

Étude de la diversité archéenne dans les salaisons, les fromages et les aliments à saumure

Présenté par Anthony Bernard

Promoteur : Prof. Jacques Mahillon (UCL/ELI/MIAE)

Lecteurs : Prof. Véronique Delcenserie (ULg/DDA)
Prof. Claude Bragard (UCL/ELI/ELIM)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de **Bioingénieur : sciences agronomiques**

Pour commencer, je voudrais remercier mon promoteur, le Professeur Jacques Mahillon, pour avoir proposé un tel sujet. Ses précieux conseils combinés à sa gestion conviviale du labo MIAE ont rendu mon mémoire des plus agréable.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance toute particulière à Carole Michaux qui a suivi mon travail de A à Z. Sa rigueur, ses connaissances et sa disponibilité ont grandement contribué à la réussite de ce mémoire. Je la remercie aussi pour la lecture et la correction approfondie du travail.

Pour avoir répondu à mes nombreuses questions mais aussi pour avoir organisé d'innombrables goûters, je remercie tous les membres du laboratoire MIAE. Je remercie aussi tous les mémorants avec qui j'ai partagé cette expérience.

Je remercie également Véronique Delcenserie et Claude Bragard d'être lecteurs et jury de ce mémoire.

Enfin, je remercie ma famille, mes amis et toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont ajouté leur grain de sel dans ce mémoire et m'ont soutenu au cours de ces cinq dernières années. Je remercie en particulier Julien pour sa relecture soignée du travail.

Bonne lecture.

Table des matières

Table des matières	i
Liste des abréviations	iii
1 Introduction	- 1 -
1.1 Les archées	- 1 -
1.1.1 Historique des découvertes et phylogénie.....	- 1 -
1.1.2 Diversité et écologie.....	- 3 -
1.1.3 Caractéristiques principales.....	- 4 -
1.1.4 Métabolisme.....	- 7 -
1.1.5 Applications	- 7 -
1.2 Les haloarchées	- 10 -
1.2.1 Introduction sur les organismes halophiles.....	- 10 -
1.2.2 Classification des archées halophiles et diversité.....	- 11 -
1.2.3 Écologie	- 14 -
1.2.4 Caractéristiques principales.....	- 15 -
1.2.5 Métabolisme.....	- 17 -
1.2.6 Adaptations osmotiques aux milieux salins.....	- 18 -
1.3 Les archées dans l'alimentation.....	- 20 -
2 Objectifs	- 24 -
3 Matériel et méthodes.....	- 25 -
3.1 Échantillons	- 25 -
3.1.1 Charcuteries.....	- 25 -
3.1.2 Fromages	- 25 -
3.1.3 Sels de salage	- 26 -
3.2 Milieux de culture.....	- 26 -
3.2.1 CDM (Chemically Defined Medium).....	- 27 -
3.2.2 Hv-YPG (Yeast-Peptone-Casamino acids)	- 29 -
3.2.3 MGM (Modified Growth Medium)	- 30 -
3.2.4 DBCM2.....	- 31 -
3.3 Mise en culture	- 32 -
3.3.1 Charcuteries et fromages	- 32 -
3.3.2 Sels	- 33 -
3.4 Prélèvement des colonies	- 34 -
3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	- 34 -
3.6 Électrophorèse.....	- 36 -

3.7	Séquençage	- 36 -
3.8	Nomenclature des isolats	- 37 -
3.9	Conservation longue durée des souches.....	- 37 -
3.10	Microbiologie alimentaire	- 37 -
3.10.1	Préparation des échantillons.....	- 38 -
3.10.2	Mise en culture et normes respectées.....	- 38 -
3.11	Extraction d'ADN total des sels et des aliments.....	- 40 -
3.11.1	Extraction d'ADN à partir des sels	- 40 -
3.11.2	Extraction d'ADN à partir d'aliments : DNeasy® PowerFood® Microbial Kit....	- 40 -
3.11.3	Extraction d'ADN à partir d'aliments : NucleoSpin® Food	- 41 -
3.12	Nested-PCR pour la métagénomique.....	- 41 -
4	Résultats.....	- 42 -
4.1	Microbiologie culture-dépendante	- 42 -
4.1.1	Culture sur milieux spécifiques pour les sels de salage.....	- 42 -
4.1.2	Culture sur milieux spécifiques pour les matrices alimentaires	- 51 -
4.1.3	Microbiologie alimentaire	- 56 -
4.2	Microbiologie culture-indépendante.....	- 58 -
5	Discussion.....	- 60 -
5.1	Le choix des matrices alimentaires	- 60 -
5.2	Le choix des milieux et des conditions de culture	- 66 -
5.3	Le protocole de la méthode culture-indépendante	- 68 -
6	Conclusion et perspectives	- 70 -
	Bibliographie.....	- 72 -
	Annexes	- 83 -
	Annexe 1 : Gels d'électrophorèse.....	- 83 -
	Annexe 2 : Colonies isolées	- 89 -

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
°C	Degré Celsius
β	Béta
μm	Micromètre
μl	Microlitre
<i>al.</i>	Alii
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN _r	Acide ribonucléique ribosomal
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
A _w	Activité de l'eau
BeT	Bromure d'Ethidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDM	Chemically Defined Medium
CFU	Colony Forming Unit
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DPANN	<i>Diapherotrites</i> , <i>Parvarchaeota</i> , <i>Aenigmarchaeota</i> , <i>Nanoarchaeota</i> et <i>Nanohaloarchaeota</i>
EDTA	Éthylène diaminetétra-acétique
EPT	Eau Peptonée Tamponnée
F	Forward
FBA	Fromage « Œillet de Bouillon » bergerie d'Acremont
FC	Fromage de Chimay
FH	Fromage de Herve doux
FM	Fromage Morbier
FMAT	Flore Mésophile Aérobie Totale
FS	Fromage Sarté
g	Gramme(s)
h	Heure(s)
ISO	International Organization for Standardization
JB	Jambon Boucherie « Istace »
JFA	Jambon « Fumet des Ardennes »
JI	Jambon italien
kDa	Kilo Dalton
LE	Low Electroendosmosis
LPSN	List of Procaryotic Names with Standing Nomenclature
M	Molaire
Mb	Mégabase
MGM	Modified Growth Medium
ml	Millilitre
MPa	Méga Pascal
MRS	Man, Rogosa, Sharp

NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanomètre
P	Pression de vapeur d'eau
P ₀	Pression de vapeur d'eau saturante
Pb	Paire de bases
PCA	Plate Count Agar
pH	Potentiel Hydrogène
PHA	Poly- β -hydroxyalkanoate
PCR	Polymérase Chain Reaction
R	Reverse
RPF	Rabbit Plasma Fibrinogène
rpm	Rotations par minute
SeBA	Sel Bergerie d'Acremont
SeBI	Sel Boucherie Istace
SeFA	Sel « Fumet des Ardennes »
SL	Solution d'éléments traces
SF	Saucisson Fuetec « Elpozo »
SFA	Saucisson sec « Fumet des Ardennes »
<i>sp.</i>	Espèce
<i>spp.</i>	Sous-espèce
SW12	Salt Water 12%
SW18	Salt Water 18%
SW25	Salt Water 25%
SW30	Salt Water 30%
TACK	<i>Thaumarchaeota</i> , <i>Aigarchaeota</i> , <i>Crenarchaeota</i> et <i>Korarchaeota</i>
TAE	Tris, Acétate, EDTA
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
USP	United States Pharmacopeial
UV	Ultraviolet
Vit	Solution de vitamines
YGC	Yeast-Glucose-Chloramphénicol
YPC	Yeast-Peptone-Casamino acids

1 Introduction

1.1 Les archées

1.1.1 Historique des découvertes et phylogénie

C'est dans les années 1950 que des preuves évidentes de l'existence d'une lignée supplémentaire en plus des procaryotes (alors constitués seulement des eubactéries) et des eucaryotes commence à voir le jour. En effet, de nombreuses « bactéries exceptionnelles » étudiées à l'époque montrent des liens phylogénétiques incertains avec les autres organismes. H. A. Barker rassemble par exemple en 1956, dans un même groupe taxonomique et sur base physiologique, l'ensemble des « bactéries méthanogènes », celles-ci étaient auparavant dispersées au sein de différents genres bactériens sur base de critères morphologiques (Barker, 1956). Ces organismes sont maintenant reconnus comme les premières archées étudiées (Jones *et al.*, 1987).

Au début des années 1970, deux nouvelles « bactéries exceptionnelles » sont découvertes : le genre *Sulfolobus* dans une source chaude de Yellowstone et le genre *Thermoplasma* dans du charbon de combustion (Brock *et al.*, 1972 ; Darland *et al.*, 1970). Elles possèdent une paroi et une composition lipidique membranaire inhabituelles (Langworthy *et al.*, 1970 ; 1974). Ces spécificités seront plus tard attribuées à leur environnement extrême à faible pH et haute température (Brock, 1978). Peu de temps après, on découvre que l'ADN de *Thermoplasma* est associé à des histones, structures que l'on pensait spécifiques aux eucaryotes et jamais rencontrées au sein des procaryotes (Searcy *et al.*, 1980). Des études sur *Halobacterium* (maintenant un genre parmi les archées) la définissent comme entité des bactéries aérobies Gram- alors qu'il est connu qu'elle possède des caractéristiques la différenciant : structure de la paroi et composition de la membrane plasmique (Larsen *et al.*, 1984 ; Kushner *et al.*, 1964 ; Sehgal *et al.*, 1962). Il n'est à l'époque pas encore possible de montrer un lien entre les bactéries méthanogènes et ces « bactéries exceptionnelles » et encore moins d'imaginer qu'elles ne sont pas des bactéries étant donné leurs ressemblances morphologiques.

C'est en se basant sur une nouvelle approche d'analyse des variations dans les séquences d'ARNr 16S entre différents organismes que Carl R. Woese et George E. Fox confirment pour la première fois en 1977 l'hypothèse de l'existence de cette troisième lignée d'êtres vivants : les

archéobactéries (Zuckerandl *et al.*, 1965 ; Holley *et al.*, 1965). Ils divisent ainsi les procaryotes en deux groupes phylogénétiques. L'ARNr 16S constitue la petite sous-unité des ribosomes de procaryotes et possède une vitesse d'évolution relativement lente qui permet d'établir des divergences génétiques anciennes. Les archéobactéries ne sont, à ce moment, représentées que par les « bactéries méthanogènes » décrites quelques années auparavant (Woese *et al.*, 1977). Ces « bactéries » se retrouvent principalement dans les boues, les sédiments marins, le tractus digestif des animaux et dans des conditions similaires à celles existant probablement sur terre il y a 3-4 milliards d'années, d'où leur nom signifiant « primitif » en grec ancien (Zeikus *et al.*, 1977 ; Rusch *et al.*, 2016).

Ce n'est qu'en 1978 que Woese, Magrum et Fox réunissent les méthanogènes, les extrêmes halophiles et les thermoacidophiles au sein des archéobactéries, sur base de caractéristiques communes (Woese, 1978 ; Magrum *et al.*, 1978).

En 1990, Carl R. Woese et son équipe proposent de rebaptiser les trois lignées en trois « domaines » : les eucaryotes, les bactéries et les archées (Woese *et al.*, 1990). Ces dernières montrent au niveau de leur ARNr 16S de plus en plus de caractéristiques communes à la fois aux bactéries et aux eucaryotes mais aussi des propriétés spécifiques (Woese *et al.*, 1983). On sait aussi désormais qu'il existe deux embranchements au sein du domaine des archées (Figure 1a) : les *Euryarchaeota* comprenant principalement les méthanogènes, les halophiles extrêmes et certains thermophiles (« sulfure dépendants »), et les *Crenoarchaeota* qui comprennent les archées hyper thermophiles et hyper acidophiles comme le genre *Sulfolobus* (Woese, 1987).

En 1996, grâce aux avancées dans les technologies de séquençage ADN et aux approches génomiques cultures-indépendantes, un nouvel embranchement provisoire d'archées est proposé en plus des deux autres : les *Korarchaeota*. Les organismes de ce nouvel embranchement sont découverts dans des échantillons d'eau de source thermale du Yellowstone National Park (Barns S. M. *et al.*, 1994 ; Barns S. M. *et al.*, 1996). D'autres embranchements proches sont ensuite trouvés, les *Thaumarchaeota* et les *Aigarchaeota* (Könneke *et al.*, 2005 ; Brochier-Armanet *et al.*, 2008 ; Nunoura *et al.*, 2011). Tous ces nouveaux embranchements, avec les *Crenoarchaeota* forment ce qu'on appelle aujourd'hui le super-embranchement TACK (Guy *et al.*, 2011).

Tout dernièrement, le super-embranchement DPANN (*Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota* et *Nanohaloarchaeota* mais aussi *Woesearchaeota*, *Micrarchaeota* et *Pacearchaeota*) a été proposé. Il est caractérisé principalement par des membres aux petites cellules et aux petits génomes (Figure 1b) (Baker *et al.*, 2010 ; Eme *et al.*, 2015a). Mais aussi le super-embranchement d'Asgard (*Lokiarchaeota*, *Odinarchaeota*, *Thorarchaeota* et *Heimdallarchaeota*) dont les membres ont été trouvés sur des cheminées hydrothermales au large du Groenland et au Yellowstone National Park (Spang *et al.*, 2015).

Ces dernières années, la théorie de l'Eocyte qui place les eucaryotes au sein des archées, et donc qui remet en question un arbre de la vie à trois domaines, refait surface (Lake *et al.*, 1984). En effet, il semblerait que les eucaryotes soient issus de l'intérieur du domaine des archées, et plus particulièrement soient un groupe sœur du super-embranchement TACK (Guy *et al.*, 2014 ; Eme *et al.*, 2017). Cependant, la récente découverte des archées d'Asgard, qui sont proches phylogénétiquement des eucaryotes et qui possèdent un génome enrichi en protéines précédemment considérées comme spécifiques à ces derniers, montrerait une autre tendance. La première cellule eucaryote serait issue de la fusion d'une archée d'Asgard hôte et d'une alphaprotéobactérie (mitochondrie) (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017 ; Eme L. *et al.*, 2017).

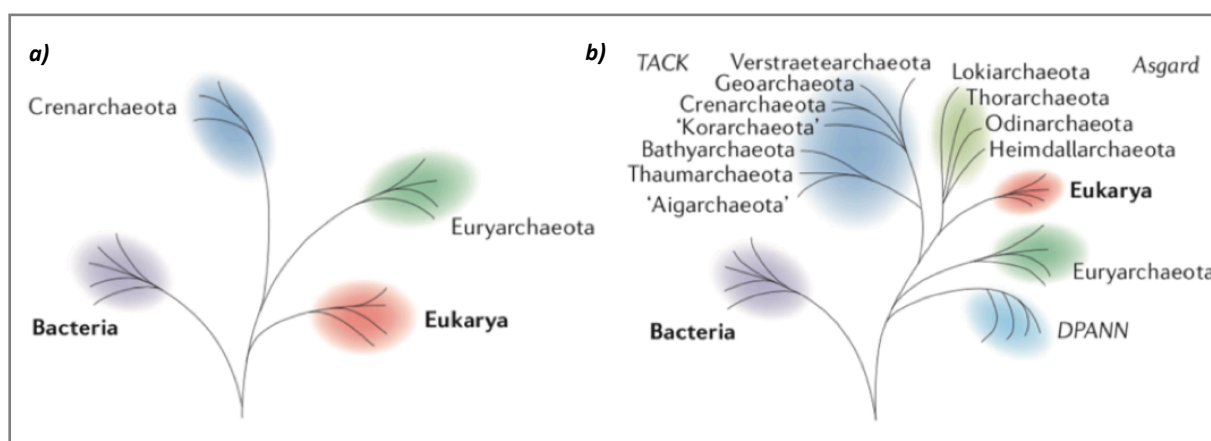


Figure 1: L'arbre phylogénétique et son évolution. a) Début des années 1990 suivant la proposition de Carl R. Woese en 1977 avec les trois lignées (Domaines en 1990) : les bactéries, les archées (Crenarchaeota et Euryarchaeota) et les eucaryotes ; b) Proposition actuelle avec les trois « super-embranchement » (TACK, DPANN et Asgard) et la théorie de l'Eocyte (Eme *et al.*, 2017).

1.1.2 Diversité et écologie

Les archées, comprennent actuellement 176 genres découverts pour 690 espèces identifiées (NCBI, Août 2018). Ces espèces sont réparties en plusieurs embranchements, les deux principaux sont les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota* mais d'autres sont proposés comme les super-embranchements DPANN, d'Asgard ou TACK (Eme *et al.*, 2017). Le phylum des *Crenarchaeota* ne comprend qu'une seule classe, les *Thermoprotei*, et six ordres. Le phylum des *Euryarchaeota* contient lui, 8 classes : *Methanomicrobia* (4 ordres), *Archeoglobi* (1 ordre), *Methanobacteria* (1 ordre), *Methanococci* (1 ordre), *Methanopyri* (1 ordre), *Thermococci* (1 ordre), *Thermoplasmata* (1 ordre) et *Halobacteria* (3 ordres) (voir point 1.2). (LPSN, Août 2018)

Longtemps considérées spécifiques des environnements extrêmes, il est désormais connu que les archées sont répandues dans de nombreux écosystèmes et qu'elles constituent une part considérable de la biomasse microbienne et près de 20% de la biomasse terrestre (Moissl-

Eichinger *et al.*, 2018 ; DeLong *et al.*, 2001). Certaines sont adaptées à des concentrations en sels allant jusque 30% (classe des *Halobacteria*), d'autres peuvent vivre à des températures au-dessus de 120°C et de fortes pressions (*Methanopyrus kandleri* peut croître à 122°C), ou à des pH proches de 0 (*Picrophilus torridus*) et supérieurs à 11 (*Natronococcus*) (Barns *et al.*, 1997 ; Gonzalez-Contreras *et al.*, 2012 ; Takai *et al.*, 2008 ; Rush, 2016 ; Witzany, 2017). Mais les archées sont aussi présentes dans l'eau douce, l'eau de mer, les sols, les marais, les sédiments marins, en symbiose avec les insectes, les coraux, les bactéries ou d'autres archées, dans le système digestif des ruminants ou les muqueuses humaines, dans les aliments ou encore le sel de cuisine (Thiel, 2011). Ainsi, des archées méthanogènes ont été détectées et certaines isolées de la cavité buccale ou vaginale, de la peau et du tractus intestinal humain. Des *Crenarchaeota* et des *Thaumarchaeota* ont aussi été découvertes au sein de ce dernier (Moissl-Eichinger *et al.*, 2017 ; Demonfort *et al.*, 2017).

1.1.3 Caractéristiques principales

Les archées sont des organismes unicellulaires sans noyau, ni organites membraneux. Elles sont asexuées, se reproduisent par fission binaire et sont non-sporulantes (Reece *et al.*, 2012). Beaucoup ont une taille entre 0,5 et 2 µm (Thiel, 2011). Certaines comme *Nanoarchaeum equitans* ne mesurent cependant que 400 nm de diamètre, ce qui font d'elles les plus petits organismes cellulaires connus (Huber *et al.*, 2002 ; Brochier *et al.*, 2005). D'autres peuvent cependant atteindre 100 µm de long comme *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* (Elkins *et al.*, 2008). Elles sont de formes sphériques, spiralées, en bâtonnets, carrées ou irrégulières. Certaines archées possèdent aussi un/des flagelle(s) comme *Pyrococcus furiosus* (Fiala *et al.*, 1986).

Les archées ne sont à priori pas pathogènes mais leur rôle dans la santé humaine reste très incertain. Il existe en revanche de nombreuses symbioses ou « parasitismes » avec les bactéries, les eucaryotes ou d'autres archées (Moissl-Eichinger *et al.*, 2011). *Cenarchaeum symbiosum* est ainsi en symbiose avec l'éponge *Axinella mexicana* et lui permettrait d'évacuer l'ammonium (Preston *et al.*, 1996 ; Turque *et al.*, 2010). *Nanoarchaeum equitans* se place quant à elle à la surface d'une autre archée, *Ignicoccus hospitalis*, et serait dépendante de cet hôte pour survivre (Jahn *et al.*, 2008). Certaines archées sont capables d'échanger des gènes entre elles au sein de biofilms, c'est le cas d'*Halorubrum lacusprofundi*, une archée halophile trouvée en Antarctique (DeMaere *et al.*, 2013). Les archées peuvent aussi être attaquées par des virus (Prangishvili *et al.*, 2016).

Bien qu'elles montrent une morphologie cellulaire procaryote, les archées se distinguent des bactéries et partagent beaucoup de caractéristiques avec les cellules eucaryotes (Ventosa *et al.*, 2015 ; Reece *et al.*, 2012). Certaines caractéristiques communes avaient déjà été pointées en 1978 par Carl R. Woese (Woese, 1978).

Membrane plasmique

Alors que pour les bactéries et les eucaryotes la membrane plasmique est composée de phospholipides consistant en un glycérol-3-phosphate hydrophile relié à des acides gras linéaires hydrophobes par un lien ester, la membrane plasmique des archées est formée, quant à elle, de chaînes d'isoprènes branchées à des groupes méthyles (le phytanyle) et reliées à un glycérol-1-phosphate par des liens éthers (Kates, 1993). Le plus commun d'entre eux est le diphytanylglycérol diéther (ou archéol) qui possède des chaînes à 20 carbones. Mais il existe aussi des structures plus uniques tel le diphytanylglycérol tétraéther (ou caldarchéol) formé de deux groupes hydrophiles connectés par des chaînes isoprènes de 40 carbones, permettant la formation d'une membrane monocouche et rendant la membrane plus stable et imperméable (Langworthy, 1977 ; Jacquemet *et al.*, 2009). Il a été montré que la composition de la membrane plasmique des archées varie en fonction de l'organisme et des conditions environnementales (Ulrich *et al.*, 2009). Ainsi, les archées hyperthermophiles comme *Thermococcus kodakarensis* augmentent leur ratio caldarchéol/archéol quand les températures montent (Matsuno *et al.*, 2009). Il ne fait aucun doute que ces structures particulières procurent un avantage aux archées pour survivre en milieux hostiles (Kates, 1993 ; Matsumi *et al.*, 2011).

Enveloppe cellulaire

Au contraire des bactéries, les parois cellulaires des archées, pour autant qu'elles en aient une, ne contiennent pas de peptidoglycane (ou muréine). Cette absence a longtemps été utilisée pour différencier ces deux domaines. Les archées montrent en revanche une très grande variété de composition pour leur surface cellulaire (Figure 2) (Varki *et al.*, 2017). Certaines archées possèdent de la pseudomuréine constituée de pseudopeptidoglycane, c'est le cas des *Methanobacteriales* et des *Methanopyrales* (Visweswaran *et al.*, 2011). D'autres archées halophiles extrêmes comme *Halococcus morrhuae* ont une paroi cellulaire composée d'hétéropolysaccharides sulfatés (Steber *et al.*, 1975). La plupart des archées n'ont pas de parois, mais possèdent une S-layer (couche protéique ou glycoprotéique), qui peut aussi parfois être entourée suivant leur environnement d'une couche d'hétéropolysaccharides, la méthanocondroitine, c'est le cas pour *Methanosarcina acetivorans* et *Methanosarcina mazei* (Barton *et al.*, 2014). Certaines souches de *Haloquadratum walsbyi* possèdent même deux S-layer et sécrètent de l'halomucine, une glycoprotéine similaire à la mucine chez les eucaryotes (Varki *et al.*, 2017). La S-layer protège ces cellules de l'environnement extérieur et confère leur forme et leur taille (Francoleon *et al.*, 2009). Les genres halophiles et alcaliphiles comme *Natronococcus* ont, quant à eux, une enveloppe cellulaire composée de polymères de glutamine (Varki *et al.*, 2017). Finalement, certaines archées comme *Ignicoccus hospitalis* ont une double membrane (Näther *et al.*, 2004). La présence ou non d'enveloppe cellulaire permet de classer les archées en Gram+ ou Gram-, respectivement (Kandler *et al.*, 1998).

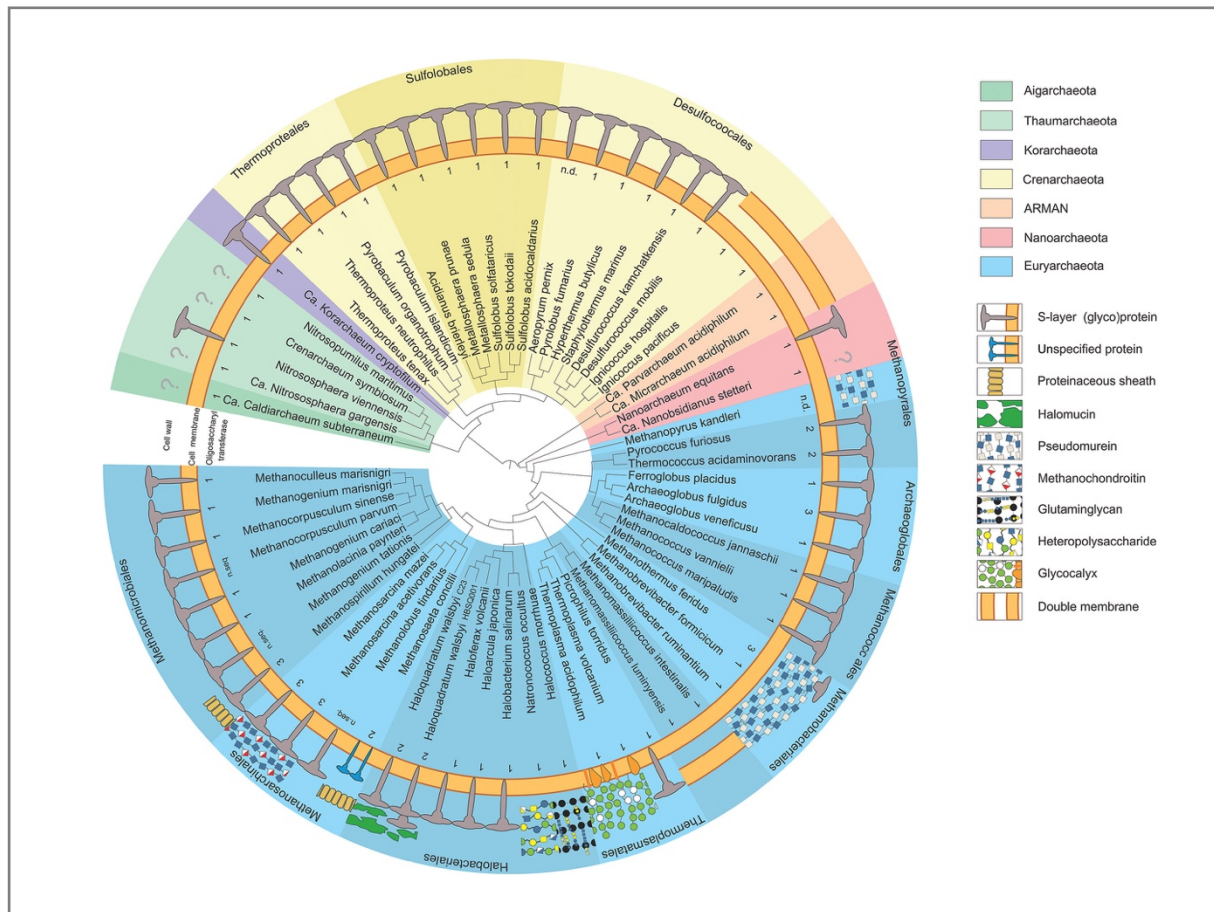


Figure 2 : Diversité de structure et de composition de l'enveloppe cellulaire dans le domaine des archées. L'arbre phylogénétique basé sur le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (Varki et al., 2017).

Matériel génétique

Jusqu'à présent, l'ensemble des archées étudiées ont des chromosomes circulaires avec une taille moyenne de 1,86 Mb, mais des variations existent quant à leur nombre de copies dans la cellule (Li *et al.*, 2014 ; Masai *et al.*, 2017). Les protéines impliquées dans la réplication et la transcription partagent de nombreuses similitudes avec celles des eucaryotes, on les considère même comme leurs homologues simplifiés (Ishino *et al.*, 2012). Les archées possèdent par exemple plusieurs types d'ARN polymérase constitués de 8 polypeptides (archées méthanogènes ou halophiles) ou de 10 polypeptides (archées hyperthermophiles). Cette multitude d'ARN polymérase les rapproche des eucaryotes qui en ont aussi plusieurs types (de 10-12 polypeptides) et les différencie des bactéries qui n'en possèdent qu'un type (de 4 polypeptides) (Madigan *et al.*, 2006 ; Reece *et al.*, 2012). Elles possèdent aussi une (comme les bactéries) ou plusieurs origines de réplication (comme les eucaryotes) (Kelman *et al.*, 2018). Des histones sont présentes chez certaines espèces (Searcy *et al.*, 1980). La machinerie de traduction est quant à elle proche de celle des bactéries mais reste spécifique aux archées, ainsi, tous les antibiotiques inhibant la traduction bactérienne sont impuissants contre les archées (Ventosa *et al.*, 2015).

1.1.4 Métabolisme

Il existe des archées aérobies et anaérobies (Eme *et al.*, 2015b). Elles exhibent une grande variété de voies métaboliques, mais elles sont, en revanche, toutes chimiolithotrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent comme source énergétique l'oxydation de molécules organiques ou inorganiques (Thiel, 2011). Aucun pigment chlorophyllien n'a encore été trouvé chez les archées, elles ne sont donc pas phototrophes au sens strict. Cependant, certaines haloarchées possèdent des analogues de bactériorhodopsines qui servent de pompes à protons au travers de la membrane plasmique, ce qui leur permet d'utiliser la lumière comme source énergétique (mais d'une manière différente des phototrophes). (Madigan *et al.*, 2006 ; Thiel, 2011 ; Rush, 2016)

Elles sont pour la plupart autotrophes, utilisant le CO₂ comme source de carbone (Witzany, 2017). Certaines sont chimiolithotrophes et fixent le carbone inorganique avec du H₂ provenant du sol ou des organismes aux alentours (Pedersen, 1997). Mais d'autres sont chimiohétérotrophes et utilisent les carbones organiques largués par d'autres microbes comme le méthanol ou l'acide acétique, et relâchent du CO₂ et du méthane (Barns *et al.*, 1997). Certaines peuvent réduire le Fe(III) comme accepteur d'électrons et l'H₂ ou une molécule organique comme donneurs. Elles peuvent aussi faire partie du cycle de l'azote ou utiliser le soufre (Thiel, 2011). Certaines peuvent finalement aussi faire la méthanogénèse autotrophe, hétérotrophe ou acétoclastique (Warren, 2016).

1.1.5 Applications

Il existe de nombreuses applications possibles grâce à l'utilisation des propriétés des archées, certaines ont déjà été mises en place alors que d'autres ne sont encore, à l'heure actuelle, que des idées.

Applications des espèces de l'embranchement des *Euryarchaeota*

Dans la classe des *Archeoglobi*, *Ferroglobus placidus* est capable d'oxyder en anaérobie et à haute température les composés aromatiques comme les phénols ou les benzoates (Hafenbradl *et al.*, 1996 ; Tor *et al.*, 2001). Celle-ci pourrait donc être utilisée pour décontaminer les zones sédimentaires de hautes températures au fond des océans qui sont contaminées au pétrole. (Rosenberg *et al.*, 2014)

D'autres archées comme celles appartenant à la famille des *Ferroplasmaceae* sont capables d'oxyder le fer et pourraient être utilisées pour « bio-oxyder » ou « bio-lixiver » les minéraux

soufrés (Golyshina *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2008). *Ferropasmaceae acidiphilum*, qui croit à un pH optimal de 1,7 produit des enzymes extracellulaires actives à très faible pH (Golyshina *et al.*, 2006).

La famille des *Halobacteriaceae* offre aussi de nombreuses applications. Leur présence dans les marais salants augmente la température des bassins et le taux d'évaporation, accroissant ainsi la production de sel (Jones *et al.*, 1981). D'un point de vue alimentaire, les *Halobacteriaceae* produisent des protéases qui participent notamment à la fermentation de nombreux produits asiatiques et augmentent leur qualité (Thongthai *et al.*, 1991). Certaines archées halophiles comme *Natrimena gari* peuvent aussi diminuer la teneur en histamine des produits marins salés et ainsi améliorer la sécurité de ces produits (Tapingkae *et al.*, 2010a ; Tapingkae *et al.*, 2010b). Plusieurs espèces de haloarchées produisent des bactériorhodopsines qui peuvent être utilisées pour la conversion des rayons lumineux en électricité, la création d'ATP ou encore le dessalement des eaux de mers. Elles produisent aussi des exo polysaccharides et du poly- β -hydroxyalkanoate (PHA). Ce dernier est d'ailleurs fortement utilisé pour la production de plastiques biodégradables. *Haloferox* produit une quantité considérable de polysaccharides extracellulaires qui peuvent être utilisés comme agents épaississants, gélifiants ou émulsifiants (Ventosa *et al.*, 1995). Ces archées produisent aussi de nombreuses enzymes (amylases, amyloglucosidases, protéases et lipases) qui sont actives à très hautes salinités (Ventosa *et al.*, 1995 ; Eichler, 2001 ; Menasria *et al.*, 2018).

Les archées méthanogènes ont elles aussi de nombreuses applications, dont la principale est la dégradation des déchets organiques en CO₂ et CH₄ (Rosenberg *et al.*, 2014). On les utilise dans un mélange contenant ces méthanogènes et d'autres bactéries hétérotrophes qui sont capables de convertir des composés organiques complexes en substrats pour celles-ci. Ces mélanges sont déjà utilisés pour transformer le lactosérum en CO₂ et CH₄ par exemple (Zellner *et al.*, 1987). Les méthanogènes peuvent aussi traiter les eaux usées domestiques dans les stations d'épuration et dégrader certains xénobiotiques (Berry *et al.*, 1987 ; Rosenberg *et al.*, 2014).

Dans la famille des *Methanobacteriaceae*, les organismes de genre *Methanobrevibacter* sont les principaux méthanogènes dans le rumen des vaches, leur production de CH₄ provoque une perte d'énergie pour l'animal et augmente la concentration de ce gaz à effet de serre. Il est possible de diminuer leur présence dans le rumen en donnant un régime spécial à la vache, riche en acide myristique et laurique. Ces deux derniers augmentent la perméabilité des membranes de *Methanobrevibacter* et les rendent non viables (Zhou *et al.*, 2013). Leur addition dans les eaux usées de distilleries a été proposée pour augmenter la production de méthane et diminuer la concentration en acides gras volatils (Savant *et al.*, 2004). Les lipides de certains membres de cette famille peuvent aussi être insérés dans des liposomes pour diverses applications médicales (administration de médicaments ou vaccins) (Rosenberg *et al.*, 2014).

Les organismes de la famille des *Methanosarcinaceae* sont les seuls, avec ceux de la famille des *Methanotrichaceae*, à pouvoir convertir l'acétate en CH₄ et CO₂. Ils sont dès lors utilisés dans les

digesteurs anaérobies pour dégrader les déchets organiques. *Methanosarcina ssp.* est adaptée à la formation de biogaz, elle tolère des concentrations élevées en acétate, en ammonium ou en sel, et de larges variations de pH (De Vrieze *et al.*, 2012). Les *Methanospirillaceae* sont aussi fréquemment retrouvées dans des digesteurs de boues anaérobies. (Rosenberg *et al.*, 2014)

La famille des *Thermococcaceae*, la seule de l'ordre des *Thermococcales*, se distingue par des organismes vivant à des températures proches des 100°C et des molécules thermostables et thermophiles. Une application rapidement développée a été d'utiliser leur ADN polymérase pour les PCR à la place de la Taq bactérienne de *Thermus aquaticus* (Comb *et al.*, 1993 ; Lundberg *et al.*, 1991). Un grand nombre de leurs amylases ont été étudiées pour la liquéfaction de l'amidon, comme ce procédé se produit à haute température (Sjoholm *et al.*, 1997). De nombreuses autres applications dans les domaines alimentaires, énergétiques et des détergents sont envisageables pour ces molécules thermostables (Rosenberg *et al.*, 2014).

Applications des espèces du super-embranchement TACK

Les archées du genre *Acidilobus* appartenant à l'embranchement des *Crenoarchaeota* sont capables de produire des hydrolases actives à hautes températures et faibles pH (Bertoldo *et al.*, 2004). Les organismes du genre *Caldisphaera* produisent aussi des enzymes stables à hautes températures et à faibles pH qui seraient utilisables pour la transformation de l'amidon ou la fabrication de bio-carburants par exemple (Itoh *et al.*, 2003 ; Antranikian *et al.*, 2007 ; Hess, 2008). Les membres de la famille des *Thermoproteaceae* sont également considérés comme potentielles sources d'enzymes thermostables et comme bio-réducteurs dans l'extraction de minerais (Antranikian *et al.*, 2007 ; Lloyd *et al.*, 2003). Les organismes du phylum des *Thaumarchaeota* ont été détectés dans quelques stations d'épuration, et parfois en très grande concentration, mais leur rôle dans celles-ci n'est pas encore très clair (Rosenberg *et al.*, 2014).

Applications des espèces de l'embranchement des *Nanoarchaeota* (DPANN)

Les membres de l'embranchement des *Nanoarchaeota* n'ont pour le moment aucune application industrielle mais leurs protéines et enzymes thermostables pourraient être utilisées dans le futur (Rosenberg *et al.*, 2014).

1.2 Les haloarchées

1.2.1 Introduction sur les organismes halophiles

Les microorganismes halophiles sont trouvés dans les trois domaines du vivant (Oren, 2005b). On retrouve ainsi les bactéries halophiles du genre *Salinibacter* ou *Halorhodospira* et des eucaryotes comme les algues unicellulaires du genre *Dunaliella* ou *Picocystis* dans des endroits saturés en NaCl comme la mer Morte ou les marais salants (Antón *et al.*, 2002 ; Raymond *et al.*, 1967 ; Oren, 2005a ; Lewin *et al.*, 2000 ; Oren, 2003). Dans le domaine des archées, les organismes halophiles sont principalement représentés par deux classes dans l'embranchement des *Euryarchaeota* : les *Halobacteria* et les *Methanomicrobia*. La première ne contient que des organismes halophiles tandis que la seconde contient aussi des organismes non-halophiles (LPSN, Août 2018 ; Oren, 2003). Les premières traces de détection d'haloarchées remontent en 1878, quand Farlow W.G a analysé le rougissement et la détérioration de cabillauds (Farlow, 1878).

Les organismes halophiles ont été classés par Kushner en 1978. On distingue ainsi les non-halophiles, des halophiles faibles, modérés ou (quasi-)extrêmes (Table 1) (Kushner, 1978). Il existe aussi des organismes halotolérants. Il s'agit d'organismes qui sont non-halophiles mais qui peuvent vivre à des hautes concentrations en sels (Schneegurt, 2012). *Staphylococcus aureus* peut par exemple survivre dans un milieu sans sel mais aussi dans un milieu de 10-15% de concentration en sels, voire plus. On retrouve des organismes extrémophiles dans les trois domaines du vivant (Oren, 2003).

