et B. Soria. 2006. A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *J Physiol Biochem* **62**:253-262.
- Levine, R. L., L. Mosoni, B. S. Berlett, et E. R. Stadtman. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:15036-15040.
- Li, G. H., Y. Mine, M. T. Hincke, et Y. Nys. 2007. Isolation and characterization of antimicrobial proteins and peptide from chicken liver. *J Pept Sci* **13**:368-378.

- Li, Y., H. Xiang, J. Liu, M. Zhou, et H. Tan. 2003. Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* **7**:401-407.
- Liepke, C., S. Baxmann, C. Heine, N. Breithaupt, L. Ständker, et W.-G. Forssmann. 2003. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromato B* **791**:345-356.
- Liu, G., J. Hou, S. Cai, D. Zhao, L. Cai, J. Han, J. Zhou, et H. Xiang. 2015. A patatin-like protein associated with the polyhydroxyalkanoate (PHA) granules of *Haloferax mediterranei* acts as an efficient depolymerase in the degradation of native PHA. *Appl Environ Microbiol* **81**:3029-3038.
- Liu Q., M. Ren, et L-L. Zhang. 2015. *Natribaculum breve* gen. nov., sp. nov. and *Natribaculum longum* sp. nov., halophilic archaea isolated from asline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**:604-608.
- Liu, X., L. Wang, J. Liu, L. Cai, et H. Xiang. 2013. Genome-wide analysis of gene expression in stationary phase and genetic characterization of stationary-phase-dependent halocin gene expression in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *J. Genet. Genomics* **40**:441-444.
- Liu, Y., Boone, D. R. et Choy, C. 1990. *Methanohalophilus oregonense* sp. nov., a methylotrophic methanogen from an alkaline, saline aquifer. *Int J Syst Bacteriol*. **40**:111–116.
- Litchfield, C. D. et P. M. Gillevet. 2002. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**:48-55.
- Litchfield, C. D. 2011. Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**:1635-1647.
- LoBasso, S., P. LoPalco, G. Mascolo, et A. Corcelli. 2008. Lipids of the ultra-thin square halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*. *Archaea* **2**:177-183.
- Lüders, T., G. A. Birkemo, J. Nissen-Meyer, Ø. Andersen, et I. F. Nes. 2005. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone H1 N-terminal peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2399-2406.
- Lugardon, K., R. Raffner, Y. Goumon, A. Corti, A. Delmas, P. Bulet, D. Aunis, et M.-H. Metz-Boutigue. 2000. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* **275**:10745-10753.
- Luk, A. W., T. J. Williams, S. Erdmann, R. T. Papke, et R. Cavicchioli. 2014. Viruses of haloarchaea. *Life (Basel)* **4**:681-715.
- Madern, D., C. Pfister, et G. Zaccai. 1995. Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem* **230**:1088-1095.
- Madern, D., Ebel, C., Mevarech, M., Richard, S.B., Pfister, C., et Zaccai, G. 2000. Insights into the molecular relationships between malate and lactate dehydrogenases: structural and biochemical properties of monomeric and dimeric intermediates of a mutant of tetrameric L-[LDH-like] malate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Biochimie* **39**:1001-1010.
- Mandelli, F., V. S. Miranda, E. Rodrigues, et A. Z. Mercadante. 2012. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *W J Microbiol Biotechnol* **28**:1781-1790.
- Mak, P., K. Wójcik, Ł. Wicherek, P. Suder, et A. Dubin. 2004. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides* **25**:1839-1847.

- Makhdoumi-Kakhki, A., M. A. Amoozegar, M. Bagheri, M. Ramezani, et A. Ventosa, 2012a. *Haloarchaeobius iranensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**:1021-1026.
- Makhdoumi-Kakhki A., M. A. Amoozegar, et A. Ventosa. 2012b. *Halovenus aranensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aran-Bidgol salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**:1331-1336.
- Maniloff, J. et H.-W. Ackermann. 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the other *Caudovirales*. *Arch Virol* **143**:2051-2063.
- Matejuk, A., Q. Leng, M. Begum, M. Woodle, P. Scaria, S. Chou, et A. Mixson. 2010. Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. *Drugs Fut* **35**:197.
- Marahiel, M., M. Nakano, et P. Zuber. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular microbiology* **7**:631-636.
- Marguet, E., M. Gaudin, E. Gaudiard, I. Fourquaux, S. L. B. Du Plouy, I. Matsui, et P. Forterre. 2013. Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of the genus *Thermococcus*. *Biochem Soc Trans* **41**:436-442.
- Martin, N. I. et E. Breukink. 2007. The expanding role of lipid II as a target for lantibiotics. *Future Microbiol* **2**:513-525.
- Martin, M. E., B. R. Byers, M. O. Olson, M. L. Salin, J. E. Arceneaux, et C. Tolbert. 1986. A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J Biol Chem* **261**:9361-9367.
- Mata-Gómez, L. C., J. C. Montañez, A. Méndez-Zavala, et C. N. Aguilar. 2014. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb Cell Fact* **13**:1.
- Maturrano, L., M. Valens-Vadell, R. Rosselló-Mora, et J. Antón. 2006. *Salicola marasensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. *Int J System Evol Microbiol* **56**:1685-1691.
- Matsuzaki, K., K. Sugishita, N. Fujii, et K. Miyajima. 1995. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* **34**:3423-3429.
- May, B. P. et P. P. Dennis. 1989. Evolution and regulation of the gene encoding superoxide dismutase from the archaebacterium *Halobacterium cutirubrum*. *J Biol Chem* **264**:12253-12258.
- McCann, K., A. Lee, J. Wan, H. Roginski, et M. Coventry. 2003. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *J Appl Microbiol* **95**:1026-1033.
- McGenity T. J., et W. D. Grant. 1995. Transfer of *Halobacterium saccharovororum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34041 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovororum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* **18**:237-243.
- McGenity T. J., R. T. Gemell, et W. D. Grant. 1998. Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**:1187-1196.
- McGenity, T. J. 2010. Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments. In: Timmis KN (ed) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, pp 665–680.
- Mehrshad M., M.A. Amoorzagar, A. makhdoumi, S. Abolhassan, H. Farahani, B. Asasi, P. Schuman, et A. ventosa. 2016. *Halosiccatu urmanus* gen. nov., sp. npv., a haloarchaeon from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**:725-730.

- Mei, S. S., Y. Li, Q. H. Lu, et H. Xiang. 2006. [Cloning and analysis of genes in the halocin C8 gene cluster]. (in Chinese). *Wei Sheng Wu Xue Bao* **46**:318-322.
- Meknaci, R., P. Lopes, C. Servy, J. P. Le Caer, J. P. Andrieu, H. Hacene, et J. Ouazzani. 2014. Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. *Extremophiles* **18**:1049-1055.
- Meseguer, I. et F. Rodriguez-Valera. 1985. Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiol Lett* **28**:177-182.
- Meseguer, I., F. Rodriguez-Valera, et A. Ventosa. 1986. Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS Microbiol Lett* **36**:177-182.
- Meseguer, I. et F. Rodriguez-Valera. 1986. Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*. *Microbiology* **132**:3061-3068.
- Meseguer, I., M. Torreblanca, et T. Konishi. 1995. Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6. *J Biol Chem* **270**:6450-6455.
- Metlitskaya, A., T. Kazakov, A. Kommer, O. Pavlova, M. Praetorius-Ibba, M. Ibba, I. Krasheninnikov, V. Kolb, I. Khmel, and K. Severinov. 2006. Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C. *J Biol Chem* **281**:18033-18042.
- Mevarech, M., F. Frolow, et L. M. Gloss. 2000. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys Chem* **86**:155-164.
- Michel-Briand, Y. et C. Baysse. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **84**:499-510.
- Miller, N. J., J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley, et C. A. Rice-Evans. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* **384**:240-242.
- Minegishi H., A. Echigo, S. Nagaoka, M. Kamekura, et R. Usami. 2010a. *Halarchaeum acidiphilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:2513-2516.
- Minegishi H., M. Kamakura, T. Itoh, A. Echigo, R. Usami et T. Hashimoto. 2010b. Further refinement of the phylogeny of *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (rpoB') gene. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:2398-2408.
- Minegishi H., A. echigo, A. Kuwahara, Y. Shimani, M. Kamekura, T. Itoh, M. Ohkuma, et R. Usami. 2015. *Halcalculus acidotolerans* gen. nov., sp. nov., an acid-tolerant haloarchaeon isolated from commercial salt. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**:1640-1645.
- Montalvo-Rodríguez R. R.H. Vreeland, A. Oren, M. Kessel, C. Betancour, et J. López-Garriga. 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int J Syst Bacteriol* **48**:1305-1312.
- Moretro, T., I. M. Aasen, I. Storro, et L. Axelsson. 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J Appl Microbiol* **88**:536-545.
- Mori K., DA. Nurcahyanto, A. Kawazaki, P. Lisdiyanti, Y. Yopi, et K-I. Suzuki. 2016. *Halobium palmae* gen. nov, sp. nov., an extremely haloarchaea isolated from solar saltern. *Int J syst Evol Microbiol*. ISSN: 1466-5034. doi: 10.1099/ijsem.0.001267.
- Mou Y.Z., X.-X. Qiu, M.-L. Zhao, H.L. Cui, D. Oh, et M. Dyall-Smith. 2012. *Halohasta litorea* gen. nov. sp. nov., and *Halohasta litchfieldiae* sp. nov., isolated from the Daliang aquaculture farm, China and from Deep Lake, Antarctica, respectively. *Extremophiles* **16**:895-901.
- Nakajima, Y., K. Ogihara, D. Taylor, et M. Yamakawa. 2003. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J Med Entom* **40**:78-81.
- Narasingarao, P., S. Podell, J. A. Ugalde, C. Brochier-Armanet, J. B. Emerson, J. J. Brocks, K. B. Heidelberg, J. F. Banfield, et E. E. Allen. 2012. *De novo* metagenomic assembly

- reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *ISME J* **6**:81-93.
- Naziri, D., M. Hamidi, S. Hassanzadeh, V. Tarhriz, B. M. Zanjani, H. Nazemyieh, M. A. Hejazi, et M. S. Hejazi. 2014. Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. *Adv. Pharm. Bull* **4**:61-67.
- Ng, W.-L. et S. DasSarma. 1993. Minimal replication origin of the 200-kilobase *Halobacterium* plasmid pNRC100. *J Bacteriol* **175**:4584-4596.
- Nicolaus, B., L. Lama, E. Esposito, M. Manca, R. Improta, M. Bellitti, A. Duckworth, W. Grant, et A. Gambacorta. 1999. *Haloarcula* spp able to biosynthesize exo-and endopolymers. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**:489-496.
- Nicolaus, B., M. Kambourova, et E. T. Oner. 2010. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environ Technol* **31**:1145-1158.
- Niederhoffer, E. C., C. M. Naranjo, K. L. Bradley, et J. A. Fee. 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol* **172**:1930-1938.
- Norais, C., M. Hawkins, A. L. Hartman, J. A. Eisen, H. Myllykallio, et T. Allers. 2007. Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*. *PLoS Genet* **3**:e77.
- O'Connor, E. M. 2002. Purification and characterization of microhalocin R1 from *Halobacterium salinarum* GN101. (edt) Northern Arizona University. 248.
- O'Connor, E. M. et R. F. Shand. 2002. Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**:23-31.
- Oesterhelt, D. et W. Stoekenius. 1973. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**:2853-2857.
- Oesterhelt, D., C. Brauchle, et N. Hampp. 1991. Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing. *Q Rev Biophys* **24**:425-478.
- Oesterhelt, D. 1995. Structure and function of halorhodopsin. *Isr J Chem* **35**: 475-494.
- Oren, A. 1990. The use of protein synthesis inhibitors in the estimation of the contribution of halophilic archaeobacteria to bacterial activity in hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol* **6**:187-192.
- Oren, A. 1994. The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev* **13**:415-439.
- Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Molec Biol Rev* **63**:334-348.
- Oren, A. 2002a. Biotechnological applications and potentials of halophilic microorganisms. *Halophilic Microorganisms and their Environments*:357-388.
- Oren, A. 2002b. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**:56-63.
- Oren, A. 2002c. *Halophilic microorganisms and their environments*. Dordrecht: Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht, 575 pp.
- Oren, A. 2002d. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **39**:1-7.
- Oren, A. 2006. Life at high salt concentrations. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The prokaryotes. A Handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*. Springer, New York. **2**: 263-282.
- Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst* **4**:2.
- Oren, A. 2009a. Microbial diversity and microbial abundance in salt saturated brines: why are the waters of hypersaline lakes red? *Natural Resources and Environmental Issues: Vol. 15, Article 49*.

- Oren, A. 2009b. Saltern evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. *Aquat Microb Ecol* **56**:193-204.
- Oren, A. 2010. The dying Dead Sea: the microbiology of an increasingly extreme environment. *Lakes & Reservoirs: Research & Management* **15**:215-222.
- Oren, A. 2013. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol Lett* **342**:1-9.
- Oren, A. 2014. Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles* **18**:825-834.
- Oren, A. 2015. Halophilic microbial communities and their environments. *Curr Opin Biotechnol* **33**:119-124.
- Oren, A. 2016. Glycerol metabolism in hypersaline environments. *Environ Microbiol*. doi: 10.1111/1462-2920.13493.
- Oren, A., G. Bratbak, et M. Heldal. 1997. Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea. *Extremophiles* **1**:143-149.
- Oren A., R. Eleveli, S. Watanabe, K. Ihara, et A. Corcelli. 2002. *Halomicrobium mukohataei* gen. nov., comb. nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1831-1835
- Oren, A. et P. Gurevich. 1995. Diversity of lactate metabolism in halophilic archaea. *Can J Microbiol* **41**:302-307.
- Oren, A., P. Gurevich, R. T. Gemmell, et A. Teske. 1995. *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. *International J System Evol Microbiol* **45**:747-754.
- Oren, A. et F. Rodríguez-Valera. 2001. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* **36**:123-130.
- Ortenberg, R. et M. Mevarech. 2000. Evidence for post-translational membrane insertion of the integral membrane protein bacterioopsin expressed in the heterologous halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem* **275**:22839-22846.
- Ozcan, B., G. Ozyilmaz, C. Cokmus, et M. Caliskan. 2009. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**:105-110.
- Ozgen, M., A. Attar, Y. Elalmis, M. Birbir, et S. Yucel. 2016. Enzymatic activity of a novel halotolerant lipase from *Haloarcula hispanica* 2TK2. *Pol J Chem Technol*. **18**:20-25.
- Paterek, J. R. et Smith, P. H. 1988. *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int J Syst. Bacteriol* **38**:122-123.
- Patrzykat, A., L. Zhang, V. Mendoza, G. K. Iwama, et R. E. Hancock. 2001. Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1337-1342.
- Park, C. B., M. S. Kim, et S. C. Kim. 1996. A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo* gargarizans. *Biochem Biophys Res Commun* **218**:408-413.
- Park, I. Y., C. B. Park, M. S. Kim, et S. C. Kim. 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett* **437**:258-262.
- Parks, W. M., A. R. Bottrill, O. A. Pierrat, M. C. Durrant, et A. Maxwell. 2007. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie* **89**:500-507.
- Parolis, H., L. A. Parolis, I. F. Boán, F. Rodríguez-Valera, G. Widmalm, M. C. Manca, P.-E. Jansson, et I. W. Sutherland. 1996. The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydr Res* **295**:147-156.

- Pašić, L., B. Velikonja, et N. P. Ulrih. 2008. Optimization of the culture conditions for the production of a bacteriocin from halophilic archaeon Sech7a. *Prep Biochem Biotechnol* **38**:229-245.
- Paul, S., S. K. Bag, S. Das, E. T. Harvill, et C. Dutta. 2008. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biol* **9**:1.
- Pedrós-Alió, C. 2004. Trophic ecology of solar salterns. Pages 33-48. *Halophilic microorganisms*. Springer.
- Peeters, E., R. P. Driessen, F. Werner, et R. T. Dame. 2015. The interplay between nucleoid organization and transcription in archaeal genomes. *Nature Rev Microbiol* **13**:333-341.
- Perez-Pomares, F., V. Bautista, J. Ferrer, C. Pire, F. C. Marhuenda-Egea, et M. J. Bonete. 2003. Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* **7**:299-306.
- Petit, V. W., J.-L. Rolland, A. Blond, C. Cazevieille, C. Djediat, J. Peduzzi, C. Goulard, E. Bachère, J. Dupont, et D. Destoumieux-Garzón. 2016. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1860**:557-568.
- Pfeifer, F. et P. Ghahraman. 1993. Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarium*: characterization of the replicon region, the gas vesicle gene cluster and insertion elements. *Molecular and General Genetics MGG* **238**:193-200.
- Pfeiffer, F., A. Broicher, T. Gillich, K. Klee, J. Mejía, M. Rampp, et D. Oesterhelt. 2008. Genome information management and integrated data analysis with HaloLex. *Arch Microbiol* **190**:281-299.
- Pietilä, M. K., N. S. Atanasova, V. Manole, L. Liljeroos, S. J. Butcher, H. M. Oksanen, et D. H. Bamford. 2012. Virion architecture unifies globally distributed pleolipoviruses infecting halophilic archaea. *J Virol* **86**:5067-5079.
- Pietilä, M. K., T. A. Demina, N. S. Atanasova, H. M. Oksanen, et D. H. Bamford. 2014. Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. *Trends Microbiol* **22**:334-344.
- Platas, G., I. Meseguer, et R. Amils. 1996. Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3. *Microbiologia* **12**:75-84.
- Platas, G., I. Meseguer, et R. Amils. 2002. Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. *Int Microbiol* **5**:15-19.
- Podoriesz, A. P. et H. E. Huttunen-Hennelly. 2010. The effects of tryptophan and hydrophobicity on the structure and bioactivity of novel indolicidin derivatives with promising pharmaceutical potential. *Org Biomolec Chem* **8**:1679-1687.
- Poli, A., P. Di Donato, G. R. Abbamondi, et B. Nicolaus. 2011. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea* **2011**:693253.
- Popescu, G. et L. Dumitru. 2009. Biosorption of some heavy metals from media with high salt concentrations by halophilic archaea. *Biotechnol Biotech Equip* **23**:791-795.
- Porter, K., P. Kukkaro, J. K. Bamford, C. Bath, H. M. Kivelä, M. L. Dyall-Smith, et D. H. Bamford. 2005. SH1: a novel, spherical halovirus isolated from an Australian hypersaline lake. *Virology* **335**:22-33.
- Powers, J.-P. S. et R. E. Hancock. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**:1681-1691.

- Prangishvili, D., I. Holz, E. Stieger, S. Nickell, J. K. Kristjansson, et W. Zillig. 2000. Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic Archaeal genus *Sulfolobus*. *J Bacteriol* **182**:2985-2988.
- Price, L. B. et R. F. Shand. 2000. Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* **182**:4951-4958.
- Quadri, I., I. I. Hassani, S. l'Haridon, M. Chalopin, H. Hacène, et M. Jebbar. 2016. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiol Res* **186**:119-131.
- Raad, I., H. Hanna, Y. Jiang, T. Dvorak, R. Reitzel, G. Chaiban, R. Sherertz, et R. Hachem. 2007. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1656-1660.
- Radler, F. 1990. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. *Am J Enol Vit* **41**:1-6.
- Rampelotto, P. H. 2010. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability* **2**:1602-1623.
- Rashid, R., M. Veleba, et K. A. Kline. 2016. Focal Targeting of the bacterial envelope by antimicrobial peptides. *Front Cell Dev Biol* **4**:55.
- Rebuffat, S. 2012. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem Soc Trans* **40**:1456-1462.
- Riley, M. et D. Gordon. 1999a. A model of intraspecific microbial warfare. *Trends Microbiol* **7**:129-133.
- Riley, M. A. et D. M. Gordon. 1999b. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol* **7**:129-133.
- Riley, M. A. et J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Revi Microbiol* **56**:117-137.
- Robinson, C. K., K. Webb, A. Kaur, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, N. S. Baliga, A. Place, et J. DiRuggiero. 2011. A major role for nonenzymatic antioxidant processes in the radioresistance of *Halobacterium salinarum*. *J Bacteriol* **193**:1653-1662.
- Rodrigo-Baños, M., I. Garbayo, C. Vilchez, M. J. Bonete, et R. M. Martínez-Espinosa. 2015. Carotenoids from *Haloarchaea* and their potential in biotechnology. *Marine Drugs* **13**:5508-5532.
- Rodriguez-Valera, F., F. Ruiz-Berraquero, et A. Ramos-Cormenzana. 1981. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol* **7**:235-243.
- Rodriguez-Valera, F., G. Juez, et D. Kushner. 1982. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can J Microbiol* **28**:151-154.
- Romano, I., B. Nicolaus, L. Lama, M. C. Manca, et A. Gambacorta. 1996. Characterization of a haloalkalophilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. *System Appl Microbiol* **19**:326-333.
- Rothschild, L. J. et R. L. Mancinelli. 2001. Life in extreme environments. *Nature* **409**:1092-1101.
- Ruas-Madiedo, P. et C. De Los Reyes-Gavilán. 2005. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* **88**:843-856.
- Ruepp, A. et J. Soppa. 1996. Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster. *J Bacteriol* **178**:4942-4947.

- Rumjuankiat, K., R. H. Perez, K. Pilasombut, S. Keawsompong, T. Zendo, K. Sonomoto, et S. Nitisinprasert. 2015. Purification and characterization of a novel plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *W J Microbiol Biotechnol* **31**:983-994.
- Ruschak, A. M., J. D. Rose, M. P. Coughlin, et T. L. Religa. 2013. Engineered solubility tag for solution NMR of proteins. *Protein Sci* **22**:1646-1654.
- Saito, T., Y. Miyabe, H. Ide, et O. Yamamoto. 1997. Hydroxyl radical scavenging ability of bacterioruberin. *Radiation Phys Chem* **50**:267-269.
- Salgaonkar, B. B., K. Mani, et J. M. Bragança. 2013. Accumulation of polyhydroxyalkanoates by halophilic archaea isolated from traditional solar salterns of India. *Extremophiles* **17**:787-795.
- Salin, M. L. et D. Oesterhelt. 1988. Purification of a manganese-containing superoxide dismutase from *Halobacterium halobium*. *Arch Biochem Biophys* **260**:806-810.
- Salin, M. L., M. V. Duke, D. Oesterhelt, et D. P. Ma. 1988. Cloning and determination of the nucleotide sequence of the Mn-containing superoxide dismutase gene from *Halobacterium halobium*. *Gene* **70**:153-159.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, USA.
- Santorelli, M., L. Maurelli, G. Pocsfalvi, I. Fiume, G. Squillaci, F. La Cara, G. del Monaco, et A. Morana. 2016. Isolation and characterisation of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Int J Biol Macromol* **92**:174-184.
- Santos, F., A. Meyerdierks, A. Peña, R. Rosselló-Mora, R. Amann, et J. Antón. 2007. Metagenomic approach to the study of halophages: the environmental halophage 1. *Environ Microbiol* **9**:1711-1723.
- Santos, F., P. Yarza, V. Parro, I. Meseguer, R. Rosselló-Móra, et J. Antón. 2012. Culture-independent approaches for studying viruses from hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* **78**:1635-1643.
- Sargent, F., B. C. Berks, et T. Palmer. 2006. Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microb Lett* **254**:198-207.
- Sarma, B. K., H. B. Singh, D. Fernando, R. N. Silva, et V. K. Gupta. 2016. Enhancing Plant Disease Resistance without R Genes. *Trends Biotechnol.* **34**:523-525.
- Satyanarayana, T., C. Raghukumar, et S. Shivaji. 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Sci* **89**:78-90.
- Savage K.N., L.R. Krumholz, A. Oren, et M.S. Elshamed. 2007. *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov, sp. nov, a halophilic archaeon isolated from a low-saltsulfite-rich spring. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:19-24.
- Savage K.N., L.R. Krumholz, A. Oren, et M.S. Elshamed. 2008. *Halosarcina pallida* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon from a low-salt, sulfide-rich spring. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:856-860.
- Saxena, R. K., K. Dutt, L. Agarwal, et P. Nayyar. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Biorese Technol* **98**:260-265.
- Scandalios, J. G. 2004. Genomic responses to oxidative stress. In: Meyers RA (Editor), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Vol. 5. 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 489-512.
- Scandalios, J. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* **38**:995-1014.
- Schaefer, A. L., D. L. Val, B. L. Hanzelka, J. Cronan, et E. Greenberg. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:9505-9509.

- Schimz, A. et Hildebrand, E. 1979. Chemosensory responses of *Halobacterium halobium*. J Bacteriol **140**: 749-753.
- Schleifer, K., J. Steber, et H. Mayer. 1982. Chemical composition and structure of the cell wall of *Halococcus morrhuae*. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie **3**:171-178.
- Schnabel, H., E. Schramm, R. Schnabel, et W. Zillig. 1982. Structural variability in the genome of phage ϕ H of *Halobacterium halobium*. Molec Gen Genet **188**:370-377.
- Schreier, H. J., K. A. Robinson-Bidle, A. M. Romashko, et G. V. Patel. 1999. Heterologous expression in the Archaea: transcription from *Pyrococcus furiosus* *gdh* and *mlrA* promoters in *Haloferax volcanii*. Extremophiles **3**:11-19.
- Schultz, M., J. Bendick, E. Holm, et W. Hertel. 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. Biofouling **27**:87-98.
- Shahmohammadi, H. R., E. Asgarani, H. Terato, T. Saito, Y. Ohshima, K. Gekko, O. Yamamoto, et H. Ide. 1998. Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents. J Rad Res **39**:251-262.
- Shand, R. F., L. B. Price, et E. M. O'Connor. 1998. 24 Halocins: Protein Antibiotics from Hypersaline Environments. Microbiol Biogeochem Hypersal Environ **5**:295.
- Shand, R. F. et K. J. Leyva. 2007. Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobocins. Pages 93-109 Bacteriocins. Springer.
- Shand, R. F. et K.J. Leyva, 2008. Archaeal antimicrobials: an undiscovered country, in: P. Blum (Ed.), Archaea: New Models for Prokaryotic Biology, Horizon Scientific Press. 233-243.
- Shimane Y., Y. Hatada, H. Minegishi, T. Mizuki, A. Echigo, M. Miyazaki, Y. Ohta, R. Usami, W. D. Grant, et K. Horikoshi. 2010. *Natronoarchaeum mannilyticum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic archaeon isolated from commercial salt. Int J Syst Evol Microbiol **60**:2529-2534.
- Shimane Y., Y. Hatada, H. Minegishi, A. Echigo, S. Nagaoka, M. Miyazaki, Y. Ohta, T. Maruyama, R. Usami, W. D. Grant, et K. Horikoshi. 2011. *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea isolated from commercial salt. Int J Syst Evol Microbiol **61**:2266-2270.
- Skerman V. B. D., V. McGowan, et P. H. A. Sneath. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. Int J Syst Bacteriol **30**: 225-420.
- Smith, D. R. et M. Dworkin. 1994. Territorial interactions between two *Myxococcus* species. J Bacteriol **176**:1201-1205.
- Song, H. S., I.-T. Cha, K. J. Yim, H.-W. Lee, D.-W. Hyun, S.-J. Lee, S.-K. Rhee, K.-N. Kim, D. Kim, J.-S. Choi, M.-J. Seo, H.-J. Choi, J.-W. Bae, J.-K. Rhee, Y.-D. Nam, et S. W. Roh. 2014. *Halapricum salinum* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from non-purified solar salt. Ant van Leeuwen **105**:979-986.
- Song H. S., I.-T. Cha, J.-K. Rhee, K. J. Yim, A. Y. Kim, J.-S. Choi, S. J. Baek, M.-J. Seo, S - T. park, Y.-D. Dam, et S. W. Roh, 2016. *Halostella salina* gen. nov., so. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from solar salt. Int J Syst Evol Microbiol **66**:2740-2746.
- Soppa, J. et D. Oesterhelt. 1989. *Halobacterium* sp. GRB: a species to work with? Can J Microbiol **35**:205-209.
- Soppa, J., A. Baumann, M. Brenneis, M. Dambeck, O. Hering, et C. Lange. 2008. Genomics and functional genomics with haloarchaea. Arch Microbiol **190**:197-215.
- Sorokin, D. Y., T. Tourova, E. Galinski, C. Belloch, et B. Tindall. 2006. Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov.

- and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:379-388.
- Sorokin, D. Y., I. V. Kublanov, M. M. Yakimov, W. I. C. Rijpstra, et J. S. S. Damlé. 2016. *Halanaeroarchaeum sulfurireducens* gen. nov., sp. nov., the first obligately anaerobic sulfur-respiring haloarchaeon isolated from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**:2377-2381.
- Steber, J. et K. H. Schleifer. 1979. N-glycyl-glucosamine: a novel constituent in the cell wall of *Halococcus morrhuae*. *Arch Microbiol* **123**:209-212.
- Sui, L., L. Liu, et Y. Deng. 2014. Characterization of halophilic C 50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. *Chin J Oceanol Limnol* **32**:1280-1287.
- Sun, C., Y. Li, S. Mei, Q. Lu, L. Zhou, et H. Xiang. 2005. A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. *Mol Microbiol* **57**:537-549.
- Sun, J. N., W. Li, W. S. Jang, N. Nayyar, M. D. Sutton, et M. Edgerton. 2008. Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non- conventional sites within the ATPase domain. *Mol Microbiol* **70**:1246-1260.
- Takao, M., T. Kobayashi, A. Oikawa, et A. Yasui. 1989. Tandem arrangement of photolyase and superoxide dismutase genes in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **171**:6323-6329.
- Tang, S. L., C. Fisher, K. Ngui, S. D. Nuttall, et M. L. Dyll-Smith. 2004. Genome sequences of the head-tail haloviruses HF1 and HF2. Pages 255-262 *Halophilic Microorganisms*. Springer.
- Tazi, L., D. P. Breakwell, A. R. Harker, et K. A. Crandall. 2014. Life in extreme environments: microbial diversity in Great Salt Lake, Utah. *Extremophiles* **18**:525-535.
- Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**:211-222.
- Thompson JD, DG Higgins, TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673-4680.
- Tindall B. J., H. N. M. Ross, et W. D. Grant. 1984: *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **5**:41-57.
- Toke, O. 2005. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* **80**:717-735.
- Tomlinson, G. A. et L. I. Hochstein. 1976. *Halobacterium saccharovororum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* **22**:587-591.
- Tommonaro, G., G. R. Abbamondi, C. Iodice, K. Tait, et S. De Rosa. 2012. Diketopiperazines produced by the halophilic archaeon, *Haloterrigena hispanica*, activate AHL bioreporters. *Microb Ecol* **63**:490-495.
- Tonk, M. et A. Vilcinskas. 2016. The Medical potential of antimicrobial peptides from insects. *Curr Topics Med Chem*. 26-32.
- Torreblanca M., F. Rodriguez-Valera, G. Juez, A. Ventosa, M. Kamekura, et M. Kates. 1986. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar

- lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. Syst Appl Microbio **8**, 89-99.
- Torreblanca, M., I. Meseguer, et F. Rodríguez-Valera. 1989. Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. Microbiology **135**:2655-2661.
- Torreblanca, M., I. Meseguer, et F. Rodríguez-Valera. 1990. Effects of halocin H6 on the morphology of sensitive cells. Biochem Cell Biol **68**:396-399.
- Torreblanca, M., I. Meseguer, et A. Ventosa. 1994. Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. Lett Appl Microbiol **19**:201-205.
- Torregrosa-Crespo, J., R. Martínez-Espinosa, J. Esclapez, V. Bautista, C. Pire, M. Camacho, D. Richardson, et M. Bonete. 2016. Chapter Two-Anaerobic metabolism in *Haloferax* genus: Denitrification as case of study. Adv Microb Physiol **68**:41-85.
- Torsvik, T. et I. D. Dundas. 1974. Bacteriophage of *Halobacterium salinarium*. Nature **248**:680-681.
- Tossi, A., L. Sandri, et A. Giangaspero. 2000. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. Peptide Sci **55**:4-30.
- Trigui, H. 2011. Etude de l'adaptation des procarotes hétérotrophes halophiles à l'environnement hypersalé: Impact des stress salin, UV et oxydant. Thèse à l'université de Sfax. 182.
- Trigui, H., S. Masmoudi, C. Brochier-Armanet, A. Barani, G. Grégori, M. Denis, S. Dukan, et S. Maalej. 2011a. Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and phylogenetic analysis. Extremophiles **15**:347-358.
- Trigui, H., Masmoudi, S., Brochier-Armanet, C., Maalej, S. et Dukan, S. 2011b. Characterization of *Halorubrum sfaxence* sp.nov., a new halophilic archaeon isolated from the solar saltern of Sfax in Tunisia. Int J Microb. ID 240191. 1-8.
- Trigui, H., S. Masmoudi, C. Brochier-Armanet, S. Maalej, et S. Dukan. 2011c. Survival of extremely and moderately halophilic isolates of Tunisian solar salterns after UV-B or oxidative stress. Can J Microbiol **57**:923-933.
- Ullah, H., J.-G. Chen, B. Temple, D. C. Boyes, J. M. Alonso, K. R. Davis, J. R. Ecker, et A. M. Jones. 2003. The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. Plant Cell **15**:393-409.
- Vaisman, N. et A. Oren. 2009. *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the *Bacteroidetes*. Int J System Evol Microbiol **59**:2571-2574.
- Van Kranenburg, R., I. C. Boels, M. Kleerebezem, et W. M. de Vos. 1999. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. Curr Opin Biotechnol **10**:498-504.
- Vassiliadis G, D. destoumieux-Garzon, C. Lombard, S. Rebuffat, et J. Peduzzi. 2010. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. Antimicrob Agents Chemother **54**:288-297.
- Ventosa, A. 2006. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. Page 223 in Symposia-Society for General Microbiology. Cambridge; Cambridge University Press; 1999.
- Ventosa A, et Oren A. 1996. *Halobacterium salinarum* nom. corrig., a name to replace *Halobacterium salinarium* (Elazari-Volcani) and to include *Halobacterium halobium* and *Halobacterium cutirubrum*. Int J Sys Bacteriol **46**:347
- Ventosa, A., J. J. Nieto, et A. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol R **62**:504-544.

- Ventosa A., M.C. Gutiérrez, M. Kamekura, et M. L. Dyal-smith. 1999. Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**:131-136.
- Ventosa, A., A. B. Fernández, M. J. León, C. Sánchez-Porro, et F. Rodríguez-Valera. 2014. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* **18**:811-824.
- Ventosa, A., R. R. de la Haba, C. Sanchez-Porro, et R. T. Papke. 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Curr Opin Microbiol* **25**:80-87.
- Vetriani, C., W. Holger, H. W. Jannasch, B. J. MacGregor, D. A., Stahl et A. L. Reysenbach. 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microb.* **65**:4375–4384.
- Vidyasagar, M., S. Prakash, C. Litchfield, et K. Sreeramulu. 2006. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea* **2**:51-57.
- Vílchez, C., E. Forján, M. Cuaresma, F. Bédmar, I. Garbayo, et J. M. Vega. 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine Drugs* **9**:319-333.
- Vincent, P. A. et R. D. Morero. 2009. The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. *Curr Med Chem* **16**:538.
- Vreeland R.H., S. Straight, J. Krammes, K. Dougherty, W.D. Rosenzweig, et M. Kamakura. 2002. *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. *Extremophiles* **6**:445-452.
- Wainø, M., B. Tindall, et K. Ingvorsen. 2000. *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *Int J System Evol Microbiol* **50**:183-190.
- Wais, A., M. Kon, R. MacDonald, et B. Stollar. 1975. Salt-dependent bacteriophage infecting *Halobacterium cutirubrum* and *H. halobium*. *Nature* **256**: 314–315.
- Wais, A. C. et L. L. Daniels. 1985. Populations of bacteriophage infecting *Halobacterium* in a transient brine pool. *FEMS Microbiol Ecol* **1**:323-326.
- Walsby, A. E. (1980). A square bacterium. *Nature* **283**:69-71.
- Wang, G. 2014. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceut* **7**:545-594.
- Wang, H., N. Peng, S. A. Shah, L. Huang, et Q. She. 2015. Archaeal extrachromosomal genetic elements. *Microbiol Molec Biol R* **79**:117-152.
- Wang, X. et G. Wang. 2016. Insights into antimicrobial peptides from spiders and scorpions. *Prot Pept Lett.* **23**:707-721.
- Wanner, C. et J. Soppa. 1999. Genetic identification of three ABC transporters as essential elements for nitrate respiration in *Haloferax volcanii*. *Genetics* **152**:1417-1428.
- Ward, J. et I. Kuo. 1970. The effect of chloride ions on the γ -radiation-induced destruction of DNA, nucleosides and nucleotides in aqueous solution. *Int J Rad Biol Rel Stud in Phys, Chemi Med* **18**:381-390.
- Webb, K. M., J. Yu, C. K. Robinson, T. Noboru, Y. C. Lee, et J. DiRuggiero. 2013. Effects of intracellular Mn on the radiation resistance of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Extremophiles* **17**:485-497.
- Weydert, C. J. et J. J. Cullen. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* **5**:51-66.
- Wilharm, T., Zhilina, T. N. et Hummel, P. 1991. DNA–DNA hybridization of methylotrophic halophilic methanogenic bacteria and transfer of *Methanococcus halophilus* VP to the