Table 1 : Classification des organismes en fonction de leur réponse face à un milieu salin (Oren, 2014a).

Catégorie	Propriétés	Exemple
Non-halophile	Milieu contenant moins de 0,2M de sels Moins de 1% de sels	La plupart des bactéries d'eau douce
Halophile faible	Milieu contenant entre 0,2M et 0,5M de sels Entre 1% et 3% de sels	La plupart des bactéries marines
Halophile modéré	Milieu contenant entre 0,5M et 2,5M de sels Entre 3% et 15% de sels	<i>Halomonas elongata</i> (bactérie) <i>Salinivibrio costicola</i> (bactérie) <i>Haloferax sulfurifontis</i> (archée)
Halophile quasi-extrême	Milieu contenant entre 1,5M et 4M de sels	<i>Halorhodospira halophila</i> (bactérie)
Halophile extrême	Milieu contenant entre 2,5M et 5,2M* de sels Entre 15% et 30% de sels	<i>Halobacterium salinarum</i> (archée) <i>Salinibacter ruber</i> (bactérie) <i>Dunaliella salina</i> (eucaryote)
Halotolérant	Non-halophile qui peut tolérer le sel	<i>Staphylococcus aureus</i> (bactérie)

* Saturation

1.2.2 Classification des archées halophiles et diversité

La majorité des haloarchées se trouvent dans l’embranchement des *Euryarchaeota*. On en retrouve la plupart (et les plus exigeantes) dans la classe des *Halobacteria*, qui est maintenant divisée en trois ordres : les *Halobacteriales*, les *Haloferacales* et les *Natrialbales* (Table 2) (Gupta *et al.*, 2015). Chacun de ces ordres contient une ou plusieurs familles (non reprises sur la Table 2) (Amoozegar *et al.*, 2017). Les *Halobacteriales* contiennent ainsi 3 familles (23 genres et 81 espèces) : les *Halobacteriaceae*, les *Halococcaceae* et les *Haloarculaceae*. Les *Haloferacales*, deux familles (15 genres et 95 espèces) : les *Halorubraceae* et les *Haloferacaceae*. Enfin les *Natrialbales* (12 genres et 56 espèces) ne contiennent qu’une seule famille : les *Natrialbaceae*. Au total, ce sont près de 50 genres et 232 espèces identifiées (LPSN, Mai 2018) et il s’agit de l’un des plus larges groupes au sein des archées. Les organismes de la classe des *Halobacteria* ont été isolés à partir d’environnements tels que les lacs salés, les marais salants ou les sols hypersalins, mais aussi au départ d’échantillons de sels commerciaux et d’aliments (Table 2). Certains genres contiennent beaucoup d’espèces (*Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloferax*) mais la plupart n’en contiennent que quelques-unes (*Haloquadratum*, *Halomonas*).

On retrouve aussi des archées halophiles (les haloarchées méthanogènes) dans la classe des *Methanomicrobia*, et dans deux de ses ordres : l’ordre des *Methanosarcinales* et dans la famille des *Methanosarcinaceae* (9 genres et 35 espèces, dont 8 halophiles), et dans l’ordre des *Methanomicrobiales* et dans la famille des *Methanocalculaceae* (une seule espèce halophile) (Table 3) (LPSN, Avril 2018 ; Oren, 2003). Cependant, dans ces deux dernières, et comme indiqué précédemment, toutes les archées ne sont pas halophiles. Enfin, certaines haloarchées méthanogènes sont seulement halotolérantes comme *Methanocalculus halotolerans* découverte dans un gisement de pétrole et qui peut croître jusqu’à une concentration de 12% en NaCl (Ollivier *et al.*, 1998).

Grâce au développement des méthodes cultures-indépendantes et cultures-dépendantes, le nombre de genres et espèces identifiés au sein des haloarchées ne fait qu’augmenter depuis quelques décennies (DasSarma *et al.*, 2001 ; Amoozegar *et al.*, 2017). Ainsi, alors que l’on a longtemps pensé que toutes les archées halophiles se retrouvaient au sein de l’embranchement des *Euryarchaeota*, des archées halophiles extrêmes ont tout récemment été retrouvées dans le super-embranchement DPANN (Aouad *et al.*, 2018). On y retrouve les *Nanohaloarchaeota*, des nanoarchées découvertes au lac Tyrell en Australie et détectées dans un marais salant en Espagne (Narasimharao *et al.*, 2012 ; Ghai *et al.*, 2011).

Dans la suite de ce chapitre sur les haloarchées, nous allons principalement nous attarder sur la classe des *Halobacteria*, celle dans laquelle on retrouve la majorité des archées halophiles extrêmes.

Table 2 : Nombre d'espèces isolées et caractérisées par genre et par type de milieu pour la classe des Halobacteria et ses trois familles (Halobacteriales, Haloferacales et Natribacales). Chaque espèce est représentée qu'une seule fois. Les données ont été compilées à partir du site web www.bacterio.net en mai 2018 (Parte, LPSN, 2018).

Genre	ALIMENTATION			ENVIRONNEMENT			Total
	Nourriture	Sel Alimentaire	Marais salant	Sol et roche	Lac salé, mer et sédiments	Autres*	
Halobacteriales							
<i>Haladaptus</i>	1		1	1		1	4
<i>Halalkalicoccus</i>	1			1	1		3
<i>Halapricum</i>		1					1
<i>Halarchaeum</i>		5				1	6
<i>Haloarchaeobius</i>			3		2		5
<i>Haloarcula</i>	2		1	2	4		9
<i>Halobacterium</i>		1	2		1	1	5
<i>Halococcus</i>	2	2	1	2	1	1	9
<i>Halomarina</i>			1		1		2
<i>Halomicroarcula</i>		1	2				3
<i>Halomicrobium</i>			1	1	1		3
<i>Halorhabdus</i>				1	2		3
<i>Halorientalis</i>			1		2		3
<i>Halorubellus</i>			2				2
<i>Halorussus</i>			2		2		4
<i>Halosimplex</i>	2		1	1			4
<i>Halovarius</i>					1		1
<i>Halovenus</i>	1		1		1		3
<i>Natribaculum</i>				2			2
<i>Natronoarchaeum</i>		2	1		1		4
<i>Natronomonas</i>			2		1		3
<i>Salarchaeum</i>		1					1
<i>Salinirubrum</i>			1				1
Haloferacales							
<i>Halobaculum</i>		1		1	1		3
<i>Halobellus</i>		1	5	1	1		8
<i>Haloferax</i>			6	1	3	3	13
<i>Halogeometricum</i>			4				4
<i>Halogramum</i>			3	1			4
<i>Halohasta</i>						2	2
<i>Halolamina</i>		2	2	2			6
<i>Halonotius</i>			1				1
<i>Halopelagius</i>			1	1	1		3
<i>Halopenitus</i>	1				3		4
<i>Haloplanus</i>			6		1		7
<i>Haloquadratum</i>			1				1
<i>Halorubrum</i>	3	3	5	6	19	1	37
<i>Halosarcina</i>							0**

<i>Salinagrum</i>			2				2
Natrialbales							
<i>Halobiforma</i>				1	2		3
<i>Halopiger</i>		1		2	3		6
<i>Halostagnicola</i>		2			2		4
<i>Haloterrigena</i>	1		2	1	6		10
<i>Halovivax</i>					4		4
<i>Natrialba</i>		1		1	3		5
<i>Natrinema</i>	1			1	4	2	8
<i>Natronobacterium</i>				1	1		2
<i>Natrococcus</i>	1				3		4
<i>Natronolimnobius</i>					2		2
<i>Natronorubrum</i>				1	5		6
<i>Salinarchaeum</i>	1	1					2
Total	17	25	61	33	85	12	232

* Sources chaudes, stromatolithes ou encore aquacultures.

** Les membres du genre *Halosarcina* (*Halosarcina limi* et *Halosarcina pallida*) ont été déplacés dans le genre *Halogeometricum* (respectivement *Halogeometricum limi* et *Halogeometricum pallidum*) en 2013.

Table 3 : Espèces d'archées méthanogènes halophiles ou halotolérantes de la classe des Methanosarcinales ou Methanomicrobiales et leur lieu de découverte.

Organisme	Origine	Référence
Methanosarcinales		
<i>Methanosarcinaceae</i>		
<i>Halomethanococcus</i>		
<i>Halomethanococcus doii</i>	Étang salé, San Francisco, USA	Yu <i>et al.</i> , 1987
<i>Methanohalobium</i>		
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	Sédiments salins, Lac Sivash, Ukraine	Zhilina <i>et al.</i> , 1987
<i>Methanohalophilus</i>		
<i>Methanohalophilus halophilus</i>	Shark bay, Australie	Zhilina, 1983
<i>Methanohalophilus levihalophilus</i>	Nappe aquifère, Minami-Kanto, Japon	Katayama <i>et al.</i> , 2014
<i>Methanohalophilus mahii</i>	Sédiments du Grand lac salé, USA	Paterek <i>et al.</i> , 1985
<i>Methanohalophilus portucalensis</i>	Marais salant, Portugal	Boone <i>et al.</i> , 1983
<i>Methanosalsum</i>		
<i>Methanosalsum natrophilum</i>	Sédiments lac salé alcalin, Kulunda, Russie	Sorokin <i>et al.</i> , 2015
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	Saumure alcaline, Wadi El Natrun, Égypte	Mathrani <i>et al.</i> , 1988
Methanomicrobiales		
<i>Methanocalculaceae</i>		
<i>Methanocalculus</i>		
<i>Methanocalculus halotolerans</i> *	Gisement de pétrole, Alsace, France	Ollivier <i>et al.</i> , 1998
<i>Methanocalculus natrophilus</i>	Lac salé alcalin, Altai, Russie	Zhilina <i>et al.</i> , 2013

* Halotolérante

1.2.3 Écologie

Les facteurs majeurs déterminant leur distribution dans l'environnement sont la concentration en sels, la composition ionique des sels et la disponibilité en nutriments (Oren, 2006). Pendant longtemps, les haloarchées étaient toutes considérées comme halophiles extrêmes, c'est-à-dire capables de vivre « aux limites des possibilités physiologiques » (Warren, 2016). Beaucoup d'entre elles ne survivent en effet pas à des concentrations en sels inférieures à 2,5-3M (15% en concentration) (Oren, 2014a ; Singh *et al.*, 2017). Cependant, d'autres moins exigeantes existent, comme *Haladaptus paucihalophilus* ou *Haloferax sulfurifontis* qui se contentent de 4,7%-6% de concentration en sels (Savage *et al.*, 2007 ; Elshahed *et al.*, 2004). En plus d'une concentration suffisante en Na⁺, qui semble être requise par l'ensemble des haloarchées, la concentration en cations divalents Mg²⁺ et Ca²⁺ semble aussi jouer un rôle important dans le bon développement de celles-ci (Oren, 2006 ; Schneegurt, 2012). Certaines haloarchées requièrent aussi autant d'ions Cl⁻ que d'ions Na⁺, c'est le cas de *Halobacterium volcanii* (Mullakhanbhai *et al.*, 1975). D'autres ont besoin de grandes concentrations en MgCl₂, c'est le cas de *Halobaculum gomorrense* ou de *Halorubrum sodomense* (Oren A. *et al.*, 1995 ; Oren A., 1983). On retrouve donc ces archées dans les eaux fortement salées (mer Morte, Grand lac salé aux USA, lac Magadi au Kenya), les marais salants, mais aussi les sols salins et hyper salins (Rosenberg *et al.*, 2014). Les haloarchées seraient aussi capables de survivre au sein des cristaux de sels pendant de nombreuses années (Grant, 2004).

La plupart des archées halophiles de la classe des *Halobacteria* ont des températures optimales de croissances entre 35-50°C, elles sont donc mésophiles (Oren, 2014 ; Schäfer *et al.*, 1999). Certaines peuvent cependant croître à de plus hautes températures comme *Natronolimnobius aegyptiacus* et *Haloferax mediterranei* qui ont un optimum à 55°C et 51°C, respectivement (Bowers *et al.*, 2011). D'autres se développent à de plus basses températures, c'est notamment le cas de *Halorubrum lacusprofundi* trouvée dans un lac salé en Antarctique, qui peut survivre à des températures aussi basses que 4°C (avec un optimum à 31-37°C) (Franzmann *et al.*, 1988). L'adaptation à de hautes températures est nécessaire pour les archées vivant dans des lacs salés des tropiques (Oren, 2014a).

Enfin, beaucoup d'haloarchées sont neutrophiles mais certaines sont alcaliphiles comme *Natronobacterium* ou *Natronococcus*, et peuvent survivre dans des environnements de pH 10-11 (Warren, 2016). Très peu de haloarchées acidophiles ont pour le moment été rapportées (Oren, 2006). La mer Morte a longtemps été l'endroit le plus acide (pH de 6) où des haloarchées ont été trouvées (Bodaker *et al.*, 2010 ; Oren, 1988). Cependant, tout récemment, une *Halobacteria* avec un pH optimal de croissance de 4,4-4,5, *Halarchaeum acidiphilum*, a été isolée d'un sel australien (Minegishi *et al.*, 2010).

1.2.4 Caractéristiques principales

Les haloarchées montrent une large diversité de morphologies et physiologies.

Morphologie et reproduction

La plupart des archées halophiles sont de couleurs rouges, orange, mauves ou roses dû aux dérivés isoprénoides présents dans leur membrane (Oren *et al.*, 2001). Elles peuvent être rondes (*Halobacterium*), en coques (*Halococcus*), en disques (*Halarchaeum acidiphilum*), ou encore carrées (*Haloquadratum walsbyi*), triangles (*Haloarcula japonica*) et même pléiomorphiques (*Haloferax*, certaines espèces de *Halobellus*, *Halogranum*) suivant leurs conditions de croissances (Amoozegar *et al.*, 2017 ; Oren, 2014b). La morphologie de *Halococcus dombrowskii* est visible au point 4.1.1. Cette diversité de formes est rendue possible par une concentration en sel aussi élevée à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule, et donc aucune pression osmotique sur la paroi cellulaire (Warren, 2016). Elles ont une taille moyenne entre 1 et 15 μm (Winters *et al.*, 2015). Beaucoup de *Halobacteria* sont motiles, c'est le cas de *Halobacterium salinarum* qui possède des flagelles (Oren, 2006). Ceux-ci sont cependant différents de ceux des bactéries (Alam, 1984). Elles peuvent exister en cellules seules, en agrégats ou en filaments qui mesurent jusqu'à 200 μm de long. Toutes les haloarchées connues se reproduisent par fission ou bourgeonnement (Warren, 2016).

Génome

Elles possèdent généralement un chromosome circulaire entre 2 et 4,5 Mb. Beaucoup d'espèces contiennent, en plus de ce chromosome principal, de l'ADN supplémentaire dans des plasmides (DasSarma *et al.*, 2008). Ainsi, beaucoup d'espèces de *Halobacteria* possèdent 25 à 30% de leur matériel génétique en-dehors de leur chromosome principal (Oren, 2014b). Le premier génome de *Halobacteria* séquencé entièrement a été celui de *Halobacterium* strain NRC-1 (Ng *et al.*, 2000).

Pigments

Les haloarchées possèdent dans leur membrane des pigments rétinien (bactériorhodopsines, halorhodopsines, rhodopsines) et caroténoïdes (bactériorubérines et β -carotènes) qui donnent des teintes orange, rouges, mauves et roses à ces organismes (Oren, 2003). Toutes les haloarchées ne sont cependant pas colorées (Rosenberg *et al.*, 2014). La quantité de ces pigments dans la membrane peut dépendre du statut nutritionnel de la cellule et de la salinité du milieu (Gochbauer *et al.*, 1972 ; Kushwaha *et al.*, 1982).

Les bactériorhodopsines constituent 75% de ce qu'on appelle les « Purple Patches », le reste des patches étant des lipides. Ces pigments mauves convertissent l'énergie des rayons lumineux en énergie chimique via une pompe à protons H^+ (Figure 3, pompe [2]). Les « Purple Patches » sont donc des endroits de photosynthèse, mais, au contraire de la chlorophylle, la lumière n'est pas utilisée pour générer un pouvoir réducteur et fixer le CO_2 , elle sert juste de supplément aux

archées en cas de faible concentration en O_2 (Warren, 2016). Beaucoup de genres au sein des *Halobacteria* produisent ces bacteriorhodopsines (*Halobacterium*, *Halorubrum*), mais pas tous (Oren, 2003). Certaines archées halophiles produisent aussi des halorhodopsines qui ont une structure proche de celle des bacteriorhodopsines mais au lieu de faire sortir des ions H^+ , elles font rentrer des ions Cl^- qui maintiennent l'équilibre osmotique et le gradient de Cl^- (Figure 3, pompe [8]) (Warren, 2016). *Halobacterium salinarum* possède en plus de ces deux pigments, deux autres rhodopsines sensorielles (I et II) qui permettent le phototactisme. La rhodopsine I répond aux couleurs vertes qui attirent l'organisme, et la rhodopsine II répond aux couleurs bleues que la cellule voudra éviter (Oren, 2003). Enfin, les archées halophiles possèdent aussi des pigments caroténoïdes qui servent de précurseurs synthétiques aux rhodopsines, mais aussi de protection face aux rayons UV-visibles et de renforts structurels pour leur membrane plasmique (Oren, 2003).

S-layer

La plupart des *Halobacteria* possède une S-layer constituée de glycoprotéines. La trame de ces glycoprotéines et le mode de glycosylation varient cependant en fonction des espèces. Cette dernière permet à ces organismes de garder leur forme (Rosenberg *et al.*, 2014). Certaines *Halobacteria*, comme *Halococcus morrhuae*, n'ont pas de S-layer mais possèdent à la place une enveloppe d'hétéropolysaccharides sulfatés (Figure 2)¹ (Steber *et al.*, 1975 ; Schleifer *et al.*, 1982). *Natronococcus occultus* possède une enveloppe composée de poly(L)-glutamine et d'autres comme *Haloferax* excrètent des exopolysaccharides qui forment une protection autour de la cellule (Niemetz *et al.*, 1997 ; Parolis *et al.*, 1996).

Halocines

Beaucoup d'espèces de *Halobacteria* excrètent des « bactériocines halophiles », appelées aussi « halocines » ou « archeocines » qui sont des protéines antibiotiques qui empêchent la croissance des autres organismes (Rodriguez-Valera *et al.*, 1982). Il a été montré que leur synthèse est quasi universelle au sein des archées halophiles et qu'il existe différents types d'halocines, avec des spectres d'activités variés (Shand *et al.*, 2007 ; Torreblanca *et al.*, 1994). Ainsi, les halocines H1 et H4 changent la perméabilité de la membrane et donc perturbent le gradient ionique de la cellule cible (O'Connor *et al.*, 2002 ; Meseguer *et al.*, 1986). Les halocines H7 ciblent l'antiport Na^+/H^+ d'espèces sensibles (Meseguer *et al.*, 1995). La taille de ces halocines varie entre 3,6 kDa (microhalocines S8) et 34,9 kDa (halocines H4) (Rosenberg *et al.*, 2014). Les microhalocines sont très robustes et résistent à la chaleur, aux variations de concentrations en sels et aux solvants organiques, elles peuvent même être toxiques pour des organismes en-dehors des *Euryarchaeota*, inhibant l'activité des organismes du genre *Sulfolobus* dans les *Crenoarchaeota* (O'Connor *et al.*, 2002).

¹ Une erreur s'est glissée dans la Figure 2, il faut inverser les enveloppes cellulaires de *Halococcus morrhuae* et de *Natronococcus occultus*.

1.2.5 Métabolisme

Une importante partie des archées halophiles extrêmes sont aérobies, quelques-unes sont aérobies facultatives et très peu sont anaérobies (Bowers *et al.*, 2011).

Beaucoup sont aérobies hétérotrophes (Tindall *et al.*, 1986). Elles préfèrent généralement les milieux complexes et peuvent utiliser une grande variété de substrats dont les principaux sont les acides-aminés, mais elles peuvent aussi utiliser des glucides ou encore des extraits de levures. C'est le cas de l'espèce «type» des *Halobacteria* : *Halobacterium salinarum* (Oren, 2014b ; Schneegurt, 2012). D'autres membres préfèrent cependant des milieux plus simples avec un seul substrat organique comme source de carbone et d'énergie. Elles sont capables de produire des exoenzymes (protéases, lipases, amylases et nucléases) qui leur permettent d'utiliser les protéines, les lipides, l'amidon et les acides nucléiques comme sources de nutriments. Certaines sont même capables de dégrader des composés aromatiques et des hydrocarbures, c'est le cas d'espèces des genres *Haloferax* et *Haloarcula* (Oren, 2014b ; Kulichevskaya *et al.*, 1991).

L'oxygène pouvant vite devenir limitant dans les endroits sursaturés en sel, certaines haloarchées produisent alors des vésicules de gaz et il a longtemps été pensé qu'elles servaient à les mener par flottaison jusqu'à la surface des plans d'eau où l'oxygène n'est pas limitant. Cependant, elles serviraient plutôt à les orienter et augmenter ainsi l'efficacité de l'absorption lumineuse (Oren *et al.*, 2006). Les autres archées halophiles peuvent adopter différentes stratégies en l'absence d'oxygène. Certaines peuvent faire de la respiration anaérobie avec différents accepteurs d'électrons : la réduction du nitrate en N_2 ou NO_2 , la réduction de diméthylsulfoxyde, de triméthylamine *N*-oxyde, de fumarate ou de thiosulfate (Tomlinson *et al.*, 1986 ; Müller *et al.*, 2005 ; Oren, 1991 ; Sorokin *et al.*, 2005 ; Oren, 2014b). D'autres peuvent fermenter l'arginine (Hartmann *et al.*, 1980). D'autres encore peuvent utiliser la lumière comme source d'énergie, grâce à la bacteriorhodopsine, une pompe à protons. La cellule utilisera ensuite le gradient de proton pour former de l'ATP au départ d'ADP (Hartmann *et al.*, 1980 ; Danon *et al.*, 1974).

Un seul membre des *Halobacteria* est anaérobie (ou en tout cas préfère des conditions anaérobies), il s'agit de *Halorhabdus tiamatea* trouvée au fond de la mer Rouge, qui obtient son énergie sans doute par fermentation (Antunes *et al.*, 2008). Les haloarchées méthanogènes sont par contre toutes anaérobies, elles acquièrent leur énergie en transformant l' H_2+CO_2 , le formate, l'acétate, le méthanol, la triméthylamine, le diméthylsulfide ou l'isopropanol en méthane (Warren, 2016). La concentration en sel maximale tolérable sera notamment fonction du substrat utilisé par ces archées (Andrei *et al.*, 2012).

1.2.6 Adaptations osmotiques aux milieux salins

Comme les membranes sont perméables à l'eau, les microorganismes vivants dans des milieux salins doivent maintenir leur espace intracellulaire iso-osmotique par rapport à l'environnement extérieur. Le résultat, dans le cas contraire, serait une rapide perte d'eau vers le milieu externe (Oren, 1999). Deux stratégies sont ainsi adoptées par ces organismes : la stratégie « Salt-in » et la stratégie « Low Salt-in ». (Oren, 2014a ; Grant, 2004)

Accumulation d'ions inorganiques dans le cytoplasme - Option « Salt-in »

Les haloarchées aérobies (la plupart des membres de la classe des *Halobacteria*) ont choisi d'accumuler des ions inorganiques dans leur cytosol. Le principal cation utilisé est le K^+ (puis le Na^+), et le principal anion est le Cl^- . Pour maintenir un gradient de concentration, elles utilisent, en plus de la chaîne respiratoire de transport d'électrons, différentes pompes, antiports ou autres protéines de transport (Schäfer *et al.*, 1999). Ces différents systèmes de transport sont représentés dans la Figure 3 (Oren, 2014a). On retrouve ainsi une extrusion de protons H^+ par la chaîne respiratoire qui génère un gradient électrochimique au travers de la membrane [1]. Les espèces qui possèdent des bactériorhodopsines dans leur membrane peuvent aussi directement les utiliser pour maintenir ce gradient [2] (Lanyi *et al.*, 2001). De l'ATP est ensuite formé au départ d'ADP grâce à ce gradient [3]. Les haloarchées possèdent aussi des antiports Na^+/H^+ [4] utilisant le gradient de H^+ pour faire sortir du Na^+ de la cellule (Hamaide *et al.*, 1983 ; Lanyi *et al.*, 1976). Ces antiports servent à garder une concentration faible en Na^+ à l'intérieur mais ils servent aussi à réguler le pH (Oren, 2014a). Le gradient de Na^+ ainsi formé sert à faire rentrer des acides-aminés ou d'autres composés à l'intérieur [5]. Les ions K^+ peuvent rentrer dans la cellule probablement via un uniport [6] et grâce au potentiel membranaire négatif à l'intérieur (Wagner *et al.*, 1978). Le Cl^- est essentiel à la croissance et à la division des cellules (Müller *et al.*, 2003), il existe deux pompes importatrices de Cl^- chez les haloarchées : un symport avec le Na^+ [7] et une pompe dépendante des rayons lumineux, l'halorhodopsine [8] (Duschl *et al.*, 1986).

Les macromolécules et protéines intracellulaires doivent s'adapter à ces hautes concentrations en sels. Elles peuvent par exemple augmenter la quantité d'acides-aminés chargés négativement à la surface de leurs protéines. La haute densité de charges va attirer l'eau et donc maintenir une couche d'hydratation autour (Mevarech *et al.*, 2000 ; Warren, 2016). Elles peuvent aussi diminuer les résidus hydrophobes dans leurs protéines, ce qui va augmenter la stabilité de ces dernières (Oren, 2014a ; Grant, 2004). Toutes ces adaptations font que ces cellules deviennent dépendantes des hautes concentrations en sels dans leur environnement et qu'elles ont très peu de flexibilité si celles-ci changeaient (Eisenberg *et al.*, 1987 ; Lanyi, 1974).

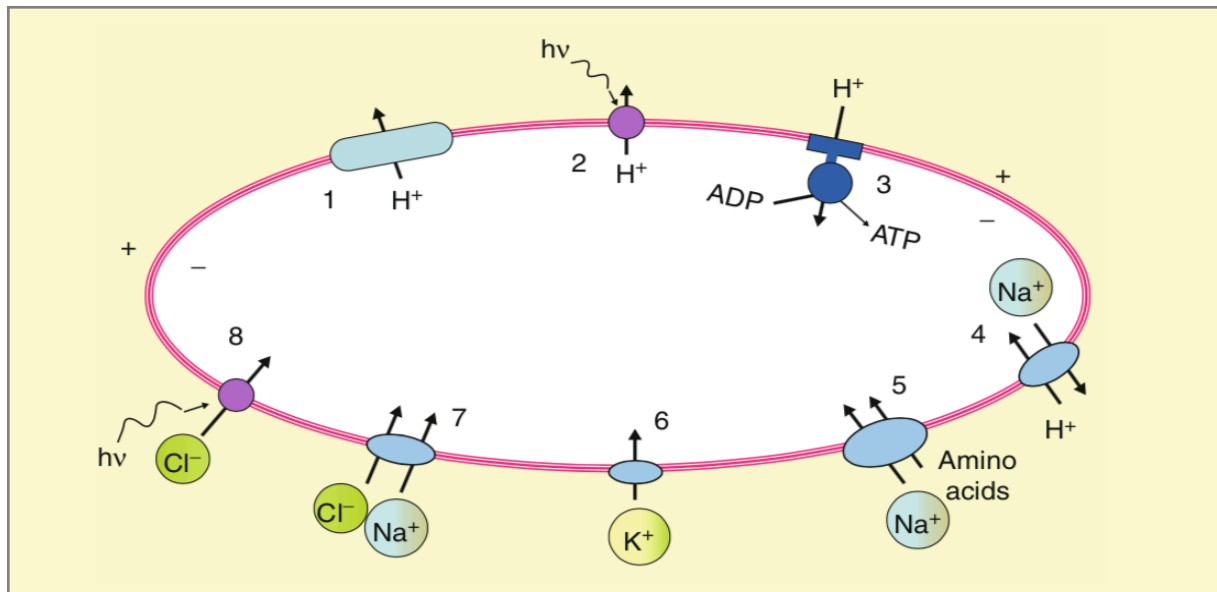


Figure 3 : Mouvements d'ions à travers la membrane chez les archées de la classe des *Halobacteria*. [1] Extrusion de H^+ via la chaîne respiratoire, [2] Extrusion de H^+ via la bacteriorhodopsine, [3] Synthèse d'ATP par une ATP synthase grâce au gradient de protons, [4] Antiport Na^+/H^+ , [5] Co-transport d'acides-aminés ou autres composés vers l'intérieur grâce au gradient de Na^+ , [6] Uniport à K^+ , [7] Symport Na^+ et Cl^- , [8] Halorhodopsine, pompe à Cl^- dépendante de la lumière (Oren A., 2014a).

Accumulation de molécules organiques dans le cytoplasme - Option « Low-salt In »

Les haloarchées méthanogènes et certains membres des *Halobacteria* alcaliphiles adoptent une autre stratégie, celle de garder leur cytoplasme à concentration plus faible que le milieu extérieur, mais de synthétiser des solutés organiques compatibles (Oren, 2005b). Il s'agit de molécules polaires, très solubles, non chargées à pH cellulaire et qui constituent la majeure partie des composés osmotiques actifs de la cellule (Oren, 2014a). Les haloarchées alcaliphiles comme *Natronobacterium* ou *Natronococcus* accumulent ainsi du 2-sulphotrehalose ou de la glycine betaine, tandis que les haloarchées méthanogènes comme *Methanohalophilus* accumulent de la glutamine ou du β -glutamate (Oren, 2005b ; Grant, 2004). Le gros avantage de cette stratégie c'est qu'elle ne nécessite pas d'adaptations enzymatiques tout en assurant un équilibre osmotique. La cellule peut aussi rapidement s'adapter à une modification du milieu en synthétisant, dégradant, modifiant, excréant ou prélevant du milieu ces composés (Oren, 2014a). Généralement, et pour des raisons énergétiques, les organismes préféreront prélever les composés plutôt que de les synthétiser, et synthétiser les plus petits au plus l'environnement devient concentré en sels (Oren, 1999).

1.3 Les archées dans l'alimentation

L'utilisation de sel (NaCl) comme conservateur est l'une des techniques les plus anciennes utilisée pour préserver la nourriture, en parallèle avec la fermentation et la déshydratation à l'air ou au soleil. L'utilisation de hautes/basses températures comme méthode de conservation n'étant arrivée que beaucoup plus tard, au 19^{ème} siècle, avec Nicolas Appert et Louis Pasteur (Guinee *et al.*, 2017). Le salage permet d'augmenter la perception des saveurs et facilite la manipulation et la fabrication de certains produits alimentaires (Gibtan *et al.*, 2017 ; Hutton, 2002). Ainsi, l'ajout de sel à différents stades de la fabrication de fromages permet d'en contrôler l'activité enzymatique, d'en maîtriser la synérèse ou d'en influencer les protéines, ce qui aura un effet direct sur l'humidité, la texture et le goût du produit final (Sutherland, 2002 ; Guinee *et al.*, 2017). Cependant, le rôle principal du salage dans l'alimentation reste de réguler le développement microbien en diminuant l'activité de l'eau (a_w) (Grant, 2004). Celle-ci est définie selon la loi de Raoult :

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

où a_w est l'activité de l'eau, P la pression de vapeur d'eau du produit et P_0 la pression de vapeur d'eau saturante à la même température. Il en suit que de l'eau pure a une a_w de 1 et que toute autre solution possède une a_w inférieure à 1 (Table 4). L' a_w peut être diminuée soit par l'ajout de solutés comme le sucre ou le sel qui vont fixer l'eau et la rendre inutilisable par les micro-organismes, soit par déshydratation (Wijaya *et al.*, 2015). Ainsi, la plupart des bactéries pathogènes pour l'homme comme les *Clostridium* ne peuvent croître à des valeurs de a_w inférieures à 0,90 (Stevenson *et al.*, 2015). Cependant, certaines peuvent survivre à une activité de l'eau bien inférieure, comme *Staphylococcus aureus* qui est halotolérante et capable de croître à une a_w de 0,82 (Houtsma *et al.*, 1996). Quand la concentration en sel augmente (et ce jusqu'au point de saturation du NaCl atteint à une a_w de 0,75), les archées halophiles deviennent les organismes procaryotes principaux capables de se développer. Ensuite, l' a_w ne peut être réduite que par ajout de solutés organiques (glucose, fructose, ...) ou déshydratation et seuls quelques espèces de levures ou de moisissures sont capables de survivre (Grant, 2004). C'est le cas de *Xeromyces bisporus*, une moisissure capable de survivre à une activité en eau de 0,61 ou encore *Zygosaccharomyces rouxii* que l'on retrouve dans les jus concentrés (Hocking *et al.*, 1999 ; Eriksen *et al.*, 1999 ; Rojo *et al.*, 2017).

Le sel permet donc bien d'inhiber une grande partie de la flore microbienne, mais il peut aussi être une source d'autres micro-organismes uniques à cet environnement. En effet, depuis quelques décennies, des archées halophiles sont découvertes dans de nombreux sels de table (Table 2 et Table 5). Ces organismes montrent une très grande diversité et leur concentration au sein de ces sels peut atteindre 10⁵ CFU/gramme de sel (Henriet *et al.*, 2014). On y retrouve

ainsi des membres de plusieurs genres au sein de la classe des *Halobacteria*. De nouvelles espèces ont récemment été isolées à partir de sels commerciaux, c'est le cas de *Salinarchaeum chitinilyticum* et de *Halorubrum gandharaense* (Minegishi *et al.*, 2017 ; Shimane *et al.*, 2015). De nouveaux genres au sein de cette classe ont aussi pu être définis grâce aux organismes isolés à partir d'échantillons de sels commerciaux : les genre *Halapricum*, *Halarchaeum* ou encore *Salarchaeum* (Minegishi *et al.*, 2010 ; Shimane *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2014). Des études cultures-indépendantes ont permis de quantifier les populations d'archées au sein de différents sels, il en ressort que les archées de la classe des *Halobacteria* dominent cet écosystème, bien que des *Nanoarchaeota* soient présents en plus faible proportion, et que d'autres comme les *Thermococci*, *Archaeoglobi* et *Methanomicrobia* subsistent à l'état de trace (Henriet *et al.*, 2014 ; Gibtan *et al.*, 2017). Il a été montré que les archées restent piégées à l'intérieur des cristaux de sel au sein des inclusions liquides et peuvent y survivre pendant plusieurs années, voire peut-être pour certains, quelques milliers d'années (Grant, 2004 ; Norton *et al.*, 1988 ; Schubert *et al.*, 2010).

Table 4 : Valeurs approximatives d'activité de l'eau (a_w) pour différents produits alimentaires et valeurs minimales d'inhibition de croissances pour différents micro-organismes (Brewer, 1999 ; Grant, 2004).

Valeur de a_w	Aliments	Inhibition des microorganismes		
		Procaryotes	Levures	Moisissures
0,97-0,95	Viande fraîche, saucisses, œufs, beurre, légumes/fruits frais ou en conserve, bacon	<i>Clostridium spp.</i> <i>Escherichia spp.</i> <i>Bacillus spp.</i>		
0,95-0,90	Fromages, jambons crus, saucissons, produits de boulangerie	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>	<i>Rhodotorula spp.</i> <i>Pichia spp.</i> <i>Candida spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i> <i>Mucor spp.</i>
0,90-0,80	Fromages à pâte dure, lait concentré sucré, confiture, jambon fumé, pain blanc	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Saccharomyces spp.</i> <i>Torulopsis spp.</i> <i>Hansenula spp.</i>	<i>Cladosporium spp.</i>
0,80-0,70	Sirup d'érable, mélasse, poisson salé	Haloarchées		<i>Aspergillus spp.</i>
0,70-0,60	Fruits déshydratés, sirup de maïs		<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	<i>Xeromyces spp.</i>
0,60-0,50	Chocolat, miel	Aliments considérés comme à faibles risques de contaminations		
0,40	Cacao, œufs déshydratés			
0,30	Flocons de pommes de terre déshydratés, chips			
0,20	Lait et légumes déshydratés			

Il a aussi été montré par des méthodes cultures-dépendantes, que les archées (et surtout celles de la classe des *Halobacteria*) sont présentes dans de nombreuses préparations asiatiques à base de fruits de mer (Table 5) (Lee, 2013). Après une fermentation de quelques mois, ces préparations coréennes à base de crevettes (Jeotgal) ou d'autres fruits de mers et de gros sel acquièrent un goût unique et servent d'additifs pour d'autres plats (Roh *et al.*, 2007b). Ainsi, de nouvelles espèces de *Halobacteria* ont été isolées à partir de Jeotgal: *Halorubrum cibi*, *Halalkilococcus*

jeotgali, *Haloterrigena jeotgali* et *Natronococcus jeotgali* (Roh *et al.*, 2007a-b, 2009a-b). En revanche, les bactéries sont en grande partie responsables de la fermentation et restent les micro-organismes les plus présents au sein de ces matrices (Jung *et al.*, 2013). Des bactéries halophiles comme *Salinicoccus jeotgali* ou *Psychrobacter jeotgali* ont ainsi été découvertes au sein de ces matrices (Aslam *et al.*, 2007 ; Yoon *et al.*, 2003). De nouvelles espèces de *Haloarcula* et de *Halococcus* ont été isolées d'une sauce de poisson salée et fermentée thaïlandaise (Nam-pla) et la nouvelle espèce *Halobacterium piscisalsi* a été isolée à partir de Pla-ra, une autre sauce de poisson salée et fermentée thaïlandaise mais qui contient en plus des grains d'amidon (Namwong *et al.*, 2007, 2011 ; Yachai *et al.*, 2008). *Natrimena gari*, isolée d'une même sauce au poisson, produit quant à elle une histamine déshydrogénase active à très haute concentration en sel (voir point 1.1.5) (Tapingkae *et al.*, 2008, 2010a-b). Un nouveau genre *Salinarchaeum* et quelques espèces ont aussi été découverts dans des algues brunes salées en Chine (Cui *et al.*, 2011 ; Han *et al.*, 2014a-b, 2015a-b). La forte concentration en sel de ces plats permet justement à beaucoup d'organismes halophiles de prospérer, des organismes qui ont d'ailleurs probablement été incorporés dans le plat par ce même sel (Lopetcharat *et al.*, 2001).

De plus en plus, les méthodes cultures-indépendantes sont désormais utilisées pour analyser la flore des produits alimentaires. Ainsi, l'analyse de raies fermentées en Corée a permis de déceler, outre les *Halobacteria*, la présence de *Methanomicrobia*, *Crenarchaeota* et *Thaumarchaeota* (Gwang *et al.*, 2017). Des *Halobacteria* ont aussi été détectées au sein de la saumure d'olives vertes fermentées et de Kimchi (légumes fermentés de Corée) (Abriouel *et al.*, 2011 ; Chang *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2009). Des archées méthanogènes comme *Methanobrevibacter smithii* ont été révélées dans des échantillons de lait cru (Van de Pol *et al.*, 2017). Une précédente étude avait d'ailleurs analysé 52 aliments différents (fromages, viandes, poissons, légumes, fruits et sucreries) et avait répertorié la présence d'archées méthanogènes sur 24 de ces échantillons (Brusa *et al.*, 1998). D'autres archées méthanogènes ont aussi été trouvées dans une liqueur chinoise, leur présence au sein de celle-ci proviendrait de la vase utilisée pour sa fermentation (Wang *et al.*, 2017). Des membres des genres *Halobacterium* et *Haloquadratum* ont récemment été détectés dans des fromages mexicains salés au gros sel (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016). Il s'agit, pour le moment, de la seule étude mettant en avant des archées halophiles dans des fromages. D'autres études ont pourtant été lancées sur du fromage ou du poisson séché norvégien (Lutefisk), sans succès (Marino *et al.*, 2017 ; Lunestad *et al.*, 2018).

La Table 5 reprend de manière non-exhaustive l'ensemble des articles mentionnant la présence d'archées dans l'alimentation.

Table 5 : Ensemble (non-exhaustif) d'articles reprenant la présence d'archées dans l'alimentation, et ce de manière culture-dépendante ou indépendante.

Sources	Archées (Embranchements/Classes : Genres)	Méthode culture-dépendante	Méthode culture-indépendante	Articles
Sels de cuisine Gros sels de cuisine de différentes origines		Halobacteria : Halopricum, Halarchaeum, Halobacterium, Halobaculum, Halobellus, Halococcus, Halolamina, Halomicrococcus, Halopiger, Halorubrum, Halostagnicola, Natrhalba, Natronarchaeum, Solarichaeum, Salinarachaeum	Halobacteria : Haloarcula, Halobacterium, Halobaculum, Halococcus, Haliferax, Halogemmatimonas, Haloterrigena, Halomicrobium, Halonitrus, Halopeleginus, Natrinema, Natronococcus, Natronomonas, ... Archeoglobi : Archeoglobus Thermococci : Thermococcus, Palaeococcus Methanobacteria Nanoarchaea	Cha <i>et al.</i> , 2014a,b ; Echigo <i>et al.</i> , 2013 ; Gibian <i>et al.</i> , 2017, 2018 ; Henriot <i>et al.</i> , 2014 ; Hezayen <i>et al.</i> , 2001 ; Koh <i>et al.</i> , 2015 ; Kondo <i>et al.</i> , 2015, 2016 ; Mancinelli <i>et al.</i> , 2009 ; Minegishi <i>et al.</i> , 2010, 2013, 2015, 2016, 2017 ; Mori <i>et al.</i> , 2016 ; Nagaoaka <i>et al.</i> , 2010, 2011 ; Petter, 1931 ; Song <i>et al.</i> , 2014 ; Shimane <i>et al.</i> , 2010, 2011, 2013, 2015 ; Shimoshige <i>et al.</i> , 2013 ; Wang <i>et al.</i> , 2007 ; Yamauchi <i>et al.</i> , 2013a,b
Produits laitiers Fromage Coujia (Lait cru, sans starter bactérien, salé au gros sel marin), Mexique Lait cru (et lait entier), Pays-Bas			Halobacteria : Halobacterium et Haloaquadratum Halobacteria : Natronococcus Methanomicrobia : Methanohalobacter, Methanosphaera, Methanothermobacter Thaumarchaeota : Nitrosoarchaea	Escobar-Zepeda <i>et al.</i> , 2016 Van de Pol <i>et al.</i> , 2017
Fruits de mer et poissons Fruits de mer fermentés (Jeotgal) : Crevettes (Saengjeot), Crustacés (Jokapjot), Seiche (Kajipinge jeot), Huîtres (Kuljeot), Lieu noir (Myeongganjeot et Chongganjeot), Crabe (Kejeot), Corée du Sud Raies fermentées (Raja puldra), Corée du Sud		Halobacteria : Halodaphnia, Halalkalicoccus, Haloarcula, Halobacterium, Halobiforma, Halococcus, Halolamina, Halopluma, Halorhabdus, Halorubrum, Haloterrigena, Halovivax, Natrinema, Natronococcus Halobacteria : Haloarcula, Halobacterium, Halococcus, Natrinema Halobacteria : Halobacterium Halobacteria : Haloarcula Halobacteria : Halococcus	Halobacteria : Halobacterium et Haloaquadratum Halobacteria : Natronococcus Methanomicrobia : Methanohalobacter, Methanosphaera, Methanothermobacter Thaumarchaeota : Nitrosoarchaea Halobacteria : Haloarcula, Halococcus, Halolamina Methanomicrobia : Methanolobus, Methanomethylotrans Crenarchaeota Thaumarchaeota : Nitrospumilus	Roh <i>et al.</i> , 2007a-b, 2009a-b, 2010a-b ; Yim <i>et al.</i> , 2014 ; Jung <i>et al.</i> , 2013 Gwang <i>et al.</i> , 2017
Sauce de poisson salée fermentée (Nam-pla), Thaïlande Poissons fermentés (Pla-ra), Thaïlande Anchois salés, Italie Cabillaud séché, États-Unis		Halobacteria : Haloarcula, Halobacterium, Halococcus, Natrinema Halobacteria : Halobacterium Halobacteria : Haloarcula Halobacteria : Halococcus	Halobacteria : Haloarcula, Halococcus, Halolamina Methanomicrobia : Methanolobus, Methanomethylotrans Crenarchaeota Thaumarchaeota : Nitrospumilus	Namwong <i>et al.</i> , 2007, 2010 ; Tanasupawat <i>et al.</i> , 2008-2009 ; Tapingkae <i>et al.</i> , 2008 ; Thongthai <i>et al.</i> , 1991, 1992 Yachai <i>et al.</i> , 2008 Moschetti <i>et al.</i> , 2006 Farlow, 1878
Légumes/fruits/Algues Chou et radis fermentés Kimchi, Corée du Sud			Halobacteria : Halobiforma, Halococcus, Halosimplex, Haloterrigena, Natronococcus, Natrhalba Halobacteria : Halorubrum, Halosarcina	Chang <i>et al.</i> , 2008 ; Park <i>et al.</i> , 2009 Abriouel <i>et al.</i> , 2011
Sauumure d'olives vertes « Aloreña » fermentées, Espagne Préparation salée d'algues Laminaria, Chine		Halobacteria : Haloputillus, Halorubrum, Halosimplex, Halococcus, Salinarachaeum	Halobacteria : Halobacterium, Methanohalobacter	Cui <i>et al.</i> , 2011 ; Han <i>et al.</i> , 2014a,b, 2015a,b
Céréales Liquor chinois à partir de Daqu (starter bactérien) et de vase, Chine			Methanobacteria : Methanobacterium, Methanohalobacter	Wang <i>et al.</i> , 2017
Divers Analyses sur différentes matrices alimentaires				Brusa <i>et al.</i> , 1998

2 Objectifs

L'utilisation de sel comme conservateur est l'une des techniques les plus anciennes utilisée pour préserver la nourriture. En diminuant l'activité de l'eau (a_w), celui-ci inhibe la croissance de microbes contaminants et/ou pathogènes présents dans l'aliment. Depuis quelques années, de nombreux micro-organismes ont cependant été isolés à partir de gros sels alimentaires. Les archées halophiles ont en effet montré une grande diversité au sein de ces derniers et y atteignent des concentrations de 10^5 CFU/g. Malgré son action antimicrobienne, le salage apporte donc aussi une nouvelle flore à l'aliment, et par voie de conséquence, il l'apporte aussi dans notre microbiote intestinal.

Dans ce mémoire, la diversité archéenne sera évaluée sur différentes matrices alimentaires salées afin de déterminer la viabilité de ces dernières au sein de l'aliment. Cette diversité sera estimée de manière culture-dépendante et indépendante.

Le premier objectif consistera à évaluer la diversité archéenne de manière culture-dépendante. Pour ce faire, des colonies seront isolées sur quatre milieux spécifiques à partir des échantillons alimentaires et des sels de salage. Les isolats seront ensuite prélevés et identifiés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARN_r 16S. Le deuxième objectif sera d'estimer cette diversité de manière culture-indépendante par une approche métagénomique. Pour cela, des extractions d'ADN seront effectuées sur les échantillons alimentaires pour ensuite être envoyées au séquençage à haut-débit.

Grâce à ces deux approches, la diversité et la viabilité des archées au sein des matrices alimentaires pourront être évaluées.

3 Matériel et méthodes

3.1 Échantillons

Plusieurs types de produits et matrices alimentaires ont été utilisés dans ce mémoire. Tout d'abord, cinq charcuteries ont été sélectionnées, pour la plupart dans des boucheries artisanales. Les sels de salage ont pu être récoltés pour trois d'entre elles. Ensuite, cinq fromages ont aussi été achetés. Un seul sel de salage a pu être récolté pour ceux-ci. Pour chaque aliment, trois échantillons sont prélevés, le premier servira à l'étalement sur les différents milieux, le deuxième à l'extraction d'ADN et le dernier restera en réserve à -20°C. Après l'achat, les échantillons de chaque aliment sont placés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

3.1.1 Charcuteries

Différentes salaisons ont été choisies dans plusieurs boucheries ou grandes surfaces. Dans la mesure du possible, un échantillon du sel de salage a été demandé. Les produits d'analyses sont repris dans la Table 6 ci-dessous.

Table 6: Noms, origines et abréviations des salaisons utilisées

Nom du produit	Source et lieu d'achat	Abréviation
Saucisson Fuetec « Elpozo »	Delhaize, Louvain-la-neuve, Belgique	SF
Saucisson sec*	Boucherie « Fumet des Ardennes », Corbion, Belgique	SFA
Jambon Cobourg*	Boucherie « Fumet des Ardennes », Corbion, Belgique	JFA
Jambon Cœur d'Ardenne*	Boucherie « Istace », Bouillon, Belgique	JBI
Jambon italien	Boucherie « A l'Italienne », Sedan, France	Jl

* Sel de salage récolté

3.1.2 Fromages

Tous les fromages ont été achetés à la « Crèmerie Istace » à Bouillon en Belgique. Trois proviennent de fermes laitières en Belgique, un d'une abbaye et le dernier provient d'une entreprise française. On retrouve la liste des fromages à la Table 7.

Table 7: Noms, origines et abréviations des fromages utilisés

Nom du produit	Source et lieu d'achat	Abréviation
Fromage « Œillet de Bouillon »*	Bergerie d'Acremont, Acremont, Belgique	FBA
Fromage de Herve doux	Fromagerie « du Vieux Moulin », Herve, Belgique	FH
Fromage de Chimay	Abbaye Notre Dame de Scourmont, Scourmont, Belgique	FC
Fromage Morbier Prestige	Fromagerie Badoz, Massif du Jura, France	FM
Fromage Sarté	Fromagerie « Le Sarté », Sart, Belgique	FS

*Sel de salage récolté

3.1.3 Sels de salage

Quelques sels ont pu être collectés auprès des boucheries et fromageries (Table 8). Ceux-ci ont été analysés en parallèle des charcuteries et fromages. Le sel de Maras (SeM) a aussi été utilisé comme contrôle positif pour les analyses. Ce sel avait obtenu des résultats positifs quant à la présence d'archées dans le mémoire de Jeanne Fourmentin en 2013 : « Étude de la diversité des archées halophiles dans les sels alimentaires et les salaisons » (Fourmentin, 2013).

Table 8: Origines et caractéristiques des sels de salage récoltés

Source	Caractéristiques	Abréviation
Sel de Maras (Contrôle positif)	Gros sel de contrôle	SeM
Sel « Fumet des Ardennes »	Gros sel du bac de salage	SeFA
Sel « Boucherie Istace »	Sel raffiné nitrité	SeBI
Sel « Bergerie d'Acremont »	Sel alimentaire	SeBA

3.2 Milieux de culture

Les milieux de culture ont été choisis pour leur concentration en sels qui va de 18% à 25%. Ces concentrations élevées favorisent le développement des haloarchées qui sont pour la plupart extrêmes halophiles et donc croissent dans des milieux aux concentrations en sels entre 20 et 30%. Les milieux diffèrent par les éléments traces et les substrats qu'ils contiennent. Ils ont été préparés avec de l'eau distillée pour éviter toute trace d'éléments pouvant altérer la croissance des archées. Les milieux ont tous été choisis depuis le livre « Halohandbook » (Dyall-Smith, 2009).

3.2.1 CDM (Chemically Defined Medium)

Le milieu CDM (Kauri *et al.*, 1990) a été mis au point pour la culture de *Haloferax volcanii* qu'on peut retrouver dans les lacs hypersalins et les marais salants (Mullakhanbhai *et al.*, 1975). Ce milieu possède une concentration en sels de 18% et contient quatre éléments traces, du NH_4Cl et du pyruvate de sodium.

Solution de Tris-Cl 1M pH 7,5

121,1g de Tris-base (Tris(hydroxyméthyl)amino méthane) (Merck) sont dissous dans 700 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du HCl concentré grâce à un pH-mètre inoLab® pH Level 1 (WTW). Le volume est porté à 1l.

Solution NH_4Cl 1M

Dissoudre 53,4g de NH_4Cl (VWR) dans 1 litre d'eau distillée. Stériliser 15 min à 121°C (Tuttnauer).

Solution Pyruvate 250 mg/ml

Dissoudre 6,25g de pyruvate (Biolife) dans 25 ml d'eau distillée puis filtrer avec un filtre 0,22 μm (Minisart® Syringe Filter, Sartorius). Conserver à 4°C jusqu'à l'utilisation.

Salt Water 18% (SW18)

Pour un litre de solution, les éléments de la Table 9 sont ajoutés à de l'eau distillée.

Table 9: Composition de la Salt Water 18% (pour 1 litre de solution)

Composant	Quantité
NaCl (VWR)	125g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Carl Roth)	50g
K_2SO_4 (Merck)	5g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)	0,26g

Quand les composants sont entièrement dissous, ajuster le pH à 7,5 avec la solution 1M de Tris-Cl (pH 7,5). Le volume est ajusté à 1l avec de l'eau distillée et la solution est gardée à température ambiante jusqu'à utilisation.

Solution tampon K_2HPO_4

Préparer une solution stock 0,5M de K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) (8,7g pour 100ml d'eau distillée) et une solution stock 0,5M de KH_2PO_4 (UCB Pharma) (6,8g pour 100 ml d'eau

distillée). Aux 100 ml de solution 0,5M de K_2HPO_4 , ajouter le volume de solution stock 0,5M de KH_2PO_4 nécessaire pour atteindre le pH de 7,5. La solution obtenue est stérilisée pendant 15 min à 121°C puis stockée à température ambiante.

Solution d'éléments traces SL4

Dans 100 ml d'eau distillée et une faible quantité de HCl concentré, les éléments de la Table 10 sont ajoutés en agitant la solution avec un barreau magnétique. L'HCl concentré permet de solubiliser plus facilement les différents éléments. Cette solution est filtrée à 0,22 μm .

Table 10: Composition pour 100 ml de solution SL4

Composant	Quantité
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Merck)	36 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck)	44 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich)	230 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (UCB Pharma)	5 mg

Milieu CDM

Pour obtenir un milieu solide, il faut dissoudre 15g d'agar PastAgar B (Bio-Rad) par litre de solution. Le milieu est ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 min. Les bouteilles sont finalement mises au bain marie à 55°C. Pour 1 litre de milieu, les éléments de la Table 11 sont ajoutés. Ces éléments sont stériles (autoclavés ou filtrés à 0,22 μm). Après homogénéisation du milieu, le milieu est coulé à 55°C dans des boîtes de Pétri (Sarstedt). Elles sont laissées reposer à température ambiante (pendant au moins 24h) avant d'être placées à 4°C emballées dans un sac hermétique pour une utilisation ultérieure.

Table 11 : Composants du milieu CDM pour 1 litre de milieu

Composant	Quantité
Solution NH_4Cl 1M	5 ml
Solution K_2HPO_4 0.5M	2 ml
Solution SL4	1 ml
1 mg/ml thiamine (filtré à 0,22 μm) (Sigma-Aldrich)	0,8 ml
1 mg/ml biotine (filtré à 0,22 μm) (Sigma-Aldrich)	0,1 ml
Solution pyruvate 250 mg/ml	20 ml

3.2.2 Hv-YPC (Yeast-Peptone-Casamino acids)

Le milieu Hv-YPC est un milieu complet qui présente une concentration en sels de 18%. Ce milieu contient des extraits de levures, des casamino-acides et de la peptone (Dyall-Smith, 2009).

Solution $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1M

Dissoudre 5,8g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 40 ml d'eau déminéralisée.

Solution Salt Water 30% (SW30)

Pour 1 litre de solution, ajouter les composants de la Table 12 à 800 ml d'eau déminéralisée en agitant avec un barreau magnétique. Le pH est ensuite ajusté à 7,5 avec de l'HCl concentré. Le volume est finalement monté à 1 litre avec de l'eau déminéralisée et la solution est gardée à température ambiante jusqu'à l'utilisation.

Table 12: Composants pour un litre de Salt Water 30%

Composant	Quantité
NaCl	240 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	30 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	35 g
KCl (Merck)	7 g
Tris-Cl 1M pH7,5	5 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1M	5 ml

Solution YPC 10x

Pour 1 litre de solution, les éléments de la Table 13 sont ajoutés. Le volume est ensuite porté à 1 litre avec de l'eau déminéralisée. Cette solution doit être utilisée directement et ne peut être stockée.

Table 13: Composants pour un litre de solution YPC

Composant	Quantité
Extrait de levure (Oxoid)	50 g
Peptone (Oxoid)	10 g
Casamino acides (Carl Roth)	10 g
KOH 1M (UCB)	17,6 ml

Milieu Hv-YPC

Pour 1 litre de milieu, ajouter les éléments de la Table 14. Le milieu est ensuite autoclavé pendant 15 min à 121°C. Avant de couler le milieu, 10 ml/l de la solution $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5M stérile sont ajoutés. Les boîtes de Petri sont laissées reposer 24h à température ambiante puis emballées dans un sac hermétique et placées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

Table 14: Composants pour un litre de milieu Hv-YPC

Composant	Quantité
H ₂ O déminéralisée	300 ml
SW30	600 ml
YPC 10x	99 ml
PastAgar B	15g

3.2.3 MGM (Modified Growth Medium)

Ce milieu a été élaboré pour permettre la croissance des espèces du genre *Haloferax*, *Halobacterium* et *Haloarcula* (Dyall-Smith, 2009). Il possède une concentration en sels de 23% et contient dix éléments traces, de la peptone et de l'extrait de levure.

Solution de 10 éléments traces SL10

Les éléments de la Table 15 sont ajoutés dans l'ordre. La solution est ensuite autoclavée à 121°C pendant 15 minutes puis stockée à température ambiante.

Table 15: Composants pour un litre de solution SL10

Composant	Quantité
HCl 25%	10 ml
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Janssen Chimica)	1,5 g
H ₂ O déminéralisée	1 l
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)	190 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)	100 mg
ZnCl_2 (Sigma-Aldrich)	70 mg
H_3BO_3 (Sigma-Aldrich)	6 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)	36 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)	24 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)	2 mg

Milieu MGM

Pour 1 litre de milieu, ajouter les composants de la Table 16. Le pH du milieu est ajusté à 7,5 avec du NaOH et le volume est porté à 1 litre avec de l'eau déminéralisée. Pour avoir un milieu solide, 15 g de PastAgar B sont dissous dans la solution et le milieu est stérilisé pendant 15 min à 121°C. Le milieu est coulé à 55°C puis laissé reposer 24h à température ambiante. Elles sont placées à 4°C jusqu'à l'utilisation. Pour la fabrication du milieu DBCM2 (point 3.2.4), l'agar n'est pas rajouté pour garder le milieu liquide.

Table 16: Composition pour un litre de milieu MGM

Composant	Quantité
H ₂ O déminéralisée	200 ml
Peptone	5 g
Extrait de levure	1 g
Salt Water 30 %	767 ml
SL10	1 ml

3.2.4 DBCM2

Ce milieu a été élaboré pour la mise en culture de *Haloquadratum walsbyi* découverte dans un marais salant en Australie (Burns *et al.*, 2007). Ce milieu contient du pyruvate, du NH₄Cl ainsi que dix éléments traces et une solution de dix vitamines. Il possède une concentration en sels de 25% (Dyall-Smith, 2009).

Solution Vitamines 10 (Vit10)

Les composants de la Table 17 sont ajoutés dans l'ordre. Le volume est ensuite porté à 1 litre avec de l'eau distillée. La solution est stérilisée par filtration à 0,22 µm dans un bouteille Duran stérile. Celle-ci est ensuite emballée dans de l'aluminium et placée à 4°C.

Table 17: Composants pour un litre de solution Vit10

Composant	Quantité
H ₂ O déminéralisée	200 ml
4-aminobenzoate (Sigma-Aldrich)	13 mg
D-(+)-biotine (Sigma-Aldrich)	3 mg
Nicotinamide (Sigma-Aldrich)	33 mg
Hemicalcium D-(+)-pantothenate (Sigma-Aldrich)	17 mg
Pyridoxamine hydrochloride (Sigma-Aldrich)	50 mg
Thiamine chloride hydrochloride (Sigma-Aldrich)	33 mg

Cyanocobalamine (Sigma-Aldrich)	17 mg
D,L-6,8-thioctique acide (Sigma-Aldrich)	10 mg
Riboflavine (Sigma-Aldrich)	10 mg
Acide folique (Sigma-Aldrich)	4 mg

Milieu DBCM2

Pour préparer ce milieu, il faut d'abord élaborer 1 litre de solution Salt Water 25% (SW25) en mélangeant 833 ml de SW 30 à 167 ml d'eau distillée. Pour obtenir un milieu solide, 15 g de PastAgar B sont ajoutés par litre de solution. Le milieu est ensuite stérilisé à 121°C pendant 15 min, puis laissé refroidir jusqu'à 55°C dans un bain-marie. Les composants de la Table 18 sont ensuite ajoutés. Ces composants ont préalablement été stérilisés par filtration ou autoclavage. Après homogénéisation du milieu, le milieu est coulé à 55°C, laissé reposer 24h à température ambiante puis conservé à 4°C dans un sac hermétique.

Table 18: Composants pour 1 litre de milieu DBCM2

Composant	Quantité
Tris-Cl 1M pH 7,5	10 ml
NH ₄ Cl 1M	5 ml
Solution tampon K ₂ HPO ₄ pH 7,5	2 ml
SL10	1 ml
Pyruvate 250 mg/ml	4,4 ml
MGM 23%	50 ml

3.3 Mise en culture

Tous les types de fromages, charcuteries et sels ont été mis en culture sur les quatre types de milieux (CDM, Hv-YPC, MGM et DBCM2).

3.3.1 Charcuteries et fromages

Trois types de produits ont été utilisés : du saucisson sec, du jambon cru et du fromage. Pour chaque type, les prises pour analyses ont été effectuées à différents endroits pour avoir une idée de la flore microbienne à chacun de ces endroits. Les prises ont été effectuées sur l'aliment frais ou décongelé et découpées avec un scalpel.

Les jambons

Les jambons ont été séparés en trois parties : le centre, la périphérie (1 cm en-dessous de la surface) et la surface. Chaque fois, 25 g de viande au centre, 10 g en périphérie et 10 g en surface ont été prélevés en essayant de représenter au maximum l'hétérogénéité du produit.

Les saucissons

Les saucissons n'ont été séparés qu'en deux parties : le centre et la surface. A chaque fois, 25 g de centre ont été prélevés, et un maximum de peau, soit plus ou moins 2 g.

Les fromages

Pour les fromages, les échantillons ont été divisés en trois parties : le centre, la périphérie et la surface. 10 g de centre ont été prélevés, 10 g de périphérie et un maximum de surface, soit plus ou moins 5 g en moyenne.

Les prises sont placées dans des sacs d'homogénéisation (VWR) différents. Du milieu MGM 23% liquide à température ambiante est ensuite ajouté aux différentes prises pour atteindre une dilution 10^{-1} . Le milieu MGM 23% permet de limiter la prolifération des microorganismes non-halophiles présents dans l'aliment et ainsi éviter cette flore interférante dans nos manipulations. Les échantillons sont soumis à trois cycles successifs de 30 sec à 230 rpm dans un Stomacher® 400 Circulator (Seward). Le liquide obtenu est utilisé pour faire des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} avec du MGM 23% liquide. 200 µl de chaque dilution sont ensuite prélevés grâce à des pipettes sérologiques (Sarstedt) puis étalés sur chaque milieu à température ambiante. Pour chaque dilution et chaque milieu, un répliquât est effectué. Ainsi, 24 boîtes par prises sont étalées (6 par milieu) donc au total 72 boîtes pour les jambons et fromages, et 48 pour les saucissons. Les boîtes sont ensuite emballées dans du Parafilm® et incubées à 37°C pendant quatre semaines en atmosphère humide dans un incubateur Binder® (Tuttlingen). Le prélèvement des colonies a lieu au terme de ces quatre semaines.

3.3.2 Sels

Une quantité de 5 g de sel est pesée et dissoute dans 25 ml de SW18 stérile dans un tube à vis (Sarstedt) de 50 ml. Le tube est placé dans un incubateur agitateur à 30°C (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) pendant 30 min jusqu'à dissolution complète du sel. Pour chaque sel, des dilutions 10^0 , 10^{-1} et 10^{-2} sont effectuées. 250 µl sont étalés et les étalements sont répétés deux fois pour chaque dilution et chaque milieu. Les boîtes sont emballées dans du Parafilm® et incubées à 37°C en atmosphère humide pendant quatre semaines. Le prélèvement des colonies a lieu au terme de ces 4 semaines d'incubation.

3.4 Prélèvement des colonies

Au terme des quatre semaines d'incubation, plusieurs colonies par types de produits, parties de l'échantillon (centre, périphérie ou surface) et milieux ont été sélectionnées. Ces colonies sont choisies afin de maximiser les différences phénotypiques entre elles pour chaque milieu et chaque partie de l'échantillon. Ces colonies sont striées sur le même milieu que celui sur lequel elles ont été prélevées. Les boîtes sont ensuite emballées dans du Parafilm® et placées dans un incubateur à atmosphère humide à 37°C pendant deux semaines. Au bout de ces deux semaines, les colonies sont utilisées pour l'amplification PCR et le stockage de longue durée.

3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Afin d'identifier les colonies isolées, le gène codant pour l'ARNr 16S de celles-ci a été amplifié par PCR. Une faible quantité de chaque isolat a été prélevée sur boîtes de Petri et suspendue dans 50 µl d'eau ultrapure stérile. Un mix PCR a été réalisé (Table 20), ce dernier est différent suivant les amorces utilisées. Trois couples d'amorces ont été utilisés pour le séquençage dans ce mémoire : deux spécifiques aux archées et un spécifique aux bactéries. Pour les archées, l'amorce S-D-Arch-0007-a-S-19 (Arch20F) (Massana *et al.*, 1997) et l'amorce anti-sens S-D-Arch-1492-a-A-22 (1492R) (Lane, 1991) ainsi que l'amorce 20F et 1540R ont été utilisées (Enache *et al.*, 2007). Les amorces universelles pour bactéries sont les 27F et 1492R (Table 19) (Chen *et al.*, 2016).

Les thermocycleurs utilisés pour les PCR sont le T100™ et C100™ de Bio-Rad ainsi que le LabCycler (SensoQuest). Les cycles PCR pour les trois différentes amorces sont détaillés dans les Tables 21 à 23. Les produits PCR sont ensuite utilisés pour l'électrophorèse puis conservés à -20°C pour être envoyés au séquençage après purification.

Table 19: Séquence des amorces pour PCR (Y = T ou C ; R = G ou A)

Amorce	Séquence	Taille de l'amplicon
Archées		
Arch20F (S-D-Arch-0007-a-S-19)	5'-TTCCGGTTGATCCYGCCRG-3'	1472 pb
1492R (S-D-Arch-1492-a-A-22)	5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3'	
20F	5'-TCCGGTTGATCCTGCCG-3'	1520 pb
1540R	5'-GGAGGTGATCCAGCCG-3'	
Bactéries		
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1465 pb
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	

Table 20: Composition du mix PCR pour les amorces utilisées

Composant	Concentration
H ₂ O ultra pure stérile	
Solution tampon incolore Go Taq® Flexi (Promega)	1x
dNTP	2 mM
Amorce sens (F) (Promega)	10 µM
Amorce anti-sens (R) (Promega)	10 µM
MgCl ₂ (Promega)	25 mM
ADN Polymérase Go Taq® Flexi (Promega)	0,03 µM

Table 21: Programme PCR pour les amorces d'archées : Arch20F et 1492R

Température	Temps
95°C	3 : 00
95°C	1 : 00
57,5°C	1 : 00
72°C	1 : 00
72°C	10 : 00
10°C	∞

Table 22: Programme PCR pour les amorces d'archées : 20F et 1540R

Température	Temps
95°C	3 : 00
95°C	1 : 00
50,9°C	1 : 00
72°C	1 : 00
72°C	10 : 00
10°C	∞

Table 23: Programme PCR pour les amorces bactériennes 27F et 1492R

Température	Temps
95°C	5 : 00
95°C	1 : 00
52°C	1 : 00
72°C	1 : 00
72°C	10 : 00
10°C	∞

Pour l'ensemble des PCR sur les échantillons, des contrôles positifs provenant du Sel de Maras (SeM) ont été utilisés. Il s'agit de SeM3 (*Haloarcula argentinensis* strain arg-1) et SeM6 (*Halobacterium noricense* strain JCM 15102). Ils sont respectivement appelés +1 et +2 sur les gels d'électrophorèse (Annexe 1 : Gels d'électrophorèse).

3.6 Électrophorèse

L'électrophorèse est utilisée après la PCR pour vérifier le succès de l'amplification de l'ADN. Cette technique consiste à faire migrer les fragments d'ADN grâce à un champ électrique. Les fragments d'ADN vont être séparés en fonction de leur taille en migrant au travers du gel, les plus longs allant le moins loin. Le gel contient 0,8% d'Agarose LE (Low Electroendosmosis) (ChemCruz™) et une solution tampon de TAE 0,5x (Tris, Acétate, EDTA) (Table 24). Le mélange d'agarose et de TAE est chauffé jusqu'à ébullition pour dissoudre l'agarose. Du BET (Bromure d'éthidium) d'une solution stock de 10mg/ml est ajouté une fois le mélange refroidi pour atteindre une concentration de 200 µl/l dans le gel. Le BET complexe l'ADN et émet dans le rose lorsqu'il est exposé à la lumière UV. Le gel est ensuite coulé dans un moule avec un peigne pour délimiter les puits de chargement. Une fois le gel gélifié, il est placé dans une cuve Mupid®One (Advance Co Ltd.) remplie de TAE contenant du BET (0,5µg/ml) en concentration 200 µl/l. Un mélange de 5 µl du produit PCR additionné de 1 µl de tampon de charge (Table 25) sont introduits dans chaque puit. Une échelle (Eurogentec) (3 µl) est aussi coulée dans le premier puit. Une différence de potentiel de 100 V est appliquée pendant 30 min pour permettre la migration de l'ADN. Le gel est finalement exposé à la lumière UV pour mettre en évidence le BET fixé sur l'ADN, les photos sont ensuite traitées par le logiciel Quantity One (Bio-Rad).

Table 24: Composition d'un litre de solution TAE 50x

Composant	Quantité
Tris	24 g
Acétate de sodium (VWR)	82 g
Na ₂ EDTA	18,6 g

Table 25: Composition du tampon de charge

Composant	Quantité
Bleu de bromophénol (Sigma-aldrich)	0,25 % (w/v)
Saccharose (VWR)	40 % (w/v)

3.7 Séquençage

Si le gel d'électrophorèse montre une bande de la taille de l'amplicon recherché, l'ADN contenu dans le produit PCR est purifié grâce au kit GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). Le séquençage en double sens est ensuite réalisé par Macrogen (Macrogen Corporation, Amsterdam, Pays-bas), puis les séquences sont confrontées à la base de

données BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI. Le pourcentage d'identité par rapport aux souches de références est obtenu, et la souche type la plus proche est sélectionnée. La séquence peut être identifiée à l'espèce quand le pourcentage d'identité est supérieur à 97%.

3.8 Nomenclature des isolats

Chaque isolat reçoit un nom en fonction de son origine et son milieu (Table 26).

Table 26: Nomenclature des isolats

Échantillon		Milieu de culture	
Nom	Abréviation	Nom	Abréviation
Sel de Maras	SeM	CDM	C
Sel « Boucherie Istace »	SeBI	DBCM2	D
Sel « Fumet des Ardennes »	SeFA	MGM	M
Sel « Bergerie d'Acremont »	SeBA	Hv-YPC	H
Saucisson Fuetec « Elpozo »	SF		
Saucisson « Fumet des Ardennes »	SFA		
Jambon Cobourg « Fumet des Ardennes »	JFA		
Jambon Cœur d'Ardenne « Istace »	JB		
Jambon Italien	JI		
Fromage « Œillet de Bouillon » bergerie d'Acremont	FB		
Fromage de Herve	FH		
Fromage de Chimay	FC		
Fromage Morbier	FM		
Fromage Sarté	FS		

3.9 Conservation longue durée des souches

Après le prélèvement d'une fraction de colonie pour l'amplification et le séquençage, le reste de la culture pure est récupéré pour être stocké à -80°C. Le prélèvement est suspendu dans un mélange de MGM 23% liquide et du glycérol (70:30).

3.10 Microbiologie alimentaire

En parallèle de la mise en culture sur milieux salins, la flore microbienne (bactéries, levures, moisissures) a aussi été estimée selon les normes en vigueur. La charge microbienne a été évaluée sur chaque « type » d'aliment : les cinq types de fromages (FBA, FH, FC, FM

et FS) ont été analysés ainsi que sur le Jambon Cobourg, le Jambon Cœur d'Ardenne et le Saucisson Fuetec « Elpozo » (JFA, JBI et SF).

3.10.1 Préparation des échantillons

Pour cette partie, 10 g représentatifs (centre, périphérie et surface) de chaque échantillon ont été prélevés et placés dans un sac d'homogénéisation avant d'être dilués 10x avec de l'eau peptonée tamponnée (EPT). Le sac subit ensuite trois cycles successifs de 30 secondes à 230 rpm dans un Stomacher® 400 Circulator. Des dilutions jusque 10^{-5} sont réalisées avec une solution de Ringer diluée au $\frac{1}{4}$ (Oxoid). Un ensemencement en masse (1 ml) est effectué pour chaque dilution, chaque milieu et chaque aliment.

Eau Peptonée Tamponnée (EPT)

Mettre en suspension 20 g de milieu déshydraté (Bio-Rad) dans 1 litre d'eau distillée. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Solution de Ringer diluée au $\frac{1}{4}$

Le Ringer (Oxoid) est un diluant isotonique pour les bactéries et les échantillons bactériologiques. Dissoudre un comprimé dans 500 ml d'eau distillée. Stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C.

3.10.2 Mise en culture et normes respectées

Norme ISO 4833-1 : Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes. Partie 1 : Comptage des colonies à 30°C par la technique d'ensemencement en profondeur

Cette norme spécifie une méthode horizontale, c'est-à-dire adaptée à tous les aliments ou environnements, de dénombrement des micro-organismes capables de se développer et de former des colonies dans un milieu solide après incubation aérobie à 30°C.

20,5 g de poudre de milieu PCA (Bio-Rad) sont dissous dans 1 l d'eau distillée, ils sont ensuite placés à 121°C pendant 15 min. Le milieu est ensuite redescendu à 45°C au bain-marie avant d'être coulé. Des dilutions de 10^{-1} jusque 10^{-5} sont effectuées pour ce milieu. Les boîtes sont finalement placées à 30°C pendant 72h.

Norme ISO 15214 : Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles. Technique de comptage des colonies à 30°C

Cette norme spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles viables par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation à 30°C pendant 3 jours.

Dissoudre 62,0 g de milieu MRS (Bio-Rad) en poudre dans un litre d'eau distillée puis stériliser à 121°C pendant 15 min. Le milieu est ensuite redescendu à 45°C avant d'être coulé en double couche. Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-4} sont effectuées pour ce milieu. Les boîtes sont incubées 72h à 30°C.

Norme ISO 7954 : Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures

Cette norme spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures viables au moyen de la technique de comptage des colonies après incubation à 25°C pendant 5 jours.

Dissoudre 41,1 g de milieu YGC (Bio-Rad) dans 1 litre d'eau distillée puis stériliser pendant 15 min à 121°C. Le milieu est refroidi à 45°C avant d'être coulé. Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-4} sont effectuées pour ce milieu. Les boîtes sont incubées pendant 5 jours à 25°C.

Norme BRD 07/08-12/04 : Méthode Rapid'*E-coli* 2 pour le dénombrement des coliformes dans les produits d'alimentation humaine

Rapid'*E-coli* 2 (Bio-Rad) est un milieu chromogénique sélectif pour dénombrent directement les *Escherichia coli* et les autres *coliformes*. C'est un milieu prêt à l'emploi, en bouteilles de 100 ml, il suffit de le faire fondre au bain-marie à 100°C avant de le couler une fois refroidi à 45°C. Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-4} sont effectuées pour ce milieu. Les boîtes ont été incubées 24h à 37°C.

**Norme ISO 6888-2/A1 : Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 2 : Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.
Amendement 1 : Inclusion des données de fidélité**

57,0 g de poudre de milieu Baird Parker (Bio-Rad) sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Répartir 90,0 ml de milieu par bouteille Duran puis stériliser pendant 15 min à 121°C. Une fois les bouteilles refroidies à 45°C, rajouter un flacon de RPF (Bio-Rad) dilué dans 10,0 ml d'eau distillée stérile et monté à 37°C. Homogénéiser puis couler les boîtes, des dilutions de 10^{-1} à 10^{-4} sont effectuées pour ce milieu. Les boîtes sont placées à 37°C pendant 18 à 24h.

3.11 Extraction d'ADN total des sels et des aliments

Des extractions d'ADN ont été réalisées sur les sels avec un protocole interne et sur les aliments avec deux kits d'extraction. La quantité et la pureté de l'ADN ont ensuite été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre 1000 NanoDrop® (Thermo Scientific).