- genus *Methanohalophilus* as *Methanohalophilus halophilus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **41**:558–562.
- Williams, T. A., P. G. Foster, C. J. Cox, et T. M. Embley. 2013. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* **504**:231-236.
- Woese, C. R. and G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5088-5090.
- Wu, W.-L., S.-J. Lai, J.-T. Yang, J. Chern, S.-Y. Liang, C.-C. Chou, C.-H. Kuo, M.-C. Lai, et S.-H. Wu. 2016. Phosphoproteomic analysis of *Methanohalophilus portucalensis* FDF1T identified the role of protein phosphorylation in methanogenesis and osmoregulation. *Sci Rep* **6**.
- Wu, Z., H. Liu, J. Liu, X. Liu, et H. Xiang. 2012. Diversity and evolution of multiple *orc/cdc6*-adjacent replication origins in haloarchaea. *BMC genomics* **13**:1.
- Xu, T., S. Levitz, R. Diamond, et F. Oppenheim. 1991. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun* **59**:2549-2554.
- Xu Y., P. Zhou, et X. Tian. 1999. Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea, *Natronorubrum bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**:261-266.
- Xue, Y., H. Fan, A. Ventosa, W.D. Grant, B.E. Jones, D.A. Cowan, et Y. Ma. 2005. *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov., sp. nov., representing a novel genus of haloalkaliphilic archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:2501-2505.
- Yang, L., T. M. Weiss, R. I. Lehrer, et H. W. Huang. 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J* **79**:2002-2009.
- Yang, S.-C., C.-H. Lin, C. T. Sung, et J.-Y. Fang. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* **5**:1-10.
- Yang, Y., R. Yatsunami, A. Ando, N. Miyoko, T. Fukui, S. Takaichi, et S. Nakamura. 2015. Complete biosynthetic pathway of the C50 carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *J Bacteriol* **197**:1614-1623.
- Ye, Z.-W., J.-G. Jiang, et G.-H. Wu. 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnol Adv* **26**:352-360.
- Yeaman, M. R. et N. Y. Yount. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* **55**:27-55.
- Yi, H.-Y., M. Chowdhury, Y.-D. Huang, et X.-Q. Yu. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:5807-5822.
- You, X.-Y., C. Liu, S.-Y. Wang, C.-Y. Jiang, S. A. Shah, D. Prangishvili, Q. She, S.-J. Liu, et R. A. Garrett. 2011. Genomic analysis of *Acidianus hospitalis* W1 a host for studying crenarchaeal virus and plasmid life cycles. *Extremophiles* **15**:487-497.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus skin*: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:5449-5453.
- Zhilina T. N., D. G. Zavarzina, V. V. Kevbrin et T. V. Kolganova. 2013. *Methanocalculus natronophilus* sp. nov., a new alkaliphilic hydrogenotrophic methanogenic archaeon from a soda lake, and proposal of the new family *Methanocalculaceae*. *Microbiology. (Russ)* **82**:686–694.
- Zillig, W., H. P. Arnold, I. Holz, D. Prangishvili, A. Schweier, K. Stedman, Q. She, H. Phan, R. Garrett, et J. K. Kristjansson. 1998. Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles* **2**:131-140.

Annexe

Articles publiés à partir des résultats issus des chapitres I et II

Une partie des résultats décrits dans le chapitre I a fait l'objet d'un premier article publié dans la revue *Extrémophiles*. Le principal objectif de cet article était d'identifier le potentiel de production de peptides antimicrobiens par des souches d'archées halophiles isolées de la saline de Sfax, en Tunisie.

Dans le cadre de ce travail nous avons également contribué à une seconde publication qui décrit la capacité d'une souche d'archée halophile ETR14, que nous avons identifiée au genre *Halorubrum*, à produire une activité protéolytique importante présentant une grande stabilité à la chaleur, à la variation de pH et à des concentrations en sel élevées.

Publication n°1:

Antagonistic interactions and production of halocin antimicrobial peptides among extremely halophilic prokaryotes isolated from the solar saltern of Sfax, Tunisia

F. Ghanmi , A. Carre- Mlouka, M. Vandervennet, I. Boujelben, D. Frikha, H. Ayadi, J. Peduzzi, S. Rebuffat, S. Maalej

Extremophiles. 2016 May; 20(3):363-374. doi: 10.1007/s00792-016-0827-9.

Publication n°2:

Characterization of halo-alkaline and thermostable protease from *Halorubrum ezzemoulense* strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia.

D.F. Dammak, S.M. Smaoui, **F. Ghanmi**, I. Boujelben, S. Maalej

Journal Basic of Microbiology (2016) Apr; 56(4):337-46. doi: 10.1002/jobm.201500475.

Antagonistic interactions and production of halocin antimicrobial peptides among extremely halophilic prokaryotes isolated from the solar saltern of Sfax, Tunisia

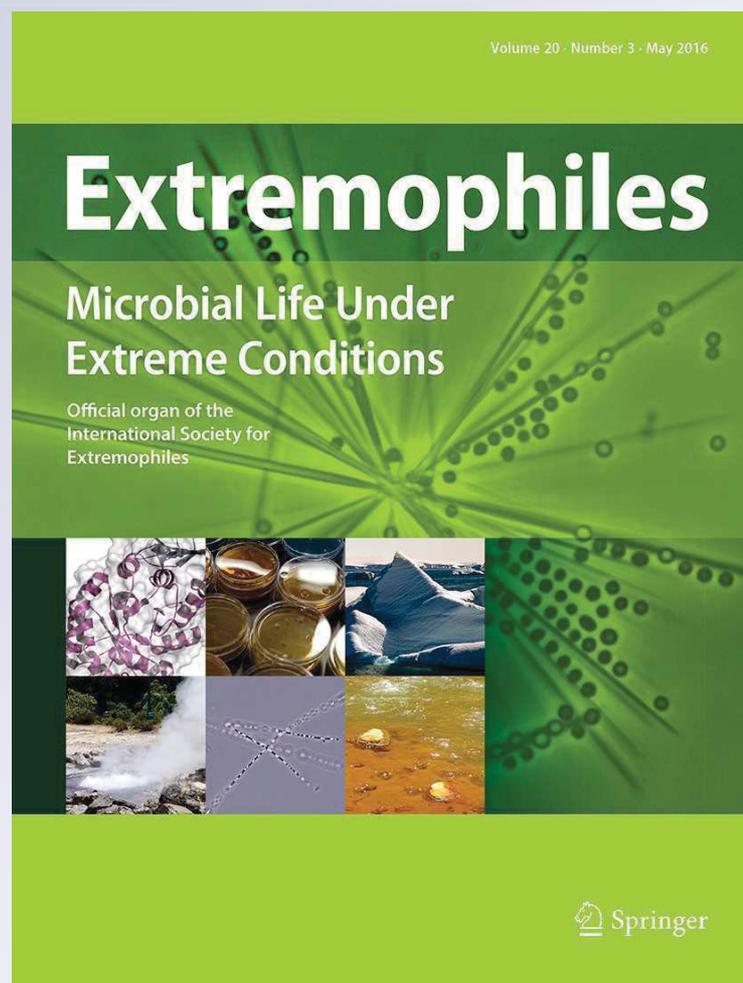
Fadoua Ghanmi, Alyssa Carré-Mlouka, Manon Vandervennet, Ines Boujelben, Doniez Frikha, Habib Ayadi, Jean Peduzzi, Sylvie Rebuffat, et al.

Extremophiles

Microbial Life Under Extreme Conditions

ISSN 1431-0651
Volume 20
Number 3

Extremophiles (2016) 20:363-374
DOI 10.1007/s00792-016-0827-9



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Japan. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Antagonistic interactions and production of halocin antimicrobial peptides among extremely halophilic prokaryotes isolated from the solar saltern of Sfax, Tunisia

Fadoua Ghanmi^{1,2} · Alyssa Carré-Mlouka² · Manon Vandervennet² · Ines Boujelben¹ · Doniez Frikha¹ · Habib Ayadi¹ · Jean Peduzzi² · Sylvie Rebuffat² · Sami Maalej¹

Received: 4 December 2015 / Accepted: 24 March 2016 / Published online: 13 April 2016
© Springer Japan 2016

Abstract Thirty-five extremely halophilic microbial strains isolated from crystallizer (TS18) and non-crystallizer (M1) ponds in the Sfax solar saltern in Tunisia were examined for their ability to exert antimicrobial activity. Antagonistic assays resulted in the selection of eleven strains that displayed such antimicrobial activity and they were further characterized. Three cases of cross-domain inhibition (archaea/bacteria or bacteria/archaea) were observed. Four archaeal strains exerted antimicrobial activity against several other strains. Three strains, for which several lines of evidence suggested the antimicrobial activity was, at least in part, due to peptide/protein agents (*Halobacterium salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, and *Haloterrigena thermotolerans* SS1R12), were studied further. Optimal culture conditions for growth and antimicrobial production were determined. Using DNA amplification with specific primers, sequencing and RT-PCR analysis, *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8 were shown to encode and express halocin

S8, a hydrophobic antimicrobial peptide targeting halophilic archaea. Although the gene encoding halocin H4 was amplified from the genome of *Htg. thermotolerans* SS1R12, no transcript could be detected and the antimicrobial activity was most likely due to multiple antimicrobial compounds. This is also the first report that points to four different strains isolated from different geographical locations with the capacity to produce identical halocin S8 proteins.

Keywords Solar saltern · Halophilic archaea · Antimicrobial peptides/proteins · Halocins

Abbreviation

OD Optical density

Introduction

Solar salterns, consisting of a series of shallow interconnected ponds filled with natural water from the sea or underground sources, have been used since antiquity for the harvest of salt for human consumption. These artificial thalassohaline extreme hypersaline environments are hostile to most macroscopic organisms, yet they are colonized by microorganisms having developed specific adaptations (Paul et al. 2008; Bardavid and Oren 2012; Reed et al. 2013; Oren 2015). Prokaryotic microorganisms belonging to the two domains, *Bacteria* and *Archaea*, thrive in these high salt concentration ecosystems (Oren 2008; Bardavid and Oren 2012; Oren 2013). Several studies focusing on the microbial diversity found in these ecosystems, using either molecular or culture-based approaches, have shown that archaea are the dominant colonizers (Antón et al. 1999; Enache et al. 2008; Ghai et al. 2011; Boujelben

Communicated by A. Oren.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00792-016-0827-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alyssa Carré-Mlouka
acarre@mnhn.fr

¹ Unité Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques Environnementaux (UR11ES/72), Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, BP 1171, 3000 Sfax, Tunisia

² Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245 CNRS-MNHN), Sorbonne Universités, Muséum national d'Histoire naturelle, Centre national de la Recherche scientifique (CNRS), CP 54, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

et al. 2012). When salinity reaches values close to saturation of NaCl, some archaeal populations become predominant to the exclusion of others; *Haloquadratum* and *Halobacterium* have frequently been cited as dominant genera, but the presence of populations dominated by *Halorubrum* sp. or *Haloarcula* sp. have also been reported (Baati et al. 2008; Ghai et al. 2011; Boujelben et al. 2014). One factor that may endow halophilic archaea with a competitive advantage is the production of gene-encoded antimicrobial peptides or proteins, named halocins (Rodriguez-Valera et al. 1982; Kirkup and Riley 2004; Kavitha et al. 2011; Atanasova et al. 2013; Besse et al. 2015). While production of antimicrobial peptides and proteins is considered to be a near-universal feature in all three domains of life (Torreblanca et al. 1994; Zassloff 2002; Cotter et al. 2005), little information is available on halocins, including their mechanism of target cell killing and their specificity (Torreblanca et al. 1994; Shand and Leyva 2008; Besse et al. 2015). Moreover, there is a lack of direct evidence that they are produced in sufficient amounts in natural environments to play a significant role in microbial competitions (Kis-Papo and Oren 2000; Atanasova et al. 2013).

Several previous studies have screened antimicrobial-producing microorganisms from hypersaline environments (Rodriguez-Valera et al. 1982; Torreblanca et al. 1986; Atanasova et al. 2013). Some of these studies allowed identification of several halocins, which were diverse in molecular mass, thermal stability, and salt-dependence, although only a few have been characterized thoroughly (Besse et al. 2015). Halocins are divided into high and low molecular mass halocins (Besse et al. 2015). Low molecular mass halocins (≤ 10 kDa), such as halocins R1/S8, A4/C8 or Sech7A, are hydrophobic peptides resistant to high temperatures or desalting. The antimicrobial activity of high molecular mass halocins (30–35 kDa), like halocins H1 and H4, is more sensitive to high temperatures and the absence of salts (Besse et al. 2015). Halocins have been reported to be produced erratically among the *Halobacteriales* by strains from genera *Haloferax*, *Natrinema*, or *Halobacterium*. However, no data is available concerning the distribution and expression of halocin genes among members of the *Halobacteriales*. It is unknown whether several strains or genera may have the capacity to produce one particular halocin, as it has been regularly observed among bacteria, often through horizontal transfer of antimicrobial peptide genes (Drider et al. 2006; Duquesne et al. 2007). The prokaryotic communities inhabiting the crystallizer and non-crystallizer pond waters of the multi-pond solar saltern of Sfax in Tunisia have been examined (Baati et al. 2008; Trigui et al. 2011a, b; Boujelben et al. 2012, 2014). Using molecular approaches, previous work focused on the diversity of the prokaryotic community from sediments and salt crystal samples found there. (Baati et al. 2010; Boujelben

et al. 2014). Those studies provide a detailed description of the diversity of the cultivable archaeal and bacterial fractions, for which members of the genera *Halorubrum* and *Salinibacter* were mostly found. However, the potential of such strains to produce halocins has never been reported.

This study identifies the antimicrobial potential of a collection of thirty-five halophilic bacterial and archaeal strains isolated from two ponds of high salinity (a crystallizer pond with a salinity of 390 g L^{-1} and a non-crystallizer pond with a salinity of 200 g L^{-1} (Trigui et al. 2011b) in the Sfax solar saltern in Tunisia. Three strains with significant antimicrobial activity were characterized further and shown to be potential producers of two known halocins, S8 and H4.

Materials and methods

Prokaryotic strains and growth conditions

The saltern of Sfax is located on the central Eastern coast of Tunisia (Trigui et al. 2011a, b; Boujelben et al. 2012). The sediment and water samples were collected in March 2007 from a crystallizer pond (TS18: 390 g L^{-1} total dissolved salts, $34^{\circ}43'N$ $10^{\circ}44'E$) and a non-crystallizer pond (M1: 200 g L^{-1} total dissolved salts, $34^{\circ}43'N$ $10^{\circ}44'E$) of the solar saltern of Sfax. The halophilic strains were isolated as described in Trigui et al. (2011a), leading to a collection of 35 halophilic isolates that were used in this study. All halophilic strains were routinely grown in SW25 medium (Difco yeast extract 5 g L^{-1} , NaCl 250 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 49.5 g L^{-1} ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 34.6 g L^{-1} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.95 g L^{-1} ; KCl 5 g L^{-1} ; NaBr 0.65 g L^{-1} ; NaHCO_3 0.167 g L^{-1} , pH 7.2), with 15 % agar (BD-Difco, France) for solid medium. For determination of the growth rate of *Halobacterium salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, and *Haloterrigena thermotolerans* SS1R12, stationary stage pre-cultures (allowing new culture growth in fresh medium) were used to inoculate 50 mL of SW25 growth medium with varying concentrations of NaCl (50, 100, 150, 200, 250, and 300 g L^{-1}) at a final OD at 600 nm (OD_{600}) = 0.1. Bacterial growth was monitored by measuring OD_{600} . Growth rate μ (h^{-1}) was calculated using two measures during the exponential phase with the equation $\mu = (\ln\text{OD}_2 - \ln\text{OD}_1) / (t_2 - t_1)$, where OD_1 and OD_2 are OD_{600} at time t_1 and t_2 (h), respectively.

Antimicrobial activity assays

The detection of antimicrobial activity was conducted using the agar well-diffusion method. Two milliliters of each target strain, sampled during the stationary phase of growth, were used to inoculate 20 mL of SW25 molten agar medium (agar 8 g L^{-1}). After pouring in Petri dishes,

wells with 0.5 cm diameter were aseptically punched. Aliquots (80 μL) of culture, culture supernatant or cell pellet of the producer strains were then deposited in the wells. The plates were incubated at 37 °C until a confluent microbial growth of the target strain was observed. Antimicrobial activity was detected by the formation around the well of a clear inhibition halo, measured in mm.

Phenotypic and enzymatic characterization of producing strains

Gram staining was carried out as described by Dussault (1955). Nitrate reduction, nitrite reduction, and urease activity were tested as described by Gerhardt et al. (1994). The assimilation of sugars introduced as single carbon sources at a final concentration of 0.1 % (w/v) was examined in modified SW25 medium where yeast extract was reduced to 0.05 % and NaCl to 20 % (w/v). The production of acid from sugar and other carbon sources was determined as described in Arahal et al. (1996). Strains were also tested on SW25 solid medium to screen for amylase, protease, lipase, and gelatinase activities by adding starch, skimmed milk, olive oil and gelatin as target substrates, respectively. The strains were inoculated by streaking one colony to the center of the plates. After incubation at 37 °C for 7–15 days, hydrolytic activities (amylase, gelatinase, lipase, urease and protease) were revealed as previously described (Kouker and Jaeger 1987; Oren et al. 1997; Salgaonkar et al. 2012).

Effect of heat, pH and proteolysis on the antimicrobial activities

The culture supernatants of producing strains used for these experiments were either from exponential or beginning of stationary phase, depending on the optimal phase for antimicrobial production. To monitor the effect of temperature, the culture supernatants or pellets from producing strains were subjected to various temperatures (37, 50, 60, 70, and 80 °C) for 15 min in a water bath, and then cooled to room temperature. To monitor the effects of pH changes, culture supernatants from producing strains, were adjusted in the range of pH 2–10 with sterile solutions of 1 N HCl or 1 N NaOH, and incubated for 2 h at 37 °C before re-adjusting the pH to 7.2. To monitor the effects of proteolysis, culture supernatants from producing strains were subjected to incubation with the halophilic protease-containing culture supernatant of *Salicola* sp. ES1R9 (identified as protease producer in this study, as described above) for 2 h at 45 °C. After each treatment, the residual antimicrobial activity was monitored using the agar well-diffusion method, as described above.

Detection of potential viral activity

When an inhibition halo was detected by the agar well-diffusion method, a fragment of agar was extracted from the clear zone of inhibition of the target strain and added to 250 mL of SW25 medium inoculated with 200 μL of the preculture of the target strains. The growth was monitored by measuring OD_{600} , and compared to growth without the agar fragment. The culture supernatant was tested during the exponential or beginning of stationary phase of growth by the agar well-diffusion method, as described above. A plaque assay was also performed, by inoculating crude culture supernatant (undiluted or diluted 2X, 5X, and 10X) together with target strain in molten agar medium, as described above.

Nucleic acid extraction, reverse transcription and PCR amplification

Genomic DNA was extracted from the cell pellet of a 40 mL stationary phase culture. It was resuspended in 1.8 mL of SET buffer (20 % sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.6). Cell lysis was obtained by adding 20 μL lysozyme (initial concentration 20 mg mL^{-1}) and incubating for 15 min at room temperature, 20 μL of 10 % SDS and incubating for 1 h with stirring, and 50 μL of 20 mg mL^{-1} proteinase K and incubating for 2 h at 55 °C, successively. After centrifugation, the lysate was dialyzed against MilliQ[®] water extensively overnight. DNA was extracted with chloroform and precipitated with isopropanol, as described (Sambrook et al. 1989). RNA extraction was performed using a 100 mL culture cell pellet using TriZOL[®] reagent, as recommended by the manufacturer (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher, France). Following treatment with 1 μL (1 U/ μL) DNase (Promega, France) for 3 h at 37 °C, RNA was further purified using PureLink[®] RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher, France). The extracted RNA (10 μg) was treated as follows: random primers (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Promega, France) and dNTP mix (0.5 mM) (Promega, France) were first added and the mixture incubated at 65 °C for 5 min; first strand buffer (1X) and DTT (0.1 M) were then added and the sample was further incubated for 2 min at 25 °C; 10 U of SuperscriptII[®] reverse transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher, France) was finally added and the incubation continued for 10 min at 25 °C. The reaction was stopped by incubation for 15 min at 70 °C.

PCR amplifications were performed using Promega reagents (France). Each 25 μL reaction mixture contained 1X PCR buffer, 10 μM dNTP mix, 0.4 μM of each primer, 1.25 U Taq polymerase, and 1 μL of genomic or cDNA template. The following PCR program was used: 95 °C for 30 s followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55–60 °C for 30 s and

72 °C for 1–2 min, followed by an extension step of 7 min at 72 °C. The oligonucleotide primers used were the specific 16S rDNA archaeal primers S-D-Arch-0025-a-S-17 (5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3') and S-*Univ-1517-a-A-21 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), or the eubacterial 16S rDNA primers Eubac 27F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3'), and Eubac 1492R (5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3') (Vetriani et al. 1999). The primers used for the amplification of the halocin genes were halS8-F1 (5'-GCTTCAGCTGTCGGATTTTC-3') and halS8-R1 (5'-CTTCAAGTATCGCGGACACA-3') for *halS8*, halH4-F1 (5'-CAGTCTCGGAGCGCTTAGTT-3') and halH4-R1 (5'-CGGATACTTGGGTTCTTCA-3') for *halH4*, C8-IG1 (5'-ACGCTGTGCGAGTAGGAGTT-3') and C8-IG2 (5'-GAGACGACGTTTCGAGGAATC-3') for *halC8*. Positive controls were performed using *Natrinema* sp. SWI6 for *halC8* (Imadalou-Idres et al. 2013) or *Haloferax mediterranei* DSM 1411 for *halH4* (Cheung et al. 1997). Amplified DNA was subjected to electrophoresis on 1 % (w/v) agarose gels in Tris–acetic acid–EDTA buffer containing 1X GelRed® (Biotium, VWR, France) and visualized under UV light.

PCR products were purified using the GeneClean Turbo® kit (MPBio, France) and cloned into the pGEM-T Easy vector following the manufacturer's instructions (Promega, France). Plasmid DNA was extracted using the QuickLyse® kit (Qiagen, France) and sequenced by Eurofins (Germany). The sequences were compared with the GenBank database using the BLASTN algorithm (Dereeper et al. 2008). Nucleotide sequences of the 16S rRNA genes from this study have been deposited in the Genbank database under the accession numbers listed in Table 1. Nucleotide sequences of the halocin genes identified have been deposited under accession numbers KT783468 for *halS8* from *Hbt. salinarum* ETD5, KR611166 for *halS8* from *Hbt. salinarum* ETD8, and KR611167 for *halH4* from *Htg. thermotolerans* SS1R12.

Results

Screening of halophilic strains producing antimicrobial activity

Thirty-five halophilic strains isolated from two ponds, TS18 and M1, of the solar saltern of Sfax were tested for their ability to produce antimicrobial agents targeting halophilic microorganisms. Among those, nineteen strains (listed in Table 1) were selected because they were either target or producer strains. Eleven of these strains inhibited the growth of at least one of the thirty-five tested isolates. The other isolates were not studied further. Table 2 summarizes antagonisms between the halophilic isolates. Seven

Table 1 Halophilic strains isolated from the solar saltern of Sfax

Strain	Sample origin	Identification (16S rRNA gene accession no)
ETD1	Water TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (HQ589030) ^a
<u>ETD2</u>	Water TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (HQ179134) ^a
ETD3	Water TS18	<i>Halorubrum chaoviator</i> (JX982772)
<u>ETD5</u>	Water TS18	<i>Halobacterium salinarum</i> (JX982770)
<u>ETD6</u>	Water TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (GU724599) ^a
<u>ETD8</u>	Water TS18	<i>Halobacterium salinarum</i> (JX982771)
ETD19	Water TS18	<i>Halobacterium salinarum</i> (KR611163)
ETD34	Water TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (KR611162)
ETR7	Water TS18	<i>Halorubrum</i> sp. (KR611164)
<u>ETR14</u>	Water TS18	<i>Halorubrum chaoviator</i> (KP827650)
<u>ES1D1</u>	Water M1	<i>Pseudomonas halophila</i> (HQ179135) ^a
ES1D6	Water M1	<i>Haloferax</i> sp. (HQ589031) ^a
ES1D29	Water M1	<i>Halorubrum</i> sp. (JX982777)
<u>ES1R9</u>	Water M1	<i>Salicola</i> sp. (KT440879)
ES1R10	Water M1	<i>Haloferax</i> sp. (HQ589032) ^a
<u>SS1R12</u>	Sediment M1	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> (JX982773)
<u>SS1R14</u>	Sediment M1	<i>Halorubrum tebenquichense</i> (JX982774)
<u>SS1R17</u>	Sediment M1	<i>Halorubrum chaoviator</i> (JX982775)
<u>SS1R21</u>	Sediment M1	<i>Halorubrum tebenquichense</i> (JX982776)

Strains exhibiting antimicrobial activity are underlined

^a Trigui et al. (2011a)

strains (ETD2, ETD6, ETR14, ES1D1, ES1R9, SS1R17, and SS1R21) exhibited antimicrobial activity against only one target strain, with inhibition halo diameters in the range 8–20 mm. Four other strains (ETD5, ETD8, SS1R12 and SS1R14) had the capacity to inhibit the growth of several other isolates, with strain ETD5 displaying the largest inhibition halos (diameter 35 mm). None of the tested strains was inhibited by its own production. Interestingly, the two strains displaying the widest inhibition halos (*Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8) against a broad range of target strains were insensitive to the produced antimicrobial activity of all the other identified strains (data not shown).

Phylogenetic assignment of selected strains

All the isolates of interest (nineteen strains, either exhibiting antimicrobial activity or sensitive to at least one active strain) were selected for further characterization. For each of them, genomic DNA was purified and amplified using universal archaeal and bacterial 16S rRNA gene primers. The nucleotide sequence was determined and analysed using the Blast algorithm (Dereeper et al. 2008). The identification of the strains, based on analysis of the 16S rRNA gene sequences, is presented in Table 1. Most of the isolates (17/19) belonged to the domain *Archaea*, order

Table 2 Antagonistic interactions between isolates

Producer strain	Target strain														
	ETD1	ETD2	ETD3	ETD6	ETD19	ETD34	ETR7	ETR14	ES1D1	ES1D6	ES1D29	ES1R10	SS1R14	SS1R17	SS1R21
ETD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
ETD5	+	++	++	+++	++	-	++	+++	+	+	+	+	-	++	+
ETD6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ETD8	+	-	-	-	+	-	++	+	-	-	+	-	+	+	+
ETR14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ES1R9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SS1R12	-	+	+	-	-	++	-	-	-	-	++	+	-	-	-
SS1R14	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
SS1R17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SS1R21	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-

Diameters (mm) of the inhibition halos (IH): +++ = $IH \geq 30$; ++ = $15 \leq IH < 30$; + = $8 \leq IH < 15$; - = no inhibition halo

All the strains isolated in this study were tested against each other (two replicates); this table includes only the producer strains for which at least one target strain is sensitive, and only the target strains sensitive to at least one producer strain. In other words, since strains ETD5, ETD8, ES1R9, and SS1R12 were not sensitive to any of the producer strains, they are therefore excluded as target strains in this table.

Table 3 Effect of heat and halophilic protease on the inhibition halos induced by the selected isolates on the target strains

Producer strain	Target strain	Inhibition halo (mm)			
		Control, 37 °C	70 °C ^a	80 °C	37 °C, protease
<i>Hbt. salinarum</i> ETD5	<i>Hrr. chaoviator</i> ETR14	26	24	8	–
<i>Hbt. salinarum</i> ETD8	<i>Hrr. chaoviator</i> SS1R17	15	15	8	–
<i>Htg. thermotolerans</i> SS1R12	<i>Hrr. chaoviator</i> ETD3	11	12	9	7

Inhibition halos (mm) are the mean values of three experiments. The untreated supernatant of the producer strain is used as control. –: no inhibition halo

^a Identical inhibition halos have been measured at 50 and 60 °C

Halobacteriales with a majority of members of the *Halorubrum* genus. This genus is the only one to be isolated from the two ponds TS18 and M1 of different salinities (390 and 200 g L⁻¹ total dissolved salts, respectively). Two bacterial strains, all isolated from pond M1, belonged to *Salicola* and *Pseudomonas*, both displaying antimicrobial activity. The eleven strains exhibiting antimicrobial activity arose almost equally from the crystallizer pond TS18 (5 strains) and the non-crystallizer pond M1 (6 strains).

Phenotypic characterization of the eleven strains with antimicrobial activity showed all strains but *Halorubrum* sp. ETD2 stained Gram-negative (Supplementary Table S1). A majority of strains was capable of nitrate reduction but only one, *Halorubrum tebenquichense* SS1R14 also reduced nitrite (Supplementary Table S1). Only three strains were able to grow on sucrose as a single source of carbon, while most strains used glucose or glycerol as a single source of carbon (Supplementary Table S1). The eleven strains were also tested on solid media for various secreted hydrolytic activities (Supplementary Table S2). Most of them could hydrolyze gelatin. Four strains were capable of degrading casein with proteolytic activity (Supplementary Table S2). Only one strain, *Pseudomonas halophila* ES1D1 did not exhibit any hydrolytic activity (Supplementary Table S2).

Localization and nature of the antimicrobial agents produced by the selected strains

Antimicrobial activities produced by microbial strains may be due to agents of various nature—lytic viruses, small secondary metabolites, or antimicrobial peptides/proteins, that either may be secreted or remain bound to the wall of the producing cells (Prangishvili et al. 2000; Sun et al. 2005). We first examined whether the antimicrobial activity was associated to the cell pellet or the culture supernatant of actively growing cultures (Supplementary Table S3). For all the eleven strains, the antimicrobial activity was detected in the cell pellet, which could be due to agents either bound to the cells, or secreted by newly growing cells. Only six strains (*Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, *P. halophila* ES1D1, *Salicola* sp. ES1R9,

Haloterrigena thermotolerans SS1R12, and *Halorubrum chaoviator* SS1R17) displayed antimicrobial activity in the culture supernatant (Supplementary Table S3), indicating that the corresponding antimicrobial agents were secreted. Three strains displaying secreted antimicrobial activity over the widest range of sensitive target strains, *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, *Htg. thermotolerans* SS1R12, were selected for further studies.

With the aim to determine the nature of the antimicrobial compounds secreted by the three selected strains, the effects of heat, pH modification, and proteolysis were examined. The culture supernatant of *Salicola* sp. ES1R9 was used as a source of halophilic protease (Supplementary Table S2). Modification of the pH (2–10) had no effect on the antimicrobial activity of the three tested strains (data not shown). For *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8, the antimicrobial activity was stable up to 70 °C, but the inhibition halo decreased upon heating at 80 °C (Table 3). Furthermore, treatment with 50 µL of *Salicola* sp. ES1R9 culture supernatant as a source of protease totally inhibited the antimicrobial activity, strongly suggesting that the antimicrobial agent was of proteic nature (Table 3). In contrast, the antimicrobial activity of *Htg. thermotolerans* SS1R12 was not significantly altered by heating at 80 °C, but the protease treatment decreased the observed inhibition halos (Table 3), thus suggesting the presence of multiple antimicrobial agents.

To rule out that the observed antimicrobial activities could be due to the lytic activity of viral particles, we sampled agar fragments from the inhibition zones produced by *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8, and *Htg. thermotolerans* SS1R12 on sensitive strains (respectively *Hrr. chaoviator* ETR14, SS1R17, and ETD3). If viruses were present in these agar fragments, adding them to actively growing liquid cultures of sensitive strains would impair microbial growth, due to replication of viral particles. Conversely, microbial growth would not be impacted if only soluble antimicrobial compounds were present, because they would be highly diluted in the culture medium. We observed that the growth curves of the three target strains with and without the agar fragments were identical (data not shown). In addition, we tested

the antimicrobial activity of the target strain supernatants, because it would contain replicated viral particles if a virus had been initially present. We did not observe any inhibition halo (data not shown), thus ruling out a lytic virus origin of the antimicrobial activities observed. Moreover, no plaques could be observed in a plaque assay using crude or diluted culture supernatant inoculated together with target strain in molten agar medium, which demonstrates the absence of a virus.

Effect of NaCl concentrations on growth of the selected strains and production of antimicrobial compounds

To determine the optimal conditions for growth of *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 and *Htg. thermotolerans* SS1R12 and production of antimicrobial compounds, the effects of various concentrations of NaCl (50–300 g L⁻¹) were monitored (Fig. 1). The growth rates μ (h⁻¹) were determined during the exponential-stage of growth and inhibition halos of culture supernatants were measured from the transition between the exponential and stationary stages. The three strains were able to grow between 50 and 300 g L⁻¹ NaCl, with optimal NaCl concentrations for growth at 150–200 g L⁻¹ for *Hbt. salinarum* ETD5 (Fig. 1a), 150 g L⁻¹ for *Hbt. salinarum* ETD8 (Fig. 1b) and 200 g L⁻¹ for *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Fig. 1c). The optimal NaCl concentrations for antimicrobial production were 200–250, 150, and 100–200 g L⁻¹ for *Hbt. salinarum* ETD5 (Fig. 1a), *Hbt. salinarum* ETD8 (Fig. 1b) and *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Fig. 1c), respectively. Only *Hbt. salinarum* ETD8 displayed the same NaCl optimum for growth and antimicrobial production. Taking into account these results, a concentration of NaCl at 150 g L⁻¹ was used to grow *Hbt. salinarum* ETD8, while for *Hbt. salinarum* ETD5 and *Htg. thermotolerans* SS1R12, the strains were grown at the optimal NaCl concentration for antimicrobial production (200 g L⁻¹) for all further experiments.

Antimicrobial production during growth at optimal conditions

To determine the optimal growth phase for production of the antimicrobial compound by strains *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 and *Htg. thermotolerans* SS1R12, the strains were grown at the optimal conditions defined above, and both microbial growth and antimicrobial activity were monitored, using culture supernatants for antimicrobial assays. For *Hbt. salinarum* ETD5 (Fig. 2a) and *Hbt. salinarum* ETD8 (Fig. 2b), antimicrobial production was maximal at the end of the exponential

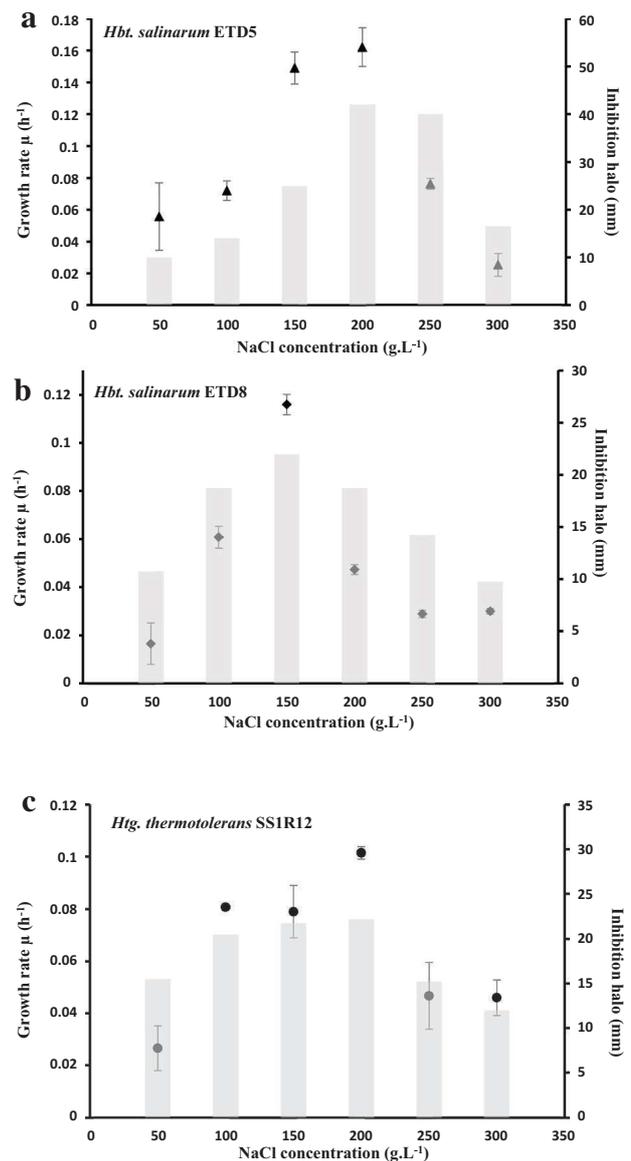


Fig. 1 Growth rate μ (h⁻¹) of *Hbt. salinarum* ETD5 (a, filled triangle), *Hbt. salinarum* ETD8 (b, filled diamond) and *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c, filled circle) grown at different concentrations of NaCl, and inhibition halos (gray bars) produced by culture supernatant against target strains of *Hrr.chaoviator* ETR14 (a), SS1R17 (b), and ETD3 (c). Growth rates are calculated during the exponential phase of growth and are presented as the mean of three independent experiments with standard error of the mean. Antimicrobial activity of supernatants is evaluated by radial diffusion assays and measure of the inhibition halos (standard deviation values were less than 5 % and are not indicated)

growth phase, while it was detectable with almost similar intensity all along growth, decreasing only during the stationary phase, for *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Fig. 2c).