3.11.1 Extraction d'ADN à partir des sels

Un échantillon de 8 g de sel est dissous dans 50 ml de SW12 (Salt Water 12%) (600 ml d'eau distillée + 400 ml de SW30) dans un tube à vis, celui-ci est placé dans un incubateur rotatif à 30°C à 120 rpm jusqu'à dissolution complète du sel. Un filtre en acétate de cellulose de 0,20 µm de porosité (Poraflo® CA, Macherey-Nagel) est préalablement autoclavé pendant 15 minutes à 121°C et placé ensuite sur une seringue stérile de 50 ml. Celle-ci est utilisée pour filtrer la solution. Le filtre est ensuite récupéré et placé dans un tube de 2 ml puis 570 µl d'une solution de Tris-EDTA (Carl-Roth) sont ajoutés. Le tube est placé dans un bain à ultrasons (Elmasonic S30-H, Elma) pendant 5 min avant d'être incubé 15 min à 37°C. 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K (20mg/ml) (Sigma-Aldrich) sont ajoutés. Au bout d'une heure d'incubation à 30°C, le filtre est retiré et 100 µl de NaCl 5M sont ajoutés ainsi que 80 µl de CTAB/NaCl. La solution est incubée 10 min à 65°C. L'ADN est purifié au moyen de deux extractions au phénol/chloroforme/isoamyl alcool (25:24:1) (Sigma-Aldrich) et précipité avec un volume égal de isopropanol pendant une nuit à -20°C. L'ADN est récupéré en centrifugeant 15 min à 13000 rpm puis il est lavé avec 500 µl d'éthanol froid 70%. Il est suspendu dans 40 µl de tampon Tris-EDTA après avoir été séché 15 min à 55°C.

3.11.2 Extraction d'ADN à partir d'aliments : DNeasy® PowerFood® Microbial Kit

Le kit d'extraction d'ADN de Qiagen permet d'obtenir de l'ADN de bonne qualité pour des applications ultérieures. Il s'agit d'un kit complet qui ne nécessite aucun réactif supplémentaire et qui peut être utilisé sur les produits laitiers et la viande. Le processus d'extraction consiste en une homogénéisation de l'échantillon alimentaire dans un premier temps. Ensuite plusieurs cycles de centrifugation sur colonne sont effectués avec les solutions fournies dans le kit afin de lyser et purifier l'ADN. Celui-ci est finalement gardé à -20°C jusqu'à utilisation.

3.11.3 Extraction d'ADN à partir d'aliments : NucleoSpin® Food

Le kit d'extraction NucleoSpin® Food de Macherey-Nagel convient pour tout type de matrice alimentaire. Les échantillons sont d'abord homogénéisés, l'ADN est ensuite extrait avec des tampons de lyse contenant des sels chaotropiques, des agents dénaturants et des détergents. L'ADN est ensuite fixé sur la membrane en silicate NucleoSpin® avec un agent liant et de l'éthanol. Il est lavé avec 2 tampons différents pour enlever les inhibiteurs potentiels de PCR. L'ADN peut enfin être élué dans de l'eau ou un tampon salin et conservé à -20°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

3.12 Nested-PCR pour la métagénomique

La liaison des amorces à des sites incorrectes est un problème majeur des PCR classiques car elles aboutissent à des amplifications de séquences inattendues. La Nested-PCR est de ce fait utilisée pour limiter ce problème. Il s'agit d'une implication de deux PCR successives avec deux paires d'amorces différentes, la deuxième paire amplifiant une séquence au sein du produit de la première PCR.

Une première PCR a donc été effectuée avec une paire d'amorces spécifiques aux archées (Table 27) (Gantner *et al.*, 2011). Dans un tube PCR, 10 µl d'extrait d'ADN sont mélangés avec 90 µl de mix PCR. De l'eau ultrapure est utilisée comme contrôle négatif et un isolat haloarchéen comme contrôle positif. Le programme PCR se trouve à la Table 28. Une électrophorèse est ensuite réalisée pour confirmer la réussite de l'amplification (voir 3.6). Si celle-ci est réussie, les échantillons sont envoyés au Research and Testing Laboratory (USA) pour effectuer une seconde PCR (la nested-PCR) et le séquençage haut-débit.

Table 27 : Séquence des amorces pour PCR (Y = T ou C ; W = A ou T)

Amorce	Séquence	Taille de l'amplicon
340F (S-D-Arch-0340-a-S-18)	5'-CCCTAYGGGGYGASCAG -3'	660 pb
1000R (S-D-Arch-1043-a-A-18)	5'-GGCCATGCACYWCYTCTC -3'	

Table 28 : Programme PCR pour les amorces 340F et 1000R

Température	Temps	
95°C	2 : 00	
95°C	0 : 30	} 35 cycles
57°C	0 : 30	
72°C	1 : 30	
72°C	10 : 00	
10°C	∞	

4 Résultats

4.1 Microbiologie culture-dépendante

Le premier objectif de ce mémoire a été d'évaluer la diversité archéenne au sein des matrices alimentaires de manière culture-dépendante. Pour ce faire, dix matrices alimentaires ayant subi une étape de salage ont été sélectionnées. Elles ont ensuite été divisées en plusieurs parties (surface, périphérie et centre) afin de déterminer la charge et la diversité en archées pour chacune d'elles. Les colonies ont ensuite été isolées sur quatre milieux spécifiques salés (CDM, Hv-YPC, MGM et DBCM2). Les isolats ont finalement été prélevés et identifiés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. Lorsque les sels de salage ont pu être récoltés, ceux-ci ont aussi été mis en culture sur ces quatre milieux spécifiques en suivant le même protocole afin de déterminer la diversité en archées dans ceux-ci.

En parallèle, la flore interférente (bactéries, levures et moisissures) a aussi été évaluée pour la flore totale mésophile aérobie, les bactéries lactiques, les levures, les moisissures, les coliformes et les staphylocoques en respectant les normes ISO détaillées au point 3.10.2.

4.1.1 Culture sur milieux spécifiques pour les sels de salage

Au terme des quatre semaines d'incubation, plusieurs colonies par sel et par milieu ont été sélectionnées. Comme il est difficile de différencier les colonies d'archées de celles de bactéries, elles sont choisies afin de maximiser les différences phénotypiques entre elles pour chacun des milieux.

Parmi les trois sels de salage récoltés (SeFA, SeBI et SeBA), seul le sel de la boucherie « Fumet des Ardennes » (SeFA) a montré une croissance sur les milieux de culture spécifiques. Il s'agit du seul gros sel collecté. Les deux autres sels n'ont montré aucune croissance de colonies après quatre semaines d'incubation à 37°C. Le sel de Maras (SeM) (contrôle positif) a aussi montré une croissance sur milieux spécifiques.

Sel de Maras (contrôle positif) (SeM)

Pour le sel SeM, une croissance microbienne a eu lieu principalement sur les milieux CDM et DBCM2, très peu de croissance a été observée sur le milieu MGM et rien n'a poussé sur le milieu Hv-YPC. Ainsi, 12 colonies ont été isolées à partir des trois milieux où une croissance a été observée : une pour MGM, cinq pour CDM et six pour DBCM2. Les colonies isolées se trouvent en Annexe 2 : Colonies isolées. Elles sont toutes rouges (claires à foncées) à l'exception de SeM9D qui est rose translucide. Elles sont de forme circulaire pour la plupart (SeM1M, SeM8D ou SeM12D) mais d'autres sont plus irrégulières et ont des bords plus ondulés, c'est le cas de SeM2C ou SeM11C par exemple. Enfin, leur taille se situe habituellement en-dessous de 2 mm de diamètre.

Ces 12 colonies ont ensuite été striées et après deux semaines d'incubation, des PCR avec les amorces spécifiques aux archées 20F-1540R et Arch20F-1492R ont été réalisées (voir en Annexe 1 : Gels d'électrophorèse). Certains isolats n'ont pu être identifiés qu'à partir des produits PCR obtenus avec les amorces 20F-1540R, c'est le cas de SeM2C, SeM7D, SeM9D et SeM11C. Une seule en revanche n'a montré une bande de la taille de l'amplicon recherché que sur le gel d'électrophorèse de la PCR avec les amorces Arch20F-1492R : SeM8D. Après lecture sur gel d'électrophorèse et identification par séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S, ces isolats se sont tous révélés être des archées de la classe des *Halobacteria* dans l'embranchement des *Euryarchaeota* (Table 29, P.49). Trois genres ont ainsi été trouvés dans ce sel, les genres *Halobacterium* et *Haloarcula* en majorité et le genre *Halolamina* en plus faible proportion. Les deux premiers genres appartiennent à l'ordre des *Halobacteriales* et la famille des *Halobacteriaceae*, le dernier genre, quant à lui, appartient à l'ordre des *Haloferacales* et à la famille des *Haloferacaceae*. Les 12 isolats ont été identifiés à l'espèce avec plus de 99% de pourcentage d'identification. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus sur ce même sel dans le mémoire de Jeanne Fourmentin (Fourmentin, 2013 ; Henriët *et al.*, 2014).

Le genre *Halobacterium* a été trouvé plusieurs fois dans ce sel. Les organismes de ce genre d'archées sont en forme de bacilles, Gram-, neutrophiles et aérobies stricts. Ils ont une croissance optimale en moyenne entre 20-27% de NaCl. Les colonies sont rouges ou roses par la présence de bactériorubérines (Rosenberg *et al.*, 2014 ; Han *et al.*, 2014c). Ce genre possède actuellement cinq espèces qui ont été découvertes dans les marais salants, les lacs hyper salins ou encore les poissons fermentés (Lu *et al.*, 2017 ; Han *et al.*, 2014c ; Yachai *et al.*, 2008). Cependant, dans ce sel, une seule espèce du genre *Halobacterium* a été retrouvée, il s'agit de *Hbt. noricense*. Cette espèce a été isolée pour la première fois en 2004 à 470m sous terre, depuis une mine de sel en Autriche. Les cellules mesurent entre 1,2 et 2,0 µm de long, elles croissent à température optimale de 37-45°C, à pH 5,2-7,0 et sur des milieux à 15-17,5% de NaCl. Les colonies sont petites, circulaires, lisses et légèrement rouges dans ces conditions (Gruber *et al.*, 2004). Les colonies isolées à partir du sel SeM, sur milieu MGM

ou DBCM2 (les milieux les plus concentrés en sels) et dans les mêmes conditions d'incubation possèdent ce même phénotype (Fig. 7, P.50).

Le genre *Haloarcula* a aussi été retrouvé de nombreuses fois dans ce sel. Les organismes du genre *Haloarcula* sont pléomorphes (disques, triangles, ou autres formes), neutrophiles et certaines espèces sont motiles. Ils sont de couleur rouge, orange ou rose et croissent à une température optimale autour des 40°C et à un pH 7-7,5. La concentration optimale en NaCl, elle, se situe généralement entre 15 et 25%, c'est pourquoi la plupart des organismes de ce genre ont été trouvés dans des marais salants ou des lacs salés (Rosenberg *et al.*, 2014). Deux espèces ont cependant récemment été isolées à partir d'échantillons de sauce de poisson fermentée (*Har. salaria* et *Har. tradensis*) (Namwong *et al.*, 2011). Ce genre possède actuellement neuf espèces et son espèce type est *Har. vallismortis* (anciennement *Halobacterium vallismortis*), découverte dans une mare salée dans la Death Valley en Californie (Gonzalez *et al.*, 1978). Cette dernière a été isolée depuis l'échantillon de sel SeM, ainsi qu'une autre espèce : *Har. argentinensis*, isolée pour la première fois depuis un échantillon de sol salin en Argentine (Lhara *et al.*, 1997). Les cellules de *Har. vallismortis* sont pléomorphes et ont une taille moyenne de 0,6 x 3 µm, les cellules de *Har. argentinensis* sont triangulaires et ont une taille de 1,0 x 3,0 µm. Les colonies sont respectivement roses et orange/rouges (Rosenberg *et al.*, 2014). L'identification au niveau de l'espèce pour les isolats SeM4C et SeM11C a été plus délicate, les isolats présentant le même pourcentage d'identification pour trois souches types différentes. L'entière des souches de *Haloarcula* ont été isolées à partir du milieu CDM. Une photo du phénotype des colonies d'une espèce de *Haloarcula* est présente à la Fig. 7 (isolat obtenu à partir du sel SeFA).

Enfin, le genre *Halolamina* a été isolé depuis cet échantillon de sel. Ce genre contient actuellement six espèces et ses organismes sont caractérisés par des cellules pléomorphes, Gram- et aérobies hétérotrophes. Toutes les espèces du genre *Halolamina* sont extrêmes halophiles et croissent à des températures entre 25-50°C (optimum à 37°C) et à des pH entre 5,5-9,5 (optimum à 7-7,5). La première espèce de ce genre, *Hlm. pelagica*, a été isolée d'un marais salant en Chine (Cui *et al.*, 2011). Depuis, d'autres ont été isolées de sels marins ou de mines de sels, c'est le cas de *Hlm. salifodinae* qui a été identifiée dans l'échantillon de sel SeM. Les cellules de *Hlm. salifodinae* sont roses, et leur croissance opère à un optimum de 37°C, à pH 7,0 et entre 20-23% de NaCl (Zhang *et al.*, 2013). Ces conditions sont donc semblables à celles appliquées lors de nos analyses (37°C, pH 6,5 sur milieu DBCM2 à 25% de concentration en sels). Le phénotype des colonies est aussi légèrement rosé sur milieu DBCM2 (Fig. 7).

À la suite de ces identifications, les isolats SeM3C (*Haloarcula argentinensis* arg-1) et SeM6D (*Halobacterium noricense* JCM 15102) ont été utilisés comme contrôles positifs pour la suite des manipulations.

Sel de la boucherie « Fumet des Ardennes » (SeFA)

Pour le sel SeFA, une croissance microbienne a été observée sur tous les milieux mais c'est sur le milieu DBCM2 que la plupart des colonies ont été observées. Ainsi, une seule colonie a été isolée pour chacun des milieux MGM et Hv-YPC, trois du milieu CDM et neuf du milieu DBCM2. Certaines boîtes ont montré une très grande diversité de colonies comme les boîtes DBCM2 à dilution 0 et après quatre semaines d'incubation (Fig. 4). De nombreux phénotypes différents ont ainsi été isolés à partir de ces boîtes. Les colonies isolées se trouvent en Annexe 2 : Colonies isolées. Elles sont toutes rouges à l'exception de SeFA3C et SeFA12D qui sont blanches et SeFA6D qui est rose. Elles ont une taille moyenne entre 2 mm de diamètre pour SeFA1M et 7 mm pour SeFA4C. Les colonies sont de forme circulaire pour la plupart mais certaines sont ondulées comme SeFA4C ou SeFA11D.

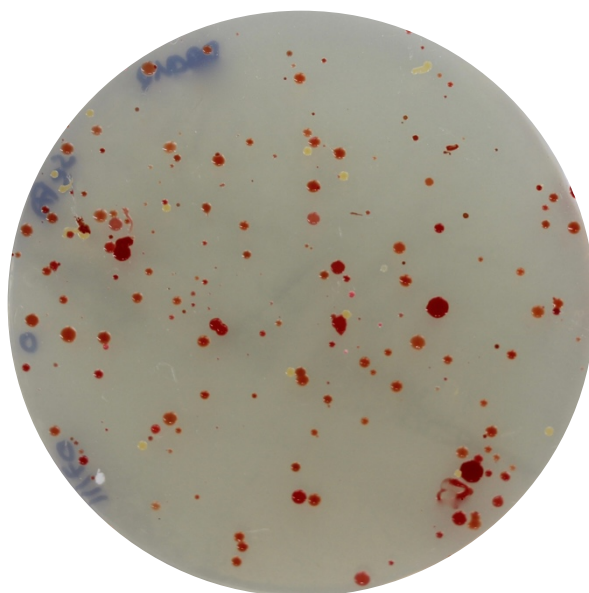


Figure 4 : Boîte obtenue à partir de l'échantillon de sel SeFA sur le milieu DBCM2 à dilution 0 (le prélèvement de certaines colonies a déjà eu lieu sur cette boîte).

Les 14 colonies ont ensuite été striées et après deux semaines d'incubation, des PCR avec les amorces spécifiques aux archées 20F-1540R et Arch20F-1492R ont été réalisées comme pour SeM (voir en Annexe 1 : Gels d'électrophorèse). Les mêmes résultats ont été obtenus pour les deux paires d'amorces, et seuls les isolats SeFA1M, SeFA3C, SeFA8D et SeFA12D n'ont pas été amplifiés. Tous les autres ont été séquencés et identifiés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S comme étant des archées de la classe des *Halobacteria* (Table 29). Cinq genres différents ont ainsi été identifiés au sein de ce sel : le genre *Haloarcula* principalement mais aussi les genres *Halobacterium*, *Natronomonas*, *Halococcus* et *Halorubrum*. Les quatre premiers font partie de l'ordre des *Halobacteriales* et la famille des *Halobacteriaceae*, le

dernier genre, quant à lui, appartient à l'ordre des *Haloferacales* et à la famille des *Haloferacaceae*. Une ou plusieurs espèces au sein de chacun de ces genres ont aussi été trouvées. Les espèces ont pu être identifiées à 99% de pourcentage d'identification sauf pour SeFA10D et SeFA14D.

Pour le genre *Halobacterium*, une seule espèce a été identifiée : *Hlb. noricense*. Il s'agit de la même souche que celle isolée à partir du sel de Maras (SeM), isolée sur le milieu DBCM2.

Pour le genre *Haloarcula*, deux espèces ont été identifiées : *Har. marismortui* et *Har. japonica*. *Har. marismortui* a été isolée sur les milieux CDM et DBCM2. Son optimal de croissance se situe autour des 20-23% de NaCl et à des températures de 40-50°C. Les colonies sont rouges, les cellules sont pléomorphes et ont une taille moyenne de 1,0 x 3,0 µm. Le premier organisme de cette espèce a été découvert dans la mer Morte (Oren *et al.*, 1990). Le phénotype des colonies de l'isolat SeFA4C identifié comme *Har. marismortui* est disponible en Fig. 7. *Har. japonica* a uniquement été isolée à partir du milieu DBCM2. Cette espèce a été identifiée pour la première fois dans un marais salant au Japon. Elle a un optimal de croissance à 15-25% NaCl, pH 7,0-7,5 et 50-53°C. Les colonies sont rouges et les cellules sont de formes triangulaires de 0,2 et 2,0 µm de long (Takashina *et al.*, 1990 ; Horikoshi *et al.*, 1993).

Une seule espèce du genre *Natronomonas* a été isolée : *Nmn. moolapensis*. Ce genre contient pour le moment trois espèces et l'espèce type est *Nmn. pharaonis* découverte dans une saumure alcaline en Égypte (Kamekura *et al.*, 1997). Les organismes du genre *Natronomonas* sont hétérotrophes, aérobies, Gram- et pléomorphes. Ils sont alcaliphiles (*Nmn. pharaonis* et *Nmn. gomsonensis*) ou non-alcaliphiles (*Nmn. moolapensis*) (Kim *et al.*, 2014 ; Burns *et al.*, 2010). Les conditions optimales de croissance de *Nmn. moolapensis* sont 18-20% NaCl, pH 7,0-7,5 et une température entre 37-40°C. Les colonies sont rouges ou roses. Les cellules ont différentes formes et une taille entre 0,7 et 1,7 µm. Le premier organisme de cette espèce a été découvert dans le bassin de cristallisation du marais salant de Cheetham en Australie (Burns *et al.*, 2010). L'isolat trouvé dans cet échantillon de sel de salage SeFA possède les mêmes caractéristiques morphologiques sur milieu DBCM2 (Fig. 7).

Seule l'espèce *Halococcus dombrowskii* a été isolée pour le genre *Halococcus*. Le genre *Halococcus* est actuellement représenté par neuf espèces que l'on retrouve notamment dans les lacs salés, l'eau de mer, le gros sel ou encore les sauces au poisson fermentées (Minegishi *et al.*, 2015). Les cellules sont coccoïdes et forment des paires ou des agrégats, elles sont neutrophiles, Gram- principalement et nécessitent 20-25% de NaCl (Rosenberg *et al.*, 2014). L'espèce type est *Hcc. morrhuae* (Kocur *et al.*, 1973). *Hcc. dombrowskii* a été isolée d'une roche de sel remontée d'une mine en Autriche. Les organismes de cette espèce sont aérobies, en forme de coques de 0,8 à 1,2 µm de diamètre qui apparaissent seules ou en agrégats de deux à cinq cellules.

On peut notamment voir ces agrégats de quatre cellules à la Fig. 5 prise à l'aide d'un microscope inversé en contraste de phase et à un grossissement x1000 (Leica DMI6000 B). Les colonies sont circulaires, lisses et rouges à des conditions optimales de 37-40°C, pH 5,8-8,0 et 20-25% NaCl (Fig. 7), les mêmes paramètres d'incubation qui ont été utilisés pour nos analyses (Stan-lotter *et al.*, 2002).

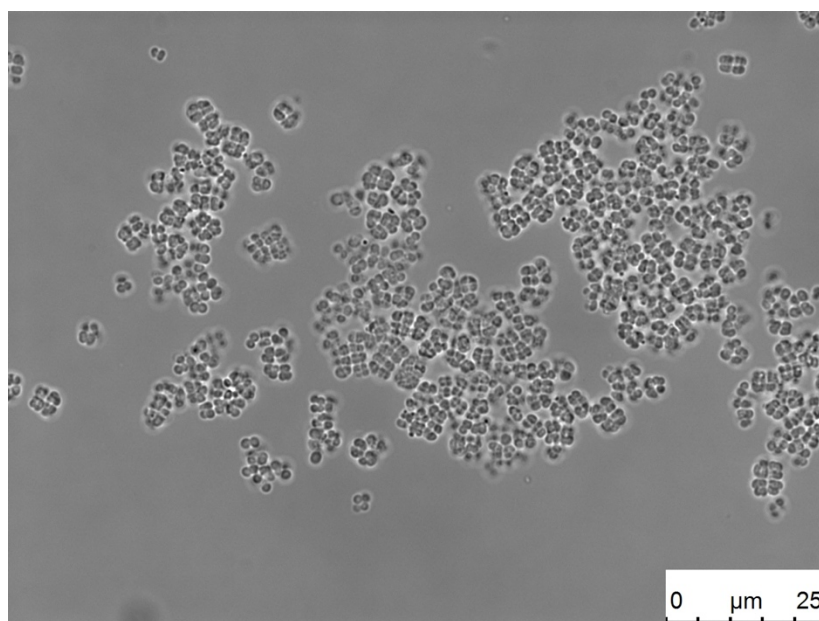


Figure 5 : *Halococcus dombrowskii* au microscope inversé en contraste de phase en grossissement x1000 (Leica DMI6000 B). Les cellules en coques et les agrégats de 4 cellules sont visibles.

Enfin, deux espèces ont été identifiées pour le genre *Halorubrum* : *Hrr. tibetense* et *Hrr. sodomense*. Le genre *Halorubrum* possède 37 espèces, il s'agit donc du genre le plus représenté au sein de la classe des *Halobacteria* (LPSN, mai 2018). Les organismes de ce genre sont généralement pléomorphes, aérobies, de couleur rouge-orange. Certaines espèces peuvent cependant être dépourvues de coloration (*Hrr. trapanicum*) (Rosenberg *et al.*, 2014). *Hrr. tibetense* a été découverte dans un lac alcalin au Tibet. Ses cellules sont en forme de bacilles de 0,5-1,0 x 1,5-2,5 µm de long. Les conditions optimales de croissance sont 18-20% de NaCl, 37-40°C et pH 9,0-9,5. Les colonies sont quant à elles rouges, circulaires, convexes et lisses (Fan *et al.*, 2004). Il s'agit donc du même phénotype de colonies que celui trouvé dans cet échantillon de sel (Fig. 7). L'autre espèce trouvée est *Hrr. sodomense* (anciennement *Halobacterium sodomense*) qui a été découverte dans la mer Morte. Ses cellules sont en forme de bacilles de 0,5 x 2,5-5,0 µm de long. Les cellules ont un optimum de croissance sur un milieu 10-15% de NaCl et à 40°C. Les colonies sont circulaires, lisses, convexes, de couleur rouge ou translucide (Oren, 1983).

Des bactéries ont aussi été isolées au départ du sel SeFA. Ces colonies ont mis moins d'une semaine pour croître sur milieux salins (MGM, CDM et DBCM2). Elles sont rouges (SeFA1M et SeFA8D) ou blanches (SeFA3C et SeFA12D). Le séquençage a permis d'identifier ces quatre colonies, elles se trouvent à la Table 30 (P.49).

Les deux colonies rouges ont donc été identifiées comme *Salinibacter ruber*. Le genre *Salinibacter* se trouve dans la famille des *Rhodothermaceae*, l'ordre des *Cytophagales*, la classe des *Cytophagia* et l'embranchement des *Bacteroidetes*. Ce genre comprend actuellement trois espèces qui sont toutes halophiles extrêmes, Gram-, aérobies hétérotrophes. On les retrouve dans les lacs salés et les marais salants. *S. ruber* est l'espèce type de ce genre. Les cellules sont en forme de bacilles de 0,4 x 2,0-6,0 µm et croissent entre 15 et 20% de NaCl, à pH 6,5-8,0 et de 37°C à 47°C. Elles sont rouges/orange grâce à des pigments caroténoïdes et les colonies sont circulaires, convexes, lisses et rouges sur milieux MGM (Antón *et al.*, 2002 ; Rosenberg *et al.*, 2014). Une photo sur boîte de *S. ruber* se trouve à la Fig. 6.

Les deux autres isolats ont été identifiés comme *Marinococcus halotolerans*. Le genre *Marinococcus* appartient à la famille des *Bacillaceae*, l'ordre des *Bacillales*, la classe des *Bacilli* (ou *Firmibacteria*) et à l'embranchement des *Firmicutes*. Ce genre contient actuellement cinq espèces qui sont halophiles, Gram+ et aérobies. L'espèce type est *M. halophilus* (Hao *et al.* 1984). *M. halotolerans* a été découverte dans un sol salin en Chine et est caractérisée par sa capacité de tolérer de fortes concentrations en NaCl (0-25%). Contrairement aux autres espèces de son genre, *M. halotolerans* ne possède pas de seuil minimal de salinité pour sa croissance. Ses cellules sont sphériques, possèdent un flagelle et font 1,0 à 1,2 µm de diamètre. Les colonies sont orange sur la plupart des milieux et à des conditions optimales de température et pH (28°C et pH 7,0-7,5) (Li *et al.*, 2005).

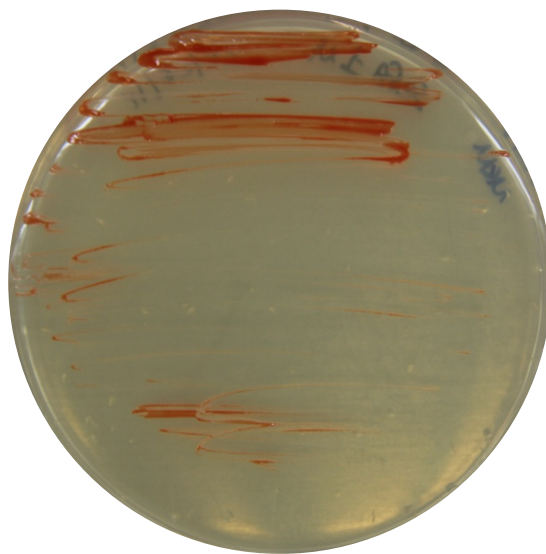


Figure 6 : Colonie bactérienne isolée à partir du sel SeFA : *Salinibacter ruber* M31 (SeFA1M).

Table 29 : Identification des colonies d'archées isolées à partir du Sel de Maras (Contrôle positif) et du Sel de la boucherie « Fumet des Ardennes » et avec les amorces 20F-1540R et Arch20F-1492R.

Source et isolat	% d'id.	Souche type la plus proche
Sel de Maras (contrôle positif)		
SeM1M	99	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102
SeM2C	99	<i>Haloarcula vallismortis</i> JCM 8877
SeM3C	99	<i>Haloarcula argentinensis</i> arg-1
SeM4C	99	<i>Haloarcula hispanica</i> Y-27
	99	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R
	99	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049
SeM5C	99	<i>Haloarcula argentinensis</i> arg-1
SeM6D	99	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102
SeM7D	99	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102
SeM8D	99	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102
SeM9D	99	<i>Halolamina salifodinae</i> WSY15-H1
SeM10D	99	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102
SeM11C	99	<i>Haloarcula argentinensis</i> arg-1
	99	<i>Haloarcula amylytica</i> JCM 13557
	99	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049
SeM12D	99	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102
Sel Boucherie « Fumet des Ardennes »		
SeFA2C	99	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049
SeFA4C	99	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049
SeFA5H	99	<i>Halococcus dombrowskii</i> JCM 12289
SeFA6D	99	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11
SeFA7D	99	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049
SeFA9D	99	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880
SeFA10D	98	<i>Halorubrum tibetense</i> JCM 11889
SeFA11D	99	<i>Haloarcula japonica</i> JCM7785
SeFA13D	99	<i>Haloarcula japonica</i> JCM7785
SeFA14D	97	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102

Table 30 : Identification des colonies de bactéries isolées depuis le sel de la boucherie « Fumet des Ardennes » et avec les amorces bactériennes 27F-1492R.

Source et isolat	% d'id.	Souche type la plus proche
Sel Boucherie « Fumet des Ardennes »		
SeFA1M	99	<i>Salinibacter ruber</i> M31
SeFA3C	99	<i>Marinococcus halotolerans</i> KCTC 19045
SeFA8D	100	<i>Salinibacter ruber</i> M31
SeFA12D	100	<i>Marinococcus halotolerans</i> KCTC 19045

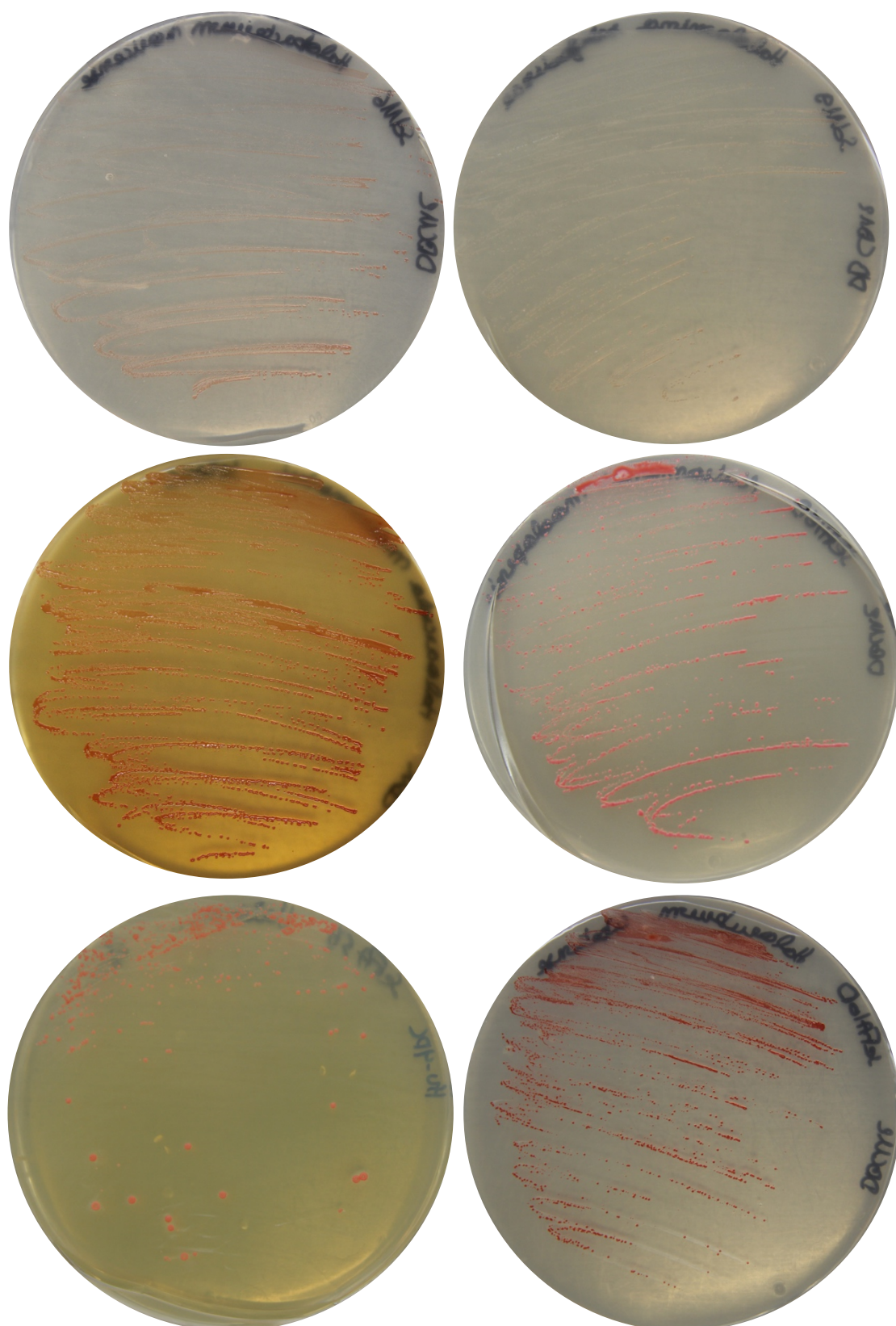


Figure 7 : Colonies d'archées isolées à partir des deux sels SeM et SeFA. Dans l'ordre (de gauche à droite et de haut en bas) : *Halobacterium noricense* JCM15102 (SeM6D), *Halolamina salifodinae* WSY15-H1 (SeM9D), *Haloarcula marismortui* ATCC43049 (SeFA4C), *Natromonas moolapensis* 8.8.11 (SeFA6D), *Halococcus dombrowskii* JCM12289 (SeFA5H) et *Halorubrum tibetense* JCM11889 (SeFA10D).

4.1.2 Culture sur milieux spécifiques pour les matrices alimentaires

Dix matrices alimentaires ont été analysées, cinq charcuteries et cinq fromages. Au total, ce sont 133 colonies isolées à partir des différentes matrices (Annexe 2 : Colonies isolées). Ces colonies ont poussé principalement sur les milieux les moins concentrés en sel comme Hv-YPC et CDM, certaines se sont cependant développées sur les milieux plus salins comme MGM et DBCM2. En général, la croissance microbienne observée sur chacun des milieux, et pour chaque aliment, était de plus en plus élevée au fur et à mesure que l'on se rapprochait de la surface de l'aliment. De plus, la croissance sur les milieux les plus salins semble augmenter au plus on se rapproche de la surface de l'aliment. Par exemple, pour le fromage de Herve doux, une croissance microbienne a été observée sur 8/24 boîtes pour le centre du fromage. Parmi ces huit boîtes, six contenaient le milieu Hv-YPC et deux le milieu CDM, les milieux les moins concentrés en sels (18%). Au contraire, pour ce même fromage, 17/24 boîtes de la surface du fromage ont montré une croissance microbienne. Des microorganismes se sont développés sur toutes les boîtes contenant les milieux Hv-YPC et CDM, mais aussi sur trois boîtes du milieu MGM et sur deux boîtes du milieu DBCM2. Une amplification PCR a été effectuée sur ces 133 colonies à l'aide des deux paires d'amorces pour archées. À la suite de la visualisation sur gel d'électrophorèse (Annexe 1 : Gels d'électrophorèse), seulement 32 colonies ont été sélectionnées. Il s'agit des produits PCR qui ont montré (pour au moins une paire d'amorces) : soit une bande correspondant à l'amplicon recherché (lot 1), soit plusieurs bandes dont une correspondant à l'amplicon recherché (lot 2), ou alors plusieurs bandes dont une avec un amplicon légèrement trop grand (lot 3). Ces différentes colonies sont reprises à la Table 31. Elles ont été isolées à partir de deux échantillons de charcuterie et les cinq échantillons de fromage (les matrices SF, JFA et JI ne sont donc plus représentées). Les 101 autres colonies n'ont montré aucune bande sur les PCR avec les deux paires d'amorces spécifiques aux archées, elles ont donc été mises de côté.

Table 31 : Résultats des PCR avec les amorces pour archées (20F-1540R et 20F-1492R).

Lot 1) Bande pour l'amplicon recherché	SFAS8M, JBIP1D, FBAS3D, FCP4C et FMP4M
Lot 2) Plusieurs bandes dont une correspondant à l'amplicon recherché	JBIS1D, JBIP2C, FHS2C, FHS9H, FBAS4H, FHC2C, FHP2C, FHP5H, FCC5M, FCC6M, FCC7D, FCS2C, FCS4D, FCP1H, FCP3C, FCP5M, FCP6D, FMS1H, FMS3C, FMS5C et FSS6C
Lot 3) Plusieurs bandes dont une avec un amplicon légèrement trop grand	SFAS1H, SFAS2H, SFAS3C, SFAS5D, SFAS7M et FCS3M

Les cinq isolats du lot 1 ainsi qu'un isolat pour chacun des lots 2 et 3 ont été envoyés au séquençage (FHS9H et SFAS2H). Le kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) a été utilisé pour les isolats des lots 2 et 3 afin de prélever la bande correspondant à l'amplicon recherché ou légèrement trop grand. Les échantillons du lot 1 ont subi une purification

classique du produit PCR avec le kit GenElute PCR Clean-Up Kit. À la suite du séquençage, aucune des sept colonies n'a pu être identifiée. Une PCR avec les amorces bactériennes 27F-1492R a donc été effectuée et elle a montré que l'ensemble de ces 32 colonies appartient au domaine des bactéries (Annexe 1 : Gels d'électrophorèse). Aucune archée n'a donc été trouvée au sein des matrices alimentaires. Parmi ces 32 colonies, sept proviennent des charcuteries et 25 des fromages. Les colonies identifiées se trouvent à la Table 32 (P.55) et sont décrites ci-dessous.

Le genre *Chromohalobacter* est le genre qui a été le plus identifié au sein des matrices alimentaires. Ce genre appartient à la famille des *Halomonadaceae*, à l'ordre des *Oceanospirillales*, à la classe des *Gammaproteobacteria* et à l'embranchement des *Proteobacteria*. Il contient pour le moment huit espèces et l'espèce type est *Chromohalobacter marismortui* (Ventosa *et al.*, 1989). Ses organismes sont caractérisés par des cellules Gram-, chémo-organotrophes, aérobies, en forme de bacilles incurvés qui sont seuls, associés en paires ou chaînes et qui ne produisent pas de spores. Ils sont halophiles modérés mais peuvent croître jusqu'à des concentrations de 30% de NaCl (Arahal *et al.*, 2001). Ils ont été isolés de la mer Morte, de marais salants ou de sols salins (Ventosa, 2005). Dans les échantillons analysés, deux espèces ont été retrouvées. Une dans les matrices saucisson sec « Fumet des Ardennes » (SFA) et le jambon « Boucherie Istace » (JBI) : *C. canadensis*, et une dans le fromage de Chimay (FC) : *C. beijerinckii*.

Chromohalobacter canadensis a été découverte au Canada et est caractérisée par des cellules en coques incurvés de 0,6-1,2 x 2,0-3,8 µm. Les colonies sont blanches et les conditions optimales de croissance sont 8% NaCl, 30°C et pH 5,0-9,0 (Sánchez-porro *et al.*, 2007 ; Ventosa, 2005 ; Arahal *et al.*, 2001). Au départ de nos échantillons, les colonies montrent le même phénotype que celui décrit : elles sont blanches et lisses. Elles sont cependant plus petites (<1 mm de diamètre) que celles décrites en conditions optimales. Il n'y a aucune différence visible entre les colonies, entre les milieux et/ou les deux matrices.