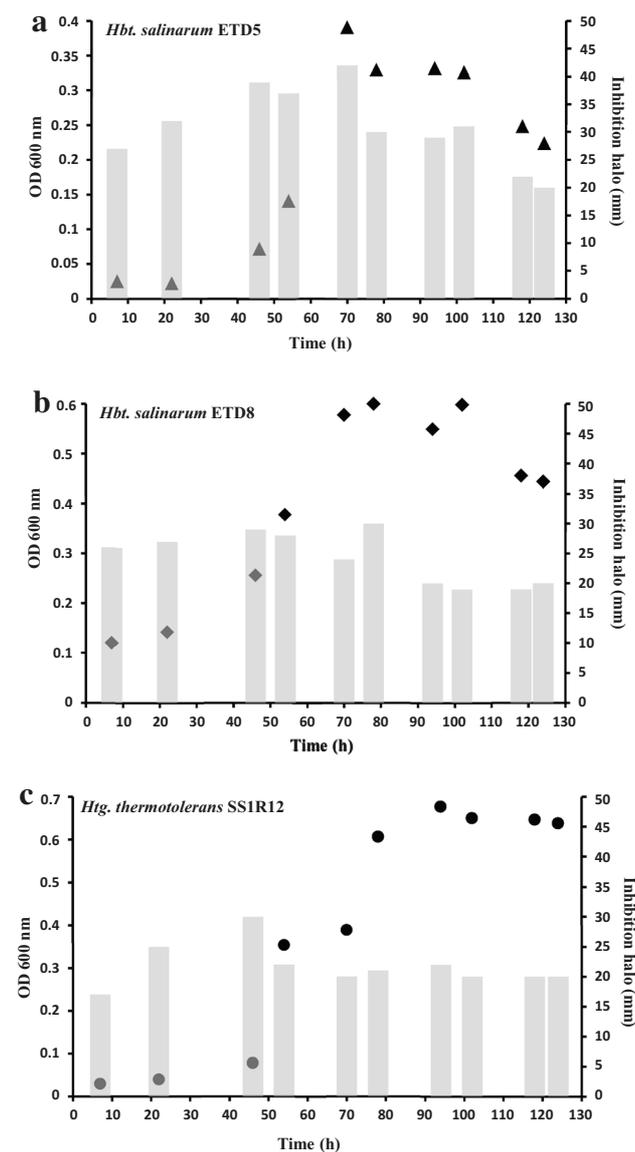


Fig. 2 Growth of *Hbt. salinarum* ETD5 (a, filled triangle), *Hbt. salinarum* ETD8 (b, filled diamond) and *Htg. thermotolerans* SS1R12 (c, filled circle), and inhibition halos (gray bars) produced by culture supernatant against target strains of *Hrr.chaoviator* ETR14 (a), SS1R17 (b), and ETD3 (c). Antimicrobial activity of supernatants was evaluated by radial diffusion assays and measure of the inhibition halos. Growth experiments and antimicrobial assays were performed in triplicate and are presented as the mean of three independent experiments; the standard deviation values for inhibition halos were less than 5 %

Identification and expression of halocin genes

As evidenced above, *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 and *Htg. thermotolerans* SS1R12 are suspected of producing a secreted proteinaceous antimicrobial compound. Although several halocins have been reported in the literature, the sequences of the encoding genes are available

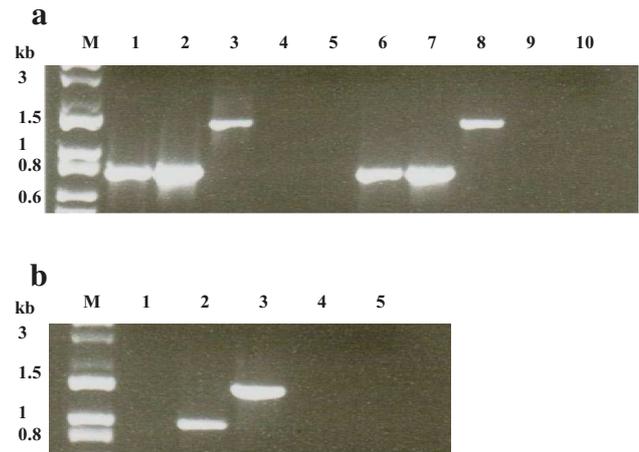


Fig. 3 Transcriptional analysis of halocin genes *halS8* in *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8 (a) and *halH4* in *Htg. thermotolerans* SS1R12 (b). **a** M Marker ExactLadder[®] DNA PreMix 2 Log (Ozyme), 1–5 *Hbt. salinarum* ETD5, 6–10 *Hbt. salinarum* ETD8, 1 and 6 cDNA amplified with *halS8*-specific primers *halS8*-F1 and *halS8*-R1, 2 and 7 genomic DNA amplified with *halS8*-specific primers *halS8*-F1 and *halS8*-R1, 3 and 8 cDNA amplified with archaeal 16S DNA primers S-D-Arch-0025-a-S-17 and S-*Univ-1517-a-A-21, 4 and 9 RNA amplified with *halS8*-specific primers *halS8*-F1 and *halS8*-R1, 5 and 10 RNase free water amplified with *halS8*-specific primers *halS8*-F1 and *halS8*-R1. **b** M Marker ExactLadder[®] DNA PreMix 2 Log (Ozyme, France), 1 cDNA amplified with *halH4*-specific primers *halH4*-F1 and *halH4*-R1, 2 genomic DNA amplified with *halH4*-specific primers *halH4*-F1 and *halH4*-R1, 3 cDNA amplified with archaeal 16S DNA primers S-D-Arch-0025-a-S-17 and S-*Univ-1517-a-A-21, 4 RNA amplified with *halH4*-specific primers *halH4*-F1 and *halH4*-R1, 5 RNase free water amplified with *halH4*-specific primers *halH4*-F1 and *halH4*-R1

for only three of them, halocin C8 (HalC8), halocin H4 (HalH4) and halocin S8 (HalS8) (Besse et al. 2015). To determine whether the antimicrobial activity exhibited by the three strains was due to a known halocin, PCR experiments using specific primers for genes *halC8*, *halS8* and *halH4* were performed on genomic DNA. A fragment of expected size (799 bp) was amplified with *halS8* specific primers for both *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8, while a fragment of expected size (838 pb) was amplified with *halH4* specific primers for *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Supplementary Fig. S1). The amplicons were cloned and sequenced. Analysis of the predicted partial amino acid sequences confirmed that the genomes of *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8 contained a *halS8* gene, with almost identical predicted amino acid sequences (only two substitutions out of the total 266). Moreover, they were also aligned with two other HalS8 sequences deduced from plasmidic genes available in the Genbank database, belonging to *Halobacterium* sp. GN101 (Besse et al. 2015) and the uncharacterized strain S8a from which HalS8 was initially discovered (Price and Shand 2000). Moreover, the sequences of the predicted mature

HalS8 peptides from the four strains ETD5, ETD8, S8a, and GN101 were identical (Supplementary Fig. S2). For *Htg. thermotolerans* SS1R12, the partial predicted amino acid sequence was identical to that of HalH4 isolated from *Hfx. mediterranei* R4 (Han et al. 2012) (data not shown).

The possible correlation between the expression of the halocin genes and the observed antimicrobial activities of proteinaceous nature were checked by RT-PCR experiments. Total RNA was extracted from late exponential-stage supernatants of *Hbt. salinarum* ETD5, *Hbt. salinarum* ETD8 and *Htg. thermotolerans* SS1R12, reverse-transcribed with random primers, and cDNA were amplified with 16S rRNA gene, *halS8* (Fig. 3a) and *halH4* (Fig. 3b)-specific primers. For the three strains, the extracted RNA proved to be devoid of genomic DNA contamination (Fig. 3a, lanes 4 and 9; Fig. 3b, lane 4), and the cDNA provided amplification of the 16S rRNA gene (Fig. 3a, lanes 3 and 8; Fig. 3b, lane 3). Amplification of a *halS8* fragment using cDNA from *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8 demonstrated that *halS8* is indeed transcribed during late exponential-stage of growth (Fig. 3a, lanes 1 and 6). Conversely, no detectable *halH4* transcript was produced by *Htg. thermotolerans* SS1R12 (Fig. 3b, lane 1).

Discussion and conclusions

Microbial warfare is a key feature for prokaryotes competing for space and nutrients in extreme halophilic conditions (Kirkup and Riley 2004). Although previous studies have examined the diversity of prokaryotic strains from the saltern of Sfax (Baati et al. 2008; Trigui et al. 2011a, b; Boujelben et al. 2012, 2014), the potential of antimicrobial production has not yet been reported. In the current study, thirty-five halophilic strains, isolated from two ponds of different salinity from the solar saltern of Sfax, were studied for their ability to exert an antimicrobial activity. Most of the strains exhibiting antimicrobial activity are halophilic archaea belonging to three genera (*Halorubrum*, *Halobacterium*, *Haloterrigena*) of the order *Halobacteriales*, but two members of the domain *Bacteria* have also been identified as producers of antimicrobials, *Salicola* sp. ES1R9 and *P. halophila* ES1D1 (Tables 1, 2). Both of these bacterial isolates originated from the pond of lower salinity (M1, 200 g L⁻¹). It has consistently been reported in previous studies that a significant fraction of microbial strains inhabiting hypersaline areas produce antimicrobial agents (Rodriguez-Valera et al. 1982; Kis-Papo and Oren 2000; Atanasova et al. 2013). A recent study has examined the antagonistic interactions among halophilic isolates of distant geographical sites (Atanasova et al. 2013). Several genera of archaea (*Halorubrum*, *Haloferax*, *Haloplanus*, *Haloarcula*, *Halogramum*, *Halobacterium*, *Halosarcina*,

Halogeometricum) and bacteria (*Halomonas*, *Salinivibrio*, *Pontibacillus* and *Salicola*) have been shown to be halocin-producers (Atanasova et al. 2013). The saltern of Sfax can thus be considered an additional geographical site where the presence of potential halocin-producing members of the archaeal genera *Halorubrum* and *Halobacterium* and the bacterial genus *Salicola* is confirmed. Antimicrobial compounds have been extensively described as produced by *Pseudomonas aeruginosa* and collectively named pyocins (Michel-Briand and Baysse 2002). More recently, a *Pseudomonas putida* strain isolated from hot-spring water has been shown to produce antimicrobials (Ghraiiri et al. 2015). Our work suggests that an additional *Pseudomonas* strain from another extreme environment, *P. halophila* ES1D1, also has the capacity to produce antimicrobial agents.

The spectrum of activity of the antimicrobial-producing strains is variable, targeting either a restricted or a wide range of sensitive strains (Table 2). This suggests that the produced antimicrobial agents are different. Most strains (seven of the eleven) have a restricted spectrum of inhibition, with only one sensitive strain (Table 2). All strains of the *Halorubrum* genus, except SS1R14 exhibit a narrow spectrum of activity (only one sensitive strain). In accordance with previous observations (Atanasova et al. 2013), three cases of cross-domain inhibition are observed, from bacteria to archaea (*P. halophila* ES1D1 and *Salicola* sp. ES1R9 inhibit *Halorubrum tebenquichense* SS1R14) and from archaea to bacteria (*Hbt. salinarum* ETD5 inhibits *P. halophila* ES1D1). Four strains, all from the domain *Archaea*, exert an antimicrobial activity against several other strains (Table 2). They belong to the genera *Halobacterium*, *Halorubrum* and *Haloterrigena*, and all three were previously shown to be halocin-producers (Atanasova et al. 2013; Besse et al. 2014).

Antagonism assays can reveal the capacity of microbial strains to inhibit the growth of competitors. The agent responsible for this activity may either be a virus or an antimicrobial compound, either a small metabolite or a peptide/protein. Several lines of evidence in this work suggest that three strains from the solar saltern of Sfax have the capacity to produce secreted antimicrobial peptides/proteins, named halocins. All three also display a broad inhibition range. Strains *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8, both isolated from pond TS18 (390 g L⁻¹) of the Sfax saltern, display secreted antimicrobial activity, which is totally destroyed by treatment with a halophilic protease (Table 3). Moreover, a *halS8* gene fragment from the genome of *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8 was amplified and sequenced (Supplementary Fig. S1). HalS8 was initially purified from an unidentified strain, S8a, from the Great Salt Lake (Utah, USA) and the *halS8* gene sequence was determined. The *halS8* gene has been shown to be translated into a 311 amino acid precursor (Supplementary

Fig. S2), yielding by an unknown mechanism a mature HalS8 peptide of 36 amino acids (Price and Shand 2000). Another strain of *Halobacterium* sp. GN101 isolated from Guerrero Negro (Mexico) also encodes a *halS8* gene (Besse et al. 2015). Both genes are carried by megaplasmids, but *Halobacterium* sp. GN101 has been reported to produce halocin R1, whose amino acid sequence is 63 % identical to that of HalS8 (O'Connor and Shand 2002), and may therefore result from expression of additional divergent copies of the gene and/or post-translational modifications (Besse et al. 2015). However, alignment of the predicted amino acid sequences deduced from the *halS8* genes from strains S8a, GN101, ETD5 and ETD8 reveals only two sites of substitution. We observed a A140G substitution for strain ETD8, as compared to the three other strains; and an I185 V substitution for strain S8a, as compared to the three other strains (Supplementary Fig. S2). The sequence of mature HalS8 is identical, thus emphasizing that the conservation of the 4 cysteines, potentially involved in disulfide bridges, is presumably essential to maintain the tridimensional structure of this highly hydrophobic peptide, and hence its high stability. This is the first report pointing to several strains from different geographical locations that have the capacity to produce identical HalS8. Three of the four strains (GN101, ETD5 and ETD8) are clearly identified by analysis of the 16S rRNA gene sequence to be affiliated to the genus *Halobacterium*. Interestingly, in the study by Atanasova et al. (2013), a single *Halobacterium* sp. strain was identified as a halocin producer. In the case of HalC8, initially purified from the Chinese strain *Natrinema* sp. AS7092, several other *Natrinema* and *Haloterrigena* strains, from various geographical sites, have also been reported as carrying *halC8* genes (Li et al. 2003; Imadalou-Idres et al. 2013; Besse et al. 2014, 2015; Meknaci et al. 2014). Future studies will help determine whether a specific halocin gene is systematically carried only by strains belonging to a specific genus from the *Halobacteriales*, and if the halocin genes are associated to features involved in horizontal gene transfer, such as the plasmidic location of *halS8* in strains S8a and GN101.

For strains *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8, the antimicrobial activity was maximal during the transition from exponential to stationary phase of growth (Fig. 2a, b), and we detected *halS8* transcripts by RT-PCR (Fig. 3a), as was reported for several halocins (Besse et al. 2015) including HalS8 (Price and Shand 2000). In strain S8a, a correlation between maximal antimicrobial activity and the presence of multiple *halS8* transcripts during transition from exponential to stationary phase of growth were observed (Price and Shand 2000). Therefore, several clues link the detected antimicrobial activity to the production of HalS8 in *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8, with similar features to what had been previously observed

in strain S8a. Therefore, we conclude that the antimicrobial activity produced by the two strains of *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8 from the solar saltern of Sfax can be explained, at least in part, by the production of HalS8.

The spectrum of inhibition of HalS8-containing supernatants from strain S8a have been reported to be directed against *Hbt. salinarum* NRC817, *Halobacterium* sp. GRB, and *Haloferax gibbonsi* (Price and Shand 2000). The inhibitory spectrum of *Hbt. salinarum* ETD5 is consistent with these findings, as inhibition of strains belonging to the genera *Halobacterium* and *Haloferax* are observed (Tables 1, 2). Moreover, both *Halobacterium* strains also inhibit several members of the genus *Halorubrum*, which was not tested in the case of strain S8a. The spectrum of the strains inhibited by *Hbt. salinarum* ETD5 and *Hbt. salinarum* ETD8 is different, as some strains are inhibited by ETD5 but not by ETD8. This might possibly be due to a lesser amount of halocin production by *Hbt. salinarum* ETD8, or to the production of an additional unidentified halocin by *Hbt. salinarum* ETD5. This halocin should be different from HalC8 and HalH4, as no amplicons were obtained by PCR using *halC8* and *halH4*-specific primers (data not shown). Moreover, inhibition halos observed for ETD8 are generally smaller than those produced by ETD5. More particularly, the cross-domain inhibition observed for *Hbt. salinarum* ETD5 against *Pseudomonas halophila* ES1D1 will have to be confirmed to determine whether it is due to HalS8 or to another antimicrobial agent.

The case of *Htg. thermotolerans* SS1R12 reveals different features. The antimicrobial activity produced by this strain is most likely due to multiple antimicrobial agents. Indeed, several clues indicate that part of the antimicrobial activity may be due to a halocin. Treatment of the supernatant with a halophilic protease reduces, but does not annihilate, the antimicrobial activity (Table 3). Amplification and sequencing of a partial *halH4* gene reveals a predicted amino acid sequence, identical to that of *Hfx. mediterranei* R4 (UniProtKB no Q48236), from which HalH4 was initially isolated (Meseguer and Rodriguez-Valera 1985). However, we were not able here to detect any *halH4* transcript (Fig. 3b), and maximal activity during microbial growth (Fig. 2c) does not follow the same pattern as what is usually observed for halocins. It is possible that HalH4 is not expressed, and that the observed antimicrobial activity of proteic nature may be due to another unknown halocin. Halocin redundancy has already been reported for HalH4-producing *Hfx. mediterranei* R4 (Naor et al. 2013).

In conclusion, the present study of the antimicrobial properties of a collection of halophilic prokaryotic strains isolated and characterized from the solar saltern of Sfax reveals that a significant fraction of the strains uses microbial warfare as a weapon against their competitors. For two

strains belonging to the *Halobacterium* genus, we have shown that the observed antimicrobial activity is most likely explained by the production of a halocin, HalS8, which is a very stable hydrophobic peptide. Perhaps it is possible that production of specific halocins may be correlated with phylogenetic assignment, but this assertion should be confirmed by further studies on the distribution of the known halocins among halophilic isolates from different geographical hypersaline areas.

Acknowledgments This study was supported by the Tunisian Ministry of Scientific Research and the French Ministry of Foreign Affairs through a joint project PHC-Utique No 13G0833, the University of Sfax (Tunisia) and the National Museum of Natural History in Paris (France). We are grateful to the Cotusal salt company in Sfax for permission to access and sample the solar saltern.

References

- Antón J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F, Amann R (1999) Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* 1:517–523. doi:10.1046/j.1462-2920.1999.00065.x
- Arahal DR, Dewhirst FE, Pasteret BJ, Volcani BI, Ventosa A (1996) Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 62:3779–3786
- Atanasova NS, Pietilä MK, Oksanen HM (2013) Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier. *Microbiol Open* 2:811–825. doi:10.1002/mbo3.115
- Baati H, Guermazi S, Amdouni R, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E (2008) Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* 12:505–518. doi:10.1007/s00792-008-0154-x
- Baati H, Guermazi S, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E (2010) Novel prokaryotic diversity in sediments of Tunisian multipond solar saltern. *Res Microbiol* 161:573–582. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.009
- Bardavid ER, Oren A (2012) Acid-shifted isoelectric point profiles of the proteins in a hypersaline microbial mat: an adaptation to life at high salt concentrations? *Extremophiles* 16(5):787–792. doi:10.1007/s00792-012-0476-6
- Besse A, Vandervennet M, Peduzzi J, Rebuffat S, Carré-Mlouka A (2014) Halocin C8, an antimicrobial peptide produced by halophilic archaea of the genera *Natrinema* and *Haloterrigena*. 10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg. Book of abstracts (Abst. P54) pp 171
- Besse A, Peduzzi J, Rebuffat S, Carre-Mlouka A (2015) Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: lessons from archaeocins. *Biochimie* 118:344–355. doi:10.1016/j.biochi.2015.06.004
- Boujelben I, Gomariz M, Martínez-García M, Santos F, Peña A, López C, Antón J, Maalej S (2012) Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax in Tunisia. *A van Leew J Microb* 845–857. doi:10.1007/s10482-012-9701-7
- Boujelben I, Martínez-García M, Pelt JV, Maalej S (2014) Diversity of cultivable halophilic archaea and bacteria from superficial hypersaline sediments of Tunisian solar salterns. *A van Leew J Microb* 4:675–692. doi:10.1007/s10482-014-0238-9
- Cheung J, Danna KJ, O'Connor EM, Price LB, Shand RF (1997) Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *J Bacteriol* 179:548–551
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3(10):777–788
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* W465–W469. doi:10.1093/nar/gkn180
- Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:564–582. doi:10.1128/MMBR.00016-05
- Duquesne S, Destoumieux-Garçon D, Peduzzi J, Rebuffat S (2007) Microcins, genes encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* 24:708–734. doi:10.1039/B516237H
- Dussault HP (1955) An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol* 70:484–485
- Enache M, Itoh T, Kamekura M, Popescu G, Dumitru L (2008) Halophilic archaea isolated from man-made young (200 years) salt lakes in Slanic, Prahova, Romania. *Cent Eur J Biol* 3:388–395. doi:10.2478/s11535-008-0034-5
- Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg R (1994) Methods for general and molecular bacteriology. Am Soc Microbiol, Washington
- Ghai R, Pašić L, Fernández AB, Martín-Cuadrado A, Mizuno CM, McMahon KD, Papke RT, Stepanauskas R, Rodríguez-Brito B, Rohwer F, Sánchez-Porro C, Ventosa A, Rodríguez-Valera F (2011) New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* 1:135. doi:10.1038/srep00135
- Ghraiiri T, Braiek OB, Hani K (2015) Detection and characterization of a bacteriocin, putadecin T01, produced by *Pseudomonas putida* isolated from hot spring water. *APMIS* 123:260–268. doi:10.1111/apm.12343
- Han J, Zhang F, Hou J, Liu X, Li M, Liu H, Cai L, Zhang B, Chen Y, Zhou J, Hu S, Xiang H (2012) Complete genome sequence of the metabolically versatile halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) producer. *J Bacteriol* 194:4463–4464. doi:10.1128/JB.00880-12
- Imadalou-Idrès N, Carré-Mlouka A, Vandervennet M, Yahiaoui H, Peduzzi J, Rebuffat S (2013) Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. *J Life Sci* 7:1057–1069
- Kavitha P, Lipton AP, Sarika AR, Aishwarya MS (2011) Growth characteristics and halocin production by new isolate, *Haloferax volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India). *Res J Biol Scis* 6:257–262. doi:10.3923/rjbsci.2011.257.262
- Kirkup BC, Riley MA (2004) Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors *in vivo*. *Nature* 428:412–414
- Kis-Papo T, Oren A (2000) Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds? *Extremophiles* 4:35–41
- Kouker G, Jaeger KE (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 53:211–213
- Li Y, Xiang H, Liu J, Zhou M, Tan H (2003) Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* 7:401–407. doi:10.1007/s00792-003-0335-6
- Meknaci R, Lopes P, Servy C, LeCaer JP, Andrieu JP, Hacène H, Ouazzani J (2014) Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platex. *Extremophiles* 18:1049–1055. doi:10.1007/s00792-014-0682-5
- Meseguer I, Rodríguez-Valera F (1985) Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiol Lett* 28:177–182
- Michel-Briand Y, Baysse C (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84:499–510

- Naor A, Yair Y, Gophna U (2013) A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. *Extremophiles* 17:973–979. doi:10.1007/s00792-013-0579-8
- O'Connor EM, Shand RF (2002) Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28:23–31. doi:10.1038/sj/jim/7000190
- Oren A (2008) Nomenclature and taxonomy of halophilic archaea—comments on the proposal by DasSarma and DasSarma for nomenclatural changes within the order *Halobacteriales*. In *J Syst Evol Microbiol* 58:2245–2246. doi:10.1099/ijs.0.2008/005173-0
- Oren A (2013) *Salinobacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol Lett* 342:1–9. doi:10.1111/1574-6968.12094
- Oren A (2015) Halophilic microbial communities and their environments. *Curr Opin Microbiol* 33:119–124. doi:10.1016/j.cobio.2015.02.005
- Oren A, Ventosa A, Grant WD (1997) Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol* 47: 233–238
- Paul S, Bag SK, Das S, Harvill ET, Dutta C (2008) Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biol* 9:R70. doi:10.1186/gb-2008-9-4-r70
- Prangishvili D, Holz I, Stieger E, Nickell E, Kristjansson JK, Zillig W (2000) Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J Bacteriol* 182: 2985–2988. doi:10.1128/JB.182.10.2985-2988.2000
- Price LB, Shand RF (2000) Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* 182:4951–4958
- Reed CR, Lewis H, Trejo E, Winston V, Evilia C (2013) Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Hindawi Publ Corp Archaea* 1–14. doi:10.1155/2013/373275
- Rodriguez-Valera F, Juez G, Kushner D (1982) Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can J Microbiol* 28:151–154. doi:10.1139/m82-019
- Salgaonkar BB, Mani K, Nair A, Gangadharan S, Braganca JM (2012) Interspecific interactions among members of family *Halobacteriaceae* from natural solar saltern. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4:98–107. doi:10.1007/s12602-012-9097-8
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Shand RF, Leyva KJ (2008) Archaeal antimicrobials; an undiscovered country. In: Blum P (ed) *Archaea: new models for prokaryotic biology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 233–243
- Sun C, Li Y, Mei S, Zhou L, Xiang H (2005) A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. *Mol Microbiol* 57:537–549. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04705.x
- Torreblanca M, Rodriguez-Valera F, Juez G, Ventosa A, Kamekura M, Kates M (1986) Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 8:89–99. doi:10.1016/S0723-2020(86)80155-2
- Torreblanca M, Meseguer I, Ventosa A (1994) Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett Appl Microbiol* 19:201–205. doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00943.x
- Trigui H, Masmoudi S, Brochier-Armanet C, Maalej S, Dukan S (2011a) Survival of extremely and moderately halophilic isolates of Tunisian solar saltern after UV-B or oxidative stress. *Can J Microbiol* 57:923–933. doi:10.1139/w11-087
- Trigui H, Masmoudi S, Brochier-Armanet C, Barani A, Gregori G, Denis M, Dukan S, Maalej S (2011b) Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and phylogenetic analysis. *Extremophiles* 15:347–358. doi:10.1007/s00792-011-0364-5
- Vetriani C, Holger W, Jannasch HW, MacGregor BJ, Stahl DA, Reysenbach AL (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microb* 65(10):4375–4384
- Zassloff M (2002) Antimicrobial peptides from multicellular organisms. *Nature* 415:389–395. doi:10.1038/415389a

Research Paper

Characterization of halo-alkaline and thermostable protease from *Halorubrum ezzemoulense* strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia

Doneyz Frikha Dammak, Salma Masmoudi Smaoui, Fadoua Ghanmi, Ines Boujelben and Sami Maalej

Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Unité Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques Environnementaux (UR/11ES72) Sfax, Tunisia

A total of 54 halophilic strains were isolated from crystallizer TS18 (26 strains) and non-crystallizer M1 (28 strains) ponds and screened for their ability to produce protease, amylase, and lipase activities. Enzymatic assays allowed the selection of thirty-two active strains, among them, the ETR14 strain from TS18 showed maximum protease production yields and therefore, selected for further analysis. The results from 16S rRNA gene sequence analysis revealed that the strain belonged to *Halorubrum ezzemoulense* (*Hrr. ezzemoulense*) species. Further results indicated that optimum growth and protease production yields were obtained with 10–15% NaCl concentrations in the DSC-97 medium. The enzyme was also able to maintain high levels of protease activity at salt concentrations of up to 25%. While readily available carbon sources were noted to significantly reduce protease production, the combination between yeast extract and peptone enhanced protease excretion, which reached a maximum of 284 U ml^{-1} at the end of the exponential growth phase. The enzyme exhibited optimum activity at pH 9 and 60°C. The halophilic protease retained 87% of its initial activity after 1 h incubation at 70 °C and showed high stability over a wide range of pH, ranging from 7 to 10. This protease exhibited good temperature, pH, and salinity tolerance, which distinguishes it from other proteases previously described from other members of the holoarchaea genera and makes it a promising candidate for application in various industries.

Keywords: Marine solar saltern / *Halorubrum* genus / Hydrolases / Halophilic protease / 16S rRNA / Phylogeny

Received: August 20, 2015; accepted: November 11, 2015

DOI 10.1002/jobm.201500475

Introduction

Proteases are a physiologically and commercially important group of enzymes that have been extensively used in various industrial applications and processes. They have commonly been used as additives in laundry detergents, pharmaceuticals, leather and diagnostic reagents, food products and formulations, waste management processes, and silver recovery units [1]. One of the major challenges hampering the efficient large-scale application of microbial proteases is their optimal activity and stability in a wide range of salinity, pH

and temperature. Accordingly, recent research has been continuously interested in the exploration of extreme habitats to screen and characterize non-conventional microorganisms having the ability to produce novel enzymes with enhanced activity and stability profiles under a wide range of operational conditions. In this respect, several hypersaline environments, such as marine solar slatterns, can offer ideal habitats for species-rich biotopes, particularly because it involves a wide variety of prokaryotic microorganisms (*Bacteria* and *Archaea*) that are exposed to increasing salinity gradients from seawater salt concentrations (3.8%) to the saturation point of NaCl (38%) and beyond. Using culture-dependent and culture-independent methods, several studies have shown that when high salinity prevails in the environment where halophiles live,

Correspondence: Doneyz Frikha, Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Unité Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques Environnementaux (UR11ES/72), BP 1171, 3000 Sfax, Tunisia
E-mail: fdoneyz@yahoo.com

halophilic *Archaea* prevail over halophilic *Bacteria* [2, 3]. To cope with the specific salinity of its brine, halophilic *Archaea* produce original proteins with more stability against not only aggregation in the presence of high salt concentrations [4], but also against radiation and reactive oxygen species [5]. Accordingly, halophilic archaea have attracted increasing interest as a promising source of stable enzymes for use in industrial applications [6].

Due to their abilities to operate under harsh physico-chemical conditions, such as salinity, temperature, and pH, halophilic proteases from halophilic archaea have received increasing attention from researchers interested in the discovery of novel proteases with desired properties and improved stabilities for industrial applications. In fact various halophilic protease-producing archaea have been screened in the literature [7]. Some of these proteases have been reported to display optimal activity in the presence of NaCl and to maintain stability over wide pH (pH 5–10) and temperature (40–75 °C) ranges [8]. Other enzymes have been described to display a wide range of polyextremophilicity, including haloalkaliphilicity [9] and halothermophilicity [10].

Considering the promising opportunities that halophilic prokaryotic enzymes might open for the development of novel enzymes with desired activity and stability profiles under harsh operational conditions, the present study was undertaken to screen halophilic strains isolated from crystallizer and non-crystallizer ponds at the solar saltern of Sfax, Tunisia, for their ability to produce active hydrolases. The results revealed that the ETR14 isolate exhibited the most attractive protease activity and was, therefore, selected and submitted to further identification and characterization analyses. This strain was identified as *Halorubrum ezzemoulense*, and its optimal growth conditions for maximum protease production were investigated.

Materials and methods

Isolation of halophilic prokaryotes

The water and sediment samples used in the present study were collected from two ponds in the solar saltern of Sfax, Tunisia, namely the crystallizer TS18 pond (TS) (mean salinity 38%, w/v) and the concentrator M1 pond (mean salinity 24%, w/v). This multi-pond solar saltern was located in the Central–Eastern coast of Tunisia about 34° 39' N and 10° 42' E. Within 2 h collection, diluted and non-diluted samples were spread on two different saline media: modified DSC-97 [11] and R2A-20 agar media [12] supplemented with 200 g L⁻¹ of NaCl. Prokaryotic

isolates were picked after 15–20 days of incubation at 37 °C, based on colony pigmentation, size, and margin and immediately streak-plated at least 3–4 times on fresh agar plates with the appropriate medium until purity was confirmed. A total of 54 strains (28 from M1 and 26 from TS18) were preserved as glycerol suspensions (40%, w/v) at –80 °C. The isolates were submitted to cell morphology examination (model Reichert-jung series 150) using cells from exponentially growing cultures. They were also submitted to phenotypic characterization tests to investigate Gram reaction, motility, catalase and oxidase production, indole, urease and β-gal production, and carbon source utilization as previously described elsewhere [13, 14].

Screening of hydrolase activities

The fifty four prokaryotic isolates were screened for amylolytic, lipase and proteolytic activities. Amylase activity screening assays involved the cultivation of strains on their corresponding solid media (DSC-97 or R2A-20) supplemented with 0.5% (w/v) starch and containing 20% (w/v) of total salts as previously described by Amoozegar *et al.* [15]. After 1 week of incubation at 37 °C, the plates were flooded with an iodine solution containing 1% (w/v) iodine in 2% (w/v) KI. The formation of a clear zone around the colony was taken to indicate starch hydrolysis, and the corresponding strain was recorded positive for amylase production.

For lipase activity, the corresponding R2A-20 and DSC-97 media were supplemented with 2.5% olive oil (v/v) and 0.001% (w/v) Rhodamine B solution and used for microorganism growth assays at 37 °C. After 1–2 weeks of culture, positive strains were detected under UV light by the presence of an orange-red fluorescent halos [16]. This method was based on the fluorescence caused by the interaction of free fatty acids released through the lipase hydrolysis of olive oil with Rhodamine B.

The proteolytic activity of the isolates was screened in skim milk agar as previously described by Amoozegar *et al.* [17]. In brief, the corresponding DSC-90 and R2A-20 media were supplemented with 10% (w/v) skim milk and proteolytic activity was detected after 7 days of incubation at 37 °C by the presence of a clear zone around the skimmed agar colony.

DNA extraction and 16S rRNA gene amplification of the potential ETR14 strain

The total genomic DNA of ETR14 strain, isolated from the crystallizer TS18 pond, was prepared from cell pellets resuspended in MilliQ water by boiling for 5 min, followed by centrifugation. The primers used for the amplification of the almost complete archaeal

16S rRNA encoding genes were S-D-Arch-0025-a-S-17 (5'-CTGTTGATCCTGCCAG-3') and S*-Univ-1517-a-A-21 (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') [18]. Positive controls were performed using *Halobacterium salinarum* DSM3754 or *Haloferax mediterranei* DSM1411. PCR was performed using a 50 μ l reaction mixture containing the following (per reaction): 5 μ l of 10 \times PCR buffer, 1 μ l of deoxyribonucleotide triphosphate mixture (10 μ M each), 1 μ l of each primer (10 μ M), 0.25 μ l (1.25 U) Taq polymerase, and 1 μ l of template DNA. The following PCR conditions were used: 95 °C for 30 s followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min, and finally an extension step of 7 min at 72 °C. The amplified DNA was submitted to electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels in Tris-acetic acid-EDTA (TAE) buffer containing 1X GelRed[®] (Biotim) and then visualized under UV light.

DNA sequencing and phylogenetic analysis

The nucleotide sequence of the amplified 16S rRNA gene of the ETR14 strain (1439 pb) was determined by Eurofins MWG Operon (Ebersberg). They were compared with the sequences available at the GenBank database using the BLASTN software program [19]. Alignment with the different sequences from other species was conducted by the BioEdit software. The maximum likelihood phylogenetic tree was inferred using Tree Finder [20] with a Jukes and Cantor model on the 1439 unambiguously aligned positions. The statistical robustness of inferred branches was estimated by the non parametric bootstrap procedure implemented in Tree Finder (1000 replicates of the original alignment).

Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of strain ETR14 determined in this study was submitted to GenBank under the accession number ID: KP827650.

Salinity growth range of *Halorubrum ezzemoulense* ETR14

Various NaCl concentrations (5, 10, 15, 20, 25, and 30%, w/v) were assayed in the DSC-97 medium to investigate the effects of salinity on the growth of the *Hrr. ezzemoulense* ETR14 strain. The pH of all media was adjusted to 7.4 using KOH 1M and temperature was maintained at 37 °C. The growth curves of strain ETR14 were obtained by monitoring culture absorbance at 600 nm and at different incubation times using a Laseny International Model I-290 spectrophotometer. Accordingly, 250-ml flasks containing 50 ml of saline medium were inoculated with 100 μ l of a stationary-phase culture and incubated at 37 °C at 200 rpm on a New Brunswick environmental incubator shaker. Samples of

500 μ l were taken at 0, 20, 24, 44, 48, 52, 69, 73, 93, 97, 109, and 130 h of incubation to monitor cellular growth in terms of absorbance at 600 nm. The mean values of triplicate samples from duplicate experiments were used for graphical representations.

Cells harvesting and protease assay

Hrr. ezzemoulense strain ETR14 cells were harvested from 48 h cultures in DSC liquid media by centrifugation at 10,000g (Hermle Z 230 MA) for 20 min at 4 °C. The culture supernatants were used to determine extracellular proteolytic activity. Accordingly, 0.5 ml of suitably diluted aliquots was mixed with 0.5 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7) prepared in 20% (w/v) NaCl and containing 1% (w/v) casein. After 15 min of incubation at 55 °C, the reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid (20%, w/v), kept at room temperature for 15 min, and then centrifuged at 13,000 rpm for 15 min to remove the precipitate. The absorbance of the supernatant was measured at 280 nm against a blank (non-incubated sample). A standard curve was generated using solutions of 0–50 mg L⁻¹ tyrosine. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μ g of tyrosine per minute under the defined experimental conditions.