Chromohalobacter beijerinckii a été trouvée lors d'études sur la flore existante dans des haricots salés. Les cellules sont en forme de bacilles seuls et mesurent 0,4-0,6 x 1,8-2,5 µm. Aucune croissance n'est observée sur des milieux ne contenant pas de NaCl mais dans des conditions optimales (10% NaCl, 30°C et pH 7,5), les colonies sont jaunes, circulaires et font 3 mm de diamètre (Peçonek *et al.*, 2006). Les colonies isolées montrent un phénotype identique à celui décrit. Il n'y a pas non plus de différences visibles entre les colonies provenant de différents milieux, de différentes matrices ou de différentes parties de la matrice.

Le genre *Cobetia* appartient à la même famille que le genre *Chromohalobacter*. Il a été retrouvé une fois à la surface de SFA et une fois au centre de FC. Le genre *Cobetia* est caractérisé par des organismes Gram-, aérobies et modérément halophiles bien que beaucoup de souches puissent croître sans NaCl dans le milieu. *C. crustatorum* a notamment été isolée à partir de Jeotgal, une préparation coréenne à base de crustacés fermentés, tout comme certaines

archées halophiles (Kim *et al.*, 2010). Les cellules sont motiles ou non. Si elles le sont, elles possèdent alors un ou plusieurs flagelles (Arahal *et al.*, 2002 ; Romanenko *et al.*, 2013). *C. marina*, l'espèce retrouvée dans nos matrices, ne possède pas de flagelle et peut croître entre 0-20% NaCl et entre 4-42°C. Elle a été découverte dans de l'eau de mer (Romanenko *et al.*, 2013). Pour nos échantillons, les colonies de *C. marina* isolées ont eu une très faible croissance seulement sur le milieu CDM (18% NaCl), les colonies sont brunes et font moins de 1 mm de diamètre.

Le genre *Halomonas*, qui appartient aussi à la famille des *Halomonadaceae*, a été isolé sept fois sur différentes matrices alimentaires : JBI, FH et FM. Trois espèces ont été trouvées : *H. variabilis*, *H. alkaliphila* et *H. s. cupida*. Le genre *Halomonas* contient près de 100 espèces qui sont Gram-, aérobies pour la plupart, chémo-organotrophes et halotolérantes (capables de croître entre 0,1 et 32,5% NaCl). Elles ont été isolées d'environnements salins comme les lacs salins, les estuaires et les océans (Vreeland, 2005).

Halomonas variabilis a été identifiée une fois dans l'échantillon JBI. Cette espèce est caractérisée par des cellules en forme de bacilles incurvés et motiles grâce à un flagelle. Les cellules ont un diamètre variant avec la concentration en sels du milieu, d'où le nom de l'espèce. Les cellules peuvent pousser dans des conditions de 5-30% NaCl, pH 6,5-8,4 et 15-37°C. Les colonies sont circulaires, lisses et brunes dans des conditions optimales (Vreeland, 2005).

Halomonas alkaliphila a été isolée plusieurs fois au départ de deux matrices (FH et FM) et sur deux milieux (CDM et Hv-YPC). Elle a été retrouvée trois fois à la surface et une fois au centre. Cette espèce possède des cellules en forme de bacilles de 0,6-0,7 x 2,3-2,6 µm et a un optimum de croissance à 10% NaCl, pH 9,0 et 37°C. La croissance peut avoir lieu en absence de NaCl. Elle a été découverte en Italie dans un marais salant (Romano *et al.*, 2006). Enfin, *Halomonas cupida* a été retrouvée à deux reprises au centre du fromage FM et sur milieu CDM. Les cellules sont en forme de bacilles blancs qui poussent entre 0-15% NaCl, pH 5,0-10,0 et température de 15-37°C (Antonio *et al.*, 2002). Les colonies isolées sont blanches et mesurent moins de 1 mm de diamètre.

Le genre *Marinococcus* a déjà été trouvé dans le sel de salage SeFA. L'espèce *M. halotolerans* a été isolée une fois à partir de la surface de la matrice SFA, le saucisson salé avec le sel SeFA. Elle a été retrouvée sur le milieu MGM et elle forme des colonies de couleur saumon et au diamètre inférieur à 1 mm.

Le genre *Thalassobacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*, à l'ordre des *Bacillales*, à la classe des *Bacilli* (ou *Firmibacteria*) et à l'embranchement des *Firmicutes*. L'espèce *Thalassobacillus devorans* a été isolée à partir de la surface du fromage de brebis (FBA). Le genre *Thalassobacillus* est caractérisé par des cellules Gram+, aérobies et halophiles modérées. Ce genre comprend actuellement quatre espèces et *T. devorans* est l'espèce type,

elle a été isolée à partir d'échantillons hyper salins enrichis en phénol en Espagne. Les cellules sont en forme de bacilles de 1,0-1,2 x 2,0-4,0 µm, elles possèdent un flagelle et peuvent croître de 0,5 à 20% NaCl, 15-45°C et pH 6,0-10,0 (optimum à 10%, 37°C et 7,0 respectivement) (García *et al.*, 2005). Sur milieu DBCM2, les colonies isolées à partir de l'échantillon FBA ont un diamètre très inférieur à 1 mm et sont blanches.

Le genre *Brevibacterium* appartient à la famille des *Brevibacteriaceae*, à l'ordre des *Micrococcales*, à la classe des *Actinobacteria* et à l'embranchement des *Actinobacteria*. Ce genre a aussi été retrouvé sur le fromage FBA. Il est caractérisé par des cellules Gram+, aérobies, halotolérantes et en forme de coques de 0,6-1,0 µm de diamètre (Trujillo *et al.*, 2015). L'identification n'a pas permis de différencier deux espèces : *B. sediminis* et *B. iodinum*. Ces espèces ont respectivement des conditions de croissance de 0-20% NaCl, 8-37°C, pH 5,0-11,0 et 0-18% NaCl, 4-37°C, pH 5,0-11,0 (Chen *et al.*, 2016). Sur milieu Hv-YPC, les colonies paraissent jaunes et font moins de 1 mm de diamètre.

Le genre *Salinivibrio* appartient à la famille des *Vibrionaceae*, à l'ordre des *Vibrionales*, à la classe des *Gammaproteobacteria* et à l'embranchement des *Proteobacteria*. Ce genre contient quatre espèces qui se retrouvent dans les viandes salées et les saumures par exemple. Les organismes de ce genre sont Gram-, anaérobies facultatives et halophiles modérées (Mellado *et al.*, 1996). L'espèce *S. costicola* identifiée a été isolée à partir de la périphérie du fromage de Herve (FH). Cette espèce contient trois sous-espèces, la sous-espèce trouvée est *S. costicola* subsp. *costicola*. Cette sous-espèce possède des cellules en bacilles incurvés de 0,5 x 1,5-3,2 µm qui croissent de 0,5-20% NaCl, 10-45°C et pH 5,0-10,0 (optimum à 10%, 35°C et pH 7,5). Aucune croissance n'est observée en absence de NaCl (Huang *et al.*, 2000). Pour cette espèce, une nette différence de croissance est visible entre le milieu Hv-YPC et CDM. En effet, les colonies isolées sur milieu Hv-YPC sont beaucoup plus nombreuses et plus larges que celles sur milieu CDM après une semaine d'incubation.

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococcaceae*, à l'ordre des *Bacillales*, à la classe des *Bacilli* (ou *Firmibacteria*) et à l'embranchement des *Firmicutes*. Ce genre contient actuellement près de 50 espèces qui sont en forme de coques, Gram+, anaérobies facultatives et chemo-organotrophes (Schleifer *et al.*, 2009). L'espèce *S. cohnii* a été retrouvée sur la périphérie du fromage morbier (FM). *S. cohnii* est un staphylocoque à coagulase négative. Elle possède des cellules en coques de 1,2 µm de diamètre qui apparaissent seules ou en paires, et qui ne forment pas de spores. Elle croît préférentiellement sur milieu avec 10% NaCl et entre 15 et 45°C (Schleifer *et al.*, 1975). On la retrouve sur la peau et dans les muqueuses humaines et elle est pathogène opportuniste (Hu *et al.*, 2014). Sur milieu MGM, les colonies sont blanches et font moins de 1 mm de diamètre.

Table 32 : Identification des bactéries isolées à partir des échantillons alimentaires grâce aux amorces bactériennes 27F-1492R.

Source et isolat	% d'id.	Souche type la plus proche
Saucisson sec Boucherie « Fumet des Ardennes »		
SFAS1H	99	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984
SFAS2H	99	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984
SFAS3C	99	<i>Cobetia marina</i> NBRC 102605
SFAS5D	99	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984
SFAS7M	98	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984
SFAS8M	98	<i>Marinococcus halotolerans</i> KCTC 19045
Jambon Cœur d'Ardenne Boucherie « Istace »		
JBIS1D	99	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984
JBIP1D	99	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984
JBIP2C	99	<i>Halomonas variabilis</i> NBRC 102410
Fromage « Céillet de Bouillon » Bergerie d'Acremont		
FBAS3D	99	<i>Thalassobacillus devorans</i> G-19.1
FBAS4H	99	<i>Brevibacterium sediminis</i> CGMCC 1.15472
	99	<i>Brevibacterium iodinum</i> DSM 20626
Fromage de Herve doux « Fromagerie du Vieux Moulin »		
FHS2C	100	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG
FHS9H	100	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG
FHP2C	99	<i>Salinivibrio costicola</i> ATCC 33508
FHP5H	99	<i>Salinivibrio costicola</i> ATCC 33508
FHC2C	99	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG
Fromage de Chimay « Abbaye de Scourmont »		
FCS2C	99	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCS3M	99	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCS4D	99	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCP1H	98	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCP3C	99	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCP4C	99	<i>Cobetia marina</i> NBRC 102605
FCP5M	98	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCP6D	99	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCC5C	99	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCC6M	98	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
FCC7D	99	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> NBRC 103041
Fromage Morbier		
FMS1H	99	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG
FMS3C	99	<i>Halomonas cupida</i> NBRC 102219
FMS5C	99	<i>Halomonas cupida</i> NBRC 102219
FMP4M	100	<i>Staphylococcus cohnii</i> GH 137
Fromage Sarté		
FSS6C	99	<i>Garicola koreensis</i> SJ5-4

Finalement, le genre *Garicola* appartient à la famille des *Micrococcaceae*, à l'ordre des *Micrococcales*, à la classe des *Actinobacteria* et à l'embranchement des *Actinobacteria*. *Garicola koreensis* est la seule bactérie isolée et identifiée à partir du fromage Sarté (FS), c'est aussi la seule espèce du genre *Garicola*. Le genre *Garicola* est caractérisé par des cellules Gram+, aérobies, mésophiles, chemo-organotrophes et halophiles modérées. *G. koreensis* possède des cellules en coques ou en courts bacilles. Elle est aérobie stricte et croît entre 15-40°C, pH 6,0-9,5 et 1-17% NaCl (optimum : 30°C, pH 6,5-7,0 et 6% NaCl). Elle a été découverte dans du Seau-jeot, un produit fermenté coréen à base de crevettes (Lo *et al.*, 2015). Sur l'échantillon FS, l'espèce *G. koreensis* a été isolée sur le milieu CDM et les colonies ont très faiblement poussé.

4.1.3 Microbiologie alimentaire

En parallèle de la microbiologie sur milieux spécifiques, la flore microbienne (bactéries, levures et moisissures) a aussi été évaluée pour huit échantillons alimentaires.

Pour les charcuteries (Fig. 8), les résultats sont différents entre le saucisson et les jambons et semblables entre les deux jambons. La flore mésophile aérobie totale (FMAT) atteint 6 log CFU/g (Colony Forming Unit) pour les trois échantillons. En revanche, pour les bactéries lactiques mésophiles, 6 log CFU/g ont été comptés dans le saucisson alors qu'il n'y a que 4 log CFU/g dans les jambons. Pour les levures et les moisissures, il y a autour de 4,5 log CFU/g dans le saucisson et à peu près 2,8 log CFU/g pour les jambons. Aucun *E.coli*, ni staphylocoque à coagulase+ n'a été dénombré dans les charcuteries.

Pour les fromages (Fig. 9), les résultats sont tous différents d'un fromage à l'autre. La FMAT de chaque fromage est supérieure à 5 log CFU/g avec un maximum de 8,1 log CFU/g pour le fromage FC. Les bactéries lactiques mésophiles sont dénombrées à 6,7 log CFU/g pour les fromages FH, FC et FM et à 5,4 log CFU/g pour les 2 autres. Les levures montrent aussi une grande variabilité de charge dans les fromages. Ainsi, les charges vont de 3,2 à 5,1 log CFU/g pour les fromages FS et FM respectivement. Les moisissures ont une charge allant de 0,3 log CFU/g pour le fromage FC à 4,6 log CFU/g pour le fromage FM. Enfin, des *E. coli* et des staphylocoques à coagulase+ ont été trouvés seulement sur les fromages FH et FM.

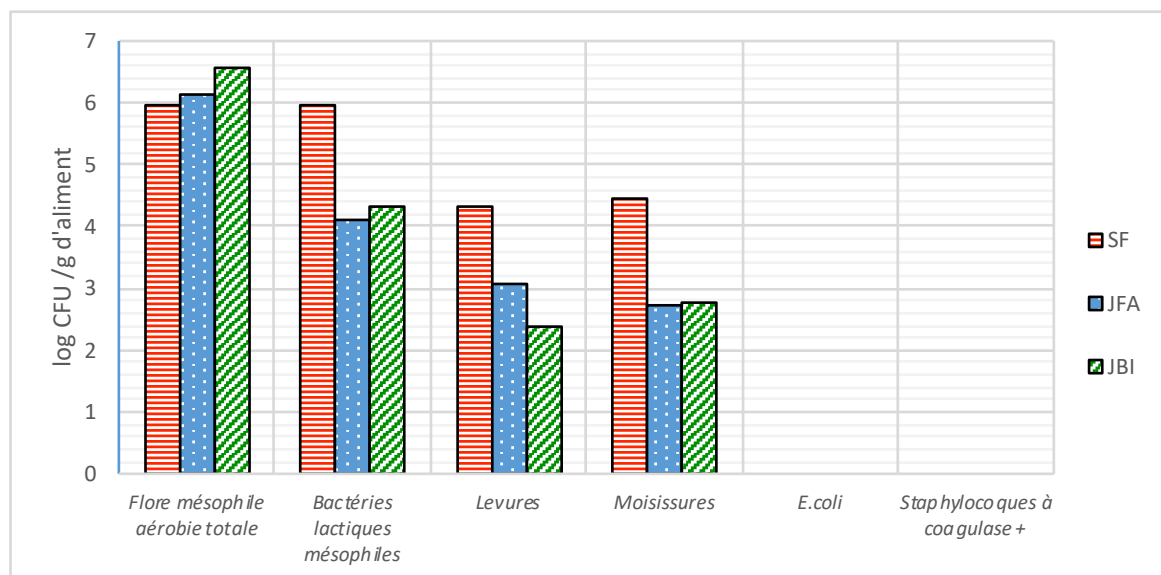


Figure 8 : Nombre de log CFU/g d'aliment pour trois échantillons de charcuteries (SF, JFA et JBI).

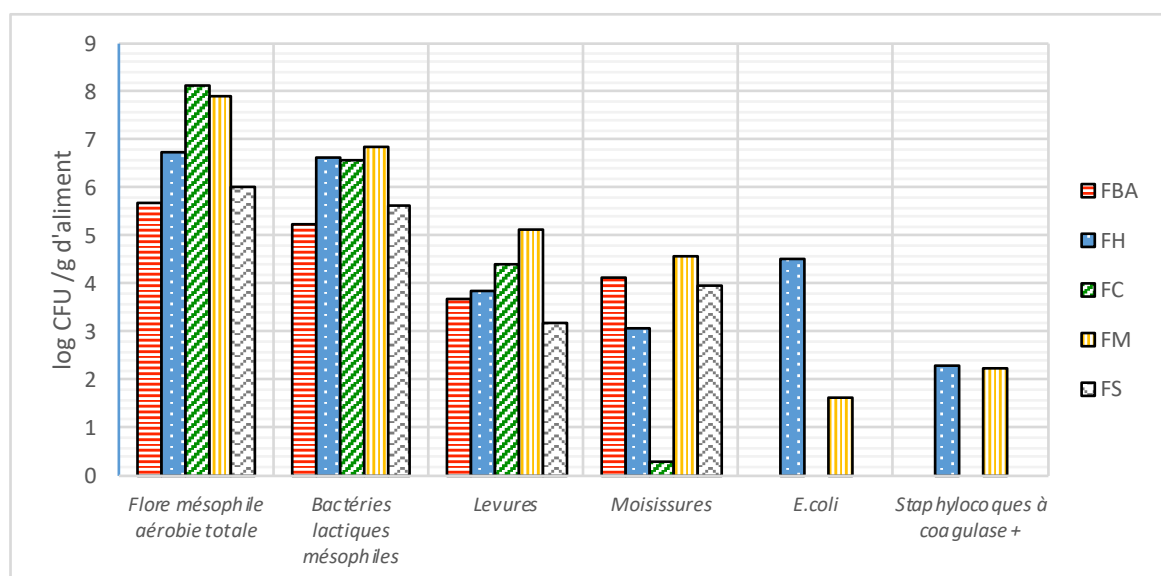


Figure 9 : Nombre de log CFU/g d'aliment pour les cinq échantillons de fromages (FBA, FH, FC, FM, FS).

4.2 Microbiologie culture-indépendante

Le deuxième objectif de ce mémoire a été d'estimer la diversité en archées de manière culture-indépendante par une approche métagénomique. Pour cela, des extractions d'ADN ont été effectuées sur les échantillons alimentaires à l'aide de deux kits d'extraction. Des extractions d'ADN ont aussi été menées sur les sels de salage avec un protocole interne.

Les extractions d'ADN ont été faites en suivant strictement le protocole du fournisseur (pour les kits) ou le protocole interne (pour les sels). La quantité et la pureté des extractions a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre 1000 NanoDrop® (Thermo Scientific). Les résultats se trouvent à la Table 33. En mesurant l'absorbance d'une solution d'acide nucléiques à 260 nm, on obtient la concentration en ADN de l'échantillon. Pour le premier kit, DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, la concentration attendue en ADN est <200 ng/µl, celle attendue pour le deuxième kit, Nucleospin® Food, se situe entre 1 et 100 ng/µl. La pureté de l'échantillon d'ADN est définie par le ratio A260/280 qui vaut 1,8 pour de l'ADN pur. Un ratio fort éloigné de cette valeur indique une contamination au phénol, à la guanidine ou tout autre réactif utilisé lors du protocole d'extraction qui absorbe proche de 280 nm. Une faible concentration en ADN (<10 ng/µl) peut aussi perturber l'exactitude de ce ratio (Thermo Scientific : NanoDrop® 1000 Spectrophotometer - V3.8 User's Manual).

Table 33 : Résultats du spectrophotomètre 1000 NanoDrop® (Thermo Scientific) pour les extractions d'ADN sur les 10 matrices alimentaires avec les 2 kits (1 : DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, 2 : Nucleospin® Food) et pour les 3 sels.

Échantillon	Quantité d'ADN (ng/µl)	Pureté (A260/280)	Échantillon	Quantité d'ADN (ng/µl)	Pureté (A260/280)
DNeasy® PowerFood® Microbial Kit			Nucleospin® Food		
SF1	5,6	2,47	SF2	106,7	1,95
SFA1	5,5	2,48	SFA2	81,9	1,92
JFA1	7,8	1,80	JFA2	102,9	2,15
JB11	12,1	3,41	JB12	198,9	2,16
J11	5,2	8,56	J12	114,1	1,85
FBA1	6	9,91	FBA2	5,7	1,94
FH1	49,4	1,90	FH2	28,3	1,87
FC1	94,3	1,96	FC2	27,6	1,82
FM1	24,3	2,20	FM2	17,6	1,72
FS1	6,8	2,76	FS2	11,6	1,77
Protocol interne pour sels					
SeM	2,8	0,81			
SeFA	97,1	1,50			
SeBI	13,3	0,99			
SeBA	95,1	1,54			

Ainsi, le succès des extractions est fort variable. Les extractions du premier kit ont un rendement relativement bas sauf pour FH et FC, et elles ont un ratio A260/280 généralement trop élevé, indiquant une forte contamination de l'échantillon en réactifs utilisés lors de l'extraction. Ces contaminations peuvent avoir un impact sur les manipulations postérieures comme la PCR. Les rendements étant très faibles, il se peut que les ratios en soient perturbés. Pour le deuxième kit, le rendement en ADN est nettement meilleur notamment pour les charcuteries mais reste plus faible pour les fromages. Les ratios A260/280 sont cependant tous autour de 1,8, indiquant une pureté correcte des échantillons et très peu de contaminations par les réactifs utilisés lors de l'extraction. Les extractions d'ADN à partir des sels ont parfaitement fonctionné pour les sels SeFA et SeBA mais les rendements et les ratios pour les deux autres sels sont très bas. SeM possède une quantité d'ADN proche de la limite de détection du spectrophotomètre (2 ng/µl).

Une PCR a ensuite été réalisée sur ces extractions avec les amorces pour archées 340F-1000R. Les gels se trouvent en Annexe 1 : Gels d'électrophorèse. Aucune amplification n'a été observée pour l'amplicon choisi. Seul le sel SeFA qui avait eu de bons résultats par la méthode culture-dépendante a montré une amplification. Aucune amplification n'est observée pour le sel de contrôle SeM qui a pourtant montré des résultats positifs quant à la présence d'archées par la méthode culture-dépendante. Ceci indique que l'extraction n'a pas fonctionné, comme expliqué ci-dessus, le rendement et la pureté sont très faibles. Des PCR ont aussi été réalisées avec les amorces Arch20F-1492R et 20F-1540R mais aucun amplicon de la taille recherchée n'a été amplifié, sauf, encore, pour l'échantillon SeFA. Ces PCR sont aussi disponibles en Annexe 1 : Gels d'électrophorèse. Comme aucun ADN archéen n'a été amplifié au sein des matrices alimentaires, les échantillons n'ont pas été envoyés pour la métagénomique.

5 Discussion

Lors de ce mémoire, deux approches ont été utilisées pour évaluer la diversité en archées sur les matrices alimentaires. La première, l'approche culture-dépendante, a permis d'isoler et d'identifier 22 colonies d'archées halophiles au départ de sels alimentaires. Aucune n'a en revanche été trouvée parmi les 133 colonies isolées des différentes matrices alimentaires. Néanmoins, 32 isolats bactériens ont été identifiés, montrant une très grande diversité de genres halophiles ou halotolérants. Dans un sel de salage, deux bactéries ont été identifiées. Une d'entre elles a notamment été retrouvée au sein de la matrice alimentaire salée avec ce gros sel de salage. Finalement, la deuxième approche culture-indépendante, n'a pas permis de mettre en avant de l'ADN d'archées au sein des matrices alimentaires.

Dans cette discussion, les différents éléments pouvant expliquer les résultats obtenus sont divisés en trois points : le choix des matrices alimentaires, le choix des conditions de culture et le choix du protocole de la méthode culture-indépendante.

5.1 Le choix des matrices alimentaires

Le point commun entre le peu d'études qui évalue la flore archéenne des matrices alimentaires est qu'elles se basent toutes sur des produits extrêmement salés. En effet, les archées halophiles se retrouvent en grande quantité dans les sels alimentaires. Dans notre étude, toutes les matrices ont subi une étape de salage. Nous allons donc discuter le fait qu'aucune archée n'a cependant été trouvée.

Le type de sel

Une grande variété de charge en archées d'un sel à l'autre a été constatée dans le mémoire de Jeanne Fourmentin en 2013. Lors de cette étude, aucune archée n'a été mise en évidence dans des sels raffinés ou fumés, alors que de nombreux genres ont été identifiés dans les gros sels. Sur base de ce constat, lors de l'achat des produits, le type de sel utilisé était demandé aux bouchers et aux fromagers. Tous les sels de salage n'ont pas pu être récoltés, et donc leur charge microbienne analysée.

Pour beaucoup de matrices, un gros sel est utilisé lors de l'étape de salage. Pour les fromages FBA et FC, l'origine du sel est inconnue. Enfin, pour le jambon JBI, il s'agit d'un sel raffiné qui contient des nitrites.

Parmi les trois sels de salage récoltés, un seul a montré une grande diversité archéenne sur milieux spécifiques, le sel SeFA qui est un gros sel. Les genres isolés ont tous été découverts dans des environnements hyper salins, leur présence au sein de ce gros sel n'est donc pas surprenante. Par contre, l'identification d'espèces comme *Halococcus dombrowskii* et *Natromonas moolapensis* qui ont été isolées, respectivement, de roches de sel ou de bassins de cristallisation, semble indiquer qu'il s'agirait probablement d'un mélange de gros sels de différentes origines. Deux espèces bactériennes ont aussi été isolées au départ de ce sel : les espèces *Marinococcus halotolerans* et *Salinibacter ruber*. Il existe très peu de bactéries capables de croître à des concentrations en sel proche de la saturation. Les haloarchées sont, dans ces milieux, les organismes prédominants (Oren, 1994). *S. ruber* est un exemple rare de bactérie halophile extrême qui rentre en compétition avec les archées dans ces milieux (Antón *et al.*, 2002). La halotérance de *M. halotolerans* peut quant à elle expliquer sa présence au sein du sel (Li *et al.*, 2005).

Pour les deux autres sels, aucune croissance microbienne n'a été détectée. Le sel SeBI est raffiné et contient des nitrites. Les nitrites sont souvent utilisés comme additifs dans la préparation de produits fermentés (Paik *et al.*, 2014). Une fois réduits en monoxyde d'azote (NO), ils joueraient un rôle antibactérien en bloquant les groupes sulfhydriles nécessaires au fonctionnement des enzymes et de la chaîne de transport d'électrons (Tompkin *et al.*, 1978). Une fois ingérés, ils sont cependant sources de nitrosamines probablement cancérigènes (Lundberg *et al.*, 2004). De ce fait, l'origine du sel n'est pas toujours prouvée et/ou divulguée, le choix de certaines matrices pour leur salage au gros sel s'est donc souvent fait en se basant seulement sur l'honnêteté de l'artisan. Tout porte à croire que le sel SeBA est aussi un sel raffiné du fait des nombreuses ressemblances physiques avec le sel SeBI. Ces sels sont tous les deux blancs à cause des traitements chimiques et physiques lors du raffinement. Les sels raffinés (aussi appelés sels de table) subissent en effet une étape de recristallisation en bassin qui permet d'éliminer les impuretés et créer ainsi des cristaux blancs de NaCl quasi purs (Soylak *et al.*, 2008). Cette étape pourrait détruire les inclusions liquides dans laquelle les archées survivent (Schubert *et al.*, 2010). Les résultats de Jeanne Fourmentin combinés aux résultats obtenus dans cette étude semblent indiquer une inhibition de la croissance des archées dans les sels raffinés. La perte de l'habitat et des nutriments qui vont avec, parfois combinée à l'ajout de nitrites pourrait compromettre grandement leur survie au sein de ces sels raffinés. Néanmoins, l'impact des nitrites sur les archées n'est toujours pas prouvé à l'heure actuelle.

Le transfert de flore du sel vers l'aliment

Le type de sel utilisé pour le salage est d'une importance capitale si l'hypothèse que les archées ne soient apportées que par celui-ci au sein de la matrice est vraie. En effet, s'il y a

effectivement un transfert de flore entre le sel et la matrice, la présence d'archées dans le sel augmenterait considérablement la probabilité d'en retrouver dans le produit fini.

Cette hypothèse ne peut être confirmée étant donné qu'aucune archée n'a été isolée sur les matrices salées avec des gros sels, notamment les salaisons salées avec le sel SeFA dans lequel de nombreux genres d'archées avaient été identifiés. Sans surprise, les matrices salées avec les sels raffinés n'ont pas non plus montré de croissance d'archées.

En revanche, un transfert de flore semble bel et bien avoir lieu entre le sel et la matrice alimentaire. En effet, la bactérie *Marinococcus halotolerans* a été isolée au départ du sel SeFA et a été retrouvée à la surface de la salaison SFA, salée avec ce sel. Cette bactérie a été découverte dans des sols salins, il est donc très peu probable qu'elle se retrouve naturellement au sein de la viande ou de la peau du saucisson (Li *et al.*, 2005). De plus, une approche métagénomique a récemment détecté la présence de *Halobacterium* et de *Haloquadratum* à la surface d'un fromage mexicain salé au gros sel marin (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016). Comme ces genres sont présents en grande quantité dans les gros sels, il est fort probable qu'ils proviennent du sel de salage. Aussi, l'ensemble des bactéries identifiées dans les matrices alimentaires ont été découvertes principalement dans les endroits salins et sont halophiles ou halotolérantes. Ces bactéries pourraient donc provenir du sel de salage. Néanmoins, pour les sels SeBI et SeBA, aucune colonie n'a été isolée sur milieu solide, alors que plusieurs genres halophiles ont été trouvés dans les matrices salées avec ces sels. Ces bactéries ne proviendraient donc pas des sels. Une récente étude a cependant montré qu'une flore bactérienne existait bel et bien au sein d'un sel de table de Camargue, malgré le procédé de raffinage. 17 espèces de bactéries halophiles et halotolérantes dont *Thalassobacillus devorans* ont ainsi été identifiées (Diop *et al.*, 2016). Cette bactérie a notamment été retrouvée à la surface du fromage « Œillet du Château ». Elle proviendrait donc du sel SeBA, même si elle n'y en a pas été isolée.

Qu'en est-il dès lors des autres espèces trouvées ? Comment expliquer le fait que presque aucune n'ait été isolée des sels ? Tout d'abord, l'hypothèse de contamination des salaisons en laboratoire doit être rejetée étant donné que les manipulations ont été faites de manière stérile. Ensuite, il faut noter que seulement quelques sels de salage ont été récoltés. L'analyse de plusieurs sels aurait sans doute permis de faire plus de liens entre la flore du sel et de la matrice. De plus, toutes les bactéries identifiées ne proviennent pas forcément du sel. La bactérie halotolérante *Staphylococcus cohnii*, retrouvée sur le Morbier, pourrait provenir de la manipulation manuelle du fromage et du sel, étant donné qu'elle se retrouve naturellement dans les muqueuses humaines (Hu *et al.*, 2014). Elle pourrait aussi venir du lait via les muqueuses de la vache (Quijada *et al.*, 2017). Le genre *Brevibacterium*, retrouvé sur le fromage « Œillet du Château », est quant à lui largement utilisé en fromagerie comme ferment d'affinage. En dégradant les lipides et les protéines en surface du fromage, il crée

des arômes et une couleur rouge-orange (Pham *et al.*, 2017). Le genre *Halomonas* proviendrait du lait ou de l'environnement (Bokulich *et al.*, 2013). En effet, le salage n'est qu'une étape d'un long processus de fabrication. Les bactéries peuvent donc être apportées lors d'autres manipulations comme le lavage ou l'entreposage. C'est ce qu'on appelle communément le transfert de la microflore naturelle ou « House microflora » (Quijada *et al.*, 2017). Enfin, dans des conditions de dessiccation ou d'augmentation de salinité, certaines bactéries adoptent des stratégies de survie comme la formation de spores ou l'organisation de biofilms résistants. Une fois les conditions revenues à la normale, celles-ci peuvent de nouveau poursuivre leur croissance (McGenity *et al.*, 2000 ; Grant, 2004 ; Zaikova *et al.*, 2018). Celles-ci, une fois sur les matrices alimentaires peuvent donc de nouveau croître dans des conditions beaucoup moins saturées. L'espèce *Thalassobacillus devorans*, isolée à partir du fromage FBA produit en effet des spores. Ainsi, même si les archées restent les organismes dominants dans les gros sels, leur capacité de survie une fois sur les matrices alimentaires est moindre que celle des bactéries qui possèdent généralement des croissances plus rapides et à des concentrations en sels plus faibles (McGenity *et al.*, 2000). En plus, les archées ne sporulent pas (Reece *et al.*, 2012). Tout ceci pourrait expliquer le fait qu'aucune archée n'ait été retrouvée au sein des différentes matrices.

Le salage

Comme il y a effectivement un transfert de flore entre le sel et l'aliment, il est probable que la méthode de salage l'impacte et compromette ainsi la viabilité des archées sur les matrices. Il existe deux méthodes principales de salage : le frottement en surface de sel et l'immersion dans une saumure. Pour les fromages, le salage peut aussi se faire directement dans le caillé (Guinee *et al.*, 2004). La plupart des matrices sélectionnées sont salées à la main dans des bacs de salage, seul le fromage de Chimay est plongé dans une saumure.

Il a été montré que le salage en surface provoquait la formation d'une fine couche saturée en sel à la surface de l'aliment (Breene *et al.*, 1965). La surface en contact avec cette couche sursaturée en NaCl pendant un long moment subit une perte d'eau considérable qui compromet la diffusion du sel jusqu'au centre de l'aliment (Godinho *et al.*, 1981). Ceci pourrait expliquer le fait que quasi toutes les bactéries halophiles isolées à partir des matrices salées à la main ont été retrouvées à leur surface ou en périphérie. En effet, dans ce type de produit, seule *Halomonas alkaliphila* a été isolée au centre du fromage de Herve. Néanmoins, quand on compare les différentes matrices, ce fromage petit et cubique possède le ratio surface/volume le plus grand. Le passage du sel de la surface jusqu'au centre est donc facilité, il n'est dès lors pas étonnant d'avoir retrouvé cette espèce halophile en son centre. Les genres *Cobetia* et *Garicola*, retrouvés dans certaines matrices ont aussi été isolés à partir de plats salés fermentés asiatiques, montrant leur très grande capacité à survivre dans les milieux hyper salins (Kim *et al.*, 2010 ; Lo *et al.*, 2015). Comme des archées ont aussi été isolées à partir de ces plats, les conditions retrouvées au sein de nos matrices pourraient donc

convenir à leur croissance. Ceci nous fait revenir à la couche saturée en NaCl en surface qui pourrait de ce fait être l'habitat propice au développement des archées. Cependant, aucune n'a été isolée de la surface des matrices. Il se peut dans ce cas qu'aucune archée ne soit présente dans le sel de salage à la base comme discuté ci-dessus. Il se peut aussi qu'une fois sur l'aliment, leur croissance cesse du fait des conditions trop peu salines à l'intérieur et de la pression des autres microorganismes, notamment les bactéries lactiques dominantes dans cet environnement. Enfin, les manipulations d'affinage comme le lavage à la brosse peuvent aussi affecter leur présence en surface en détruisant la couche saturée en sel qui pourrait être le seul endroit propice à leur développement. Pour les saucissons, la présence d'une peau en boyau pourrait aussi compromettre la diffusion du sel à l'intérieur et donc le développement d'organismes halophiles dans la viande. Enfin, pour les jambons, les pièces étudiées sont issues de la découpe du gros jambon et ne contiennent donc plus la couche saturée en NaCl.

Lors du salage en saumure, le sel migre plus rapidement au centre du fromage que pour un salage en surface, créant ainsi plus rapidement un gradient décroissant de sel de la surface au centre et, à l'inverse, un gradient croissant d'humidité dans la même direction. Ce type de salage ne provoque donc pas la formation d'une couche saturée en NaCl (Guinee *et al.*, 2017). De ce fait, et contrairement à toutes les autres matrices, des bactéries halophiles comme *Chromohalobacter beijerinckii* se retrouvent jusqu'au centre du fromage de Chimay. Des archées comme *Halorubrum* ont déjà été retrouvées dans des saumures alimentaires (Abriouel *et al.*, 2011). Néanmoins, pour ce fromage, aucune archée n'a été isolée, probablement pour les mêmes raisons que celles évoquées pour le salage à la main.

Aucun fromage analysé n'a subi un salage directement dans le caillé. Le sel est principalement ajouté à cette étape pour contrôler la flore microbienne indigène (El-Baradei *et al.*, 2007). L'exemple le plus extrême de l'utilisation de NaCl à cet effet est celui de la fabrication du Domiati, un fromage égyptien dans lequel 12-15% de NaCl v/v sont ajoutés au lait avant le caillage (Naguib *et al.*, 1979). On obtient ainsi des fromages fortement salés (6% v/v et 3% v/v pour le Domiati et la Feta respectivement) comparés aux autres fromages (0,7% v/v pour l'Emmental) (Guinee *et al.*, 2017). Ces fromages possèdent cependant une concentration homogène en sel, à l'inverse des fromages salés par frottement en surface. Il n'y a donc pas non plus de couche saturée en NaCl. La présence d'archées dans ces matrices est de ce fait probablement compromise. Néanmoins, il aurait été intéressant d'en analyser une pour évaluer et comparer sa flore.

La méthode de fabrication

Il a donc d'abord été montré qu'il y a effectivement une flore halophile qui varie en fonction du type de sel. Il a ensuite été prouvé qu'il y a bien un transfert de cette flore sur la matrice alimentaire lors de l'étape de salage. Finalement, l'impact de la méthode de salage sur son développement au sein de la matrice a été mis en avant et il en a été déduit que la présence

d'archées serait la plus probable à la surface des matrices salées au gros sel. De ce fait, le développement de cette surface joue un rôle primordial dans la survie des archées. Celui-ci est notamment lié aux caractéristiques physiques et chimiques du produit (pH, a_w , composition, taille), à ses conditions d'affinage (température et humidité) mais aussi à ses manipulations (lavage, entreposage) (Ratnay et al., 1999). Ces paramètres de fabrication font de chaque matrice un produit unique qu'il convient de discuter au cas par cas.

Les fromages à pâte molle comme le Herve (le Munster ou le Camembert) ne subissent ni chauffage, ni pressage. Très peu de lactosérum est donc perdu et ils ont une pâte molle. Les fromages à pâte dure subissent une cuisson du caillé (pour le Sarté et le Chimay par exemple) ou non (le Morbier et l'Éillet du Château) puis sont pressés, ils perdent ainsi beaucoup plus de lactosérum et sont beaucoup plus secs. Leur activité en eau (a_w) est donc plus faible (0,95) que les fromages à pâte molle (0,98) (Guinee et al., 2017). Les jambons crus et saucissons ont quant à eux une a_w proche de 0,95 (Brewer, 1999). La plupart des bactéries se développent à une a_w supérieure à 0,90. En-dessous de cette valeur, les archées sont souvent les organismes principaux rencontrés dans les produits salés et ce jusqu'à saturation à 0,75 (voir Table 4) (Grant, 2004). Comme les a_w de nos fromages et de nos charcuteries se trouvent toutes au-dessus de 0,95, la croissance bactérienne rapide dans ces conditions surpasse certainement celle des archées. Ceci pourrait expliquer le fait qu'aucune n'a été trouvée, mais que de nombreux genres bactériens halophiles ont été isolés. Des fromages plus secs comme le Parmesan (0,92) et le Provolone (0,91) d'Italie ou le Gammelost (0,90) de Norvège pourraient de ce fait être des habitats plus propices à la croissance archéenne.

Certains fromages comme le Herve (le Munster ou le Maroilles) sont lavés et brossés à l'eau salée plusieurs fois par semaine durant le processus d'affinage. Ils développent ainsi une odeur et une couleur rouge-orange en surface, typique de ces fromages à croûte lavée. Cette couleur rappelle celle des archées mais elle serait en fait attribuée à *Brevibacterium linens*, un ferment d'affinage largement utilisé en fromagerie (Ratnay et al., 1999). Une récente étude métagénomique sur le fromage de Herve a aussi montré la présence en surface de *Psychroflexus halocasei*, une bactérie halophile qui donne sa couleur orange au fromage à raclette (Delcenserie et al., 2014 ; Seiler et al., 2012). De plus, de nombreuses bactéries rouges existent, comme *Salinibacter ruber*, trouvée dans le sel SeFA. La couleur rouge du fromage de Chimay viendrait quant à elle de l'utilisation de rocou, un colorant naturel rouge notamment utilisé pour colorer la surface du Cheddar ou du Gouda lors du lavage. La couleur des fromages analysés ne viendrait donc pas de la présence d'archées. En revanche, lors de l'étude sur le Herve, le genre *Halomonas* a été retrouvé au centre et à la surface du fromage (Delcenserie et al., 2014). Il est d'ailleurs souvent retrouvé dans les salaisons (Amato et al., 2012 ; Schornsteiner et al., 2014). Ce genre a aussi été identifié dans le Herve analysé, ainsi qu'à la surface du Morbier et du jambon Cœur d'Ardenne, indiquant qu'une flore halophile peut bel et bien se développer malgré le fait qu'aucune archée n'ait été identifiée.

Il a aussi été montré que de nombreuses levures halophiles peuvent se développer dans ces croutes (Cogan *et al.*, 2014). C'est principalement le brossage et le lavage à répétition de la croute qui apportent cette flore au fromage. Ils permettent aussi de répandre de manière uniforme les micro-organismes de surface (Mounier *et al.*, 2017). On appelle souvent cette flore la microflore naturelle (Bokulich *et al.*, 2013). Le saucisson SFA était recouvert d'une poudre blanche, aussi appelée la « Fleur du saucisson » lors de l'achat. Il s'agit normalement de moisissures ou de levures blanches. En revanche, ici, il s'agit de farine et de sel afin de rendre plus attirant le saucisson. *M. halotolerans* trouvé en surface pourrait donc provenir de ce mélange et n'avoir jamais été en contact avec la matrice alimentaire. La surface des salaisons est donc riche en diversité. La présence de ces nombreux micro-organismes pourrait compromettre la croissance des archées. Aussi, l'analyse de l'eau utilisée lors du lavage pourrait éventuellement mettre en évidence leur présence, et qui sait, montrer qu'elles font elles aussi partie de la microflore naturelle.

Aucun fromage à croute fleurie comme le Camembert n'a été analysé. Ils sont recouverts de *Penicillium* et ne subissent pas de lavage. La flore de surface de ces fromages est très complexe, et à cause de la compétition et de l'inhibition du *Penicillium*, les bactéries ont souvent de grandes difficultés à se développer (Spinnler, 2017). La présence d'archées dans ces matrices est dès lors fortement compromise.

Les conditions d'affinage pourraient aussi jouer un rôle dans le bon développement des archées dans les différentes matrices. Pour les fromages, la durée, la température et l'humidité dans la pièce d'affinage sont très variables d'un fromage à l'autre. Avoir une haute humidité relative permet par exemple au fromage de ne pas sécher, la combinaison température-durée permet quant à elle la croissance des microorganismes (Mounier *et al.*, 2017). Pour les charcuteries, l'affinage se fait généralement dans un local froid pendant plusieurs mois. Les conditions d'affinage de ces différentes matrices sont donc loin des conditions optimales de croissance des archées. Cela pourrait donc aussi expliquer pourquoi aucune n'a été trouvée. Les charcuteries ont aussi été choisies non-fumées. Le fumage n'altérerait cependant pas la microflore des salaisons. Celle-ci est en effet surtout liée aux ingrédients et aux autres procédés de fabrication (Vaz-Velho *et al.*, 2003). Il ne serait donc pas une cause de l'absence d'archées dans nos matrices.

5.2 Le choix des milieux et des conditions de culture

Le choix des milieux et des conditions de culture s'est fait sur base des précédentes études menées au sein du laboratoire. Néanmoins, d'autres conditions auraient pu être appliquées pour améliorer la croissance des archées et potentiellement isoler d'autres genres.

La température d'incubation utilisée était de 37°C bien que le maximum de croissance de beaucoup d'archées se situe à 49-58°C (Robinson *et al.*, 2005). Un doublement de croissance est notamment observé à des températures de 42-45°C (Dyall-Smith, 2009). De fait, les températures optimales de croissance des archées trouvées dans les sels de salage se trouvent toutes au-dessus des 37°C. L'optimum de *Haloarcula japonica* se situe par exemple à 50-53°C (Takashina *et al.*, 1990). Ainsi, des températures d'incubations plus hautes auraient sans doute augmenté la diversité en archées isolées sur les milieux. De plus, de telles températures auraient freiné la croissance des bactéries. Toutes les bactéries isolées des matrices ont en effet des températures optimales à 37°C ou en-dessous. Seule la bactérie *S. ruber* croît préférentiellement entre 37°C et 47°C (Oren *et al.*, 2002).

La durée d'incubation de quatre semaines pourrait également être augmentée à huit semaines. En effet, quatre semaines de plus permettraient l'apparition de plusieurs genres supplémentaires sur les milieux (Burns *et al.*, 2004). Le problème est qu'une augmentation du temps d'incubation (combinée à une augmentation de température) pourrait assécher les milieux et provoquer la cristallisation des sels (Dyall-Smith, 2009).

Les milieux à pH 7,5 utilisés semblent convenir à tous les haloarchées neutrophiles et non-alcaliphiles. Néanmoins, certaines archées sont alcaliphiles et nécessitent des pH plus basiques, c'est le cas de *Natronobacterium* et *Natronococcus* (Warren, 2016). L'utilisation d'un milieu alcaliphile, comme proposé par Peter Jablonski (Dyall-Smith, 2009), pourrait mettre en évidence ces genres qui n'ont pas été isolés à partir de nos milieux.

Les concentrations en sels choisies vont de 18% à 25%. Ces conditions sont favorables à la croissance de la majorité des archées halophiles extrêmes (Oren, 2014a). Elles n'empêchent cependant pas la croissance de certaines bactéries. En effet, de nombreuses bactéries halophiles ont été isolées à partir des milieux. La plupart de celles-ci ont poussé sur les milieux les moins salés comme CDM et Hv-YPC mais certaines comme *Chromohalobacter beijerinckii* ont montré une très grande tolérance en poussant sur tous les milieux. Ses colonies étaient cependant de plus en plus petites au plus les milieux étaient salés. Cette croissance bactérienne est généralement beaucoup plus rapide que celle des archées. Les bactéries isolées ont en effet poussé en moins d'une semaine. Leur présence sur les milieux de culture pourrait avoir eu un effet sur la croissance des archées. Pour l'empêcher, des antibiotiques comme la pénicilline ou l'ampicilline auraient pu être utilisés (Oren, 2003). Enfin, toutes les archées ne sont pas halophiles extrêmes, c'est le cas de *Haladaptus paucihalophilus* (Savage *et al.*, 2007). Un milieu moins salé aurait peut-être permis de l'isoler. Néanmoins, il a été montré que des souches avec de faibles optimaux poussaient relativement bien à de plus hautes concentrations, l'inverse n'est cependant pas vrai (Dyall-Smith, 2009).

L'utilisation de substrats particuliers et d'éléments traces dans les milieux permet aussi de favoriser la croissance des archées. Les haloarchées requièrent généralement des milieux complexes comme Hv-YPC et MGM qui contiennent des extraits de levures, des casaminoacides et des peptones (Oren, 2003). Lors de notre étude, seulement deux archées ont cependant été isolées à partir de ces milieux. Et c'est sur ceux-ci que beaucoup de bactéries halophiles ont été identifiées. Certaines archées comme *Haloarcula* et *Halosimplex* peuvent pousser sur les milieux DBCM2 et CDM, qui contiennent des substrats plus simples comme le pyruvate (Dyall-Smith, 2009). De fait, le genre *Haloarcula* n'a été retrouvé que sur ces milieux dans notre étude. La simplicité de ceux-ci n'a en revanche pas permis d'empêcher la croissance bactérienne. Les éléments traces pourraient aussi jouer un rôle important dans le développement des archées. En effet, une seule espèce (*Halococcus dombrowskii*) a été isolée du milieu Hv-YPC, le seul milieu ne contenant pas d'éléments traces, alors que de nombreuses ont été isolées à partir des trois autres milieux. Certaines archées peuvent aussi avoir besoin d'amidon et d'argile, c'est le cas de *Halorubrum sodomense* (Oren, 2003). Cette espèce a cependant été isolée du milieu DBCM2 qui n'en contient pas. Ceci montre que beaucoup d'archées peuvent vivre au-delà de leurs conditions optimales de croissance.

Finalement, l'incubation aurait aussi pu se faire à la lumière étant donné que de nombreuses archées peuvent l'utiliser comme source d'énergie (Rush, 2016). Néanmoins, toutes les haloarchées peuvent croître dans l'obscurité (Oren, 2003). Une phase de culture en lumière n'aurait donc sans doute pas apporté beaucoup plus de résultats.

5.3 Le protocole de la méthode culture-indépendante

L'approche culture-indépendante n'a pas permis de mettre en avant de l'ADN d'archées dans les différentes matrices. Ce résultat peut être expliqué par différents points.

Tout d'abord, il est essentiel de sélectionner une méthode d'extraction d'ADN en accord avec nos objectifs et nos manipulations en aval. Pour les aliments, les kits d'extraction utilisés sont renseignés dans de nombreux articles pour l'extraction d'ADN microbien (surtout des bactéries, levures et moisissures) à partir de différentes matrices (Heller *et al.*, 2003 ; Jara *et al.*, 2008). Néanmoins, aucune étude ne montre s'ils sont efficaces pour l'extraction d'ADN d'archées. Comme elles ont en effet des parois et des membranes particulières, il est possible que les kits ne soient pas adaptés à l'extraction de leur ADN. De plus, les micro-organismes sont généralement fermement associés à la matrice alimentaire et cela peut altérer l'accessibilité par le réactif de lyse. La population microbienne peut aussi être très faible dans certaines matrices et il faut alors homogénéiser une large quantité d'aliment pour avoir un résultat significatif (Barbosa *et al.*, 2016). Il se peut donc que des archées soient bien présentes

dans nos salaisons mais que leur quantité soit trop faible et que notre méthode d'échantillonnage n'ait pas permis de les prélever. Il se peut aussi que la lyse n'ait pas fonctionné comme mentionné ci-dessus. Enfin, la quantité et la qualité des extractions étant très variables, il se peut que les kits ne conviennent pas aux matrices choisies. L'utilisation d'autres kits est donc envisageable, le kit DNeasy® Blood & Tissue DNA extraction kit (Qiagen) a notamment déjà été utilisé sur le fromage de Herve et pourrait donc convenir pour les autres matrices étudiées (Deltens *et al.*, 2014). Cependant, et encore une fois, l'ADN d'archées n'a pas été recherché lors de cette précédente étude. En revanche, une étude évaluant la flore archéenne du Lutefisk, un poisson séché norvégien, n'en n'a pas trouvé en utilisant ce même kit (Lunestad *et al.*, 2018). Le protocole interne d'extraction d'ADN à partir des sels a quant à lui donné de bons résultats d'extraction (quantité et qualité), et a permis de détecter de l'ADN d'archées dans ce mémoire sur le sel SeFA (Annexe 1 : gels d'électrophorèse) et dans le mémoire de Jeanne Fourmentin sur de nombreux autres sels. Il serait donc intéressant de recommencer les extractions pour les sels qui ont eu une faible quantité et qualité d'ADN car il s'agit peut-être de la conséquence d'une erreur de manipulation.

Les différentes amorces utilisées dans ce mémoire étaient toutes universelles mais spécifiques aux archées. La paire 340F-1000R utilisée pour la nested-PCR possède notamment une haute spécificité aux archées (<1% d'amplification de bactéries) et elle couvre 95-97% des séquences connues de *Euryarchaeota* et *Crenoarchaeota* (Gantner *et al.*, 2011). Les deux autres paires d'amorces utilisées ont montré, malgré leur spécificité, de nombreuses amplifications pour des isolats identifiés plus tard comme bactériens. Ceci montre qu'elles ne sont peut-être pas si spécifiques. Enfin, quelques souches d'archées n'ont pas été amplifiées par certaines paires d'amorces, c'est en effet le cas de *Halolamina salifodinae*, montrant qu'elles ne sont peut-être pas non plus totalement universelles. C'est donc l'utilisation d'une double paire d'amorces pour l'identification des isolats dans la méthode culture-dépendante qui a permis d'augmenter le nombre d'espèces identifiées.

6 Conclusion et perspectives

L'objectif de ce mémoire a été d'analyser différentes matrices alimentaires ayant subi une étape de salage afin d'en évaluer la diversité en archées. En effet, de nombreuses archées halophiles sont retrouvées au sein de gros sels de salage. Ainsi, la flore de dix matrices salées a été explorée premièrement par une approche culture-dépendante sur milieux salins et ensuite via une approche culture-indépendante. Les sels utilisés pour le salage ont aussi été analysés pour certaines matrices.

L'approche culture-dépendante a permis d'isoler et d'identifier 22 colonies d'archées halophiles au départ de gros sels alimentaires. Aucune archée n'a en revanche été trouvée dans les sels de salage raffinés, confirmant l'hypothèse que le raffinement détruit la flore archéenne des sels. Bien qu'un transfert de flore ait bel et bien lieu entre le sel et l'aliment, aucune archée n'a été trouvée parmi les 133 colonies isolées des différentes matrices salées au gros sel. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, la méthode de salage pourrait avoir un impact sur leur survie au sein de la matrice. Un salage par frottement pourrait être idéal pour la survie des archées en formant une couche saturée en sel. Néanmoins, aucune archée n'a été isolée des surfaces de matrices salées par frottement au gros sel. Ensuite, les méthodes de fabrication pourraient également altérer leur croissance au sein des produits. Enfin, les conditions de culture, peut-être trop sélectives, ne permettraient pas la croissance de toutes les archées halophiles. 32 isolats bactériens halophiles et halotolérants ont cependant été identifiés parmi les 133 colonies isolées des différentes matrices. Un tel type de flore peut donc effectivement survivre au sein de ces matrices. Aussi, nombre d'entre eux ont déjà été isolés de plats asiatiques fortement salés dans lesquels certaines archées ont été découvertes. Les conditions au sein des matrices salées sont donc potentiellement adéquates pour la croissance des archées.

La deuxième approche, l'approche culture-indépendante, n'a pas permis de mettre en avant de l'ADN d'archées au sein des matrices alimentaires. Ce résultat est expliqué en partie par la faible qualité et quantité de l'ADN collecté lors des extractions.

Bien que la présence d'archées au sein de matrices alimentaires n'ait pas été prouvée dans ce mémoire, les résultats obtenus permettent quand même d'ouvrir ou de fermer quelques portes. Dans de précédentes études, l'analyse de matrices salées a déjà permis d'isoler une grande diversité d'archées. Beaucoup de ces matrices proviennent entre autres d'environnements aquatiques. Il serait dès lors intéressant d'étendre les recherches vers certains poissons séchés comme, par exemple, le merlan de la mer du Nord. De plus,

multiplier les études sur d'autres matrices comme d'autres types de fromages ou charcuteries pourrait apporter son lot de nouvelles découvertes. Comme le sel pourrait être la source principale d'archées au sein de l'aliment, la récolte et l'analyse de ceux utilisés lors du salage pourrait d'ores et déjà exclure certaines matrices. Une confirmation de la non-viabilité des archées au sein de sels raffinés pourrait entre autres limiter la quantité de matrices à étudier. Même si aucune archée n'a été trouvée à la surface des matrices analysées, la présence d'une couche saturée en sel sur certaines de ces matrices pourrait être un environnement propice à leur développement et des prospections supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer cette absence. Des conditions de culture différentes pourraient notamment permettre la croissance d'autres genres archéens. De plus, l'appui d'une analyse métagénomique à partir d'extractions d'ADN des matrices alimentaires pourrait appuyer les résultats obtenus de manière culture-dépendante. Pour ce faire, les kits d'extraction et les amorces utilisés doivent être revus.

En conclusion, et même si aucune n'a été isolée, tout porte à croire que la présence d'archées au sein de certaines matrices alimentaires salées reste fortement probable. Et ceci relance donc la question de leur destinée et leur impact dans le système digestif qui n'est, à l'heure actuelle, pas encore connu...

Bibliographie

- ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., LUCAS, R. and GÁLVEZ, A. (2011) : Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *Int. J. of Food Microbiol.* 144(3) : 487-496.
- ALAM, M. and OESTERHELT, D. (1984) : Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.* 176: 459-475.
- AMATO, L., RITSCHARD, J.S., KURTZ, O., ARIAS-ROTH, E., LACROIX, C., SCHUPPLER, M. and MEILE, L. (2012) : Microbial composition of defect smear - A problem evolving during foil-prepacked storage of red-smear cheeses. *Int. Dairy J.* 27 : 77–85.
- AMOOZEGAR, M.A., SIROOSI, M., ATASHGAHI, S., SMIDT, H. and VENTOSA, A. (2017) : Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology 2017*.163:623-645.
- ANDREI, A-S., BANCUI, H.L. and OREN, A. (2012) : Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* 330 : 1-9.
- ANTRANIKIAN, G. and EGOROVA, K. (2007) : Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology. In: Gerday, C. and Glansdorff, N. (eds) : *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM, Washington DC, 361-406.
- ANTÓN, J., OREN, A., BENLOCH, S., RODRÍGUEZ-VALERA, F., AMANN, R. and ROSSELLÓ-MORA, R. (2002) : *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extreme halophilic bacterium from saltern crystallizer ponds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 485-491.
- ANTONIO, J.M., MARTÍNEZ-CÁNOVAS, J., QUESADA, E. and BÉJAR, V. (2002) : A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. and Appl. Microbiol.* 25 :360-375.
- ANTUNES, A., TIBORDA, M., HUBER, R., MOISSE, C., NOBRE, M.F. and DA COSTA, M.S. (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.
- AOUAD, M., TAIB, N., OUDART, A., LECOCQ, M., GOUY, M. and BROCHIER-ARMANET, C. (2018) : Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen Class II lineages, *Mol. Phylogenet Evol.*
- ARAHAL, D.R., GARCÍA, M.T., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. and VENTOSA, A. (2001) : Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 :1443-1448.
- ARAHAL, D.R., CASTILLO, A.M., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. and VENTOSA, A. (2002) : Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25 : 207–211.
- ASLAM, Z., LIM, J. H., IM, W. T., YASIR, M., CHUNG, Y. R. and LEE, S. T. (2007) : *Salinicoccus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:633-638.
- BAKER, B.J., COMOLLI, L.R., DICKA, G.J., HAUSER, L.J., HYATT, D., DILL, B.D., LAND, M.L., VERBERKMOES, N.C., HETTICH, R.L. and BANFIELD, J.F. (2010) : Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:8806-8811.
- BARBOSA, C., NOGUEIRA, S., GADANHO, M. and CHAVES, S. (2016) : Chapter 7 : DNA extraction : finding the most suitable method. Molecular microbial diagnostic methods : pathways to implementation for the food and water industries. 153-154.
- BARKER, H. A. (1956) : Bacterial fermentations. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- BARNS, S.M., DELWICHE, C.F., PALMER, J.D. and PACE, N.R. (1996) : Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:9188-9193.
- BARNS, S.M. and NIERZWICKI-BAUER, S.A. (1997) : Microbial diversity in ocean, surface and subsurface environments. In Banfield, J. F., and Nealson, K. H. (eds.), *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals. Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. Washington, DC: Mineralogical Society of America and Geochemical Society, 35:35–79.
- BARNS, S.M., FUNDYGA, R.E., JEFFRIES, M.W. and PACE, N.R. (1994) : Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1609-1613.
- BARTON, L.L., BAZYLINSKI, D.A. and XU, H. (2014) : Nanomicrobiology, Physiological and environmental characteristics.
- BERQUIST, B.R., SONEJA, J. and DASSARMA, S. (2005) : Comparative genomic survey of information transfer systems in two diverse extremely halophilic Archaea, *Halobacterium* sp. strain NRC-1 and *Haloarcula marismortui*. Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya. Cellular Origin, Life in Extreme habitats and Astrobiology. Volume 9.
- BERTOLDO, C., DOCK, C. and ANTRANIEKIAN, G. (2004) :Thermoacidophilic microorganisms and their novel biocatalysts. *Eng. Life Sci.* 4:521-532.
- BERRY, D.F., FRANCIS, A.J. and BOLLAG, J-M. (1987) : Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 51:43-59.
- BODAKER, I., SHARON, I., SUZUKI, M.T., FEINGERSCH, R., SHMOISH, M., ANDREISHCHEVA, E., SOGIN, M.L., ROSENBERG, M., MAGUIRE, M.E., BELKIN, S., OREN, A. and BEJA, O. (2010) : Comparative community genomics in the Dead Sea : an increasingly extreme environment. *ISME J.* 4:399-407.
- BOKULICH, N.A. and MILLS, D.A. (2013) : Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of Artisan cheesemaking plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 : 5214–5223.
- BOONE, D.R., MATHRANI, I.M., LIU, Y., MENAIA, J.A.G.F., MAH, R.A. and BOONE, J.E. (1993) : Isolation and characterization of *Methanohalophilus portucalensis* sp. nov. and DNA reassociation study of the genus *Methanohalophilus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:430-437.

- BOWERS, K.J. and WIEGEL, J. (2011) : Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*.15:119-128.
- BRENE, W.M., OLSON, N.F. and PRICE, W.V. (1965) : Salt absorption by Cheddar cheese curd. *J. Dairy Sci.* 48 :621-627.
- BREWER, M. S. (1999) : Traditional preservatives sodium chloride. *Encyclopaedia of food microbiology*, (ed. R. K. Robinson, C. A. Blatt & P. D. Patel). 3:1723–1728.
- BROCHIER, C., GRIBALDO, S., ZIVANOVIC, Y., CONFALONIERI, F. and FORTERRE, P. (2005) : *Nanoarchaea*: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biol. Evol.* 6(5), R42.
- BROCHIER-ARMANET, C., BOUSSAU, B., GRIBALDO, S. and FORTERRE, P. (2008) : Mesophilic *Grenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:245-252
- BROCK, T.D. (1978). Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag KG, Berlin.
- BROCK, T.D., BROCK, K.M., BEILEY, R.T. and WEISS, R.L. (1972) : *Sulfolobus*: a new genus of sulfur oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* 84:54-68.
- BRUSA, T., FERRARI, F. and CANZI, E. (1998) : Methanogenic bacteria: presence in foodstuffs. *J. Basic Microbiol.* 38 :79-84.
- BURNS, D.G., CAMAKARIS, H.M., JANSSEN, P.H. and DYALL-SMITH, M.L. (2004) : Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 5258-5265.
- BURNS, D.G., JANSSEN, P.H., ITOH, T., KAMEKURA, M., LI, Z., JENSEN, G., RODRÍGUEZ-VALERA, F., BOLHUIS, H. and DYALL-SMITH, M.L. (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., JANSSEN, P.H., ITOH, T., MINEGISHI, H., USAMI, R., KAMEKURA, M. and DYALL-SMITH, M.L. (2010) : *Natronomonas moolapensis* sp. nov., non-alkaliphilic isolates recovered from a solar saltern crystallizer pond, and emended description of the genus *Natronomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 :1173-1176.
- CAFORIO, A. and DRIESSEN, A.J.M. (2017) : Archaeal phospholipids: structural properties and biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1862:1325-1339.
- CHA, I.-T., YIM, K.J., SONG, H.S., LEE, H.-W., HYUN, D.-W., KIM, K.N., SEO, M.J., KIM, D., CHOI, J.S., LEE, S.J., BAE, J.W., RHEE, S.K., CHOI, H.J., RHEE, J.K., NAM, Y.D. and ROH, S.W. (2014a) : *Halobellus nifus* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from non-purified solar salt. *Antonie van Leeuwenhoek.* 105:925-932.
- CHA, I.-T., YIM, K.J., SONG, H.S., LEE, H.-W., HYUN, D.-W., KIM, K.N., SEO, M.J., KIM, D., CHOI, J.S., LEE, S.J., BAE, J.W., RHEE, S.K., CHOI, H.J., RHEE, J.K., NAM, Y.D. and ROH, S.W. (2014b) : *Halolamina rubra* sp. nov., a haloarchaeon isolated from non-purified solar salt. *Antonie van Leeuwenhoek.* 105 :907-914.
- CHANG, H.W., KIM, K.H., NAM, Y.D., ROH, S.W., KIM, M.S., JEON, C.O., OH, H.M. and BAE, J.W. (2008) Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 126(1) :159-166.
- CHEN, P., ZHANG, L., WANG, J., RUAN, J., HAN, X. and HUANG, Y. (2016) : *Brevibacterium sediminis* sp. nov., isolated from deep-sea sediments from the Carlsberg and Southwest Indian Ridges. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 :5268-5274.
- CHEN, L., ZHANG, H., LIU, G. and SHA, W. (2016) : First report on the bacterial diversity in the distal gut of dholes (*Canis alpinus*) by using 16S rRNA gene sequences analysis. *J. Appl. Genetics.* 57:275-283.
- COGAN, T.M., JAMET, E., BEDUHN, R., BORA, N., CHAMBA, J.-F., IRLINGER, F., SEBASTIANI, H., DESMASURES, N., HOHENEGGER, M., MOUNIER, J., WARD, A.C., GOODFELLOW, M., GOERGES, S., GUEGUEN, M., LARPIN, S., SWINGS, J., VANCANNEYT, M., GELSOMINO, R., REA, M.C. and SCHERER, S. (2014) : Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen cheeses. *Microbiol. Spectr.* 2 : 0010-2012.
- COMB, D.G. and KUCERA, R.B. (1993) : Purified thermostable DNA polymerase obtainable from *Thermococcus litoralis*. European Patent EP0455430B1.
- CUI, H.-L., GAO, X., YANG, X. and XU X.-W. (2011) : *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae*. *Int. J. Food Microbiol.* 61 :1617-1621.
- CUI, H.-L., YANG, X. and MOU, Y.-Z. (2011) : *Salinarchaeum laminariae* gen. nov., sp. nov.: a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from salted brown alga *Laminaria*. *Extremophiles* 15 :625-631.
- DANON, A. and STOECKENIUS, W. (1974) : Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1234-1238.
- DARLAND, G., BROCK, T.D., SAMSONOFF, W. and CONTI, S.F. (1970) : A thermophilic acidophilic *Mycoplasma* isolated from a coal refuse pile. *Science* 170:1416-1418.
- DASSARMA, S. and ARORA, P. (2001): Halophiles. In: Encyclopedia of Life Science. Nature Publishing Group.
- DASSARMA, S., CAPEL, M. and DASSARMA, P. (2008) : Haloarchaeal megaplasmids. *Microbiol. Monogr.* 11:3-30.
- DELCENSERIE, V., TAMINIAU, B., DELHALLE, L., NEZER, C., DOYEN, P., CREVECOEUR, S., ROUSSEY, D., KORSACK, N. and DAUBE, G. (2014) : Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *J. Dairy Sci.* 97 : 6046–6056.
- DELONG, E.F. and PACE, N.R. (2001) : Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50:470-8.
- DEMAERE, M.Z., WILLIAMS, T.J., ALLEN, M.A., BROWN, M.V., GIBSON, J.A.E., RICH, J., LAURO, F.M., DYALL-SMITH, M., DAVENPORT, K.W., WOYKE, T., KYRPIDES, N.C., TRINGE, S.G. and CAVICCHIOLI, R. (2013) : High level of intergenera gene exchange shapes the evolution of haloarchaea in an isolated Antarctic lake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110 :16939-16944.
- DEMONFORT, V., HENRISSAT, B. and DRANCOURT, M. (2017) : Archaea : Essential inhabitants of the human digestive microbiota. *Hum. Microbiom. J.* 3 :1-8.
- DE VRIEZE, J., HENNEBEL, T., BOON, N. and VERSTRAETE, W. (2012) : *Methanosarcina* : the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Biores. Technol.* 112:1-9.
- DIOP, A., KHELAIFA, S., ARMSTRONG, N., LABAS, N., FOURNIER, P.-E., RAOULT, D. and MILLION, M. (2016) : Microbial culturomics unravels the halophilic microbiota repertoire of table salt : description of *Gracilbacillus massiliensis* sp. nov. *Microb. Ecol. Health Dis.* 27 : 132049.
- DUCIC, M., BLAGOJEVIC, B., MARKOV, S., VELICANSKI, A. and BUNCIC, S. (2014) : General patterns of background microbiota and selected bacterial pathogens during production of fermented sausages in Serbia. *Food Control.* 43:231-237.

- DUSCHL, A. and WAGNER, G. (1986) : Primary and secondary chloride transport in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 168:548-552.
- DYALL-SMITH, M.L. (2009) : The Halo handbook, protocols for haloarchaeal genetics.
- ECHIGO, A., MINEGISHI, H., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T. and USAMI, R. (2013) : *Halomicroarcula pellucida* gen. nov., sp. nov., a non-pigmented, transparent-colony-forming, halophilic archaeon isolated from solar salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(10):3556-3562.
- EICHLER, J. (2001) : Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol. Adv.* 19:261-278.
- EISENBERG, H. and WACHTEL, E.J. (1987) : Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16:69-92.
- EL-BARADEI, G., DELACROIX-BUCHET, A. and OGIER, J.-C. (2007) : Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional egyptian Domiat cheese. *Appl. Env. Microbiol.* 73 : 1248–1255.
- ELKINS, J.G., PODAR, M., GRAHAM, D.E., MAKAROVA, K.S., WOLF, Y., RANDAU, L., HEDLUND, B.P., BROCHIER-ARMANET, C., KUNIN, V., ANDERSON, I., LAPIDUS, A., GOLTSMAN, E., BARRY, K., KOONIN, E.V., HUGENHOLTZ, P., KYRPIDES, N., WANNER, G., RICHARDSON, P., KELLER, M. and STETTER, K.O. (2008) : A *Korarchaeal* genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 8102-8107.
- ELSHAHED, M.S., SAVAGE, K.N., OREN, A., GUTIERREZ, M.C., VENTOSA, A. and KRUMHOLZ, L.R. (2004) : *Haloferrax sulfurifontis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide and sulfur-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2275-2279.
- EME, L. and DOOLITTLE, W.F. (2015a) : Microbial diversity: a bonanza of phyla. *Curr. Biol.* 25 :R227-R230.
- EME, L., and DOOLITTLE, W.F. (2015b) : Archaea. *Curr. Biol.* 25 :R851-R855.
- EME, L., SPANG, A., LOMBARD, J., STAIRS, C.W. and ETTEMA, T.J.G. (2017) : Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 15 :711-723.
- ENACHE, M., ITOH, T., KALEKURA, M., TEODOSIU, G. and DUMITRU, L. (2007) : *Haloferrax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 :393-397.
- ERIKSEN, J.P. and MCKENNA, D.N. (1999) : *Zygosaccharomyces*. In *Encyclopaedia of food microbiology* (ed. R. K. Robinson, C. A. Batt & P. D. Patel). 3 :2359-2365.
- ESCOBAR-ZEPEDA, A., SANCHEZ-FLORES, A. and QUIRASCO BARUCH, M. (2016) : Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol.* 57:116-127.
- FAN, H., XUE, Y., MA, Y., VENTOSA, A. and GRANT, W.D. (2004) : *Halorubrum tibetense* sp. nov., a novel haloalkaliphilic archaeon from Lake Zabuye in Tibet, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1213–1216.
- FARLOW, W.G. (1878). On the nature of the peculiar reddening of salted codfish during the summer season (1878). U.S. Fish Comm., Report of the Commissioner for 1878. 969-973.
- FIALA, G., STETTER, K.O., (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* 145(1) :56-61.
- FONTANA, C., COCCONCELLI, P.S. and VIGNOLO, G. (2005) : Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 103 :131-142.
- FONTANA, C., BASSI, D., LOPEZ, C., PISACANE, V., OTERO, M.C., PUGLISI, E., REBECCHI, A., COCCONCELLI, P.S. and VIGNOLO, G. (2016) : Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. *Int. J. Food Microbiol.* 236 :17-25.
- FOURMENTIN, J. (2013) : Étude de la diversité des archées halophiles dans les sels alimentaires et les salaisons. Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Environnementale Université Catholique de Louvain.
- FRANCOLEON, D.R., BOONTHEUNG, P., YANG, Y., KIM, U., YTTTERBERG, A.J., DENNY, P.A., DENNY, P.C., LOO, J.A., GUNSALUS R.P. and OGORZALEK LOO, R.R. (2009) : S-layer, surface-accessible, and concanavalin A binding proteins of *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei*. *J. Proteome Res.* 8 :1972-1982.
- FRANZMANN, P.D., STACKEBRANDT, E., SANDERSON, K., VOLKMAN, J.K., CAMERON, D.E., STEVENSON, P.L., MCMEEKIN, T.A. and BURTON, H.R. (1988) : *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.* 11:20-27.
- GANTNER, S., ANDERSSON, A.F., ALONSO-SAEZ, L., and BERTILSSON, S. (2011) : Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J. Microbiol. Methods.* 84 :12-18.
- GARCÍA, M.T., GALLEGO, V., VENTOSA, A. and MELLADO, E. (2005) : *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 : 1789-1795.
- GHAH, R., PASIC, L., FERNANDEZ, A.B., MARTIN-CUADRADO, A.-B., MIZUNO, C.M., MCMAHON, K.D., PAPKE, R.T., STEPANAUSKAS, R., RODRIGUEZ-BRITO, B., ROHWER, F., SÁNCHEZ-PORRO, C., VENTOSA, A. and RODRÍGUEZ-VALERA, F. (2011) : New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci. Rep.* 1 :739- 751.
- GIBTAN, A., PARK, K., WOO, M., SHIN, J.-K., LEE, D.-W. and LEE, H.-S. (2017) : Diversity of extremely halophilic archaeal and bacterial communities from commercial salts. *Front. Microbiol.* 8 :1-11.
- GIBTAN, A., SONG, H.S., KIM, J.Y., KIM, Y.B., PARK, N., PARK, K., LEE, S.J., KWON, J., ROH S.W. and LEE, H.S. (2018) : *Halorubrum aethiopicum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from commercial rock salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(1) :416-422.
- GOCHNAUER, M.B., KUSHWAHA, S.C., KATES, M. and KUSHNER, D.J. (1972). : Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* 84:339-349.
- GODINHO, M. and FOX, P.F. (1981) : Ripening of Blue cheese: salt diffusion rates and mould growth. *Milchwissenschaft.* 36 : 329–333.
- GOLYSHINA, O.V., GOLYSHIN, P.N., TIMMIS, K.N. and FERRER, M. (2006) : The “pH optimum anomaly” of intracellular enzymes of *Ferroplasma acidiphilum*. *Environ. Microbiol.* 8:416-425.
- GOLYSHINA, O.V., PIVOVAROVA, T.A., KARAVAIKO, G.I., KONDRATEVA, T.F., MOORE, E.R., ABRAHAM, W.R., LÜNSDORF, H., TIMMIS, K.N., YAKIMOV, M.M. and GOLYSHIN, P.N. (2000) : *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov. sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:997-1006.

- GONZALEZ, C., GUTIERREZ, C. and RAMIREZ, C. (1978) : *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol.* 24:710–715.
- GONZALEZ-CONTRERAS, P., WEIJMA, J. and BUISMAN, C.J.N. (2012) : Kinetics of ferrous iron oxidation by batch and continuous cultures of thermoacidophilic Archaea at extremely low pH of 1.1–1.3. *Appl. Microbiol. Biotech.* 93(3) :1295-1303.
- GRANT, W.D. (2004) : Life at low water activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 359 :1249-1267.
- GRUBER, C., LEGAT, A., PFAFFENHUEMER, M., RADAX, C., WEIDLER, G., BUSSE, H.J. and STAN-LOTTER, H. (2004) : *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles* 8 :431-439.
- GUINEE, T.P. and FOX, P.F. (2004) : Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol 1- General aspects. (Third ed.) 207–259.
- GUINEE, T.P. and FOX, P.M. (2017) : Chapter 13 : Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. Cheese : Chemistry, Physics & Microbiology (Fourth ed.). Academic Press (UK).
- GUPTA, R.S., NAUSHAD, S. and BAKER, S. (2015) : Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaeaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 :1050-1069.
- GUY, L. and ETTEMA, T.J.G. (2011) : The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol.* 19 :580-587.
- GUY, L., SAW, J.H. and ETTEMA, T.J.G. (2014) : The archaeal legacy of eukaryotes: a phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 :a016022.
- GWANG, I.J., GAHEE, K., CHUNG, Y.H. and BYUNG, C.C. (2017) : Prokaryotic community composition in alkaline-fermented skate (*Raja pulchra*). *Food Microbiol.* 61 :72-82.
- HAFENBRADL, D., KELLER, M., DIRMEIER, R., RACHEL, R., ROSSNAGEL, P., BURGGRAF, S., HUBER, H. and STETTER, K.O. (1996) : *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* 166:308-314.
- HAMAIDE, F., KUSHNER, D.J. and SPROTT, G.D. (1983) : Proton motive force and Na⁺/H⁺ antiport in a moderate halophile. *J. Bacteriol.* 156:537-544.
- HAN, D., ZHANG, W.J., CUI, H.L. and LI, Z.R. (2015a) : *Halovenus rubra* sp. nov., isolated from salted brown alga *Laminaria*. *Curr. Microbiol.* 70(1) :91-95.
- HAN, D. and CUI, H.-L. (2014a) : *Halosimplex pelagicum* sp. nov. and *Halosimplex rubrum* sp. nov., isolated from salted brown alga *Laminaria*, and emended description of the genus *Halosimplex*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 :169-173.
- HAN, D. and CUI, H.-L. (2015b) : *Halonubrum laminariae* sp. nov., isolated from the brine of salted brown alga *Laminaria*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 107 :217-223.
- HAN, D., CUI, H.L. and LI, Z.R. (2014b) : *Halopenitus salinus* sp. nov., isolated from the brine of salted brown alga *Laminaria*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 106 :743-749.
- HAN D. and CUI H.-L. (2014c) : *Halobacterium rubrum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Arch. Microbiol.* 196:847–851.
- HARTMANN, R., SICKINGER, H.-D. and OESTERHELT, D. (1980) : Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3821-3825.
- HELLER, L.C., DAVIS, C.R., PEAK, K.K., WINGFIELD, D., CANNONS, A.C., AMUSO, P.T. and CATTANI, J. (2003) : Comparison of methods for DNA isolation from food samples for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1844-1846.
- HENRIET, O., FOURMENTIN, J., DELINCÉ, B. and MAHILLON, J. (2014) : Exploring the diversity of extremely halophilic archaea in food-grade salts. *Int. J. Food Microbiol.* 191 :36-44.
- HESS, M. (2008) : Thermoacidophilic proteins for biofuel production. *Trends Microbiol.* 16:414-419.
- HEZAYEN, F.F., REHM, B.H.A., TINDALL, B.J. and STEINBUCHER, A. (2001) : Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly(glutamic acid). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1133-1142.
- HU, X., LI, A., LV, L., YUAN, C., GUO, L., JIANG, X., JIANG, H., QIAN, G., ZHENG, B., GUO, J. and LI, J. (2014) : High quality draft genome sequence of *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* strain hu-01. *Stand. Genomic Sci.* 9:755-762.
- HUANG, C.Y., GARCIA, J.L., PATEL, B.K.C., CAYOL, J.L., BARESI, L. and MAH, R.A. (2000) : *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibrio costicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 : 615-622.
- HUBER, H., HOHN, M.J., RACHEL, R., FUCHS, T., WIMMER, V.C. and STETTER, K.O. (2002) : A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417 :63–67.
- HUTTON, T. (2002) : Sodium: technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products. *Br. Food J.* 104 :126-152.
- HOCKING, A.D. and PITT, J.I. (1999) : *Xeromyces bisporus* Frazer. In *Encyclopaedia of food microbiology* (ed. R. K. Robinson, C. A. Batt & P. D. Patel) 3 :2329-2333.
- HOLLEY, R.W., APGAR, J., EVERETT, G.A., MADISON, J.T., MARQUISEE, M., MERRILL, S.H., PENSWICK, J.R. and ZAMIR, A. (1965) : Structure of a ribonucleic acid. *Science* 147 :1462-1465.
- HORIKOSHI, K., AONO, R. and NAKAMURA, S. (1993) : The triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1. *Experientia* 49:497–502.
- HOUTSMA, P.C., DEWIT, J.C. and ROMBOUTS, F.M. (1996) : Minimum inhibitory concentration of sodium lactate and sodium chloride for spoilage organisms at different pH values and temperatures. *J. Food Protect.* 59 :1300-1304.
- ISHINO, Y. and ISHINO, S. (2012) : Rapid progress of DNA replication studies in Archaea, the third domain of life. *Science China Life Sciences* 55(5) :386–403.
- ITO, T., SUZUKI, K., SANCHEZ, P.C. and NAKASE, T. (2003) : *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic *Crenarchaeote* isolated from a hot spring at Mt Maquilung, Philippines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1149-1154.
- JACQUEMET, A., BARBEAU, J., LEMIÈGRE, L. and BENVÉGU, T. (2009) : Archaeal tetraether bipolar lipids: structures, functions and applications. *Biochimie* 91 :711-717.