Effects of different compounds and physico-chemical conditions on protease production

Several constituents and process parameters were evaluated in terms of their optimal conditions for protease production by the *Hrr. ezzemoulense* strain ETR14 in the saline DSC-97 medium using the one-factor-at-a-time approach. This strategy involved the evaluation of the effect of each variable for its optimum level for maximal protease production, and its subsequent incorporation at its optimized level in the following experiment while evaluating the next variable. The variables investigated included the following in the sequential order: NaCl concentration (5, 10, 15, 20, 25, and 30% (w/v)), carbon sources at final concentrations of 1% (w/v) (glucose, mannose, maltose, sucrose, xylose, and starch), nitrogen sources at 1% (w/v) (urea, peptone, tryptone, and NH₄Cl), inorganic salts at 1% (w/v) (ZnCl₂, CaCl₂, CuSO₄, and MgSO₄), temperature range (30, 37, 40, and 47 °C), and pH values (6, 7, 7.5, 8, and 9). For all experiments, protease activity, expressed by the diameter of hydrolyse zone of casein, was determined after 48 h of incubation.

Properties of the extracellular protease

The effects of pH and temperature on the protease activity and stability against heat and detergents were

investigated. Optimum pH was determined by assaying enzyme activity at 55 °C in 20% NaCl (w/v), with casein as a substrate dissolved in the potassium phosphate buffer (pH 6–8) and glycine–NaOH buffer (pH 9–10). For optimum temperature, protease activity was assayed at different temperatures (30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, and 80 °C) at pH 9 in 20% NaCl (w/v). Thermostability assays involved the pre-incubation of cell free supernatants at various temperatures from 37 to 70 °C and the residual protease activity, compared to the non pre-incubated control was determined after 15, 30, 45, and 60 min at pH 9, 55 °C and in the presence of 20% NaCl (w/v). To investigate the effect of detergents on enzyme activity, aliquots of cells free supernatants were pre-incubated with different detergents, SDS, CTAB (cetyl trimethylammonium bromide), Triton X-100, Tween-80, and Tween-100 each at a final concentration of 10 mM and at 37 °C. After 30 min, protease activities were determined at pH 9 and 55 °C as previously described and compared to their corresponding controls (without detergents).

Results

Screening of extreme halophiles producing hydrolase activities

Fifty-four, presumably pure prokaryotic strains, were isolated from the TS18 (26 strains) and M1 (28 strains) ponds and subsequently screened for producing protease, amylase, and lipase activities on solid media. Water and sediment samples were plated on two solid saline media (R2A-20 and DSC-97) containing 20% (w/v) NaCl to detect mainly extreme halophilic Bacteria and Archaea and obtain a more representative number of halophilic isolates with different nutrient requirements. Among those strains, thirty-two active strains were selected and their hydrolase activities were summarized in Table 1.

Among the 26 isolates selected from the TS18 pond, 6 (23%) exhibited protease activity (3 from R2A-20 and 3 from DSC-97 media), 6 (23%) displayed amylase activity (all from DSC-97 media), and 3 (11%) showed lipase activity (all from R2A-20 media) (Table 1). The M1 pond, on the other hand, had lower salinity than the TS18 pond and was, therefore, marked by higher frequencies of positive strains. From the 28 selected isolates, 12 (43%) showed protease activity (11 from R2A-20 and 1 from DSC-97 media), 15 (53%) had amylase activity (10 from R2A-20 and 5 from DSC-97 media), and 6 (21%) displayed lipase activity (all from R2A-20 media) (Table 1). The results also revealed that some strains in the M1 pond displayed combined hydrolytic activities, with one strain

(ES1R49) presenting lipase and protease activities, 3 strains (ES1D7; ES1R19, and ES1R33) showing protease and amylase activities, and 5 strains (ES1R8, ES1R9, ES1R12, ES1R38, and ES1R51) exhibiting protease, amylase, and lipase activities. In the TS18 pond, however, only two strains (ETR14 and ETR12) were noted to show combined protease and lipase activities (Table 1). The strains isolated from the two ponds could, therefore, be considered promising sources of novel enzymes for a wide range of biotechnological applications and processes.

Identification of the potential protease producing ETR14 strain

Among the several protease producing strains screened from the M1 and TS18 ponds, strain ETR14 from the crystallizer pond was noted to exhibit a large zone of hydrolysis on casein plates and was, therefore, selected and maintained for further experimental and optimization studies. Cells of this strain were predominantly occurring as single, Gram negative, motile rods. On the solid DSC-97 complex medium containing 20% NaCl, colonies were brick red, opaque or circular, and about 2 mm in diameter. They were catalase-positive and oxidase-negative. While indole production and MR tests were positive, the VP test was negative. No growth was observed in the liquid medium containing 5% NaCl, and the organism required a minimum of 10% NaCl for growth. Optimum growth was obtained at 10–20% NaCl concentrations, and the organism could not grow in saturated NaCl (Fig. 1). The ETR14 strain was able to hydrolyze gelatin, casein, lipids, and utilize urea. Glucose, maltose, lactose, and xylose were fermented without gas production.

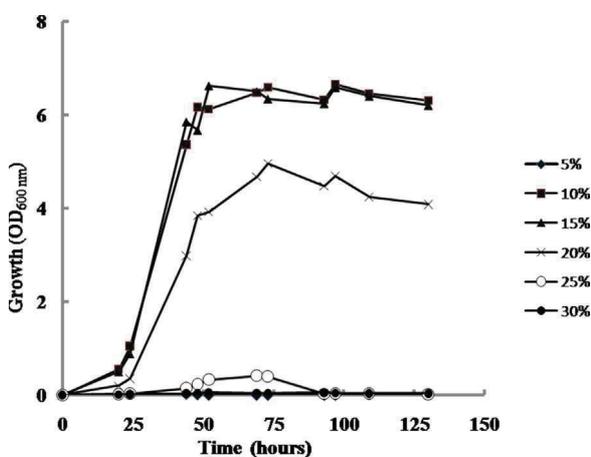
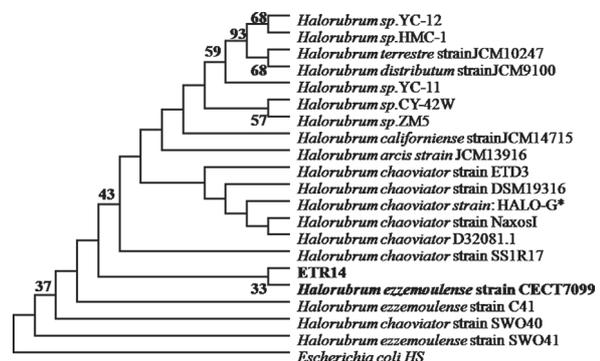
The purified DNA was amplified by the polymerase chain reaction using the specific archaeal S-D-Arch-0025-a-S-17 and S^{*}-Univ-1517-a-A-21 primers to identify the ETR14 isolate [21]. The nucleotide sequence of the amplified DNA was compared with other sequences available at the GenBank database using the BLAST search program. The results revealed 99% homology with the rDNA 16S of the *Halorubrum ezzemoulense* strain CECT7099 (Fig. 2).

Optimization of protease production medium

Several medium constituents and growth parameters were assayed for their effects on protease production by the *Hrr. ezzemoulense* ETR14 strain. The effects of different NaCl concentrations on growth and protease activity of ETR14 strain are presented in Fig. 3. While the enzyme showed no protease activity at 5% NaCl, it underwent rapid increase in protease activity at 10% NaCl and

Table 1. Hydrolase related-enzymes detected in assay tests performed on isolates of halophilic prokaryotes obtained from TS18 and M1 ponds. Only positive strains were reported.

Strain code, identification (16S rRNA gene accession n°)	Origin/medium	Protease	Amylase	Lipase
ETD3 <i>Halorubrum chaoviator</i> (JX982772)	TS18/DSC	–	++	–
ETD4	TS18/DSC	–	+++	–
ETD5 <i>Halobacterium salinarum</i> (JX982770)	TS18/DSC	–	+++	–
ETD7	TS18/DSC	+++	–	–
ETD9	TS18/DSC	++	–	–
ETD13	TS18/DSC	+++	–	–
ETR18	TS18/R2A	+	–	–
ETD32	TS18/DSC	–	+	–
ETD34 <i>Halorubrum</i> sp. (KR611162)	TS18/DSC	–	++	–
ETD47	TS18/DSC	–	++	–
ETR3	TS18/R2A	–	–	+++
ETR12	TS18/R2A	+++	–	+++
ETR14 <i>Halorubrum ezzemoulense</i> (KP827650)	TS18/R2A	+++	–	+++
ES1D5 <i>Halorubrum</i> sp. (HQ179131)	M1/DSC	–	++	–
ES1D17	M1/DSC	–	+++	–
ES1D19	M1/DSC	++	+++	–
ES1D21	M1/DSC	–	+++	–
ES1D32	M1/DSC	–	++	–
ES1R7	M1/R2A	++	+	–
ES1R8	M1/R2A	+++	+++	++
ES1R9 <i>Salicola</i> sp. (KT440879)	M1/R2A	+++	++	++
ES1 ES1R10 <i>Haloferax</i> sp. (HQ589032)	M1/R2A	–	++	–
ES1R12	M1/R2A	++	++	++
ES1R26	M1/R2A	–	++	–
ES1R31	M1/R2A	++	–	–
ES1R33	M1/R2A	++	+	–
ES1R38	M1/R2A	+	++	+
ES1R40	M1/R2A	+++	–	–
ES1R41	M1/R2A	–	++	–
ES1R46	M1/R2A	++	–	–
ES1R49	M1/R2A	++	–	+
ES1R51	M1/R2A	++	+	+

**Figure 1.** Kinetic growth of strain ETR14 at pH 7.4 and 37 °C in DSC-97 medium amended with different concentrations of NaCl. Each point represents the mean of three determinations and two independent experiments (SD < 15% of the mean).**Figure 2.** Phylogenetic tree based on neighbor joining analysis of 1000 resampled data. Values at nodes represent bootstrap values computed with Tree finder and expressed as percentages of 1000 replications. The phylogram showing the position of strain ETR14 with other members of the genus *Halorubrum* based on 16S rRNA gene sequence. Strain ETR14 and outgroup are shown in bold. Only bootstrap values above 30 are shown.

exhibited a maximum proteolysis diameter of 2.4 cm after 3 days of incubation at 37 °C. At NaCl concentration ranging between 10 and 25%, the diameter of the zone of proteolysis was relatively constant, which provided support for the adaptive nature of this strain to a wide range of salinity levels. In the presence of 30% NaCl, however, the proteolytic activity of the ETR4 strain was completely repressed.

The results also revealed that maximum extracellular protease production by *Hrr. ezzemoulense* ETR14 was obtained at 37 °C and at pH 7.5 (data not shown). While protease production was significantly reduced by about 60% on either extremes of temperature, it was quite comparable at extremes of pH. When compared to control conditions wherein no readily available carbon sources were employed in the DSC-97 media, the addition of glucose, mannose, maltose, sucrose, xylose, and starch reduced significantly protease production yields. Furthermore, among the nitrogen sources used, protease production was optimum in the DSC-97 medium supplemented with 1% peptone. Under those conditions, an increase of about 40% in protease activity was observed when compared to the control DSC-97 medium containing only 1% yeast extract.

Various divalent cations were also assayed for their effects on the protease production ability of the *Hrr. ezzemoulense* ETR14 strain. The results revealed that while protease activity was strongly inhibited by Zn^{2+} , it was

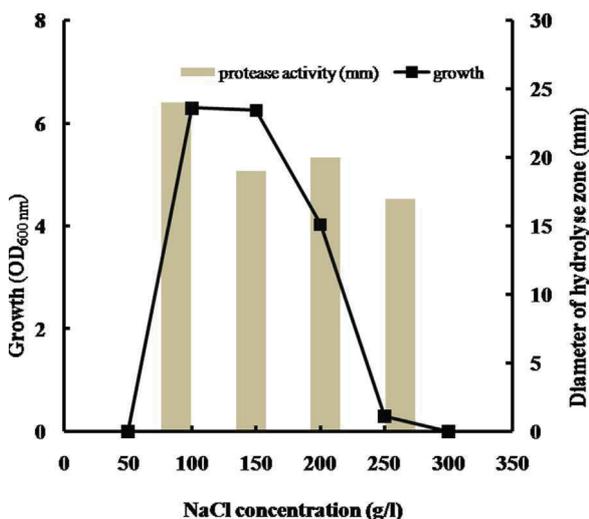


Figure 3. Effect of NaCl concentrations on extracellular protease activity in the cell free supernatant (expressed by the diameter of hydrolyse zone of casein) and growth (OD at 600 nm) of strain ETR14 assayed after 48 h of incubation in DSC-97 medium at 37 °C and pH 7.4. Each point represents the mean of three determinations and three independent experiments (SD < 15% of the mean).

not affected by Mn^{2+} and Ca^{2+} and slightly improved to about 10% by Mg^{2+} .

Growth kinetics and protease production

The investigation of the physico-chemical and culture-related parameters revealed that the highest level of proteolytic activity was obtained when cells were incubated in the DSC-97 medium, containing 10–20% (w/v) NaCl, 1% peptone, and 1% $MgSO_4$, at a temperature of 37 °C and a pH value of 7.4. A good correlation was, therefore, observed between the optimal concentration for growth and for enzyme production.

To investigate the presence of protease activity during growth under the optimum conditions described above, samples were harvested during different stages of ETR14 growth. The cells were separated from culture media by centrifugation, and cell-free supernatants were used for the determination of protease activity using the casein method. The results presented in Fig. 4 show that, after a short lag phase of 5 h, the cells exhibited an exponential phase of growth for up to 52 h, which was then followed by a stationary phase. Protease secretion was detected in the fermentation broth as soon as the strain started the active growth phase and then gradually increased until reaching maximum activity ($284 U ml^{-1}$) at the end of the exponential growth phase after about 45 h of culture.

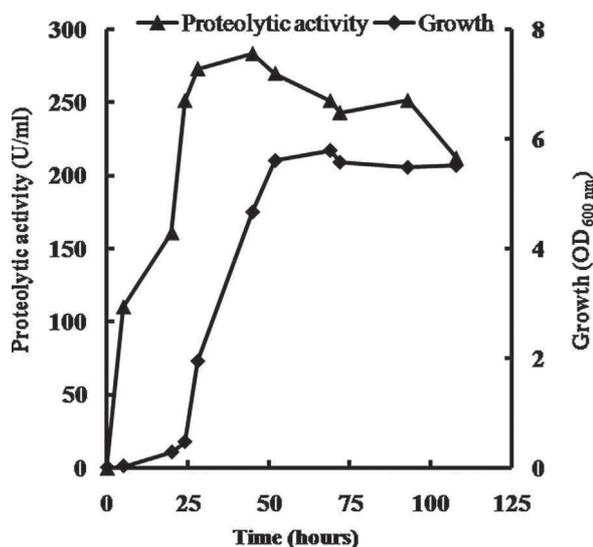


Figure 4. Proteolytic activity during the growth curve of *Hrr. ezzemoulense* ETR14. The isolate was grown in DSC-97 medium supplemented with 15% NaCl, 1% peptone, 1% $MgSO_4$, at a temperature of 37 °C and pH 7.4. Samples were taken at different time intervals, cell growth was determined at OD_{600nm} and the cells free supernatant was assayed for proteolytic activity. Each point represents the mean of three determinations and three independent experiments (SD < 15% of the mean).

Properties of the extracellular protease

In order to determine the properties of the proteolytic enzyme produced by *Hrr. ezzemoulense* ETR14 strain in the supernatant, the effect of pH, temperature, and stability against heat and detergents were investigated. The results presented in Fig. 5 showed that the enzyme was active in broad range pH of 7–10, with optimum activity at pH 9. The enzyme retained 90% of activity at pH 10 thus demonstrating its alkali tolerance. The protease was also thermoactive in the temperature range of 50–70 °C, with optimum levels being observed at 60 °C (Fig. 5). The temperature kinetics of the protease suggested that enzyme activity increased sharply from 40 to 60 °C, and then started to decline after 60 °C. Moreover, the results illustrated in Fig. 6 show that the protease was stable in 20% NaCl at 50–60 °C for more than 1 h. At 70 °C, the enzyme was stable for up to 45 min, and was able to retain 87% of its activity after 60 min. Furthermore, the enzyme exhibited considerable stability to anionic detergents, such as SDS, cationic detergents, such as CTAB, and non-ionic detergents, such as Triton X-100 and Tween-80, although enzyme activity was slightly reduced with Tween-20 (data not shown). This provided support for the suitability of the enzyme for application in the detergent industry.

Discussion

Despite their prevalence in habitats with salinities at or near saturation, research on extreme halophilic prokaryotes with hydrolytic activities is very scarce in the literature [22, 23].

In particular, and despite the large flow data on the prokaryotic diversity in the solar saltens of Sfax, Tunisia [3, 5, 24] no screening program has so far been designed to identify extreme halophiles with the ability to break down polymeric compounds. The exploration of hypersaline habitats to search for extreme halophilic microorganisms with the ability to produce hydrolases has, however, attracted increasing attention in recent research worldwide. This is particularly due to the fact that the hydrolysis of high-molecular-weight biopolymers constitutes an initial step in the metabolism of organic compounds in the different ecosystems, thus playing an important role in the carbon and nitrogen cycles of hypersaline environments [25]. Moreover, the discovery of new isolates able to produce new enzymes from nature is very important for industry. With these concerns in mind, the present study was undertaken to investigate the distribution of protease, amylase, and lipase activities in crystallizer and non-crystallizer ponds from the solar salterns of Sfax, Tunisia, and characterize a potential archeal strain able to produce haloalkaline and thermostable protease.