- JAHN, U., GALLENBERGER, M., PAPER, W., JUNGAS, B., EISENREICH, W., STETTER, K.O., RACHEL, R. and HUBER, H., (2008) : *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* 190:1743-1750.
- JARA, C., MATEO, E., GUILLAMÓN, J.M., TORIJA, M.J. and MAS, A. (2008) : Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* 128 : 336-341.
- JONES, A.G., EWING, C.M. and MELVIN, M.V. (1981) : Biotechnology of solar salt fields. *Hydrobiologia* 82:391-406
- JONES, W.J., NAGLE, D.P., JR. And WHITMAN, W.B. (1987) : Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev.* 51 :135-177.
- JUNG, J.Y., LEE, S.H., LEE, H.J. and JEON, C.O. (2013) : Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood. *Food Microbiol.* 34(2) :360-368.
- KAMEKURA, M., DYALL-SMITH, M.L., UPASANI, V., VENTOSA, A. and KATES, M. (1997) : Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halonubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halonubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:853-857.
- KANDLER, O. and KÖNIG, H. (1998) : Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell. Mol. Life Sci.* 54 :305-308.
- KATAYAMA, T., YOSHIOKA, H., MOCHIMARU, H., MENG, X.-Y., MURAMOTO, Y., USAMI, J., IKEDA, H., KAMAGATA, Y. and SAKATA, S. (2014) : *Methanohalophilus levihalophilus* sp. nov., a slightly halophilic, methylotrophic methanogen isolated from natural gas-bearing deep aquifers, and emended description of the genus *Methanohalophilus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 :2089-2093.
- KATES, M. (1993) : Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia* 49 :1027-1036.
- KAURI, T., WALLACE, R. and KUSHNER, D.J. (1990) : Nutrition of the halophilic archaeobacterium, *Haloflex volcanii*. *Syst. Appl. Microbiol.* 13 :14-18.
- KELMAN, L.M. and KELMAN, Z. (2018) : Do Archaea Need an Origin of Replication ? *Trends Microbiol.* 26(3) :172-174.
- KIM, M.S., ROH, S.W. and BAE, J.W. (2010) : *Cobetia crustatorum* sp. nov., a novel slightly halophilic bacterium isolated from traditional fermented seafood in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:620-626.
- KIM, T.Y., KIM, S.J., PARK, S.J., KIM, J.G., CHA, I.T., JUNG, M.Y., LEE, S.A., ROH, S.W., YIM, K.J., ITOH, T. and RHEE, S.K. (2014) : *Natronomonas gomsonensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *Antonie van Leeuwenhoek.* 104 :627-635.
- KOCUR, M. and HODGKISS, W. (1973) : Taxonomic status of the genus *Halococcus* Schoop. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23:151-156.
- KOH, H.W., SONG, H.S., SONG, U., YIM, K.J., ROH, S.W. and PARK, S.J. (2015) : *Halolamina sediminis* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from solar salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 : 2479-2484.
- KONDO, Y., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M., TAKAHASHI-ANDO, N., FUKUSHIMA, Y., YOSHIDA, Y. and USAMI, R. (2015) : *Halonubrum gandharaense* sp. nov., an alkaliphilic haloarchaeon from commercial rock salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(8):2345-2350.
- KONDO, Y., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M., TANAKA, A., TAKAHASHI-ANDO, N., FUKUSHIMA, Y., YOSHIDA, Y., IHARA, K. and USAMI, R. (2016) : *Haloparvum alkalitolerans* sp. Nov., alkali-tolerant haloarchaeon isolated from commercial salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66(12) :5314-5319.
- KÖNNEKE, M., BERNHARD, A.E., DE LA TORRE, J.R., WALKER, C.B., WATERBURY, J.B. and STAHL, D.A. (2005) : Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437 :543-546
- KULICHEVSKAYA, I.S., MILEKHINA, E.I., BOREZINKOV, I.A., ZVYAGINTSEVA, I.S. and BELYAEV, S.S. (1991) : Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiol.* 60:596-601.
- KUSHNER, D.J. (1978) : Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In: Kushner DJ (ed) *Microbial life in extreme environments* 317-368.
- KUSHNER, D.J., BAYLEY, S.T., BORING, J., KATES, M. and GIBBONS, N. E. (1964) : Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* 10:483-497.
- KUSHWAHA, S.C., JUEZ-PÉREZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F., KATES, M. and KUSHNER, D.J. (1982) : Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Can. J. Microbiol.* 28:1365-1372.
- LAKE, J.A., HENDERSON, E., OAKES, M. and CLARK, M.W. (1984). Eocytes: A new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3786-3790.
- LANE, D.J. (1991) : 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, 115-147.
- LANGWORTHY, T.A. (1977) : Long-chain diglycerol tetraethers from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta* 487 :37-50.
- LANGWORTHY, T.A., MAYBERRY, W.R. and SMITH, P.F. (1972) : Lipids of *Thermoplasma acidophilum*. *J. Bacteriol.* 112:1193-1200.
- LANGWORTHY, T.A., SMITH, P.F. and MAYBERRY, W.R. (1974) : Long-chain glycerol diether and polyol dialkyl glycerol triether lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 119:106-116.
- LANYI, J.K. (1974) : Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38:272-290.
- LANYI, J.K. and LUECKE, H. (2001) : Bacteriorhodopsin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(4) :415-419.
- LANYI, J.K. and MACDONALD, R.E. (1976) : Existence of electrogenic hydrogen/sodium transport in *Halobacterium* cell envelope vesicles. *Biochemistry* 15:4608-4614.
- IHARA, K., WATANABE, S. and TAMURA, T. (1997) : *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:73-77.
- LARSEN, H. (1984) : Family V. *Halobacteriaceae*, Gibbons (1974). In N. R. Kreig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 261-267.
- LEWIN, R.A., KRIENITZ, L., GOERICKE, R., TAKEDA, H. and HEPPELLE, D. (2000) : *Picocystis salinarum* gen. et sp. nov. (Chlorophyta) a new picoplanktonic green alga. *Phycologia* 39:560-565.

- LI, W.J., SCHUMANN, P., ZHANG, Y.Q., CHEN, G.Z., TIAN, X.P., XU, L.H., STACKEBRANDT, E. and JIANG, C.L. (2005) : *Marinococcus halotolerans* sp. nov., isolated from Qinghai, north-west China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 :1801-1804.
- LI, X.-Q. and DU, D. (2014) : Variation, evolution, and correlation analysis of C+G content and genome or chromosome size in different kingdoms and phyla. *PLoS ONE*, 9(2) :e88339.
- LLOYD, J.R., LOVLEY, D.R. and MACASKIE, L.E. (2003) : Biotechnological application of metal-reducing microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 53:85-128.
- LO, N., LEE, S.H., JIN, H.M., JUNG, J.Y., SCHUMANN, P. and JEON, C.O. (2015) : *Garicola koreensis* gen. nov., sp. nov., isolated from saeu-jeot, traditional Korean fermented shrimp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 :1015-1021.
- LOPETCHARAT, K., CHOI, Y. J., PARK, J. W. and DAESCHEL, M. A. (2001) : Fish sauce products and manufacturing: a review. *Food Rev. Int.* 17 :68-88.
- LPSN, Parte C.A., Bacterio.net, List of Procaryotic Names with Standing Nomenclature.
- LU, Z. Z., LI, Y., ZHOU, Y., CUI, H. L. and LI, Z. R. (2017) : *Halobacterium litoreum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67:4095-4099.
- LUNDBERG, J.O., WEITZBERG, E., COLE, J.A., and BENJAMIN, N. (2004) : Nitrate, bacteria and human health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 : 593–602.
- LUNDBERG, K.S., SHOEMAKER, D.D., ADAMS, M.W., SHORT, J.M., SORGE, J.A. and MATHUR, E.J. (1991) : High- fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108:1–6.
- LUNESTAD, B. J., GREVSKOTT, D.H., ROIHA, I.S. and SVANEVIK, C.S. (2018). Microbiota of *Lutefisk*, a Nordic traditional cod dish with a high pH. *Food Control* 90 : 312-316.
- MADIGAN, M.T. and MARTINKO, J.M. (2006) : Brock biology of micro-organisms, 11th edn. Englewood Cliffs N.J.: Prentice Hall.
- MAGRUM, L.J., LUEHRSEN, K.R. and WOESE, C.R. (1978) : Are extreme halophiles actually « Bacteria » ? *J. Mol. Evol.* 11 :1-8.
- MANCINELLI, R.L., LANDHEIM, R., SÁNCHEZ-PORRO, C., DORNMAYR-PFAFFENHUEMER, M. and GRUBER, C. (2009) : *Halorubrum chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(8) :1908–1913.
- MARTIN, W. F., GARG, S. and ZIMORSKI, V. (2015) : Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370 :20140330.
- MATHRANI, I.M., BOONE, D.R., MAH, R.A., FOX, G.E. and LAU, P.P. (1988) : *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylytrophic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 139-142.
- MASAI, H. and FOIANI, M. (2017) : DNA replication, from old principles to new discoveries. *Adv. Exp. Med. Biol.* 10.
- MASSANA, R., MURRAY, A.E., PRESTON, C.M. and DELONG, E.F. (1997) : Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 :50-56.
- MATSUMI, R., ATOMI, H., DRIESSEN, A.J.M. and VANDEROOST, J. (2011) : Isoprenoid biosynthesis in Archaea - biochemical and evolutionary implications. *Res. Microbiol.* 162 :39-52.
- MATSUNO, Y., SUGAI, A., HIGASHIBATA, H., FUKUDA, W., UEDA, K., UDA, I., SATO, I., ITOH, T., IMANAKA, T. and FUJIWARA, S. (2009) : Effect of growth temperature and growth phase on the lipid composition of the archaeal membrane from *Thermococcus kodakaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 :104-108.
- MCGENITY, T.J., GEMMELL, R.T., GRANT, W.D. and STAN-LOTTER, H. (2000) : Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Env. Microbiol.* 2 :243-250.
- MELLADO, E., MOORE, E.R.B., NIETO, J.J. and VENTOSA, A. (1996) : Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 : 817-821.
- MENASRIA, T., AGUILERA, M., HOCINE, H., BENAMMAR, L., AYACHI, A., SI BACHIR, A., DEKAK, A. and MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. (2018) : Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiol. Res.* 207 :289-298.
- MESEGUER, I. and RODRIGUEZ-VALERA, F. (1986) : Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*. *J. Gen. Microbiol.* 132:3061-3068.
- MESEGUER, I., TORREBLANCA, M. and KONISHI, T. (1995) : Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6. *J. Biol. Chem.* 270:6450-6455.
- MEVARECH, M., FROLOW, F. and GROSS, I.M. (2000) : Halophilic enzymes : proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86 :155-164.
- MINEGISHI, H., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M. and USAMI, R. (2015). *Halococcus agarilyticus* sp. nov., an agar-degrading haloarchaeon isolated from commercial salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(5) :1634-1639.
- MINEGISHI, H., ECHIGO, A., NAGAOKA, S., KAMEKURA, M. and USAMI, R. (2010) : *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., ENOMOTO, S., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KONDO, Y., INOMA, A., KAMEKURA, M., TAKAI, K., ITOH, T., OHKUMA, M., IHARA, K., TAKAHASHI-ANDO, N., FUKUSHIMA, Y., ISHII, S., YOSHIDA, Y. and USAMI, R. (2017) : *Salinarchaeum chitinilyticum* sp. nov., a chitin-degrading haloarchaeon isolated from commercial salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 :2274-2278.
- MINEGISHI, H., SHIMOGAKI, R., ENOMOTO, S., ECHIGO, A., KONDO, Y., NAGAOKA, S., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M., NUNOURA, T., TAKAI, K. and USAMI, R. (2016) : *Halopiger thermotolerans* sp. nov., a thermo-tolerant haloarchaeon isolated from commercial salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 :4975-4980.
- MINEGISHI, H., YAMAUCHI, Y., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M. and USAMI, R. (2013) : *Halarchaeum nitratireducens* sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial sea salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(11):4202-4206.
- MOSCHETTI, G., APONTE, M., BLAIOTTA, G., CASABURI, A., CHIURAZZI, M., VENTORINO, V. and VILLANI, F. (2006) : Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. *Annals Microbiol.* 56(2) :119-127.
- MOISSEL-EICHINGER, C. and HUBER, H. (2011) : Archaeal symbionts and parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 364-370.

- MOISSE-EICHINGER, C., PAUSAN, M., TAFFNER, J., BERG, G., BANG, C. and SCHMITZ, R.A. (2018) : Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends Microbiol.* 26(1) :70-85.
- MOISSE-EICHINGER, C., PROBST, A.J., BIRARDA, G., AUERBACH, A., KOSKINEN, K., WOLF, P. and HOLMAN, H.-Y.N. (2017) : Human age and skin physiology shape diversity and abundance of Archaea on skin. *Sci. Rep.* 7 :4039.
- MORI, K., NURCAHYANTO, D.A., KAWASAKI, H., LISDIYANTI, P., YOPI and SUZUKI K.I. (2016) : *Halobium palmae* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66(10) :3799-3804.
- GUINEE, T.P. and FOX, P.M. (2017) : Chapter 38 : Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. Cheese : Chemistry, Physics & Microbiology (Fourth ed.). Academic Press (UK).
- MULLAKHANBHAI, M.F. and LARSEN, H. (1975): *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch. Microbiol.* 104:207-214.
- MÜLLER, J.A. and DASSARMA, S. (2005): Genomic analysis of anaerobic respiration in the archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC-1: dimethyl sulfoxide and trimethylamine N-oxide as terminal electron acceptors. *J. Bacteriol.* 187:1659-1667.
- MÜLLER, J.A. and OREN, A. (2003): Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles* 7:261-266.
- NAGAOKA, S., MINEGISHI, H., ECHIGO, A. and USAMI, R. (2010): *Halostagnicola kamekurae* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from solar salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:2828-2831.
- NAGAOKA, S., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M. and USAMI, R. (2011): *Halostagnicola alkaliphila* sp. nov., an alkaliphilic haloarchaeon from commercial rock salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1149-1152.
- NAGUIB, M.M.A., SABBOUR, M.M. and NOUR, M.M. (1979) : The effect of salting rate and initial count of *Salmonella typhi* in Domiati cheese milk on its longevity during pickling. *Arch. Lebensmittelhygiene.* 30: 140-151.
- NAMWONG, S., TANASUPAWAT, S., VISESSANGUAN, W., KUDO, T. and ITOH, T. (2007): *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2199-2203.
- NAMWONG, S., TANASUPAWAT, S., KUDO, T. and ITOH, T. (2011): *Haloarcula salaria* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov. from salt in Thai fish sauce. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 231-236.
- NARASINGARAO, P., PODELL, S., UGALDE, J.A., BROCHIER-ARMANET, C., EMERSON, J.B., BROCK, J.J., HEIDELBERG, K.B., BANFIELD, J.F. and ALLEN, E.E. (2012) : De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *ISME J.* 6 :81-93.
- NÄTHER, D.J. and RACHEL, R. (2004) : The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem. Soc. Trans.* 32 :199–203.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine.
- NG, W.V., KENNEDY, S.P., MAHAIRAS, G.G., BERQUIST, B., PAN, M., SHUKLA, H.D., LASKY, S.R., BALIGA, N.S., THORSSON, V., SBROGNA, J., SWARTZELL, S., WEIR, D., HALL, J., DAHL, T.A., WELTI, R., GOO, Y.A., LEITHAUSER, B., KELLER, K., CRUZ, R., DANSON, M.J., HOUGH, D.W., MADDOCKS, D.G., JABLONSKI, P.E., KREBS, M.P., ANGEVINE, C.M., DALE, H., ISENBERGER, T.A., PECK, R.F., POHLSCHRODER, M., SPUDICH, J.L., JUNG, K.W., ALAM, M., FREITAS, T., HOU, S., DANIELS, C.J., DENNIS, P.P., OMER, A.D., EBHARDT, H., LOWE, T.M., LIANG, P., RILEY, M., HOOD, L. and DASSARMA, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12176-12181.
- NIEMETZ, R., KÄRCHER, U., KANDLER, O., TINDALL, B. and KÖNIG, H. (1997) : The cell wall polymer of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus*. *Eur. J. Biochem.* 249:905-911.
- NORTON, C.F. and GRANT, W.D. (1988) : Survival of *Halobacteria* within fluid inclusions in salt crystals. *J. Gen. Microbiol.* 134 :1365-1373.
- NUNOURA, T., TAKAKI, Y., KAKUTA, J., NISHI, S., SUGAHARA, J., KAZAMA, H., CHEE, G.J., HATTORI, M., KANAI, A., ATOMI, H., TAKAI, K. and TAKAMI, H. (2011) : Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* 39 :3204-3223.
- O'CONNOR, E.M. and SHAND, R.F. (2002) : Halocins and sulfobactins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:23-31.
- OGER, P.M. and CARIO, A. (2013) : Adaptation of the membrane in Archaea. *Biophys. Chemis.* 183 :42-56.
- OLLIVIER, B., FARDEAU, M., CAYOL, J., MAGOT, M., PATEL, B., PRENSIER, G. and GARCIA, J. (1998) : *Methanocaldococcus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48(3):821-828.
- OREN, A. (1983) : *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33 :381-386.
- OREN, A. (1988). The microbial ecology of the Dead Sea. In: Marshall KC (ed) *Advances in microbial ecology*, 10:193–229.
- OREN, A. (1991) : Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of fumarate. *J. Gen. Microbiol.* 137:1387-1390.
- OREN, A. (1994) : The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 13 : 415–440.
- OREN, A. (1999) : Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 :334-348.
- OREN, A. (2003) : Halophilic Microorganisms and their Environments. *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats*. Volume 5.
- OREN, A. (2005a) : A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, 1:2.
- OREN, A. (2005b) : Halophilic Microorganisms: Physiology and Phylogeny. In : Joseph Seckbach. Origins, Evolution and Diversity of Life. *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats and Astrobiology*.
- OREN, A. (2006) : The order *Halobacteriales*. The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.
- OREN, A. (2014a) : Life at high salt concentrations. *The Prokaryotes : prokaryotic communities and ecophysiology. Fourth Edition*.

- OREN, A. (2014b) : The Family *Halobacteriaceae*. *The Prokaryotes. Other Major Lineages of Bacteria and Archaea, Fourth Edition*.
- OREN, A., GINZBURG, M., GINZBURG, B.Z., HOCHSTEIN, L.I. and VOLCANI, B.E. (1990) : *Haloarcula marismortui* (*Volcani*) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:209–210.
- OREN, A., GUREVICH, P., GEMMELL, R.T. and TESKE, A. (1995) : *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 :747-754.
- OREN, A., PRIEL, N., SHAPIRO, O. and SIBONI, N. (2006) : Buoyancy studies in natural communities of square gas-vacuolate archaea in saltern crystallizer ponds. *Saline Systems* 2:4.
- OREN, A. and RODRIGUEZ-VALERA, F. (2001) : The contribution of halophilic bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:123-130.
- PAIK, H.-D. and LEE, J.-Y. (2014) : Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. *Meat Science*. 97 :609-614.
- PARK, E.J., CHANG, H.W., KIM, K.H., NAM, Y.D., ROH, S.W. and BAE, J.W. (2009) : Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi. *J. Microbiol.* 47(6) :682-685.
- PAROLIS, H., PAROLIS, L.A.S., BOÂN, I.F., RODRÍGUEZ-VALERA, F., WIDMALM, G., MANCA, M.C., JANSSON, P.E. and SUTHERLAND, I.W. (1996) : The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic archaeon *Haloflex mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydr. Res.* 295:147-156.
- PATEREK, J.R. and SMITH, P.H. (1988) : *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 :122-123.
- PEÇONEK, J., GRUBER, C., GALLEGÓ, V., VENTOSA, A., BUSSE, H.J., KÄMPFER, P., RADAX, C. and STAN-LOTTER, H. (2006) : Reclassification of *Pseudomonas beijerinckii* Hof 1935 as *Chromohalobacter beijerinckii* comb. nov., and emended description of the species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 :1953-1957.
- PEDERSEN, K. (1997) : Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiol. Rev.* 20 :399-414.
- PETTER, H.F.M. (1931) : On the bacteria of salted fish. *Proc. K. Ned. Akad. Wet. B.* 34 :1417-1423.
- PHAM, N.-P., LAYEC, S., DUGAT-BONY, E., VIDAL, M., IRLINGER, F. and MONNET, C. (2017) : Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics*. 18 : 955.
- PRANGISHVILI, D., BASTA, T., GARRETT, R. A. and KRUPOVIC, M. (2016) : Viruses of the Archaea. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- PRESTON, C.M., WU, K.Y., MOLINSKI, T.F. and DELONG, E.F. (1996) : A psychrophilic *Crenarchaeon* inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6241-6246.
- QUIJADA, N.M., MANN, E., WAGNER, M., RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., HERNÁNDEZ, M. and SCHMITZ-ESSER, S. (2017) : Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hard cheese surfaces and its production environment. *Int. J. Food Microbiol.* 267 : 54-61.
- RANTSIOU, K., URSO, R., IACUMIN, L., CANTONI, C., CATTANEO, P., COMI, G. and COCOLIN, L. (2005) : Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 :1977-1986.
- RATTRAY, F.P. and FOX, P.F. (1999) : Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* 82:891–909.
- RAYMOND, J.C. and SISTROM, W.R. (1967) : The isolation and preliminary characterization of a halophilic photosynthetic bacterium. *Arch. Microbiol.* 59(1) :255–268.
- REECE, J.B., URRY, L.A., CAIN, M.L., WASSERMAN, S.A., MINORSKY, P.V. and JACKSON, R.B. (2012) : Campbell Biology (9th Edition), Pearson.
- ROBINSON, J.L., PYZYNA, B., ATRASZ, R.G., HENDERSON, C.A., MORRILL, K.L., BURD, A.M., DESOUCY, E., FOGLEMAN, R.E., NAYLOR, J.B., STEELE, S.M., ELLIOTT, D.R., LEYVA, K.J. and SHAND, R.F. (2005) : Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) as revealed by Arrhenius plots. *J. Bacteriol.* 187: 923-929.
- RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G. and KUSHNER, D.J. (1982) : Halocins: Salt dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.* 28:151-154.
- ROH, S.W., KIM, K.H., NAM, Y.D., CHANG, H.W., PARK, E.J. and BAE, J.W. (2010a) : Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J.* 4:1-16.
- ROH, S.W., LEE, M.L. and BAE, J.W. (2010b) : *Haladaptatus cibarius* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from seafood, and emended description of the genus *Haladaptatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 :1187-1190.
- ROH, S.W. and BAE, J.W. (2009a) : *Halonubrum cibi* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from salt-fermented seafood. *J. Microbiol.* 47 :162– 166.
- ROH, S.W., NAM, Y.D., CHANG, H.W., KIM, K.H., LEE, H.J., OH, H.M. and BAE, J.W. (2007a) : *Natronococcus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from shrimp jeotgal, a traditional fermented seafood from Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 :2129–2131.
- ROH, S.W., NAM, Y.D., CHANG, H.W., SUNG, Y., KIM, K.H., OH, H.M. and BAE, J.W. (2007b) : *Halalkalicoccus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon from shrimp jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 :2296–2298.
- ROH, S.W., NAM, Y.D., CHANG, H.W., KIM, K.H., SUNG, Y., KIM, M.S., OH, H.M. and BAE, J.W. (2009b) : *Haloterrigena jeotgali* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from salt-fermented food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 :2359–2363.
- ROJO, M.C., TORRES PALAZZOLO, C., CUELLO, R., GONZÁLEZ, M., GUEVARA, F., PONSONE, M.L., MERCADO, L.A., MARTÍNEZ, C. and COMBINA, M. (2017) : Incidence of osmophilic yeasts and *Zygosaccharomyces rouxii* during the production of concentrate grape juices. *Food Microbiol.* 64 :7-14.
- ROMANENKO, L.A., TANAKA, N., SVETASHEV, V.I. and FALSEN, E. (2013) : Description of *Cobetia amphilecti* sp. nov., *Cobetia litoralis* sp. nov. and *Cobetia pacifica* sp. nov., classification of *Halomonas halodurans* as a later heterotrophic synonym of *Cobetia marina* and emended descriptions of the genus *Cobetia* and *Cobetia marina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63 : 288-297.
- ROMANO, I., LAMA, L., NICOLAUS, B., POLI, A., GAMBACORTA, A. and GIORDANO, A. (2006) : *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52 : 339–348.

- ROSENBERG, E., DELONG, F.E., LORY, S., STACKEBRANDT, E. and THOMPSON, F. (2014) : The Prokaryotes. *Other Major Lineages of Bacteria and Archaea, Fourth Edition*.
- RUSCH, A. (2016) : Archaea. In: Kennish M.J. (eds) Encyclopedia of Estuaries. *Encyclopedia of Earth Sciences Series*.
- SÁNCHEZ-PORRO, C., TOKUNAGA, H., TOKUNAGA, M. and VENTOSA, A. (2007): *Chromohalobacter japonicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Japanese salty food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2262-2266.
- SAVAGE, K.N., KRUMHOLZ, L.R., OREN, A. and EL SHAHED, M.S. (2007) : *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, high-sulfide spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:19-24.
- SAVANT, D.V. and RANADE, D.R. (2004) : Application of *Methanobrevibacter acididurans* in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 50:109-114.
- SCHÄFER, G., ENGELHARD, M. and MÜLLER, V. (1999) : Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:570-620.
- SCHLEIFER, K.-H. and JULIA, A.B. (2009) : Genus I. *Staphylococcus*. Rosenbach 1884, 18AL (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958, 153.) DE VOS, P., GARRITY, G.M., JONES, D., KRIEG, N.R., LUDWIG, W., RAINEY, F.A., SCHLEIFER, K.-H. and WHITMAN, W.B : Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd Ed. Vol.3. The Firmicutes.
- SCHLEIFER, K.H. and KLOOS, W.E. (1975) : Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Evol. Bact.* 25 : 50-61.
- SCHLEIFER, K.H., STEBER, J. and MAYER, H. (1982). Chemical composition and structure of the cell wall of *Halococcus morrhuae*. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* C3: 171-178.
- SCHNEEGURT, M.A. (2012) : Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and archaea. *Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms*. Vreeland, R.H. (Ed.) VIII, 244.p.
- SCHUBERT, B.A., LOWENSTEIN, T.K., TIMOFEEFF, M.N. and PARKER, M.A. (2010) : Halophilic Archaea cultured from ancient halite, Death Valley, California. *Environ. Microbiol.* 12 :440-454.
- SCHORNSTEINER, E., MANN, E., BEREUTER, O., WAGNER, M. and SCHMITZ-ESSER, S. (2014) : Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. *Int. J. Food Microbiol.* 180, 88–97.
- SEARCY, D.G. and STEIN, D.B. (1980) : Nucleoprotein subunit structure in an unusual prokaryotic organism: *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta* 609:180-195.
- SEHGAL, S.N., KATES, M. and GIBBONS, N.E. (1962) : Lipids of *Halobacterium cutinibrum*. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40: 69-81.
- SEILER, H., A. BLEICHER, H.-J. BUSSE, J. HUFNER, and S. SCHERER. (2012) : *Psychroflexus halocaei* sp. nov., isolated from a microbial consortium on a cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:1850–1856.
- SONG, H.S., CHA, I.T., YIM, K.J., LEE, H.W., HYUN, D.W., LEE, S.J., RHEE, S.K., KIM, K.N., KIM, D., CHOI, J.S., SEO, M.J., CHOI, H.J., BAE, J.W., RHEE, J.K., NAM, Y.D. and ROH, S.W. (2014) : *Halapricum salinum* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from non-purified solar salt. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105 :979-986.
- SOYLAK, M., PEKER, D.S.K. and TURKOGLU, O. (2008) : Heavy metal contents of refined and unrefined table salts from Turkey, Egypt and Greece. *Environ. Monit. Assess.* 143:267–272.
- SHAND, R.F. and LEYVA, K.J. (2007) : Peptide and protein antibiotics from the domain archaea: halocins and sulfolobocins. In M. A. Riley & M. A. Chavan, eds. *Bacteriocins: Ecology and Evolution* 109.
- SHIMANE, Y., HATADA, Y., MINEGISHI, H., MIZUKI, T., ECHIGO, A., MIYAZAKI, M., OHTA, Y., USAMI, R., GRANT, W.D. and HORIKOSHI, K. (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., HATADA, Y., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., NAGAOKA, S., MIYAZAKI, M., OHTA, Y., MARUYAMA, T., USAMI, R., GRANT, W.D. and HORIKOSHI, K. (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.
- SHIMANE, Y., NAGAOKA, S., MINEGISHI, H., KAMEKURA, M., ECHIGO, A., HATADA, Y., ITO, T. and USAMI, R. (2013) : *Natronoarchaeum philippinense* sp. nov., a haloarchaeon isolated from commercial solar salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63 :920-924.
- SHIMANE, Y., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M., TSUBOUCHI, T., USUI, K., MARUYAMA, T., USAMI, R. and HATADA, Y. (2015) : *Halarchaeum grantii* sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from a commercial salt sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 :3830-3835.
- SHIMOSHIGE, H., YAMADA, T., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T. and USAMI, R. (2013) : *Halobaculum magnesiophilum* sp. nov., a magnesium-dependent haloarchaeon isolated from commercial salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 861-866
- SUTHERLAND, B.J. (2002) : Cheese: Salting of Cheese. In H. Roginski, ed. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford.
- SINGH, A. and SINGH, A.K. (2017) : Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. *Biotech. Letters* 39 :1793-1800.
- SJOHOLM, C. and ANTRANIKIAN, G. (1997) : (*Thermococcus*) amylase and pullulanase. *Int. Pat. Class.* C12N 9/26, 9/44.
- SOROKIN, D.Y., ABBAS, B., MERKEL, A.Y., RIJPSSTRA, W.I., DAMSTE, J.S., SUKHACHEVA, M.V. and VAN LOOSDRECHT, M.C. (2015). *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 :3739-3745.
- SOROKIN, D.Y., TOUROVA, T.P. and MUYZER, G. (2005) : Oxidation of thiosulfate by an haloarchaeon isolated from hypersaline habitat. *Extremophiles* 9:501-504.
- SPANG, A., SAW, J.H., JØRGENSEN, S.L., ZAREMBA-NIEDZWIEDZKA, K., MARTIJN, J., LIND, A.E., VAN EIJK, R., SCHLEPER, C., GUY, L. and ETTEMA, T.J.G. (2015) : Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521 :173-179.
- SPINNLER, H.-E. (2017) : Chapter 36 : Surface mold-ripened cheeses. Cheese : Chemistry, Physics & Microbiology (Fourth ed.). Academic Press (UK).

- STAN-LOTTER, H., PFAFFENHUEMER, M., LEGAT, A., BUSSE, H.J., RADAX, C. and GRUBER, C. (2002) : *Halococcus dombrovskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52 :1807-1814.
- STEBER, J. and SCHLEIFER, K.H. (1975) : *Halococcus morrhuae*: a sulfated heteropolysaccharide as the structural component of the bacterial cell wall. *Arch. Microbiol.* 105 :173-177.
- STEVENSON, A., CRAY, J.A., WILLIAMS, J.P., SANTOS, R., SAHAY, R., NEUENKIRCHEN, N., MCCLURE, C.D., GRANT, I.R., HOUGHTON, J.D., QUINN, J.P., TIMSON, D.J., PATIL, S.V., SINGHAL, R.S., ANTÓN, J., DIJKSTERHUIS, J., HOCKING, A.D., LIEVENS, B., RANGEL, D.E., VOYTEK, M.A., GUNDE-CIMERMAN, N., OREN, A., TIMMIS, K.N., MCGENTY, T.J. and HALLSWORTH, J.E. (2015) : Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *ISME Journal* 9 :1333-1351.
- TAKASHINA, T., HAMAMOTO, T., OTOZAI, K., GRANT, W.D. and HORIKOSHI, K. (1990) : *Haloarcula japonica* sp. nov., a new triangular halophilic archaeobacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 13 :177-181.
- TALON, R., LEROY-SÉTRIN, S. and FADDA, S. (2002) : Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. *Research Sign. Post.* 175-191.
- TANASUPAWAT, S., NAMWONG, S., KUDO, T. and ITOH, T. (2008-2009) : Identification of halophilic bacteria from fish sauce (*nam-pla*) in Thailand. *J. Cult. Coll.* 6 :69-75.
- TAPINGKAE, W., TANASUPAWAT, S., ITOH, T., PARKIN, K.L., BENJAKUL, S., VIESSANGUAN, W. and VALYASEVI, R. (2008) : *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 :2378-2383.
- TAPINGKAE, W., PARKIN, K.L., TANASUPAWAT, S., KRUEANATE, J., BENJAKUL, S. and VIESSANGUAN, W. (2010a) : Whole cell immobilization of *Natrinema gari* BCC 24369 for histamine degradation. *Food Chem.* 120:842-849.
- TAPINGKAE, W., TANASUPAWAT, S., PARKIN, K.L., BENJAKUL, S. and VIESSANGUAN, W. (2010b) : Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme Microb. Technol.* 46:92-99.
- TAKAI, K., NAKAMURA, K., TOKI, T., TSUNOGAI, U., MIYAZAKI, M., MIYAZAKI, J., HIRAYAMA, H., NAKAGAWA, S., NUNOURA, T. and HORIKOSHI, K. (2008) : Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 :10949-10954.
- THIEL, V. (2011) : Archaea. In: Reitner J., Thiel V. (eds) *Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series*.
- THONGTHAI, C. and SUNTINANALERT, P. (1991) : Halophiles in Thai fish sauce (*nam-pla*). In: Rodriguez-Valera F. (ed), *General and applied aspects of halophilic microorganisms* 381-388.
- THONGTHAI, C., MCGENTY, T.J., SUNTINANALERT, P. and GRANT, W.D. (1992) : Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from traditionally fermented Thai fish sauce (*nam-pla*). *Lett. Appl. Microbiol.* 14 :111-114.
- TINDALL, B.J. and TRÜPER, H.G. (1986) : Ecophysiology of the aerobic halophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 7:202-212
- TOMLINSON, G.A., JAHNKE, L.L. and HOCHSTEIN, L.I. (1986) : *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:66-70.
- TOMPKIN, R. B., CHRISTIANSEN, L. N., and SHAPARIS, A. B. (1978) : Enhancing nitrite inhibition of *Clostridium botulinum* with isoascorbate in perishable canned cured meat. *Appl. Env. Microbiol.* 35 : 59-61.
- TOR, J.M. and LOVLEY, D.R. (2001). Anaerobic degradation of aromatic compounds coupled to Fe(III) reduction by *Ferroglobus placidus*. *Environ. Microbiol.* 67:1363-1365.
- TORREBLANCA, M., MESEGUER, I. and VENTOSA, A. (1994) : Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:201-205.
- TRUJILLO, M.E. and GOODFELLOW, M. (2015) : *Brevibacterium*. In Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria (eds W.B., Whitman, F., Rainey, P., Kämpfer, M., Trujillo, J., Chun, P., DeVos, B., Hedlund and S., Dedysh).
- TURQUE, A.S., BATISTA, D., SILVEIRA, C.B., CARDOSO, A.M., VIEIRA, R.P., MORAES, F.C., CLEMENTINO, M.M., ALBANO, R.M., PARANHOS, R., MARTINS, O.B. and MURICY, G. (2010) : Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. *PLoS ONE*, 5:e1577
- ULRIH, N.P., GMAJNER, D. and RASPOR, P. (2009) : Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 :249-260.
- VAN DE POL, J.A.A., VAN BEST, N., MBAKWA, C.A., THIJS, C., SAVELKOU, P.H., ARTS, I.C.W., ARTS, I.C.W., HORNEF, M.W., MOMMERS, M. and PENDERS, J. (2017) : Gut Colonization by Methanogenic Archaea Is Associated with Organic Dairy Consumption in Children. *Front. Microbiol.* 8 :355.
- VARKI, A., CUMMINGS, R.D., ESKO, J.D., FREEZE, H., STANLEY, P., BERTOZZI, C., HART, G. and ETZLER, M. (2017) : Essentials of Glycobiology. 3rd Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- VAZ-VELHO, M. (2003) : Smoked foods - Production. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 5302-5309.
- VENTOSA, A. and DE LA HABA, R.R. (2015) : Archaea. In: Gargaud M. et al. (eds) *Encyclopedia of Astrobiology*.
- VENTOSA, A., GUTIERREZ, M.C., GARCIA, M.T. and RUIZ-BERRAQUERO, F. (1989) : Classification of "*Chromobacterium marismortui*" in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:382-386.
- VENTOSA, A. and NIETO, J.J. (1995) : Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:85-94.
- VENTOSA, A. (2005) : Genus III. *Chromohalobacter*. Ventosa, Gutierrez, García and Ruiz-Berraquero (1989). Arahal, García, Ludwig, Schleifer and Ventosa 2001a, 1446. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 316-319. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. New York: Springer.
- VISWESWARAN, G.R.R., DIJKSTRA, B.W., and KOK, J. (2011) : Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea - a comparative view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92:921-928
- VREELAND, R.H. (2005) : Genus II. *Halomonas*. Vreeland, Litchfield, Martin, and Elliot 1980, 494VP emend. Dobson and Franzmann 1996, 557. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 300-313. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. New York: Springer.
- WAGNER, G., HARTMANN, R. and OESTERHELT, D. (1978) : Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* 89:169-179.

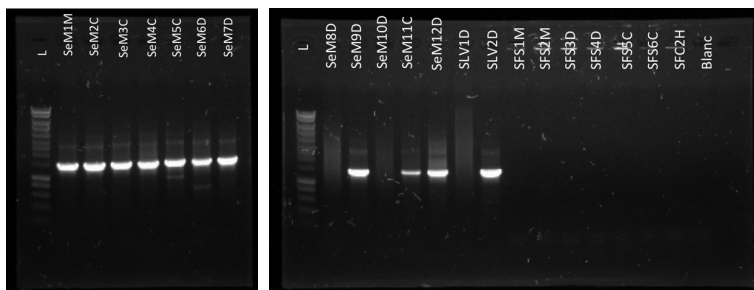
- WANG, Q., LI, W., YANG, H., LIU, Y., CAO, H., DORNMAYR-PFAFFENHUEMER, M., STAN-LOTTER, H. and GUO, G. (2007) : *Halococcus qingdaonensis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a crude sea-salt sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:600-604.
- WANG, X., DU, H. and XU, Y. (2017) : Tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong- flavor liquor. *Int. J. Food Microbiol.* 244 :27-35.
- WARREN, J.K. (2016) : Evaporites. A Geological compendium. Second edition.
- WIJAYA, C.H., WIJAYA, W. and MEHTA, B.M. (2015) : General properties of major food components. In: Cheung P., Mehta B. (eds) *Handbook of Food Chemistry*.
- WINTERS, Y.D., LOWENSTEIN, T.K. and TIMOFEEFF, M.N. (2015) : Starvation-Survival in Haloarchaea. *Life* 5 :1587-1609.
- WITZANY, G. (2017) : Biocommunication of Archaea. Springer International Publishing AG 2017
- WOESE, C. R. (1987) : Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51 :221-271.
- WOESE, C.R., MAGRUM, L.J. and FOX, G.E. (1978) : Archeabacteria. *J. Mol. Evol.* 11 :245-252.
- WOESE, C.R. and FOX, G.E. (1977) : Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74 :5088-5090.
- WOESE, C.R., GUTELL, R., GUPTA, R. and NOLLER, H.F. (1983) : Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 621-699.
- WOESE, C.R., KANDLER, O. and WHEELIS, M.L. (1990) : Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :4576-4579.
- YAMAUCHI, Y., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M., DOUKYU, N., INOUE, A. and USAMI, R. (2013a) : *Halarchaeum rubridurum* sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial sea salt samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:3143-3147.
- YAMAUCHI, Y., MINEGISHI, H., ECHIGO, A., SHIMANE, Y., SHIMOSHIGE, H., KAMEKURA, M., ITOH, T., OHKUMA, M., DOUKYU, N., INOUE, A. and USAMI, R. (2013b) : *Halarchaeum salinum* sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial sea salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:1138-1142.
- YACHAI, M., TANASUPAWAT, S., ITOH, T., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W. and VALYASEVI, R. (2008) : *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (*pla-ra*) in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2136-2140.
- YIM, K.J., CHA, I.-T., LEE, H.-W., SONG, H.S., KIM, K.-N., LEE, S.J., NAM, Y.D., HYUN, D.W., BAE, J.W., RHEE, S.K., SEO, M.J., CHOI, J.S., CHOI, H.J., ROH, S.W. and KIM, D. (2014) : *Halonubrum halophilum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt-fermented seafood. *Antonie van Leeuwenhoek* 105 :603-612.
- YOON, J.H., KANG, K.H. and PARK, Y.H. (2003a) : *Psychrobacter jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 :449-454.
- YU, I.D.A.K. and KAWAMURA, F. (1987) : *Halomethanococcus doii* gen. nov., sp. nov.: an obligately halophilic methanogenic bacterium from solar salt ponds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33 :303-310.
- ZAIKOVA, E., BENISON, K.C., MORMILE, M.R. and JOHNSON, S.S. (2018) : Microbial communities and their predicted metabolic functions in a desiccating acid salt lake. *Extremophiles*. 22:367-379.
- ZAREMBA-NIEDZWIEDZKA, K., CACERES, E.F., SAW, J.H., BÄCKSTRÖM, D., JUZOKAITE, L., VANCAESTER, E., SEITZ, K.W., ANANTHARAMAN, K., STARNAWSKI, P., KJELDSEN, K.U., STOTT, M.B., NUNOURA, T., BANFIELD, J.F., SCHRAMM, A., BAKER, B.J., SPANG, A. and ETTEMA, T.J. (2017) : Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 541 :353-358.
- ZEIKUS, J.G. (1977) : The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41 :514-541.
- ZELLNER, G., VOGEL, P., KNEIFEL, H. and WINTER, J. (1987) : Anaerobic digestion of whey and whey permeate with suspended and immobilized complex and defined consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 : 306-314.
- ZHANG, W.-Y., HUO, Y.-Y., ZHANG, X.-Q., ZHU, X.-F. and WU, M. (2013) : *Halolamina salifodinae* sp. nov. and *Halolamina salina* sp. nov., two extremely halophilic archaea isolated from a salt mine. *Int. J. Food Microbiol.* 63 :4380-4385.
- ZHILINA, T.N. (1983) : A new obligate halophilic, methane-producing bacterium. *Microbiol.* 52:375-382.
- ZHILINA, T.N. and ZAVARZIN, G.A. (1987) : *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp. The extremely halophilic methanogenic Archaeobacterium. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 293 :464-468.
- ZHILINA, T.N., ZAVARZINA, D.G., KEVBRIN, V.V. and KOLGANOVA, T.V. (2013) : *Methanocalculus natronophilus* sp. nov., a new alkaliphilic hydrogenotrophic methanogenic archaeon from a soda lake, and proposal of the new family *Methanocalculaceae*. *Microbiol.* 82:686-694
- ZHOU, X., MEILE, L., KREUZER, M. and ZEITZ, J.O. (2013) : The effect of saturated fatty acids on methanogenesis and cell viability of *Methanobrevibacter ruminantium*. *Archaea* 2013 :06916.
- ZHOU, H., ZHANG, R., HU, P., ZENG, W., XIE, Y., WU, C. and QIU, G. (2008). Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite. *J. Appl. Microbiol.* 105:591-601.
- ZUCKERKANDL, E. and PAULING, L. (1965) : Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theoret. Biol.* 8 :357-366.

Annexes

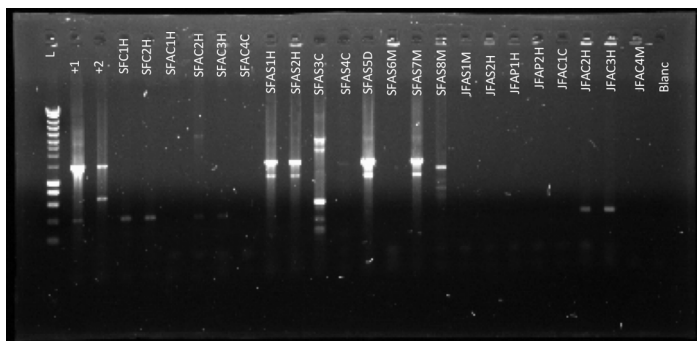
Annexe 1 : Gels d'électrophorèse

Amorces archéennes 20F et 1540R

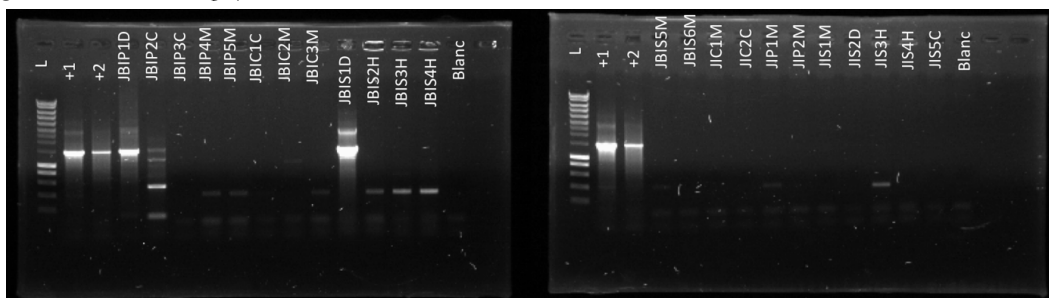
1) Gels d'électrophorèse pour le Sel de Maras (SeM), Sel de lave-vaisselle (SLV) (hors étude) et le Saucisson Fuetec « ElPozo » (SF) :



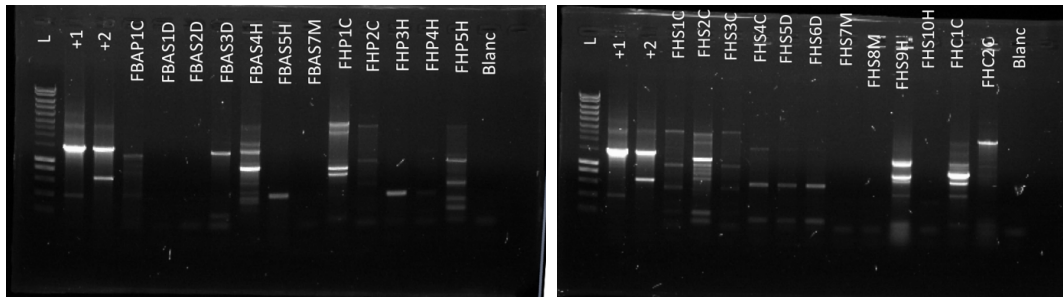
2) Gels d'électrophorèse pour le Saucisson Fuetec « El Pozo » (SF), le Saucisson « Fumet des Ardennes » SFA et le Jambon Cobourg « Fumet des Ardennes » (JFA) :



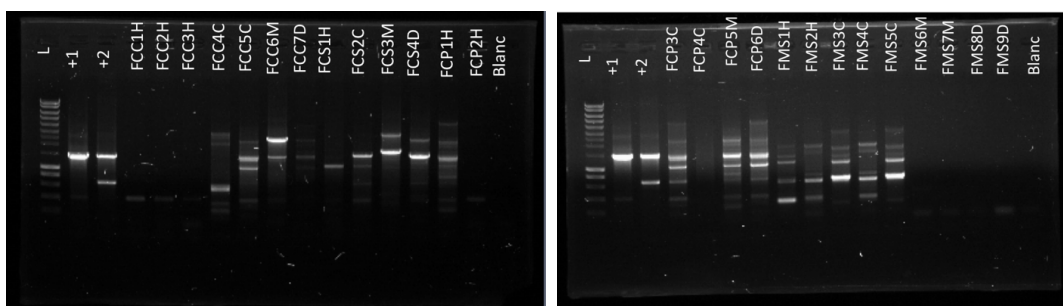
3) Gels d'électrophorèse pour le Jambon Cœur d'Ardenne « Boucherie istace » (JBI) et le Jambon Italien (JI) :



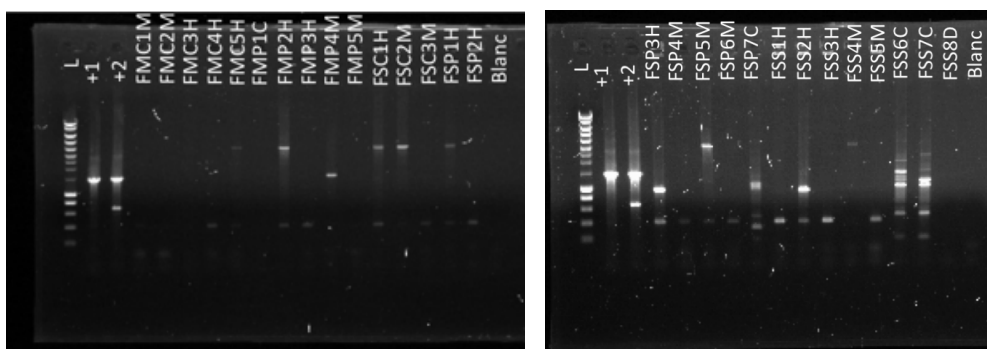
4) Gels d'électrophorèse pour le Fromage de brebis de la Bergerie d'Acremont (FBA) et le Fromage de Herve (FH) :



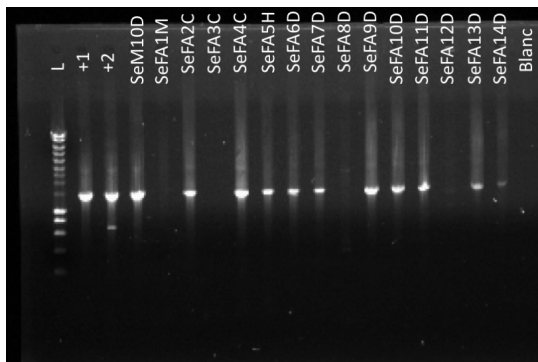
5) Gels d'électrophorèse pour le Fromage de Chimay (FC) et le Fromage Morbier (FM) :



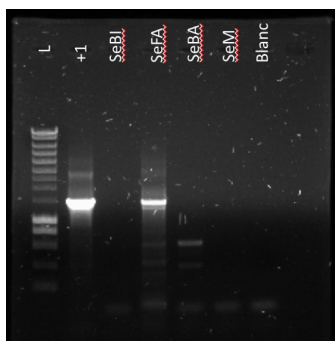
6) Gels d'électrophorèse pour le Fromage Morbier (FM) et le Fromage Sarté (FS) :



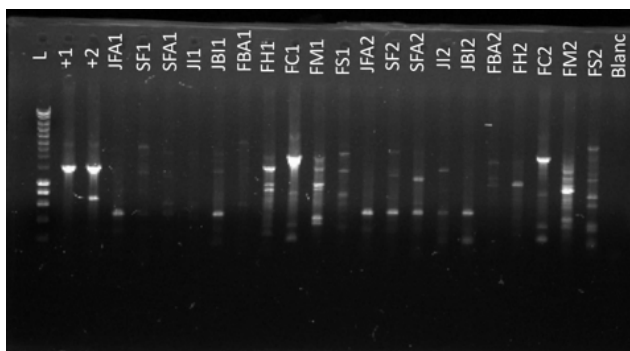
7) Gels d'électrophorèse pour le Sel de salage du « Fumet des Ardennes » (SeFA) :



8) Gels d'électrophorèse pour les extractions d'ADN à partir des sels de salage :

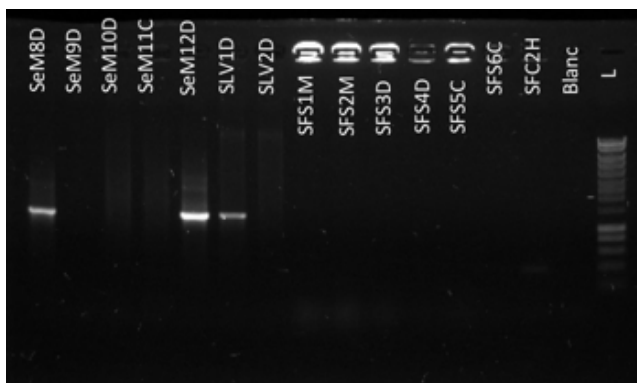
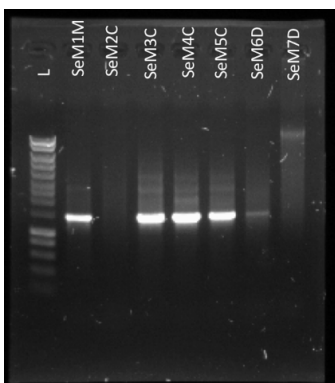


9) Gels d'électrophorèse pour les extractions d'ADN à partir des échantillons alimentaires et pour les deux kits d'extraction (1 : DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, 2 : Nucleospin® Food) :

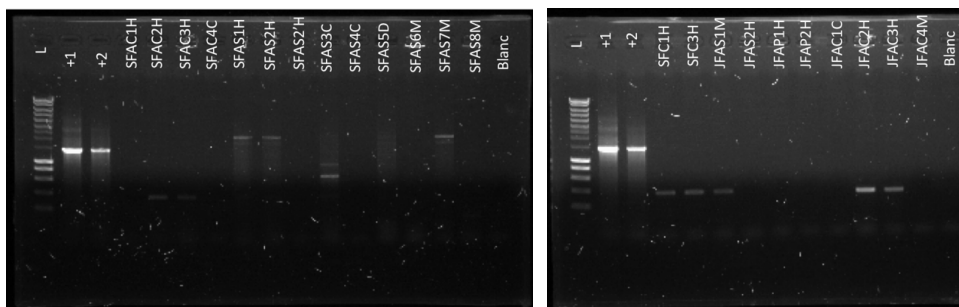


Amorces archéennes Arch20F et 1492R

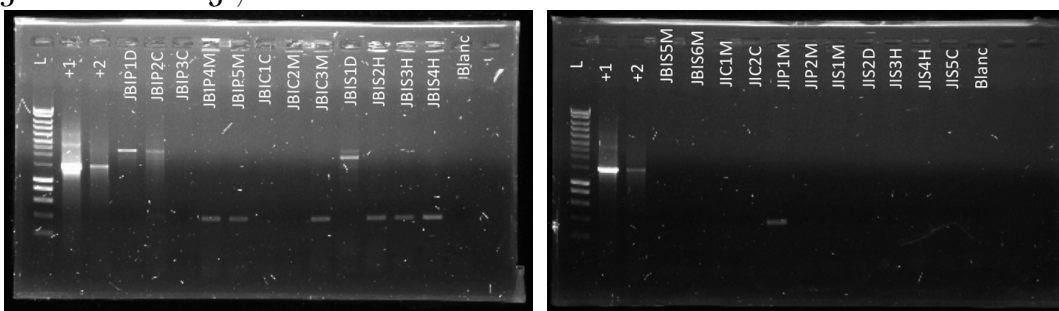
1) Gels d'électrophorèse pour le Sel de Maras (SeM), Sel de lave-vaisselle (SLV) (hors étude) et le Saucisson Fuet « El Pozo » (SF) :



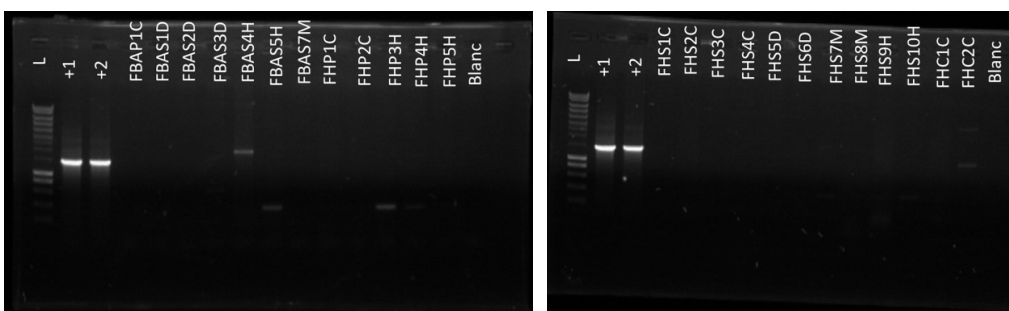
2) Gels d'électrophorèse pour le Saucisson Fuet « El Pozo » (SF), le Saucisson « Fumet des Ardennes » SFA et le Jambon Cobourg « Fumet des Ardennes » (JFA) :



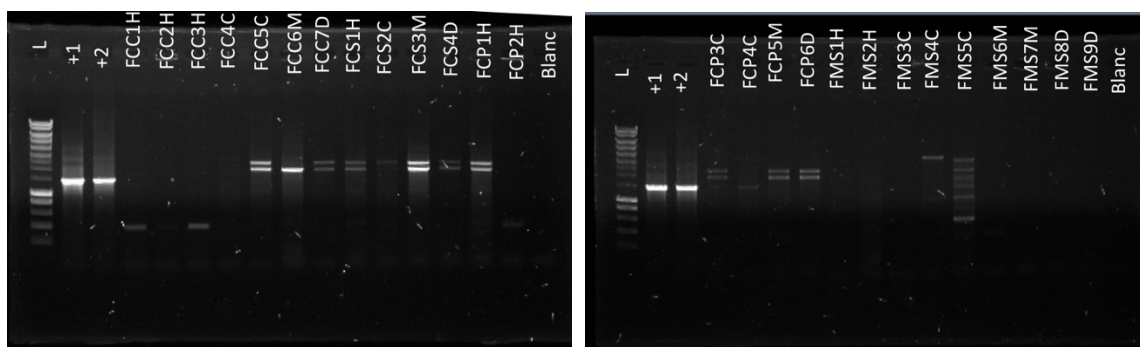
3) Gels d'électrophorèse pour le Jambon Cœur d'Ardenne « Boucherie istace » (JBI) et le Jambon Italien (JI) :



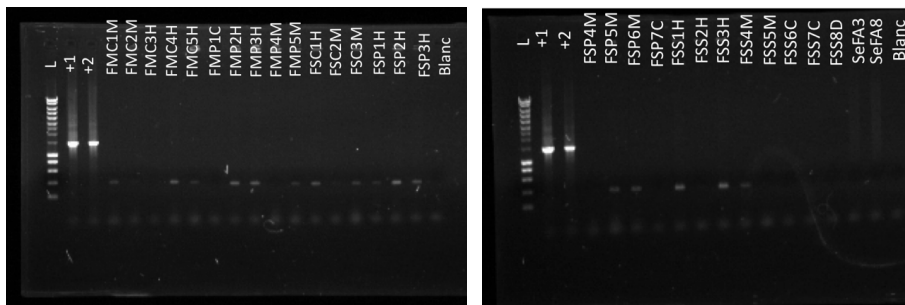
4) Gels d'électrophorèse pour le Fromage de brebis de la Bergerie d'Acremont (FBA) et le Fromage de Herve (FH) :



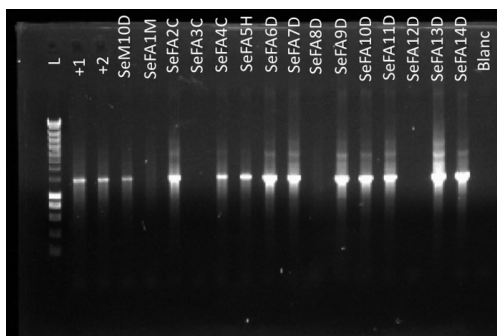
5) Gels d'électrophorèse pour le Fromage de Chimay (FC) et le Fromage Morbier (FM) :



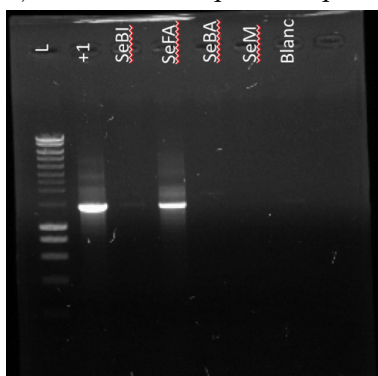
6) Gels d'électrophorèse pour le Fromage Morbier (FM) et le Fromage Sarté (FS) :



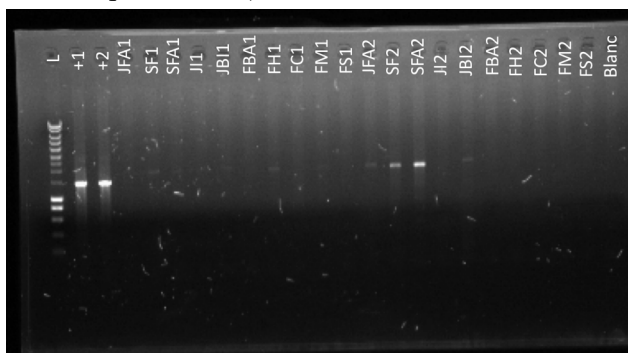
7) Gels d'électrophorèse pour le Sel de salage du « Fumet des Ardennes » (SeFA) :



8) Gels d'électrophorèse pour les extractions d'ADN à partir des sels de salage :

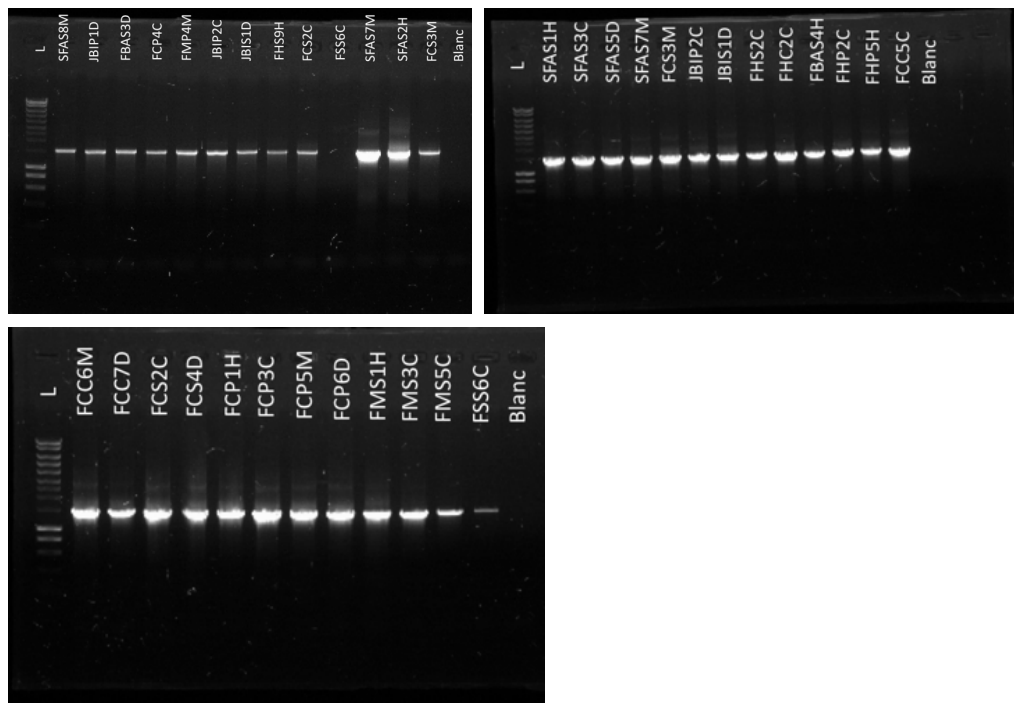


9) Gels d'électrophorèse pour les extractions d'ADN à partir des échantillons alimentaires et pour les deux kits d'extraction (1 : DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, 2 : Nucleospin® Food) :

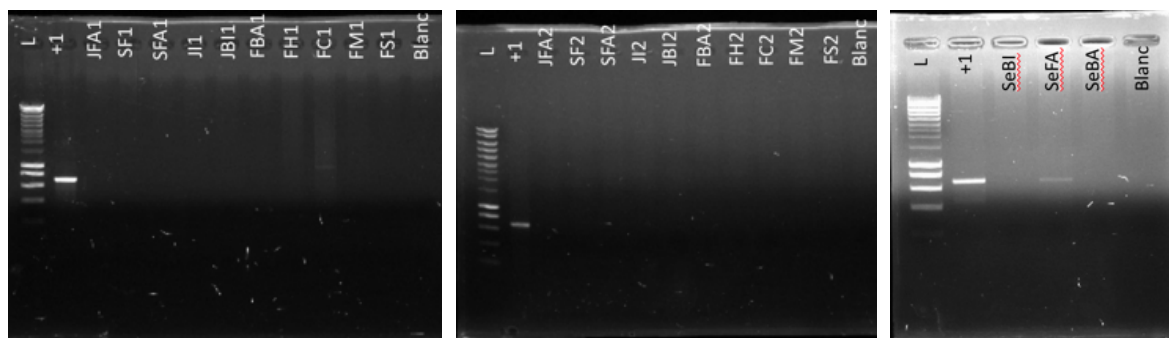


Amorces bactériennes 27F et 1492R

1) Colonies isolées



Amorces archéennes 340F et 1000R pour métagénomique



Annexe 2 : Colonies isolées

Colonies isolées à partir des sels de salage (en gris les colonies identifiées)

Source	Milieu	Abréviation
Sel de Maras		
Sel de Maras (contrôle positif)	MGM	SeM1M
Sel de Maras (contrôle positif)	CDM	SeM2C
Sel de Maras (contrôle positif)	CDM	SeM3C
Sel de Maras (contrôle positif)	CDM	SeM4C
Sel de Maras (contrôle positif)	CDM	SeM5C
Sel de Maras (contrôle positif)	DBCM2	SeM6D
Sel de Maras (contrôle positif)	DBCM2	SeM7D
Sel de Maras (contrôle positif)	DBCM2	SeM8D
Sel de Maras (contrôle positif)	DBCM2	SeM9D
Sel de Maras (contrôle positif)	DBCM2	SeM10D
Sel de Maras (contrôle positif)	CDM	SeM11C
Sel de Maras (contrôle positif)	DBCM2	SeM12D
Sel « Fumet des Ardennes »		
Sel « Fumet des Ardennes »	MGM	SeFA1M
Sel « Fumet des Ardennes »	CDM	SeFA2C
Sel « Fumet des Ardennes »	CDM	SeFA3C
Sel « Fumet des Ardennes »	CDM	SeFA4C
Sel « Fumet des Ardennes »	Hv-YPC	SeFA5H
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA6D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA7D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA8D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA9D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA10D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA11D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA12D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA13D
Sel « Fumet des Ardennes »	DBCM2	SeFA14D
Sel « Boucherie Istace »	Aucune colonie isolée	
Sel « Bergerie d'Acremont »	Aucune colonie isolée	

Colonies isolées à partir des échantillons alimentaires (en gris les colonies identifiées)

Source et endroit du prélèvement	Milieu	Abréviation
Saucisson Fuetec « Elpozo »		
Surface	MGM	SFS1M
Surface	MGM	SFS2M
Surface	DBCM2	SFS3D
Surface	DBCM2	SFS4D
Surface	CDM	SFS5C
Surface	CDM	SFS6C
Surface	Hv-YPC	SFS7H
Centre	Hv-YPC	SFC1H
Centre	Hv-YPC	SFC2H
Centre	Hv-YPC	SFC3H
Saucisson « Fumet des Ardennes »		
Surface	Hv-YPC	SFAS1H
Surface	Hv-YPC	SFAS2H
Surface	CDM	SFAS3C
Surface	CDM	SFAS4C
Surface	DBCM2	SFAS5D
Surface	MGM	SFAS6M
Surface	MGM	SFAS7M
Surface	MGM	SFAS8M
Centre	Hv-YPC	SFAC1H
Centre	Hv-YPC	SFAC2H
Centre	Hv-YPC	SFAC3H
Centre	CDM	SFAC4C
Jambon Cobourg « Fumet des Ardennes »		
Surface	MGM	JFAS1M
Surface	Hv-YPC	JFAS2H
Périphérie	Hv-YPC	JFAP1H
Périphérie	Hv-YPC	JFAP2H
Centre	CDM	JFAC1C
Centre	Hv-YPC	JFAC2H
Centre	Hv-YPC	JFAC3H
Centre	MGM	JFAC4M
Jambon Cœur d'Ardenne « Istace »		
Surface	DBCM2	JBIS1D
Surface	Hv-YPC	JBIS2H

Source et endroit du prélèvement	Milieu	Abréviation
Surface	Hv-YPC	JBIS3H
Surface	Hv-YPC	JBIS4H
Surface	MGM	JBIS5M
Surface	MGM	JBIS6M
Périphérie	DBCM2	JBIP1D
Périphérie	CDM	JBIP2C
Périphérie	CDM	JBIP3C
Périphérie	MGM	JBIP4M
Périphérie	MGM	JBIP5M
Centre	CDM	JBIC1C
Centre	MGM	JBIC2M
Centre	MGM	JBIC3M
Jambon Italien		
Surface	MGM	JIS1M
Surface	DBCM2	JIS2D
Surface	Hv-YPC	JIS3H
Surface	Hv-YPC	JIS4H
Surface	CDM	JIS5C
Périphérie	MGM	JIP1M
Périphérie	MGM	JIP2M
Centre	MGM	JIC1M
Centre	CDM	JIC2C 9
Fromage « Oeillet de Bouillon » bergerie d'Acremont		
Surface	DBCM2	FBAS1D
Surface	DBCM2	FBAS2D
Surface	DBCM2	FBAS3D
Surface	Hv-YPC	FBAS4H
Surface	Hv-YPC	FBAS5H
Surface	CDM	FBAS6C
Surface	MGM	FBAS7M
Périphérie	CDM	FBAP1C
Fromage de Herve		
Surface	CDM	FHS1C
Surface	CDM	FHS2C
Surface	CDM	FHS3C
Surface	CDM	FHS4C
Surface	DBCM2	FHS5D
Surface	DBCM2	FHS6D
Surface	MGM	FHS7M
Surface	MGM	FHS8M

Source et endroit du prélèvement	Milieu	Abréviation
Surface	Hv-YPC	FHS9H
Surface	Hv-YPC	FHS10H
Périphérie	CDM	FHP1C
Périphérie	CDM	FHP2C
Périphérie	Hv-YPC	FHP3H
Périphérie	Hv-YPC	FHP4H
Périphérie	Hv-YPC	FHP5H
Centre	CDM	FHC1C
Centre	CDM	FHC2C
Centre	Hv-YPC	FHC3H
Fromage de Chimay		
Surface	Hv-YPC	FCS1H
Surface	CDM	FCS2C
Surface	MGM	FCS3M
Surface	DBCM2	FCS4D
Périphérie	Hv-YPC	FCP1H
Périphérie	Hv-YPC	FCP2H
Périphérie	CDM	FCP3C
Périphérie	CDM	FCP4C
Périphérie	MGM	FCP5M
Périphérie	DBCM2	FCP6D
Centre	Hv-YPC	FCC1H
Centre	Hv-YPC	FCC2H
Centre	Hv-YPC	FCC3H
Centre	CDM	FCC4C
Centre	CDM	FCC5C
Centre	MGM	FCC6M
Centre	DBCM2	FCC7D
Fromage Morbier		
Surface	Hv-YPC	FMS1H
Surface	Hv-YPC	FMS2H
Surface	CDM	FMS3C
Surface	CDM	FMS4C
Surface	CDM	FMS5C
Surface	MGM	FMS6M
Surface	MGM	FMS7M
Surface	DBCM2	FMS8D
Surface	DBCM2	FMS9D
Périphérie	CDM	FMP1C
Périphérie	Hv-YPC	FMP2H

Source et endroit du prélèvement	Milieu	Abréviation
Périphérie	Hv-YPC	FMP3H
Périphérie	MGM	FMP4M
Périphérie	MGM	FMP5M
Centre	MGM	FMC1M
Centre	MGM	FMC2M
Centre	Hv-YPC	FMC3H
Centre	Hv-YPC	FMC4H
Centre	Hv-YPC	FMC5H
Fromage le Sarté		
Surface	Hv-YPC	FSS1H
Surface	Hv-YPC	FSS2H
Surface	Hv-YPC	FSS3H
Surface	MGM	FSS4M
Surface	MGM	FSS5M
Surface	CDM	FSS6C
Surface	CDM	FSS7C
Surface	DBCM2	FSS8D
Périphérie	Hv-YPC	FSP1H
Périphérie	Hv-YPC	FSP2H
Périphérie	Hv-YPC	FSP3H
Périphérie	MGM	FSP4M
Périphérie	MGM	FSP5M
Périphérie	MGM	FSP6M
Périphérie	CDM	FSP7C
Centre	Hv-YPC	FSC1H
Centre	MGM	FSC2M
Centre	MGM	FSC3M

Étude de la diversité archéenne dans les salaisons, les fromages et les aliments à saumure

Présenté par Anthony Bernard

Résumé Suite à leur découverte dans les années 1950, de nombreuses archées ont depuis été isolées et il est désormais connu qu'elles représentent une part considérable de la biomasse microbienne terrestre. Elles sont répandues dans de nombreux écosystèmes et beaucoup sont capables de croître dans conditions extrêmes de température, pH, pression ou salinité. Les environnements extrêmement salés ont de ce fait montré une importante variété de genres et espèces d'archées halophiles. Une précédente étude du laboratoire a, en outre, dénombré une forte charge en archées dans certains sels alimentaires. Au-delà de son action antimicrobienne, le salage apporterait donc une nouvelle flore sur l'aliment.

L'objectif de ce mémoire a donc été d'étudier la diversité en archées dans différentes matrices alimentaires salées et ce, au travers d'une approche culture-dépendante sur milieux spécifiques et d'une approche culture-indépendante par métagénomique.

La première approche culture-dépendante a permis d'isoler et d'identifier 22 colonies d'archées halophiles au départ de gros sels alimentaires. Aucune archée n'a en revanche été trouvée parmi 133 colonies isolées des différentes matrices alimentaires. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce résultat. Les méthodes de fabrication ainsi que la méthode de salage pourraient avoir un impact sur leur survie. De plus, les conditions de culture utilisées pourraient aussi être trop sélectives et ne pas permettre la croissance de toutes les archées halophiles. Néanmoins, 32 isolats bactériens halophiles et halotolérants ont été identifiés parmi les 133 colonies isolées des différentes matrices. Une telle flore peut donc effectivement survivre au sein de ces dernières et certaines souches proviendraient notamment du sel de salage. Nombre de ces bactéries ont en plus déjà été isolées de plats asiatiques fortement salés dans lesquels certaines archées ont été découvertes. Les conditions au sein des matrices salées sont donc potentiellement adéquates pour la croissance des archées. La deuxième approche culture-indépendante n'a pas permis de mettre en avant de l'ADN d'archées au sein des matrices alimentaires. Ce résultat est expliqué en partie par la faible qualité et quantité de l'ADN collecté lors des extractions. Le choix des kits d'extraction et des amorces doit être revu suite à la grande variabilité des résultats.

Suite aux différents résultats obtenus, et malgré le fait qu'aucune n'ait été retrouvée, tout porte à croire que la présence d'archées au sein de certaines matrices alimentaires salées reste fortement probable. Et ceci relance donc la question de leur destinée et leur impact dans le système digestif qui n'est, à l'heure actuelle, pas encore connu.