From an ecological viewpoint, the results have shown that the frequencies recorded for strains producing protease and amylase activities in the two ponds were almost 2 times higher than the ones recorded for strains producing lipases. This is in agreement with the results previously reported by Moreno et al. [22] who investigated a salt pond with a salinity of about 15% in the Southwest of Spain and found that the most frequent hydrolytic activity was observed for amylase (70% of total hydrolytic isolates) and protease (17% of total hydrolytic isolates). In an earlier study, however,

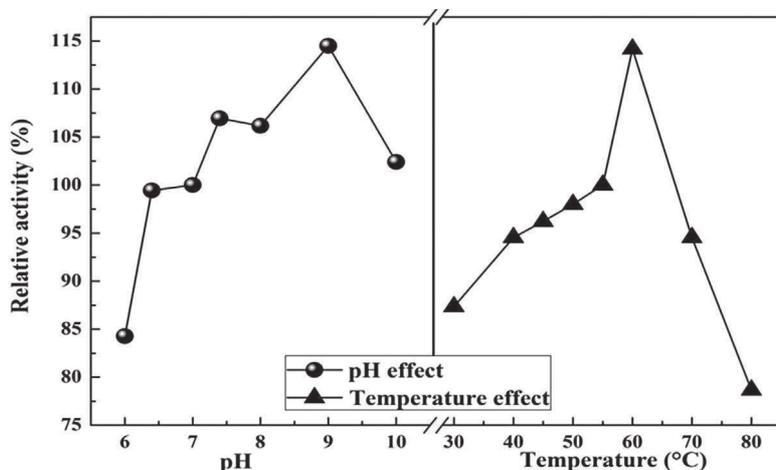


Figure 5. Effects of pH and temperature on the cells free supernatant protease activity. The effect of pH with respected buffer was determined at 55 °C in 20% NaCl (w/v). The effect of temperature was measured at pH 9.0 in 20% NaCl (w/v). Each point represents the mean of two determinations and three independent experiments (SD < 10% of the mean).

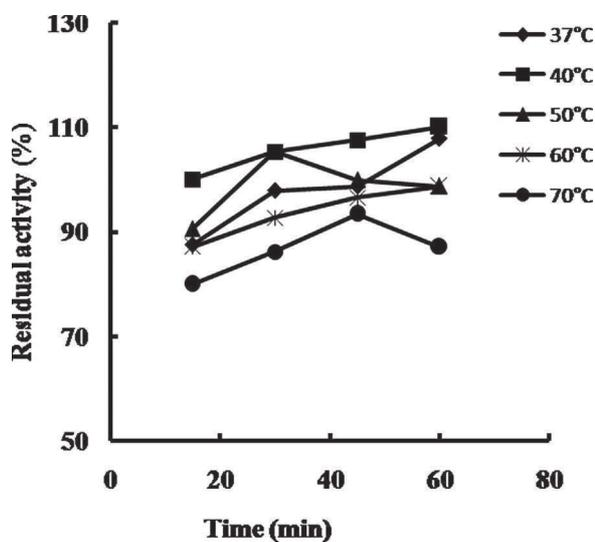


Figure 6. Thermal stability of the extracellular protease. Cells free supernatant enzyme was incubated at different temperatures, pH 9.0 in 20% NaCl (w/v) and samples were withdrawn at different time interval for residual protease assay. Each point represents the mean of two determinations and three independent experiments (SD < 5% of the mean).

González and Gutiérrez [26] reported that extracellular lipase production represented 66% of their haloarchaea. More recently, Bhatnagar et al. [16] screened an Algerian culture collection for lipolytic activity and reported on the detection of lipolytic activity in 35 haloarchaea. The differences in those results could presumably be attributed to differences in the physico-chemical conditions of the sites and screening methods employed [27]. If we assume that these frequencies are related to the nature of the organic matter in the pond, these results suggest that carbohydrates and proteins in the solar saltern of Sfax are the major carbon sources for the halophilic prokaryotes inhabiting the two ponds. Interestingly, frequencies of total positive strains that could produce hydrolase activities were reduced, from 75% in the non-crystallizer pond, to 50% in the crystallizer one, despite the reported increase in the density of the total prokaryotic communities [3, 28]. Thus, shift in the metabolism of a fraction of heterotrophic prokaryotes in the crystallizer pond from high-molecular-weight biopolymers catabolism to lower molecular-weight could be suggested. This is in agreement with the results previously reporting that, at salinities higher than 25%, the glycerol produced by *Dunaliella salina*, one of the last Eukarya capable of surviving and proliferating at such salinities, becomes the main energy and carbon sources for the heterotrophic prokaryote [29, 30]. Moreover, our results previously

reported on the same ponds, showed that when salinity exceeds 25%, heterotrophic archaea related to *Haloquadratum*, *Haloferax*, and *Halorubrum* genera become the most dominant [5, 31]. Such prevalence of survival rates in hypersaline habitats have been ascribed to different reasons, including the ability of those species to adapt the osmotic stress [25] or to overcome interspecific competitors [27]. Another possible explanation pertain to the genetic background of those genera to catabolize low molecular weigh carbon sources, via the semi-phosphorylated Entner-Doudoroff (ED) and the tricarboxylic acid (TC) pathways [32–34].

The results of the present study also revealed that the frequency of hydrolase activities decreased with the increase of salinity. In fact, when the frequencies of protease, amylase, and lipase positive strains in the two ponds were compared, the frequencies recorded for the non-crystallizer pond (43, 57, and 21%) were twice as high as those observed for the crystallizer pond (23, 23, and 11%, respectively). This could presumably be ascribed to the high selection pressure at the crystallizer pond, which reduces cells diversity and, hence, leads to the development of only several assemblages with reduced enzymatic potentialities. Furthermore, most of the hydrolase positive strains that survived in the crystallizer pond could have lost their culturability on solid media as reported previously by Boujelben et al. [31].

From a biotechnological viewpoint, extreme halophilic archaea are a physiologically diverse group of interest for the synthesis of various industrial enzymes and metabolic products [35, 36]. The results from the optimization assays of the enzyme production medium revealed the title strain demonstrated a protease activity comparable to and even higher than several other isolates reported in the literature. Vidiyasagard et al. [8] has, for instance, reported on 65 U ml^{-1} of haloalkaliphilic thermostable protease production from *Halogeometricum* sp. TSS101 isolated from the solar salt evaporation pond of an Indian coastal region. The results of our study showed that the *Hrr. ezzemoulense* ETR14 strain gave a protease production yield of 284 U ml^{-1} , a value that was four times higher than that of the *Halogeometricum* strain. D'Alessandro et al. [37] have reported that the haloarcheon *Natrialba magadii* strain was able to produce only 4 U ml^{-1} of haloalkaliphilic thermostable protease.

The properties displayed by the haloalkaline protease from *Hrr. ezzemoulense* ETR14 differs from those reported for *Halogeometricum* sp. TSS101[38] and *Natrialba magadii* [39]. The *Hrr. ezzemoulense* ETR14 strain grows in a broader pH range (6–9) and its extracellular protease does not have a strict pH requirement for its activity.

Enzyme activity was stable at 10–25% NaCl, 30–60 °C, and pH from 7 to 9. Most of the halophilic enzymes previously reported in the literature required a temperature ranging between 50 and 65 °C and a neutral pH for optimal activity [6]. Taken together, the results presented in this work indicated that the haloalkaline protease secreted by *Hrr. ezzemoulense* ETR14 has a wide range of attractive properties, which make it a potential promising candidate for use in various biotechnological applications and processes, including the treatment of saline waters or development of waste management solutions with proteinaceous materials and salt contents. Accordingly, further studies, some of which are currently underway in our laboratory, are needed to purify the enzyme and further characterize its catalytic properties.

Acknowledgments

We thank the Tunisian COTUSAL salt company in Sfax for permission to access to the saltern and Mr. Anouar Smaoui and Mrs. Hanen Ben Salem from the English Language Unit at the Faculty of Science of Sfax, Tunisia, for their valuable proofreading and language editing services.

References

- [1] Nijafi, M.F., Deobagkar, D., Deobagkar, D., 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD 100. *Electronic J. Biotechnol.*, **8**, 197–203.
- [2] Antón, J., Peña, A., Santos, F., Martínez-García, M., 2008. Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Syst.*, **4**, 15–25.
- [3] Boujelben, I., Gomariz, M., Martínez-García, M., Santos, F., et al., 2012. Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Anton. Leeuw.*, **101**, 845–857.
- [4] Mevarech, M., Frolow, F., Gloss, L.M., 2000. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.*, **86**, 155–164.
- [5] Trigui, H., Masmoudi, S., Brochier-Armanet, C., Barani, A., et al., 2011. Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and phylogenetic analysis. *Extremophiles*, **15**, 347–358.
- [6] Gomes, J., Steiner, W., 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food. Technol. Biotechnol.*, **42**, 223–235.
- [7] Mellado, A., Sanchez-Porro, C., Ventosa, A., 2005. Proteases produced by halophilic bacteria and archaea. In: Barredo, J.L. (Ed.), *Microbial Enzymes and Biotransformations*, Humana Press Inc., pp. 181–190.
- [8] Vidyasaga, R.M., Prakash, S., Sreeramulu, K., 2006. Optimization of culture conditions for the production of haloalkaliphilic thermostable protease from an extremely halophilic archaeon *Halogetometricum* sp. TSS101. *Let. Appl. Microbiol.*, **43**, 385–391.
- [9] Vijayanand, S., Hemapriya, J., Selvin, J., Kiran, S., 2010. Production and optimization of haloalkaliphilic protease by an extremophile *Halobacterium* sp. Js1, isolated from Thalassohaline environment. *Glob. J. Biotechnol. Biochem.*, **5**, 44–49.
- [10] Vidyasagar, M., Prakash, S., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K., 2007. Optimization of culture conditions for the production of halothermophilic protease from halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TV SP101. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 655–662.
- [11] DasSarma, S., Fleischmann, E.M., Rodriguez-Valera, F., 1995. Appendix 2: media for halophiles, in: DasSarma, S., Fleischmann, E.M. (Eds.), *Archaea: A Laboratory Manual: Halophiles*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 225–230.
- [12] Reasoner, D.J., Geldreich, E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1–7.
- [13] Quesada, E., Valderrama, M.J., Bejar, V., Ventosa, A., et al., 1990. *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic non motile gram-negative rod. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 261–267.
- [14] Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 504–544.
- [15] Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F., Malik, K.A., Schumann, P., et al., 2003. *Halobacillus karajensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1059–1063.
- [16] Bhatnagar, T., Boutaiba, S., Hacene, H., Cayol, J.L., et al., 2005. Lipolytic activity from Halobacteria: screening and hydrolase production. *FEMS Microbiol. Lett.*, **248**, 133–140.
- [17] Amoozegar, M.A., Azadeh, Z.F., Hamid, R., Karbalaie-Heidarib, H.R., et al., 2007. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol. Res.*, **162**, 369–377.
- [18] Trigui, H., Masmoudi, S., Brochier-Armanet, C., Maalej, S., et al., 2011. Survival of extremely and moderately halophilic isolates of Tunisian solar salterns after UV-B or oxidative stress. *Can. J. Microbiol.*, **57**, 923–933.
- [19] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 3389–3402.
- [20] Jobb, G., von Haeseler, A., Strimmer, K., 2004. TREE-FINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.*, **4**, 18.
- [21] Vetriani, C., Jannasch, H.W., MacGregor, B.J., Stahl, D.A., et al., 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4375–4384.
- [22] Moreno, M.L., García, M.T., Ventosa, A., Mellado, E., 2009. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and

- protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **68**, 59–71.
- [23] Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A., 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.*, **194**, 295–300.
- [24] Baati, H., Guerhazi, S., Amdouni, R., Gharsallah, N., *et al.*, 2008. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles*, **12**, 505–518.
- [25] Oren, A., 2002. Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol.*, **39**, 1–7.
- [26] González, C., Gutiérrez, C., 1970. Presence of lipase among species of extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 1165–1166.
- [27] Bhakti, B.S., Kabilan, M., Sowmya, G., Judith, M.B., 2012. Interspecific interactions among members of family Halobacteriaceae from natural solar salterns. *Probiotics. Antimicrob. Prot.*, **4**, 98–107.
- [28] Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., 1999. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ. Microbiol.*, **1**, 517–523.
- [29] Elloumi, J., Guerhazi, W., Ayadi, H., Bouain, A., *et al.*, 2009. Abundance and biomass of prokaryotic and eukaryotic microorganisms coupled with environmental factors in an arid multi-pond solar saltern (Sfax, Tunisia). *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **89**, 243–253.
- [30] Elevi Bardavid, R., Khristo, P., Oren, A., 2006. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles*, **12**, 5–14.
- [31] Boujelben, I., Martínez-García, M., Pelt, J.V., Maalej, S., 2014. Diversity of cultivable halophilic archaea and bacteria from superficial hypersaline sediments of Tunisian solar salterns. *Anton. Leeuw.*, **106**, 675–692.
- [32] Danson, M.J., Hough, D.W., 1992. The enzymology of archaeobacterial pathways of central metabolism. *Biochem. Soc. Symp.*, **58**, 7–21.
- [33] Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., *et al.*, 2008. Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, **12**, 177–196.
- [34] Verhees, C.H., Kengen, S.W., Tuininga, J.E., Schut, G.J., *et al.*, 2003. The unique features of glycolic pathways in Archaea. *Biochem. J.*, **375**, 231–246.
- [35] Litchfield, C.D., 2011. Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 1635–1647.
- [36] Oren, A., 2011. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.*, **31**, 825–834.
- [37] D'Alessandro, C.P., De Castro, R.E., Giménez, M.I., Paggi, R.A., 2007. Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **44**, 637–642.
- [38] Yu, X.T., 1991, Protease of haloalkaliphiles, in: Horikoshi, K., Grant, W.D. (Eds), *Superbugs*, Springer Verlag, New York, 76–83.
- [39] Giménez, M.I., Studdert, C., Sánchez, J.J., De Castro, R.E., 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, **4**, 181–188.

Liste des communications

Communications orales

Fadoua Ghanmi, Alyssa Carré-Mlouka, Jean Peduzzi, Sylvie Rebuffat, and Sami Maalej (2015). Production and characterization of halocin S8 produced by the strain *Halobacterium salinarum* ETD5, isolated from the solar saltern of Sfax. The 26th Congress of ATSB, Tunisian Association of Biological Sciences, Monastir, Tunisia.

Fadoua Ghanmi, Alyssa Carré-Mlouka, Jean Peduzzi, Manon Vandervennet, Sylvie Rebuffat, and Sami Maalej (2013). Production and characterization of antimicrobial peptides by extremely halophilic archaea, isolated from the solar saltern of Sfax. The 40th Congress of CIESM, International Commission for the Scientific Exploration of the Mediterranean Sea: Marseille, France.

Communications par affiches

Fadoua Ghanmi, Alyssa Carré-Mlouka, Jean Peduzzi, Sami Maalej and Sylvie Rebuffat (2016). The solar saltern of Sfax, environment extreme: source of new antimicrobial peptides. Colloque MTE2016 la microbiologie dans tous ses états, Paris, France.

Fadoua Ghanmi, Alyssa Carré-Mlouka, Jean Peduzzi, Sylvie Rebuffat, and Sami Maalej (2014). Halocin-producing archaea from the solar saltern of Sfax (Tunisia). The first Congress of Young Natural History Scientific Meeting, Paris, France.

Fadoua Ghanmi, and Sami Maalej (2012). Screening of new strains of halophilic archaea producing antimicrobials. The 14th Days of Tunisian Association of Marine Sciences ATSmr, Sousse, Tunisia.

Résumé

La saline de Sfax est un milieu hypersalin localisé dans la zone centrale de la côte est de Tunisie. Dans ce travail, nous avons isolé, identifié, et caractérisé des souches halophiles produisant des peptides antimicrobiens (halocines), afin de mieux comprendre leur rôle dans les interactions microbiennes au sein des milieux hypersalins. Deux étangs salins (TS18, 390 g.L⁻¹ NaCl et M1, 200 g.L⁻¹ NaCl) ont été choisis pour l'échantillonnage. Trente-cinq souches de procaryotes halophiles ont été isolées et caractérisées, dont 11 ont présenté une activité antimicrobienne. Parmi ces souches, 3 produisent des substances antimicrobiennes de nature protéique. A l'aide de PCR et RT-PCR nous avons montré que les souches *Halobacterium salinarum* ETD5 et ETD8 exprimaient le gène de l'halocine S8, un peptide de 3,6 kDa préalablement purifié d'une souche S8a non identifiée. Le peptide a été purifié à partir de cultures de la souche *Hbt. salinarum* ETD5. Après purification bioguidée, les fractions actives révèlent deux bandes de 8 et 14 kDa présentant une activité antimicrobienne. L'analyse par séquençage N-terminal et spectrométrie de masse a permis d'identifier ces deux halocines. La bande de 8 kDa correspond à une halocine S8 de 81 acides aminés qui subirait une maturation post-traductionnelle protéolytique différente de celle initialement décrite dans la littérature. Le clonage et le séquençage du gène codant le précurseur de l'halocine S8 démontrent que la séquence est identique chez les deux souches ETD5 et S8a. La bande de 14 kDa correspond à une nouvelle halocine, l'halocine S14. L'halocine S14 correspond à une forme tronquée en partie N-terminale de la Mn-superoxyde dismutase (SOD) d'*Hbt. salinarum*. Il pourrait s'agir d'évolution divergente d'un gène codant deux protéines distinctes, ou d'une maturation différente de la SOD. Ce travail permettra de mieux connaître les molécules intervenant dans les interactions microbiennes dans les milieux hypersalins, des milieux extrêmes susceptibles de révéler des structures et des modes d'action originaux.

Mots clés : Milieu hypersalin, archées halophiles, *Halobacterium*, peptides antimicrobiens, halocines, superoxyde dismutase.

Abstract

The solar saltern of Sfax is a hypersaline located in the central area of the eastern coast of Tunisia. In this study, we isolated, identified, and characterized halophilic strains producing antimicrobial peptides (halocins), aiming to understand their role in microbial interactions in hypersaline environments. Two ponds (TS18, 390 g.L⁻¹ NaCl and M1, 200 g.L⁻¹ NaCl) were selected for sampling. Thirty-five halophilic strains have been isolated and characterized, among which 11 displayed antimicrobial activity. Three of them produced antimicrobial substances of proteinaceous nature. Using PCR and RT-PCR, we have demonstrated that *Halobacterium salinarum* ETD5 and ETD8 express the gene encoding halocin S8, a 3.6 kDa peptide previously isolated from a strain S8 unidentified. The peptide was purified from cultures of strain *Hbt. salinarum* ETD5. Following bioguided purification, the active fractions revealed two protein bands of 8 and 14 kDa exhibiting antimicrobial activity. N-terminal sequencing and mass spectrometry analyses allowed identification of these two halocins. The 8 kDa band corresponds to halocin S8, undergoing a different proteolytic post-translational processing from that originally described. Cloning and sequencing of the gene encoding the precursor of halocin S8 showed that the sequence is identical for both strains ETD5 and S8a. The 14 kDa band is a new halocin termed halocin S14. Halocin S14 corresponds to an N-terminally truncated portion of the archaeal Mn-superoxide dismutase (SOD). This could result from divergent evolution of a gene encoding two distinct proteins, or a different post-translational processing of SOD. Our study helps to better understand which molecules are involved in microbial interactions within hypersaline environments and how they contribute to the competitions in such extreme environments, which are susceptible to give rise to original structures and modes of action.

Keywords: hypersaline environments, halophilic archaea, *Halobacterium*, antimicrobial peptides, superoxide dismutase.